



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Estudio de las proteínas CRISP como reguladores de la fertilidad y el sistema inmune**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Lic. Ludmila Curci**

**Director de tesis:** Dra. Patricia Sara Cuasnicú

**Director Adjunto:** Dra. Mariana Weigel Muñoz

**Consejero de estudios:** Dr. Juan Carlos Calvo

**Lugar de trabajo:** Instituto de Biología y Medicina Experimental  
(IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 12 de diciembre de 2019

## Estudio de las proteínas CRISP como reguladores de la fertilidad y el sistema inmune

Las proteínas de la familia CRISP1-4 (Cysteine-Rich Secretory Proteins) se expresan tanto en el tracto reproductor de mamíferos donde actúan como mediadores del proceso de fertilización, como en órganos de importancia inmunológica. En base a ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido investigar la relevancia de las CRISP como reguladores tanto de la fertilidad como del sistema inmune a través del empleo de animales simples y múltiples knockout (KO) para las CRISP.

Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio indicando que la proteína CRISP1 exhibe la capacidad de inhibir a CatSper, el principal canal de calcio del espermatozoide esencial para la fertilidad masculina, como primer objetivo nos planteamos continuar investigando la actividad de CRISP1 como regulador de CatSper y explorar su posible empleo para el desarrollo de un método anticonceptivo masculino. Los resultados revelaron que la exposición de espermatozoides a HC-056456 (HC), un compuesto que inhibe la actividad de CatSper tal como CRISP1, fue capaz de inhibir la capacidad fertilizante de los espermatozoides tanto *in vitro* como *in vivo*, apoyando la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo masculino basado en la actividad inhibitoria de CRISP1 sobre CatSper.

La normal fertilidad de los machos simples KO para las proteínas CRISP1, CRISP2 y CRISP4 generados en nuestro laboratorio, junto a la observada subfertilidad de los machos carentes de dos proteínas CRISP (CRISP1 y CRISP4) simultáneamente, apoyan la existencia de mecanismos de compensación entre los diferentes miembros de la familia CRISP. En base a ello, y considerando la no disponibilidad del ratón simple KO para la proteína CRISP3, el segundo objetivo de esta Tesis consistió en el desarrollo y caracterización tanto del animal simple KO para CRISP3 como de animales múltiples KO para diferentes CRISP a través del empleo de la técnica CRISPR/Cas9. Los resultados revelaron que la presencia de la mutación en el gen *Crisp3* afectó la expresión de CRISP1, llevando a la generación de un animal doble KO (DKO) para CRISP1 y CRISP3. La caracterización de estos animales a nivel reproductivo mostró una bajada significativa de la fertilidad tanto en los machos como en las hembras, representando ésta la primera evidencia de la relevancia de las CRISP para la fertilidad femenina. Más aun, observamos que la subfertilidad de esta colonia se debería,

principalmente, a defectos en el desarrollo temprano de los embriones, revelando por primera vez el rol de las CRISP en eventos posteriores a la fertilización. Los animales carentes de más de dos proteínas CRISP simultáneamente se generaron empleando una construcción capaz de interferir con los genes *Crisp1* y *Crisp3* en animales fértiles DKO CRISP2/CRISP4 disponibles en el laboratorio. El estudio de la fertilidad de los animales triples (TKO) y cuádruples (CKO) KO generados reveló que los machos eran prácticamente infértiles a juzgar por un promedio de crías por camada inferior a 1. El análisis de los mecanismos subyacentes a este fenotipo reveló defectos en la migración por el tracto femenino y capacidad fertilizante de los espermatozoides como así también en el desarrollo embrionario temprano, indicando que la severa bajada de la fertilidad sería la resultante de una combinación de defectos a diferentes niveles.

Finalmente, en base a observaciones previas de nuestro grupo indicando la presencia de CRISP1 y CRISP3 en células dendríticas (CD), investigamos el posible rol inmunoregulador de las CRISP utilizando animales simples y DKO para estas proteínas. Los resultados mostraron que la ausencia de CRISP1 y CRISP3 modificó la expresión de citoquinas de las CD y produjo un aumento en el porcentaje de Linfocitos T regulatorios en un co-cultivo de ambas células, favoreciendo una respuesta inmune de perfil tolerogénico. Consistente con ello, la inyección de células tumorales MA-10 en los animales simple KO y DKO condujo a un mayor crecimiento tumoral *in vivo* comparado con los controles, apoyando el rol de las CRISP en la regulación del sistema inmune.

En conjunto, consideramos que estos resultados contribuirán a una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de la fertilidad y del sistema inmune, abriendo la posibilidad de que las CRISP sean empleadas en el futuro como agentes diagnósticos y/o targets terapéuticos.

**Palabras clave:** Fertilidad, fertilización, espermatozoide, CRISP, *knockout*, células dendríticas.

## **Study of CRISP proteins as regulators of fertility and the immune system**

The Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP1-4) are mainly expressed in the mammalian male reproductive tract where they act as mediators of the fertilization process as well as in organs of immunological importance. Based on this, the main aim of this Thesis has been to study the relevance of CRISP as possible regulators of fertility and the immune system through the use of simple and multiple knockout (KO) animals for these proteins. Based on previous results from our laboratory indicating that mouse CRISP1 protein exhibits the ability to inhibit CatSper, the main sperm calcium channel essential for male fertility, the first aim was to continue studying the role of CRISP1 as a CatSper regulator and to explore the possibility of its use for male contraceptive development. Results revealed that exposure of sperm to HC-056456 (HC), a drug that inhibits CatSper activity as CRISP1, was capable of inhibiting the sperm fertilizing ability *in vitro* as well as *in vivo*, supporting the possibility of developing a male contraceptive method based on the inhibitory activity of CRISP1 on CatSper channel.

The normal fertility of single KO males for CRISP1, CRISP2 and CRISP4 generated by our group together with the subfertility observed in males lacking two CRISP proteins (CRISP1 and CRISP4) simultaneously, supports the existence of compensatory mechanisms among different CRISP family members. Based on this, and considering the unavailability of the single KO animal for CRISP3, the second objective of this work has been the generation and characterization of the single KO for CRISP3 as well as of multiple KO for different CRISP using the CRISPR/Cas9 technique. Results revealed that the mutation in *Crisp3* affected the expression of CRISP1, leading to the generation of a double KO animal (DKO) for CRISP1 and CRISP3. The reproductive characterization of these DKO mice showed a significant decrease in fertility of both males and females, representing the first evidence of the relevance of CRISP proteins for female fertility. Moreover, we observed that the subfertility of this colony could be mainly due to defects in early embryo development, revealing for the first time the role of CRISP proteins in post-fertilization events. The animals lacking more than two CRISP simultaneously were generated through the introduction of a construct capable of interfering with *Crisp1* and *Crisp3* genes in fertile DKO CRISP2/CRISP4 animals already available in our laboratory. Evaluation of fertility of the generated triple (TKO) and quadruple (QKO) KO mice

revealed that the males were almost infertile as judged by an average litter size of less than one. Analysis of the mechanisms underlying this phenotype revealed severe defects in sperm migration through the female tract and sperm fertilizing ability as well as on early embryonic development, indicating that the severe decrease in male fertility would be the result of a combination of defects at different levels.

Finally, based on previous observations of our group indicating the presence of CRISP1 and CRISP3 in dendritic cells (CD), we investigated the possible immunoregulatory role of CRISP using both single KO and DKO mice for these proteins. Results revealed that the absence of CRISP1 and CRISP3 modified the cytokine expression profile of the CD and produced an increase in the percentage of regulatory T lymphocytes in a co-culture of both cells, favoring a tolerogenic type immune response. Consistent with this, injection of MA-10 tumor cells in KO and DKO animals led to a greater *in vivo* tumor growth compared to controls, supporting the role of CRISP as regulators of the immune system.

Altogether, we believe these results will contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the regulation of fertility and the immune system, opening the possibility of using CRISP in the future as diagnostic agents and / or therapeutic targets.

**Key words: Fertility, fertilization, sperm, CRISP, knockout, dendritic cells.**

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis doctoral no solo fue el producto de 5 años de trabajo y dedicación, sino que a nivel personal también representó un sinfín de experiencias, personas, desafíos, emociones, pérdidas, pero sobretodo, ganancias. La misma no podría haber sido posible sin el apoyo y el aporte de muchas personas a las cuales me gustaría agradecer...

A Paty, mi directora, por haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su laboratorio. Por transmitirme su pasión por las gametas y la fertilización, por su dedicación, conocimiento y consejos durante todos estos años.

A Marian, directora adjunta de mi Tesis, por su cariño, su atención y el soporte incondicional en el día a día, en especial en esos momentos críticos que tanto abundan cuando se está pipeteando.

A todos los miembros del Lab, los que están: Deb, Vani, Marian, Mati, Mili, Lucas, Sol, Pili, y los que estuvieron durante estos 5 años: Nico B., Guille, Estefi, Tom y Nico V. Porque una de las cosas que más destaco de esta experiencia fue el grupo con el que me tocó trabajar, su compañerismo y amistad. Siempre dispuestos a dar una mano tanto en lo laboral como en lo personal.

A Juan Carlos, mi consejero de estudios, siempre predispuesto a ayudar y brindar asesoramiento, y al Comité de Seguimiento, integrado por los Dres. Juan Carlos Calvo, Pablo Cética y Claudia Perez Leiros, por sus valiosos aportes.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA) por brindar el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

A los distintos colaboradores quienes aportaron sus conocimientos y tiempo, contribuyendo de manera directa en algunos de los resultados que conforman esta Tesis. En particular, al Dr. Gabriel Rabinovich y Nicolás Pinto, cuyo aporte en el área de la inmunología fue imprescindible para los experimentos con las dendris; Al Dr. Marcelo Rubinstein y a Daniela Rojo, por la enorme ayuda con la generación de los animales knockout por

CRISPR/Cas9; a la Lic. Fernanda Raffo, por tomarse el tiempo de recuperar y procesar las células de cúmulus humano; al Dr. Alberto Darszon, por las mediciones de calcio en espermatozoides humanos; al Dr. Daniel Lombardo y Pablo Torres por la ayuda con los experimentos de motilidad realizados con el CASA.

A todos los miembros del IBYME (becarios, investigadores, bioterio, técnicos, etc.) que hacen del instituto un lugar donde da gusto trabajar y en especial al grupo de gametas, por todo lo aprendido y compartido durante los seminarios de reproducción.

A mis amigos de la facu, quienes me acompañaron desde el inicio de mi carrera profesional y se han convertido en grandes amigos y colegas.

Al Instituto Martínez Plaza y mis amigas de danza, con quienes descubrí que la danza es otra de mis pasiones pero, principalmente, mi cable a tierra y la forma de volver a mi centro en los momentos más críticos.

A Griep, quien apareció inesperadamente para hacer la escritura mucho más llevadera y divertida. Siempre atento, generoso y, que sin querer, me ayudo a dar lo mejor de mí.

A Juli y Joha, dos amigas que la vida me puso en el momento justo para brindarme su contención, alegría y cariño.

A la manada, porque son la base, el sostén, la definición de incondicionalidad.

A toda mi familia, siempre presente desde el apoyo y el cariño. En especial, a mis hermanas mayores, Dani y Caro, porque siempre están ahí, y a Nati, mi hermana menor, todos estos años no hubiesen sido lo mismo sin ella.

A mis papás, por su amor y entrega. Porque gran parte de lo que soy hoy, es gracias a ellos.

A todos, los que estuvieron y a los que están,

GRACIAS!!

## ÍNDICE

<u>Introducción</u> .....	9
El tracto reproductor femenino .....	10
La gameta femenina.....	11
El tracto reproductor masculino .....	17
La gameta masculina.....	18
Maduración epididimaria .....	24
Eyacuación y transporte .....	27
Capacitación espermática .....	31
Fertilización .....	45
Activación del ovocito y desarrollo preimplantatorio .....	54
Las proteínas CRISP y su rol en la reproducción.....	56
Las proteínas CRISP y el sistema inmune.....	71
Animales genéticamente modificados .....	73
<u>Objetivos</u> .....	76
<u>Materiales y métodos</u> .....	78
<u>Resultados</u> .....	98
Capítulo I .....	99
Capítulo II .....	122
Capítulo III .....	149
<u>Discusión</u> .....	159
Capítulo I .....	160
Capítulo II .....	169
Capítulo III .....	184
<u>Conclusión</u> .....	190
<u>Abreviaturas</u> .....	194
<u>Bibliografía</u> .....	199

# INTRODUCCIÓN

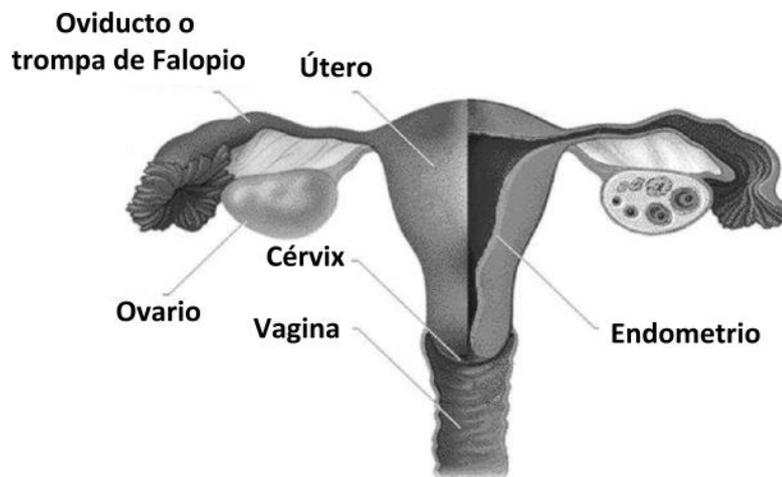
---

---

El proceso de fertilización involucra la unión de dos gametas haploides el espermatozoide (masculina) y el ovocito (femenina), para dar origen a un individuo diploide cuya composición genética es diferente a la de los padres. Este proceso es el resultado de una secuencia ordenada y precisa de eventos e interacciones celulares que aún no es del todo conocida. En este sentido, el estudio de los mecanismos subyacentes a la fertilización resulta de sumo interés ya que no solo contribuye a una mejor comprensión de la biología reproductiva sino también al desarrollo de nuevos métodos tanto de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad como de regulación de la fertilidad (Florman and Fissore 2014).

### EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

El tracto reproductor femenino está compuesto por los ovarios, los oviductos o trompas de Falopio en el humano, el útero, el cérvix y la vagina. (Figura 1).



**Figura 1** El tracto reproductor femenino.

Los ovarios son estructuras anatómicas pares adosadas a la pared posterior de la cavidad pélvica, compuestos por una zona periférica o corteza donde se encuentran las estructuras que contienen a los ovocitos, y una zona central o médula, formada básicamente por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos (Austin and Short 1972). Los ovarios están en estrecho contacto con el útero a través de los oviductos (o trompas de Falopio). La región del oviducto proximal al ovario, denominada ampulla, es el sitio donde se produce la

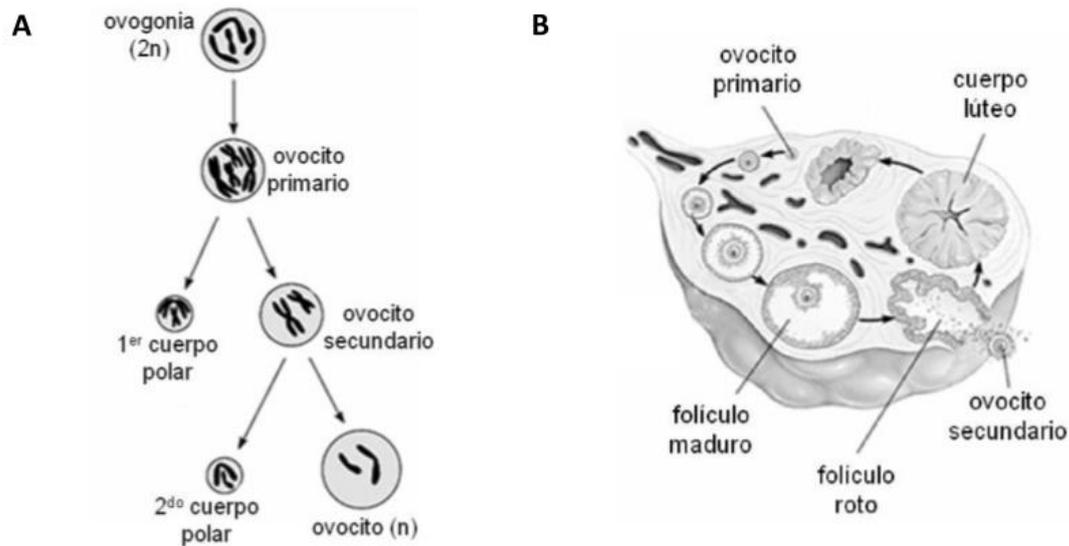
fertilización, en tanto la región media, el isthmus, actúa como reservorio de espermatozoides previo a la fertilización (Hunter 1995; Suarez and Pacey 2006). Por último, la porción distal del oviducto involucra la conexión entre el útero y oviducto y recibe el nombre de unión utero-tubárica (UTJ). La estructura de la UTJ varía entre los mamíferos pero en la mayoría de los casos la misma suele ser muy estrecha, siendo uno de los obstáculos a los cuales se enfrentan los espermatozoides durante el transporte dentro del tracto reproductor femenino. (Fujihara, Miyata, and Ikawa 2018; Suarez 2014)

El útero se extiende desde el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal, conectándose a la vagina por el cérvix. A diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, el útero es una estructura única en primates, y bicornes en la mayoría de los mamíferos. En el caso murino, si bien los cuernos uterinos parecen estar unidos, se mantienen separados por un septo medio y cada uno de ellos desemboca, por su respectivo conducto cervical, en el extremo superior de la vagina. Histológicamente, las paredes del útero están compuestas por tres capas de tejido diferentes: la externa o serosa, la media muscular o miometrio y la mucosa interna o endometrio (Ham et al. 1970). Si bien su función principal es alojar y favorecer el desarrollo del embrión, se ha demostrado que, además, las suaves contracciones musculares de este órgano, causadas por la estimulación nerviosa del apareamiento, permiten que los espermatozoides sean impulsados hacia adelante, permitiendo alcanzar los segmentos superiores del oviducto dentro de los primeros minutos siguientes al apareamiento.

## **LA GAMETA FEMENINA**

Los ovocitos se originan a partir de un escaso número de células pluripotenciales de origen extragonadal, las cuales son re-localizadas a la gónada primitiva durante los primeros estadios de la embriogénesis (Austin and Short 1972; Freeman 2003). Una vez diferenciado el ovario, las células germinales primordiales comienzan a desarrollarse para, finalmente, en la vida adulta, originar los ovocitos (Wassarman 1988a). La ovogénesis, representada en la Figura 2, comienza con la división de las células germinales por mitosis, las cuales pasan a denominarse ovogonias. Posteriormente, durante el desarrollo embrionario, estas células comienzan a sintetizar ADN en preparación para la meiosis, perdiendo su pluripotencialidad

y denominándose ovocitos primarios. Al nacimiento, las hembras poseen un número finito de ovocitos, los cuales permanecen arrestados en Profase I de la meiosis hasta la pubertad, momento en el cual se produce el crecimiento de los ovocitos en forma coordinada con células de origen somático, en estructuras celulares llamadas folículos. Durante el período periovulatorio, un ovocito reanuda la meiosis estimulada por la acción de hormonas, experimentando la primera división reductiva. Esta división desigual del citoplasma de la gameta femenina provoca que, mientras una de las células hijas, el ovocito, recibe la mayor parte del citoplasma y es capaz de originar un embrión, la otra, el corpúsculo polar, recibe una cantidad mínima, y está destinada a la apoptosis. En cada ciclo menstrual o estral, un cierto número de ovocitos, dependiente de la especie, es capaz de alcanzar el estadio en que son ovulados. En el momento de la ovulación, el ovocito secundario, que se encuentra en folículos maduros, preovulatorios o de Graaf, junto con el primer cuerpo polar y algunas células de soporte, es expulsado del ovario hacia el oviducto donde es retenido. En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en el estadio de Metafase II, con el primer corpúsculo polar emitido. Finalmente, la meiosis continúa solamente después de la entrada del espermatozoide al ovocito, resultando en la extrusión del segundo corpúsculo polar. Si por el contrario no ocurre la fertilización, el ovocito secundario se degenera sin haber completado la meiosis. De esta manera, la meiosis femenina se inicia en la etapa fetal, se prolonga hasta la edad madura de la hembra y, sólo se completa durante el proceso de fertilización.

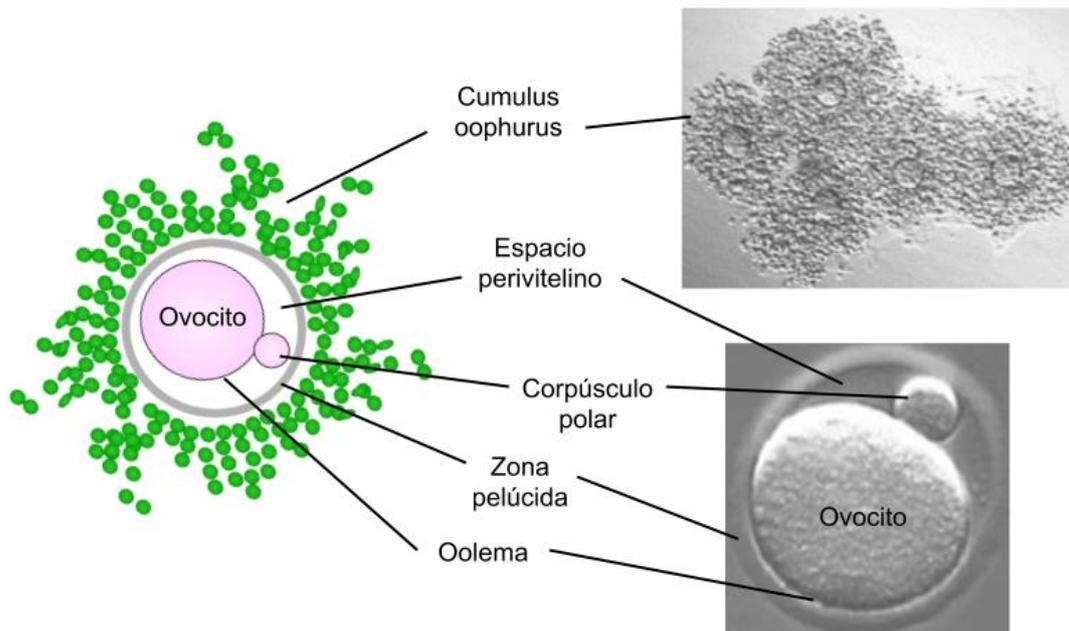


**Figura 2 La ovogénesis y la ovulación.** **A.** Diagrama resumiendo las etapas de la meiosis femenina. **B.** Esquema de un corte transversal de un ovario resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis y ovulación.

El ovocito ovulado en los mamíferos euterianos es una célula esférica, de diámetro variable según la especie (70-120  $\mu\text{m}$ ), rodeada de una matriz extracelular denominada zona pelúcida (ZP) y varias capas de células de la granulosa que reciben el nombre de cúmulus oophorus. Al conjunto del ovocito, la ZP, las células del cúmulus y la matriz extracelular se la denomina complejo cúmulos-ovocito (COC) (Figura 3). Entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito, se encuentra el espacio perivitelino conformado por una matriz extracelular sintetizada principalmente por el ovocito pero con el agregado de fluido y moléculas provenientes de las células que lo rodean (Talbot and Dandekar 2003).

Una característica particular de la membrana plasmática del ovocito, también denominada oolema, radica en la presencia de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área que coincide con la región que recubre al huso meiótico, y a través de la cual, raramente ocurre la fusión del espermatozoide (Matsudaira 1990; O’Rand, Welch, and Fisher 1986; Shalgi and Phillips 1980). Al igual que en otras células, dentro del citoplasma u ooplasma se encuentran las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, organelas importantes para los diferentes procesos metabólicos que debe cumplir el ovocito. En la región cortical del ovocito maduro, por debajo del oolema se

encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana (Ducibella 1996). La aparición de dichos gránulos se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito (Ducibella, Duffy, and Buetow 1994). Los gránulos corticales resultan importantes para el desarrollo de un embrión viable ya que su fusión con el oolema luego de la fertilización, evento conocido como reacción cortical, aseguraría la entrada de un único espermatozoide dentro del ovocito (Yanagimachi 1994).



**Figura 3 La gameta femenina.** Esquema representando un complejo cúmulus-ovocito y sus componentes.

La ZP es una matriz glicoproteica cuyos componentes, sintetizados por el ovocito (Wassarman 1988b), se depositan alrededor del mismo durante su crecimiento (Philpott, Ringuette, and Dean 1987; Roller et al. 1989). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúan en contacto con el ovocito a través de uniones estrechas de tipo gap entre extensiones de las células del cúmulus y el oolema (Austin and Short 1972; Florman and Fissore 2014), las cuales tendrían importancia en el mantenimiento de las funciones nutricionales y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito. La ZP está compuesta, principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias según la especie (Lefièvre et al. 2004; Wassarman 1988b). Gran parte de la información sobre la naturaleza bioquímica, estructura, y función de la ZP provienen de los laboratorios de los

Drs. Paul Wassarman y Jurrien Dean quienes han utilizado al ratón como modelo para la mayoría de sus estudios (Hoodbhoy and Dean 2004; Wassarman 1988b; Wassarman and Litscher 2001). En esta especie, la ZP está compuesta por tres proteínas altamente glicosiladas: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes.

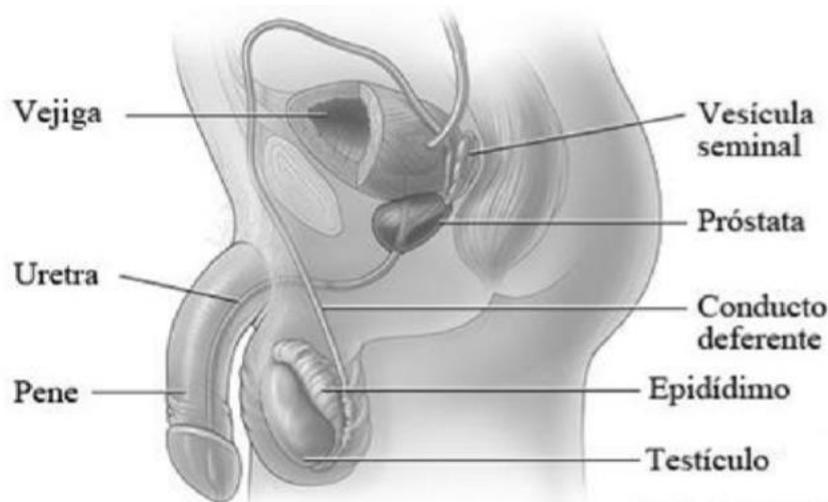
La relevancia de cada una de las proteínas de la ZP y sus funciones durante la fertilización y el desarrollo fue demostrada mediante el estudio de ratones genéticamente modificados carentes de ZP1, ZP2 o ZP3. Los ratones knockout (KO) para ZP3 presentan los defectos más drásticos ya que los ovocitos provenientes de estas hembras carecen de ZP y los animales son completamente infértiles (Rankin et al. 1996). En el caso de las hembras KO para ZP1, las mismas presentan una ZP compuesta por ZP2 y ZP3, más frágil que la normal, que no afecta la producción ni la fertilización de los ovocitos pero produce una reducción de la fertilidad del 50%, atribuida al hatching prematuro de los embriones (Rankin et al. 1999). Según estos resultados, la ZP1 sería una proteína minoritaria de la matriz, con un rol estructural no indispensable para el desarrollo del ovocito ni para la fertilización. Por último, el fenotipo de los animales KO para ZP2 fue diferente al de los dos anteriores ya que los ovocitos forman una ZP delgada (similar a la de los ratones deficientes para ZP1), que se pierde previo a la ovulación, resultando en la esterilidad de las hembras (Rankin et al. 2001). Funcionalmente, la ZP cumple un rol crítico ya que sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia, y proteger al ovocito y embrión de daños físicos, especialmente durante el clivaje tal como evitar que se separen los blastómeros, asegurando la individualidad.

Como se mencionara anteriormente, en la mayoría de los mamíferos, la ZP se encuentra rodeada por el *cumulus oophorus*, conformado por un grupo de células de la granulosa llamadas células del cúmulus, embebidas en una matriz extracelular. En el folículo ovárico, las células del cúmulus se encuentran asociadas entre sí por uniones de tipo gap. Como respuesta al pico de gonadotrofinas que precede a la ovulación, dichas células depositan abundante matriz extracelular y, en consecuencia, los COC aumentan en volumen de 20 a 40 veces respecto de su tamaño inicial. Por este motivo, se denomina a este proceso “expansión del cúmulus” (Zhuo and Kimata 2001). Originalmente, el ácido hialurónico era considerado el componente principal de la matriz del cúmulus (Eppig 1979). Posteriormente, se han descrito otros componentes de dicha matriz, particularmente glicosaminoglicanos y

proteínas, sintetizados por las células de la granulosa, que también serían parte importante de esta estructura (Zhuo and Kimata 2001). Además de las moléculas antes mencionadas, existen factores extrafolículos de origen plasmático importantes en la composición y estabilización de la matriz del cúmulus. Es sabido que los ovocitos euterianos son capaces de ser fertilizados desprovistos de las células del cúmulus tanto *in vitro* como *in vivo* (J Michael Bedford 2004; Yanagimachi 1994), sugiriendo que el cúmulus no sería esencial para la interacción de las gametas. No obstante, numerosos trabajos muestran el efecto beneficioso del cúmulus durante la fertilización (Chen, Russell, and Larsen 1993; Yanagimachi 1994). Se ha propuesto que existirían factores solubles en el cúmulus que estimularían tanto la motilidad de los espermatozoides como la ocurrencia de la reacción acrosomal (RA) (Roblero et al. 1990; Schroer et al. 2000). Además, se ha sugerido que el cúmulus tendría otras funciones tales como aumentar el tamaño del pequeño ovocito de modo tal de ser más fácilmente ubicado por los espermatozoides en el oviducto (Bedford and Kim 1993), guiar al espermatozoide hacia el ovocito en un proceso denominado quimiotaxis (Ernesto et al. 2015; Kaupp, Kashikar, and Weyand 2008; Yoshida and Yoshida 2011), favorecer la penetración de la ZP (Yudin, Cherr, and Katz 1988), prolongar la vida fértil del ovocito impidiendo el hardening de la ZP, seleccionar aquellos espermatozoides con mayor capacidad fertilizante (Roblero et al. 1990; Van Soom et al. 2002) y favorecer el desarrollo embrionario (Zhang et al. 1995). De esta manera, aunque no esencial para la interacción de gametas, la presencia de las células del cúmulus incrementa el éxito de la fertilización.

## EL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO

El tracto reproductor masculino está compuesto por los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes, las glándulas accesorias, como la próstata y las vesículas seminales, la uretra y el pene (Figura 4).



**Figura 4** El tracto reproductor masculino.

Los testículos son órganos pares que consisten en una serie de lóbulos que contienen en su interior los túbulos seminíferos separados por tejido intersticial. Dentro de los túbulos, no solo se encuentra la línea germinal, la cual va a dar origen a los espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis (detallada más adelante) (Austin and Short 1972) sino que contienen también las células de Sertoli. La función de estas células es crear y mantener un microambiente apropiado para el correcto desarrollo de los espermatozoides. Su forma es única ya que se apoyan en la membrana basal y llegan hasta el lumen del epitelio seminífero, extendiéndose entre las células germinales. La presencia de uniones estrechas entre las células de Sertoli permite la formación de una barrera que limita el pasaje de moléculas de gran tamaño tales como los anticuerpos, entre las células adyacentes. Esta permeabilidad reducida es parte de lo que se conoce como “barrera hemato-testicular”, y determina que las células haploides se encuentren aisladas del sistema inmune (Hedger 2014). Esto resulta relevante ya que los espermatozoides diferenciados aparecen, por primera vez en el tracto masculino, al momento de la madurez sexual, mucho después de la maduración del sistema

inmunológico y del establecimiento de los sistemas de tolerancia inmune, por lo cual, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los tejidos y órganos, los espermatozoides son particularmente susceptibles al sistema inmune. Sin embargo, la explicación tradicional del privilegio inmunológico basado únicamente en la barrera hemato-testicular no es consistente con los conceptos actuales de tolerancia inmunológica ni con la organización histológica del tracto reproductor. Estos conceptos se focalizan en la actividad inmunoregulatoria de las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos, así como también en una supresión activa de la respuesta inmune antígeno-específica mediada por células somáticas a través de la liberación de citoquinas inmunoregulatorias, esteroides androgénicos, y otros factores antiinflamatorios. En este sentido, se ha demostrado que la normal función reproductiva se encuentra íntimamente ligada al correcto desarrollo de un microambiente inmunológico. (Hedger 2014).

Una vez formados los espermatozoides en el testículo, los mismos son transportados través de los conductos eferentes hasta el epidídimo. Este órgano es un conducto único con muchas circunvoluciones que cubre el borde posterior del testículo, siendo fundamental no solo para el proceso de maduración sino también para el transporte, la protección y el almacenamiento de los espermatozoides. Tal como ocurre en los testículos, el epidídimo presenta una barrera funcional que se conoce como barrera hemato-epididimaria. Sin embargo, la misma parece ser mucho más débil en comparación con la barrera hemato-testicular ya que es bastante más frecuente observar infiltraciones de leucocitos luminales en el epidídimo así como de inmunoglobulinas que acceden al compartimento luminal en comparación con los túbulos seminíferos (Hedger 2011, 2014). Además, el epidídimo contiene numerosas células inmunes intra-epiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas (CD), que formarían un ambiente inmunotolerante particular (Hedger 2014). Convencionalmente, si bien no existen límites anatómicos definidos, el epidídimo se divide en cuatro regiones principales según su proximidad con el testículo: segmento inicial (IS, región más próxima al testículo), caput o cabeza, corpus o cuerpo (región media) y cauda o cola (región distal al testículo). Aunque los distintos segmentos están formados por los mismos tipos de células epiteliales, estos presentan diferencias en cuanto a su morfología general. Mientras más distal el segmento, más delgado es el epitelio y mayor el diámetro del

túbulo permitiendo el almacenamiento de millones de espermatozoides en el cauda epididimario hasta el momento de su eyaculación (Markey and Meyer 1992).

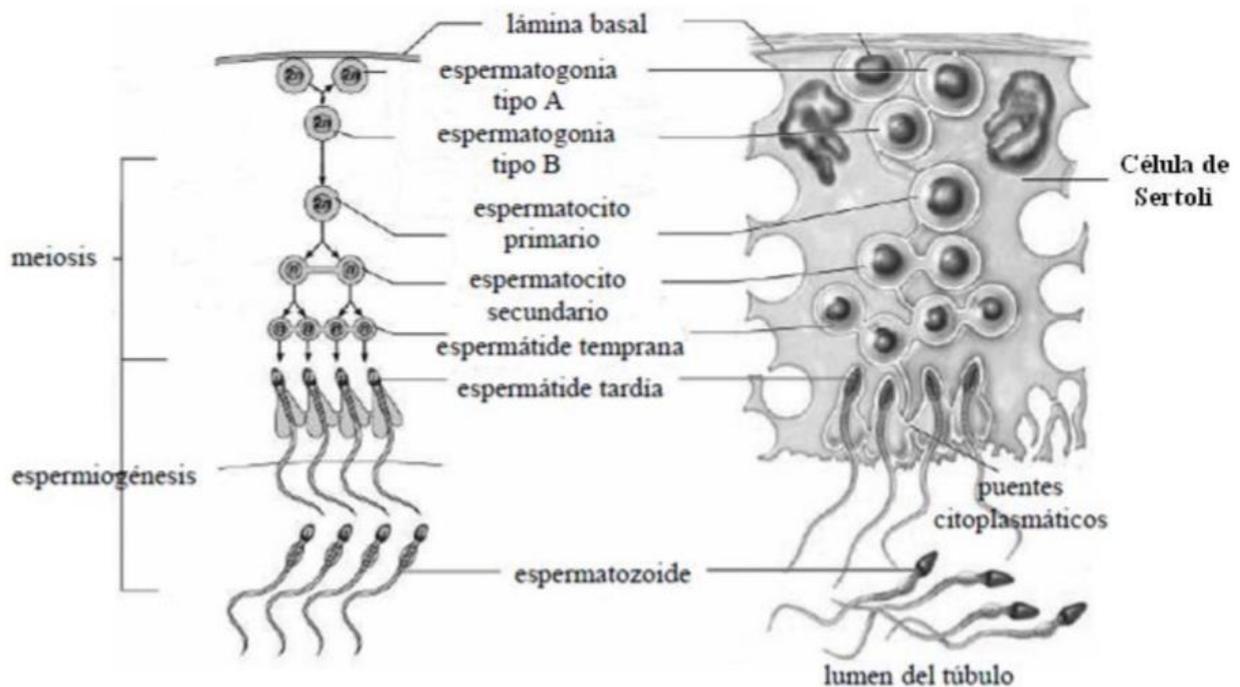
Por último, durante el proceso de eyaculación los espermatozoides entran en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y son transportados a través de los conductos deferentes o vas deferens hasta alcanzar la uretra (Eddy and O'Brien 1994) para finalmente ser depositados dentro del tracto reproductor femenino.

## **LA GAMETA MASCULINA**

Tal como fuera mencionado, el espermatozoide se produce en los testículos como consecuencia de un proceso conocido como espermatogénesis (Figura 5) (Austin and Short 1972)(Valli et al. 2014). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las células germinales (espermatogonias) durante la vida embrionaria y requiere de la división meiótica para la producción de gametas haploides. La gran diferencia con la hembra radica en que mientras que en la oogénesis todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario, en el macho, la espermatogénesis comienza recién luego de la pubertad y ocurre durante toda la vida adulta del individuo.

A partir de ese momento, una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis mientras que otras se diferencian en espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis generando espermatocitos secundarios. Los mismos entran a una interfase intermeiótica de poca duración para pasar luego a la segunda división meiótica que da origen a las células llamadas espermátides. Estas últimas son células redondas que se diferencian morfológicamente para dar origen a los espermatozoides a través de un proceso denominado espermiogénesis, caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta. Como consecuencia de la pérdida casi completa del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la expresión de proteínas, síntesis y degradación de lípidos, y transporte vesicular. Finalmente, se produce la liberación de los

espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por un proceso denominado espermiación. (Valli et al. 2014).



**Figura 5 La espermatogénesis.** A la izquierda, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis masculina y a la derecha, se esquematiza los diferentes estadios celulares presentes durante la espermatogénesis en un corte transversal de un tubo seminífero.

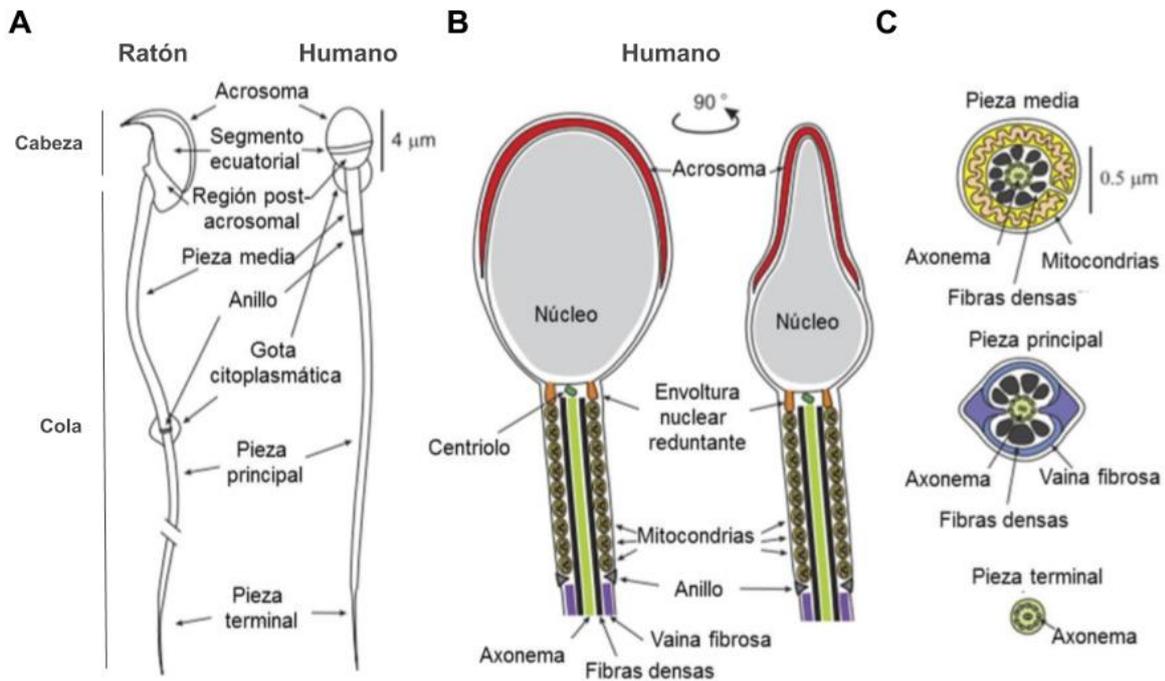
El espermatozoide (Figura 6) es una célula altamente especializada con capacidad para transportarse hasta el sitio de fertilización en el tracto femenino y fertilizar al ovocito. A pesar de que la forma y el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de mamíferos son variables, los mismos comparten una estructura general similar. Básicamente, el espermatozoide posee dos componentes morfológicos distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (Darszon et al. 2011; Toshimori and Eddy 2014). La cabeza del espermatozoide contiene dos elementos fundamentales, un núcleo compacto debido a la presencia de cromatina altamente condensada, y el acrosoma, estructura cuyos contenidos son importantes para la fertilización (Toshimori and Eddy 2014). El núcleo del espermatozoide es de un tamaño significativamente menor al del resto de los tipos celulares, debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas básicas de bajo peso molecular llamadas protaminas que permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina

que las histonas presentes en las células somáticas. El núcleo se encuentra rodeado por una envoltura nuclear bastante inusual, caracterizada por la cercanía entre las dos membranas que la conforman y la escasez de poros nucleares. (Toshimori and Eddy 2014). Por su parte, el acrosoma es una estructura membranosa que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, originada en el aparato de Golgi. La forma y el tamaño del acrosoma es variable en las diferentes especies, relacionándose generalmente a la forma de la cabeza. Si bien la membrana que rodea al acrosoma es única y continua, se ha definido como membrana acrosomal interna a aquella que envuelve a la membrana nuclear externa, y como membrana acrosomal externa a la que se encuentra por debajo de la membrana plasmática. El acrosoma, a su vez, está constituido por dos regiones denominadas capuchón acrosomal y segmento ecuatorial. En cuanto a la composición del acrosoma, el mismo contiene en su interior varias moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. Sin embargo, estudios de microscopía y extracción diferencial de proteínas han sugerido que esta organela no sería simplemente un reservorio de enzimas solubles sino que existiría una organización funcional de moléculas dada por la presencia de una matriz intra-acrosomal (Kim and Gerton 2003; Yanagimachi and Bhattacharyya 1988). Las dos enzimas mejor caracterizadas del acrosoma son acrosina, una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas, y hialuronidasa, ambas con expresión específica en las células espermatogénicas. Si bien por su estructura y contenidos, el acrosoma se ha descrito como un lisosoma especializado, esta organela tendría, además, algunas características de una vesícula de secreción ya que libera sus contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales propias durante la capacitación y externas durante la interacción del espermatozoide con el tracto femenino y el ovocito. (Toshimori and Eddy 2014).

En la cabeza del espermatozoide, se encuentran también estructuras de citoesqueleto que se distribuyen en dos regiones: el citoesqueleto sub-acrosomal o perforatorium, localizado entre el acrosoma y el núcleo, compuesto principalmente por material denso, y el citoesqueleto post-acrosomal, que se localiza entre el núcleo y la membrana plasmática de la región post-acrosomal del espermatozoide (Fouquet and Kann 1994; Toshimori and Eddy 2014). En la mayoría de los mamíferos, incluidos el hombre y gran parte de los animales domésticos, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada en la que el núcleo y

el acrosoma son estructuras simétricas, de forma aplanada en el sentido longitudinal de la célula. En otras especies, como el hámster y el cobayo, existe una protrusión del acrosoma, perpendicular al plano aplanado de la cabeza y en la mayoría de los roedores, la cabeza es falciforme, con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo (Yanagimachi 1994).

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal. El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de nueve pares de microtúbulos siguiendo la disposición característica de "9+2". Rodeando al axonema desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo, que envuelven a la cola en forma helicoidal y que cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para modular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural (Darszon et al. 2011; Toshimori and Eddy 2014).



**Figura 6. La gameta masculina.** **A** Esquema de un espermatozoide de ratón y otro de humano en el que se muestran las diferentes estructuras. **B.** Estructuras generales de la cabeza y pieza media de un espermatozoide humano visto de frente y de costado. **C.** Cortes transversales del flagelo en las diferentes secciones. (Darszon et al. 2011).

A pesar de que los espermatozoides liberados de los testículos son células altamente diferenciadas, en los mamíferos, no tienen aún la capacidad de moverse progresivamente o de interactuar con el ovocito. Para adquirir estas capacidades y llegar al sitio de fertilización en estado competente, los espermatozoides deben sufrir numerosas modificaciones post-testiculares durante su pasaje tanto por el tracto masculino como por el femenino (Florman and Fissore 2014; Yanagimachi 1994). De esta manera, los espermatozoides no solamente tienen que transportarse desde el testículo hacia el oviducto, sitio donde ocurre la fertilización, sino también sufrir una serie de cambios que se describirán a continuación.

## MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

En los mamíferos, los espermatozoides que salen del testículo aún no poseen motilidad progresiva ni la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito. Estas capacidades las adquieren durante su pasaje por el epidídimo, en un proceso conocido como maduración epididimaria (Robaire and Hinton 2014). Los espermatozoides se encuentran a medida que transitan por el epidídimo con un microambiente altamente especializado y específico de cada segmento del órgano, el cual es generado mediante la secreción y absorción activa de agua, iones, solutos orgánicos y proteínas, así como también por la barrera hemato-epididimaria.

Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies, la gran mayoría de los espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar al cauda epididimario (Yanagimachi 1994).

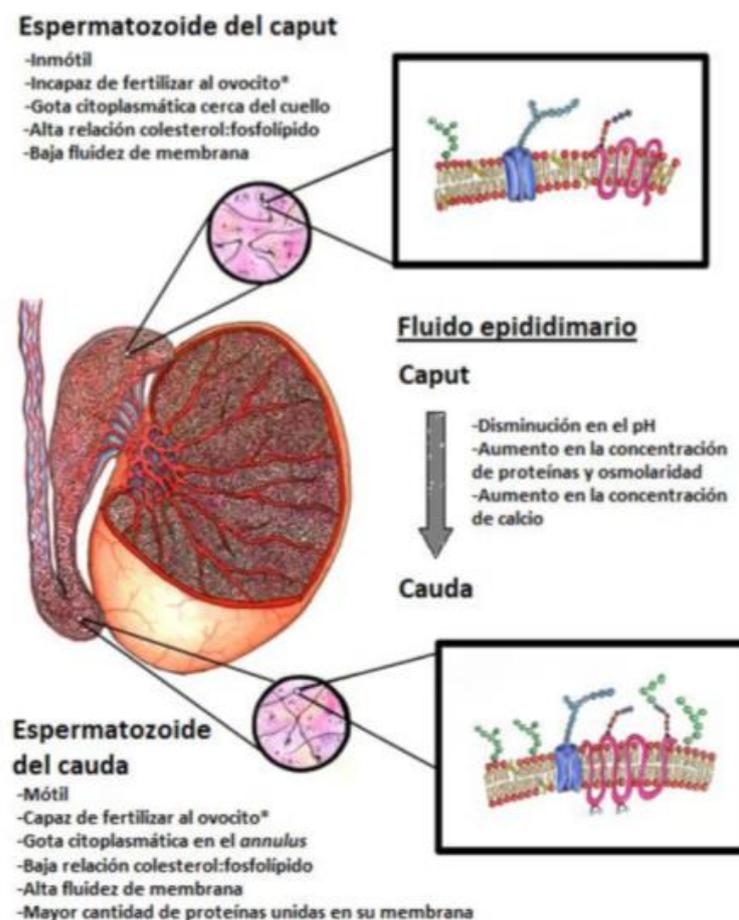
El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Robaire and Hinton 2014) y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento del consumo de oxígeno, y cambios a nivel de la membrana plasmática los cuales representan la mayor parte de las modificaciones que ocurren durante la maduración. Los cambios moleculares y bioquímicos que ocurren a nivel de la superficie incluyen alteraciones en la carga de superficie, en las propiedades de unión de lectinas, en el contenido lipídico, en los carbohidratos de superficie y en la composición proteica (Toshimori and Eddy 2014), y surgen como consecuencia de la adquisición de nuevos componentes a la membrana del espermatozoide y la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la superficie de la gameta. Es generalmente aceptado que todos los cambios producidos durante esta etapa de maduración son tendientes a estabilizar la membrana del espermatozoide.

Mediante la utilización de distintas estrategias experimentales, se ha estudiado la síntesis y secreción de proteínas de origen epididimario como así también su unión o integración a diferentes dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Cuasnicú et al. 2002).

De este modo, se ha descrito que la gran mayoría de las nuevas proteínas adquiridas por los espermatozoides son proteínas de superficie que se unen a la membrana de los espermatozoides a través de interacciones electrostáticas (Cooper 1998). Sin embargo, también existen evidencias que indican que algunas proteínas adquiridas durante la maduración se comportan como proteínas integrales de membrana (Cohen, Rochwerger, et al. 2000; Kirchhoff, Hale, and William 1996; Légaré et al. 1999). Muchas de estas proteínas asociadas fuertemente a la superficie de los espermatozoides se encuentran ancladas a la membrana mediante uniones GPI (Frenette and Sullivan 2001; Robaire and Hinton 2014). Sin embargo, según la vía clásica de secreción de proteínas, una proteína anclada por GPI a la membrana de una célula tiene que transitar por el retículo endoplasmático, luego por el aparato de Golgi y, finalmente, por las vesículas secretoras hasta alcanzar la superficie celular. De acuerdo con este mecanismo de secreción, el espermatozoide no podría adquirir proteínas unidas a GPI durante su pasaje por el epidídimo. Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo alternativo por el cual estas proteínas epididimarias se secretarían y se unirían a los espermatozoides. En este sentido, Yanagimachi y colaboradores (1985) describieron, por primera vez, mediante microscopía electrónica de cortes de epidídimos de hámster, la existencia de vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides. Varios años luego de esta primera observación, el laboratorio del Dr. Robert Sullivan describió la participación de dichas vesículas membranosas en la transferencia de proteínas epididimarias a la superficie de los espermatozoides durante la maduración (Frenette, Lessard, and Sullivan 2002; Sullivan, Frenette, and Girouard 2007). Estas vesículas han sido denominadas “epididimosomas”, y han sido descritas en el epidídimo 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). Algunas proteínas epididimarias se encuentran asociadas a estas pequeñas vesículas y, de este modo, son transferidas a los espermatozoides durante la maduración (Sullivan et al. 2007). En cuanto al origen de estas pequeñas vesículas membranosas, se ha sugerido un mecanismo de secreción apócrina que implicaría la formación de vesículas citoplasmáticas en el polo apical de las células epiteliales secretoras, que se desprenden de las células y, una vez en el lumen del órgano, se desintegran liberando así su contenido (Aumüller et al. 1997; Hermo and Jacks 2002). Estas vesículas citoplasmáticas contendrían a los epididimosomas en su interior.

Mientras que algunas de las proteínas que se asocian durante la maduración mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicú et al. 2002) otras, que reciben el nombre de “factores decapacitantes”, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia prematura del proceso de capacitación (Fraser 2010; Fraser et al. 2006).

La Figura 7 resume algunos de los cambios que ocurren durante la maduración epididimaria sobre los espermatozoides y el fluido epididimario.



**Figura 7** Representación esquemática de los cambios que ocurren en el fluido epididimario y en los espermatozoides a lo largo del epidídimo. Se muestran las principales características morfológicas, funcionales y moleculares de espermatozoides inmaduros del caput y maduros de la cauda. También se presentan las modificaciones en el fluido epididimario del caput y cauda. \*Después de la incubación del espermatozoide en condiciones capacitantes. Adaptado de (Gervasi and Visconti 2017)

## EYACULACION Y TRANSPORTE

Luego del tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, los mismos son almacenados en la región del cauda hasta que, en respuesta a señales sensitivas, se desencadena la eyaculación. El eyaculado está formado por una fracción celular, los espermatozoides y una fracción líquida denominada plasma seminal, la cual estaría compuesta por el fluido epididimario y las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales). La función principal del plasma seminal es el transporte, nutrición y protección de los espermatozoides. El mismo está constituido por diversos componentes como proteínas, citoquinas, prostaglandinas, fructosa, ácido cítrico, poliaminas, iones como zinc y Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), y enzimas tales como proteasas y fosfatasas ácidas. Al día de hoy no existe una comprensión clara de la función fisiológica de muchas de estas sustancias o la importancia de las mismas para la fertilidad. En este sentido, está bien establecido que los espermatozoides que no han tenido contacto con el plasma seminal son capaces de fertilizar un ovocito tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, existen evidencias donde ratones a los cuales se les han extraído las vesículas o son deficientes de alguno de los componentes presentes en el mismo, pueden presentar problemas de fertilidad (Kawano et al. 2014; Peitz and Olds-Clarke 1986). Por lo tanto, se podría decir que si bien el plasma seminal no es absolutamente esencial para que la fertilización ocurra exitosamente, sus componentes permitirían optimizar las condiciones para el transporte y supervivencia de los espermatozoides a medida que transitan por el tracto reproductor femenino maximizando la llegada y la capacidad fertilizante de los mismos (Prins and Lindgren 2014).

En la mayoría de las especies (humanos, bovinos, caninos, felinos, caprinos, entre otras) el sitio de deposición del semen es la vagina, mientras en que otras, la deposición ocurre en el cérvix (porcinos) o directamente en el útero (equinos y muchos roedores) (Coy et al. 2012). En el humano, tras la deposición, algunos de los componentes presentes en el semen tales como el fibrinógeno o la semenogelina, coagulan temporalmente evitando la expulsión de los espermatozoides y protegiéndolos del pH vaginal. Luego de unos minutos, por acción de la fibrinolisisina, se produce la licuefacción del coágulo, permitiendo la liberación de los espermatozoides. En otras especies como el ratón, el coágulo es tan denso que forma lo que se conoce como tapón vaginal que, de no formarse, tal como sucede en el modelo de ratones KO para PN-1, produce severos defectos en la fertilidad, observándose la ausencia

de espermatozoides en el útero quince minutos post-apareo. (Murer et al. 2001). Algo similar ocurre con los animales KO para SVS2, donde la ausencia de formación del tapón vaginal y los menores porcentajes de viabilidad de los espermatozoides en útero impactan en un menor número de crías (Kawano et al. 2014). Asimismo, se ha demostrado en la rata, que la ligadura de las glándulas que promueven la coagulación no sólo impide la formación del tapón, sino también el transporte de los espermatozoides al útero (Suarez and Pacey 2006).

Una vez depositados dentro de la hembra, los espermatozoides deben atravesar el tracto reproductor femenino hasta alcanzar el sitio de fertilización para luego encontrar los ovocitos. Durante el tránsito por el tracto, los espermatozoides sufren un proceso denominado capacitación espermática (Ver más adelante) que les conferirá la capacidad de reconocer y fertilizar a los ovocitos. El encuentro de las gametas podría parecer una simple cuestión de azar, sin embargo, cada vez son más las evidencias que apoyan la hipótesis de que el tracto reproductivo tiene mecanismos de selección altamente sofisticados que permite que solo aquellos espermatozoides de alta calidad lleguen al sitio de fertilización (Fujihara et al. 2018; Holt and Fazeli 2015; Sakkas et al. 2015; Suarez 2016). Independientemente de en donde se produzca la deposición del semen, en todas las especies, los espermatozoides deben atravesar el útero y entrar al oviducto, siendo el paso a través de la UTJ un paso limitante para la mayoría de los espermatozoides (Coy et al. 2012). Se cree que la UTJ serviría como una especie de filtro ya que su morfología estrecha y la presencia de moco espeso impedirían el paso tanto de patógenos provenientes del exterior y del plasma seminal, como de espermatozoides morfológicamente anormales o con deficiencias en su motilidad. En este sentido, se ha observado en diversas especies que aquellos espermatozoides que exhiben una motilidad más lineal y progresiva logran pasar la UTJ con mayor éxito que espermatozoides con patrones de motilidad no lineales. (Gaddum-Rosse 1981; Suarez 2014). Por otro lado, numerosas evidencias indican que los movimientos peristálticos del útero favorecerían la llegada de los espermatozoides al oviducto (Suarez and Pacey 2006). Las evidencias indican que el semen juega un papel fundamental en la iniciación de estas contracciones. Al respecto, se ha observado que las contracciones uterinas en la rata son significativamente menores cuando se colocan en apareo con machos vasectomizados, sugiriendo que tanto los espermatozoides como los componentes del

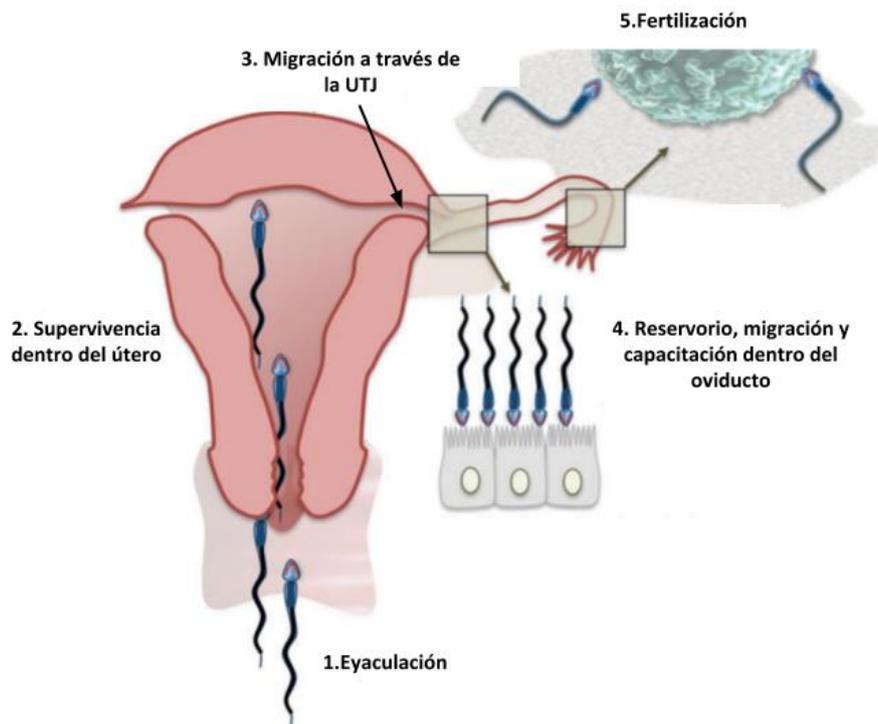
plasma seminal serían capaces de estimular las contracciones (Peitz and Olds-Clarke 1986). Más aun, en el ratón, se ha sugerido que las glándulas sexuales masculinas también podrían jugar algún rol en este proceso ya que la remoción de las vesículas seminales provoca una disminución de las contracciones uterinas impactando significativamente en menores tasas de preñez (Crane and Martin 1991). Sin embargo, ni la motilidad ni las contracciones uterinas serían suficientes para el pasaje de los espermatozoides al oviducto, ya que se ha reportado que espermatozoides de ratones deficientes en ciertas proteínas tales como Ace, algunas de los miembros de la familia de proteínas Adam, Calr3, Clgn, Tpst2, PDILT, entre otras (Fujihara et al. 2019; Okabe 2015) son incapaces de atravesar la UTJ a pesar de presentar morfología y motilidad normal. En resumen, si bien aún no se conocen en profundidad los mecanismos de selección existentes a nivel del tránsito por la UTJ, el paso de los espermatozoides al oviducto requiere los mismos presenten una morfología normal y un determinado tipo de motilidad así como marcas bioquímicas específicas en su superficie (Fujihara et al. 2018; Holt and Fazeli 2015; Sakkas et al. 2015; Suarez 2016).

Otro factor crítico para que la fertilización ocurra exitosamente es el tiempo de vida de las gametas. En muchas especies los espermatozoides permanecen en el oviducto a la espera de la llegada del ovocito por varios días e incluso meses (Suarez and Pacey 2006). En este sentido, existen evidencias que demuestran que los espermatozoides motiles se unen por la zona de la cabeza al epitelio oviductal y que esta interacción prolongaría la vida de los mismos estabilizando la membrana y retrasando la capacitación espermática probablemente por inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  a los espermatozoides (Suarez 2014). Como parte del complejo proceso de capacitación (detallada más adelante), los espermatozoides sufren cambios que pueden desempeñar un rol en la liberación del epitelio. Por un lado, las modificaciones que ocurren a nivel de la membrana plasmática, en particular por la pérdida del capuchón acrosomal, podrían reducir la afinidad de unión del espermatozoide a posibles receptores en el epitelio oviductal. Por otro lado, el desarrollo de una motilidad más vigorosa conocida como hiperactividad (HA) que se caracteriza por un aumento de la amplitud y frecuencia del batido flagelar (Yanagimachi 1970), podría proporcionarle la fuerza necesaria para superar la adhesión con epitelio oviductal (Suarez 2014).

En cuanto a la gameta femenina, en general, los ovocitos permanecen fértiles por un período de 24 hs luego de la ovulación (vaca, oveja, cerdo, hombre). Sin embargo, en

algunos casos, este período no sobrepasa las 12 hs post-ovulatorias (conejo, rata, hámster, ratón) (Austin, 1970). Si el tiempo transcurrido entre la ovulación y la fertilización es mayor que la vida fértil del ovocito, el desarrollo embrionario puede iniciarse pero, generalmente, resulta anormal y de duración limitada (Austin 1982). En base a ello, debido a que el tiempo transcurrido desde la ovulación hasta la fertilización es relativamente corto, la mayor consideración respecto a su transporte es la llegada con éxito al sitio de fertilización para evitar embarazos ectópicos (Suarez and Pacey 2006).

En la Figura 8 se resumen los principales eventos asociados al transporte de los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino.



**Figura 8 Principales eventos asociados al tránsito de los espermatozoides dentro del tracto femenino.** 1. Deposición de los espermatozoides por la eyacuación. 2. Supervivencia de los espermatozoides a medida que transitan por el útero. 3. Migración a través de la UTJ hacia el oviducto. 4. Reservorio, migración y capacitación de los espermatozoides dentro del oviducto. 5. Encuentro con los ovocitos en la ampulla y fertilización de los mismos. (Aitken and Nixon 2013).

## CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Luego de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos aun no son capaces de reconocer ni fertilizar al ovocito ya que la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria es tan solo de carácter potencial (Florman and Fissore 2014; Yanagimachi 1994). De esta manera, los espermatozoides eyaculados deben permanecer en el tracto femenino durante cierto tiempo para poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración y, finalmente, penetrar al ovocito. Es durante el trayecto hacia el sitio de fertilización que los espermatozoides sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que, en su conjunto, se denominan capacitación (Austin 1952; Chang 1951). Entre dichos cambios se encuentran la remoción del colesterol de la membrana, la pérdida de los factores decapacitantes, la redistribución de antígenos de superficie, el ingreso de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y  $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento del pH intracelular, la hiperpolarización de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr), los cuales ocurren a través de mecanismos moleculares aún no del todo conocidos (Visconti et al. 2011). Dado que el espermatozoide carece de transcripción y traducción, las modificaciones de las concentraciones de mensajeros intracelulares tales como AMP cíclico (cAMP) y  $\text{Ca}^{2+}$ , los flujos de iones a través de la membrana plasmática y las modificaciones post-traduccionales tales como la fosforilación/defosforilación de proteínas, podrían ser los mecanismos regulatorios responsables de generar los cambios que tienen lugar durante la capacitación y modular así el funcionamiento del espermatozoide (Visconti, Bailey, et al. 1995; P E Visconti, Moore, et al. 1995). Mientras que algunos de estos cambios se inician ni bien el espermatozoide entra en contacto con el tracto femenino, otros ocurren luego de un cierto período de permanencia en el mismo (Battistone et al. 2013).

A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe atravesar el tracto femenino para capacitarse y adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* incubándose a los espermatozoides en un medio definido. La composición del medio de capacitación puede variar de una especie a otra, si bien, en general, debe contar con una constitución similar a la del fluido oviductal, e incluir fuentes de energía y carbono tales como piruvato, lactato, y glucosa, un aceptor de colesterol como la albúmina, e iones tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Visconti et al. 2002). El descubrimiento de las condiciones necesarias para una correcta capacitación *in vitro* fue esencial para el

desarrollo de las técnicas de fertilización *in vitro*. La gran relevancia de las técnicas de reproducción asistida genera la necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos moleculares del proceso de capacitación para mejorar y garantizar el éxito de las técnicas de fertilización *in vitro*.

Las modificaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios tanto a nivel de la cabeza como de la cola que permiten al espermatozoide sufrir un evento exocítico en la cabeza denominado reacción acrosomal, y desarrollar un patrón de motilidad vigoroso en la cola, llamado hiperactivación. Debido a que la cabeza y la cola son estructuralmente distintas, existe una tendencia a desvincular sus funciones. Sin embargo, en los últimos años, las evidencias sugieren que debe considerarse al flagelo como una cilia sensorial capaz de captar alteraciones en el medio extracelular y transmitir las a la cabeza a través de mensajeros secundarios, pudiendo influir sobre la ocurrencia de la RA (Mariano G. Buffone et al. 2012). A continuación, se detallan varios de los mecanismos moleculares del proceso de capacitación y las consecuencias funcionales del mismo.

### **Producción de cAMP, activación de PKA y fosforilación de proteínas en tirosina**

Los espermatozoides utilizan una porción significativa de sus fuentes de energía para regular el flujo y el gradiente intracelular de iones a través de bombas y transportadores iónicos de membrana, modificando así el potencial eléctrico de la célula y las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros (Miller et al. 2015; Visconti et al. 2011). Aunque el papel exacto de estas moléculas continúa en estudio, existen evidencias que muestran que tanto  $\text{HCO}_3^-$  como  $\text{Ca}^{2+}$  juegan un rol central en la regulación de la capacitación modulando diferentes cascadas de señales intracelulares (P E Visconti, Moore, et al. 1995; Visconti et al. 2011).

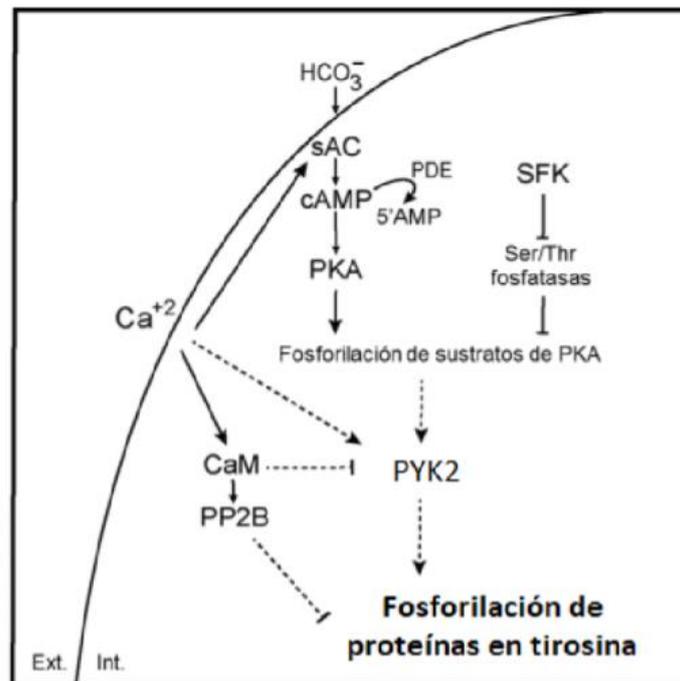
Numerosos estudios en diferentes especies han mostrado que la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  durante la capacitación es necesaria para la activación de la proteína adenilato ciclasa soluble (sAC), llevando a un aumento en los niveles de cAMP y la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA) (Figura 9). De este modo, PKA fosforila diversas proteínas en residuos Ser y Thr para, finalmente, activar una cascada de señalización conducente al aumento de fosforilación de proteínas en tirosina en los espermatozoides (Visconti 2009).

Asimismo, evidencias obtenidas tanto en humanos como en roedores señalan que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA se encuentran regulados por la acción de las Tyr quinasas de la familia Src (SFK, Src kinase family), que, a su vez, inactivan a Ser/Thr fosfatasas (Battistone et al. 2013). La fosforilación de sustratos de PKA en respuesta al aumento de cAMP y a la activación de SFKs suele ser rápida (Battistone et al. 2013) y es importante para diferentes aspectos del proceso de capacitación, incluyendo el aumento del pH intracelular (Wang et al. 2007; Zeng, Oberdorf, and Florman 1996), el incremento de  $Ca^{2+}$  (Tateno et al. 2013), la hiperpolarización (Demarco et al. 2003) y la inducción de la vía de pTyr (P. E. Visconti, Moore, et al. 1995). La importancia de esta vía se observó en los animales KO para sAC, los cuales no exhiben el aumento en pTyr asociado a la capacitación y son infértiles debido a alteraciones en la motilidad de sus espermatozoides (Esposito et al. 2004; Hess et al. 2005).

La vía cAMP-PKA que conduce a la fosforilación de proteínas en tirosina tiene distintos niveles de regulación. El aumento inicial de cAMP sería dependiente de la activación de la sAC por  $Ca^{2+}$ , y la concentración de cAMP el resultado del balance entre la síntesis a través de la acción de sAC y la degradación del mismo por las fosfodiesterasas (PDEs), generando 5'AMP (Figura 9). En espermatozoides de ratón, se cree que el  $Ca^{2+}$  intracelular ejerce regulaciones negativas y positivas sobre la cascada de pTyr (Navarrete et al. 2015). Por un lado, al estimular a calmodulina (CaM), el  $Ca^{2+}$  aumentaría la actividad de PDEs y PP2B dependientes de CaM y, por ende, la degradación del cAMP e inhibición de pTyr (regulación negativa). Por otro lado, el  $Ca^{2+}$  también estimularía a sAC, generando aumento de cAMP (modulación positiva) (Navarrete et al. 2015). Además, PYK2, posible mediador entre la actividad de PKA y el aumento de pTyr, posee también dominios de unión a  $Ca^{2+}$  por lo que podría haber una regulación directa de la actividad de esta quinasa por las concentraciones de este ion (Battistone et al. 2014) (Figura 9). Tanto en espermatozoides humanos como de ratón, la ausencia total de  $Ca^{2+}$  en el medio de capacitación por el agregado de EGTA, induce un aumento exacerbado de los niveles de pTyr en ambas especies (Battistone et al. 2014; Navarrete et al. 2015).

El aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina es uno de los eventos moleculares que ocurre durante la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro*, y que llevaría a la regulación de la actividad de las moléculas requeridas para los eventos posteriores a dicho proceso. De

este modo, la vía de pTyr en el flagelo estaría relacionada con el desarrollo de la HA del espermatozoide (Mahony and Gwathmey 1999; Nassar et al. 1999; Visconti 2009), requerida para la penetración del cúmulus y la ZP (Puga Molina et al. 2018). Además, se ha reportado que los espermatozoides de ratón unidos al oolema mantienen la fosforilación en el flagelo (Urner and Sakkas 2003). Por otro lado, se han descrito proteínas fosforiladas en Tyr en la cabeza del espermatozoide (Asquith et al. 2004; Urner, Leppens-Luisier, and Sakkas 2001), a las cuales se les atribuyó roles en la RA y en la interacción del espermatozoide con el ovocito. De esta manera, la vía de pTyr regularía la mayoría de los procesos dependientes de la capacitación modulando, en consecuencia, el proceso de fertilización (Battistone et al. 2014; Galantino-Homer, Visconti, and Kopf 1997; Pommer, Rutllant, and Meyers 2003; Visconti et al. 1999).

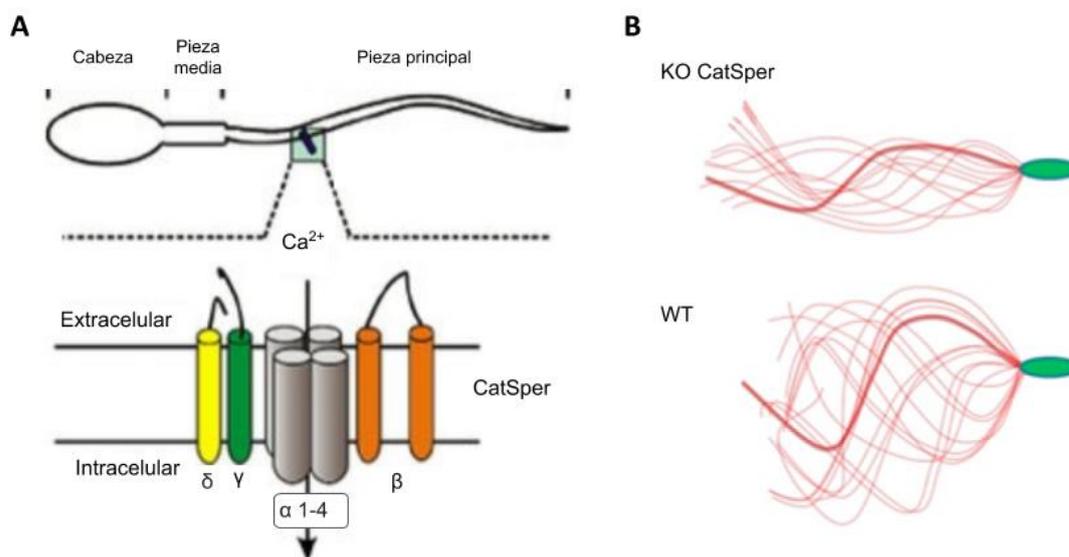


**Figura 9 Capacitación espermática.** Esquema de las cascadas de señalización involucradas en la capacitación, incluyendo las vías de cAMP/PKA y de las SFK conducentes a la fosforilación de proteínas en tirosina, y la modulación de las mismas por  $\text{Ca}^{2+}$  (Battistone et al. 2014).

### Incremento del calcio intracelular

Durante la capacitación del espermatozoide, ocurre un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Baldi et al. 1991; Ruknudin and Silver 1990). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática ocurre principalmente a través de CatSper (Cation channel of Sperm), el principal canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del espermatozoide el cual se ha demostrado que es esencial para el desarrollo de la HA y para la fertilidad tanto en roedores como en humanos. (Ren et al. 2001; Smith et al. 2013).

Más específicamente, CatSper se expresa exclusivamente en los testículos y se localiza en la pieza principal de la cola del espermatozoide (Qi et al. 2007; Quill et al. 2003; Ren et al. 2001). El mismo presenta una estructura muy compleja ya que está conformado por nueve subunidades: cuatro subunidades alfa formadoras del poro CatSper 1 a 4, y cinco subunidades auxiliares CatSper  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  (Figura 8).



**Figura 10 Canal CatSper.** **A.** Esquema representando la localización del canal CatSper en la pieza principal del espermatozoide y su estructura principal compuesta por cuatro subunidades formadoras del poro ( $\alpha$  1-4) y tres de las cinco subunidad auxiliares ( $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\beta$ ). (Cai et al. 2015). **B.** Esquema representando el batido flagelar de un espermatozoide KO para CatSper, el cual no desarrolla su HA, o un espermatozoide WT.

Tal como se mencionó anteriormente, el canal resulta esencial para la fertilidad masculina ya que los ratones KO para la mayoría de las subunidades resultan completamente infértiles (Chung et al. 2011, 2017; Jin et al. 2007; Qi et al. 2007; Ren et al. 2001; Wright and Bianchi

2016). Esta deficiencia sería consecuencia de la incapacidad de los espermatozoides KO de las distintas subunidades del canal de desarrollar la HA y por ende de penetrar la envolturas del ovocito (Carlson et al. 2003; Ren et al. 2001). También se ha sugerido que la HA desarrollada por la activación de CatSper es importante para la migración de los espermatozoides, más específicamente, la HA le conferiría a los espermatozoides la fuerza necesaria para desprenderse del epitelio oviductal (Ho, Collin A. Wolff, and Suarez 2009). En humanos, existen evidencias que asocian mutaciones en CatSper1-2 con astenoteratozoospermia y problemas de fertilidad (Avenarius et al. 2009; Smith et al. 2013)

En cuanto a su regulación, las evidencias indican que tanto en roedores como en humanos, CatSper resulta sensible a los cambios de pH intracelular que ocurren durante la capacitación, activándose con la alcalinización citoplasmática (Kirichok, Navarro, and Clapham 2006). Recientemente se ha observado que esta sensibilidad a los cambios de pH estaría dada por la interacción directa entre la proteína EF-hand calcium binding domain-containing protein 9 (EFCAB9) y la subunidad CatSper  $\zeta$ . Más específicamente, a medida que el pH intracelular se alcaliniza, las proteínas se disocian parcialmente permitiendo la apertura del poro y, en consecuencia, la entrada los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  los cuales, al unirse a EFCAB9, provocan un cambio conformacional que mantiene el canal abierto por un periodo largo de tiempo (Hwang et al. 2018). Asimismo, se ha visto que la despolarización de la membrana puede activar las corrientes del canal (Carlson et al. 2003), al igual que la progesterona en el caso de los espermatozoides humanos (Lishko, Botchkina, and Kirichok 2011; Strünker et al. 2011).

Pese a que la activación de CatSper es fundamental para el desarrollo de la HA (Carlson et al. 2003; Ren et al. 2001), este tipo de motilidad requeriría, además, de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares (Alasmari, Costello, et al. 2013; Chang and Suarez 2011a). Más allá, del influjo por CatSper, el  $\text{Ca}^{2+}$  podría ingresar en menor medida al espermatozoide a través de canales operados por  $\text{Ca}^{2+}$  (store operated calcium entry) tal como ORAI, intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , o canales TRP (transient receptor potential channels) tales como TRMP8 (Darszon et al. 2011) (Figura 11). En cuanto a este último, sus corrientes son sensibles a diferencias de voltaje y a temperaturas menores a 25 °C. Si bien los animales KO para dicho canal son fértiles, sus espermatozoides presentan deficiencias en la RA, en concordancia con su localización en la cabeza (Martínez-López et al. 2011). Más aún, este

canal se encuentra también en el flagelo, postulándose su participación en el desarrollo de la HA (De Blas et al. 2009).

Por otro lado, la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide ocurre, principalmente, a través de PMCA4 (bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa isoforma 4). Los animales KO para esta proteína presentan espermatozoides epididimarios inmóviles con altas concentraciones de calcio intracelular, demostrando la importancia de mantener la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  para la fertilidad de los machos (Okunade et al. 2004; Schuh et al. 2004).

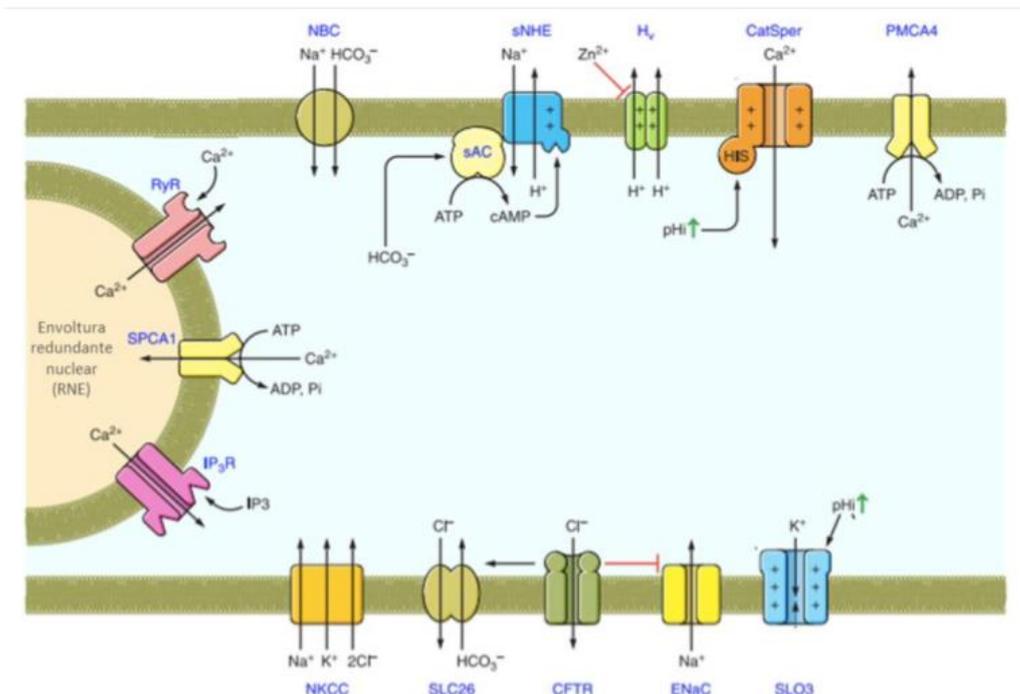


Figura 11 Flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y otro iones durante la capacitación (Darszon et al. 2011).

## Hiperpolarización

El potencial de membrana de las células está determinado por la permeabilidad de la membrana a los iones presentes en el medio, principalmente los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y al anión  $\text{HCO}_3^-$ , como así también a la concentración de los mismos a ambos lados de la membrana. Los cambios en la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$ , por su parte, no tendrían un efecto evidente en las variaciones de potencial. En este sentido, evidencias en la bibliografía indican que el potencial de membrana del espermatozoide en reposo es más despolarizado que el

de otros tipos celulares (Hernández-González et al. 2006; Zeng, Clark, and Florman 1995), probablemente debido a su mayor permeabilidad al  $\text{Na}^+$  por la presencia de los canales de  $\text{Na}^+$  epiteliales que estarían normalmente abiertos en el espermatozoide en reposo (Hernández-González et al. 2006). Por otro lado, el proceso de capacitación está acompañado de una hiperpolarización de la membrana (De La Vega-Beltran et al. 2012; Zeng et al. 1995), ya que ocurre un aumento de la concentración intracelular de cargas negativas en comparación con el medio extracelular.

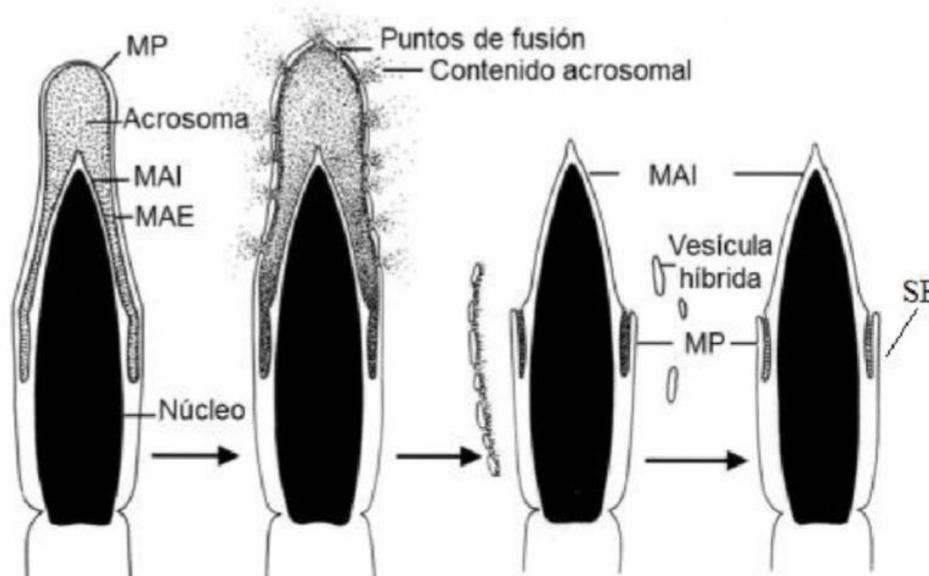
Si bien aún no es clara la regulación del potencial de membrana del espermatozoide durante la capacitación, existen diversas evidencias que sugieren que la hiperpolarización ocurriría debido a un aumento en la permeabilidad al  $\text{K}^+$ . La salida de  $\text{K}^+$  a través de canales rectificadores sería responsable, en parte, de la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación (Acevedo et al. 2006; Muñoz-Garay et al. 2001). Resultados obtenidos en el modelo del ratón KO para el canal de  $\text{K}^+$  Slo3, indicaron que el mismo sería esencial para la ocurrencia de la hiperpolarización (Santi et al. 2010) y, a su vez, regularía la actividad de CatSper (Chávez et al. 2014). Pese a que la relevancia de la hiperpolarización para la HA es aún poco clara, la dependencia del voltaje de canales críticos para la capacitación tales como CatSper o Hv1, sugiere que la misma tendría un rol importante en este proceso. Por otro lado, se ha reportado que la hiperpolarización es esencial y suficiente para la ocurrencia de la RA (De La Vega-Beltran et al. 2012).

### **Reacción acrosomal**

La RA es un evento excitotóxico que permite la liberación regulada del contenido acrosomal del espermatozoide y tiene dos consecuencias que resultan fundamentales para la fertilización. Una de ellas es la exposición de moléculas intra-acrosomales involucradas en la interacción y penetración de las envolturas que rodean al ovocito, mientras que la segunda consecuencia, no menos importante, es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial.

La RA consiste en la vesiculización del capuchón acrosomal del espermatozoide mediante un mecanismo similar al proceso de exocitosis observado en otras células del organismo. El proceso comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del segmento

ecuatorial. Como consecuencia de la fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas mixtas que se desprenden en un fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del capuchón acrosomal". Entre las vesículas se crean poros por los que se libera el contenido del acrosoma quedando así la membrana acrosomal interna expuesta al medio extracelular, y con continuidad con la membrana plasmática del segmento ecuatorial (Figura 12) (Toshimori and Eddy 2014; Yanagimachi 1994). Se denomina intacto a aquel espermatozoide cuyo acrosoma no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, modificado a aquel que presenta alteraciones morfológicas en el acrosoma tales como hinchamiento o rugosidades, y reaccionado a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal.

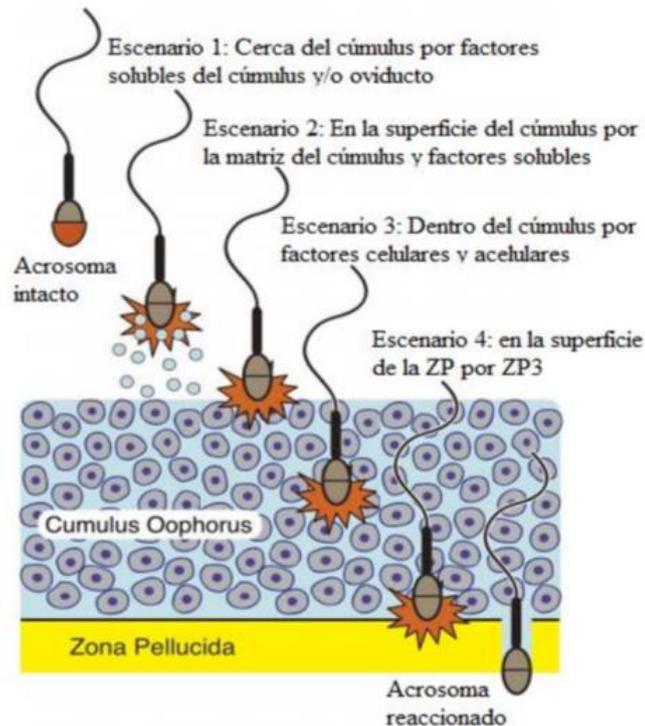


**Figura 12 Progresión de la RA.** Diagrama que representa las etapas de la RA en la cabeza del espermatozoide de ratón. A la izquierda se muestra un espermatozoide intacto y hacia la derecha, diferentes estados de la RA siendo el último un espermatozoide ya reaccionado. MP: membrana plasmática, MAI: membrana acrosomal interna, MAE: membrana acrosomal externa, SE: segmento ecuatorial. (Yanagimachi 1994).

A nivel molecular, los eventos que desencadenan la RA involucran a múltiples receptores presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado, los cuales reconocen a su ligando complementario (entre ellos, ZP3 y progesterona) desencadenando la transducción de señales que produce el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de otros mensajeros

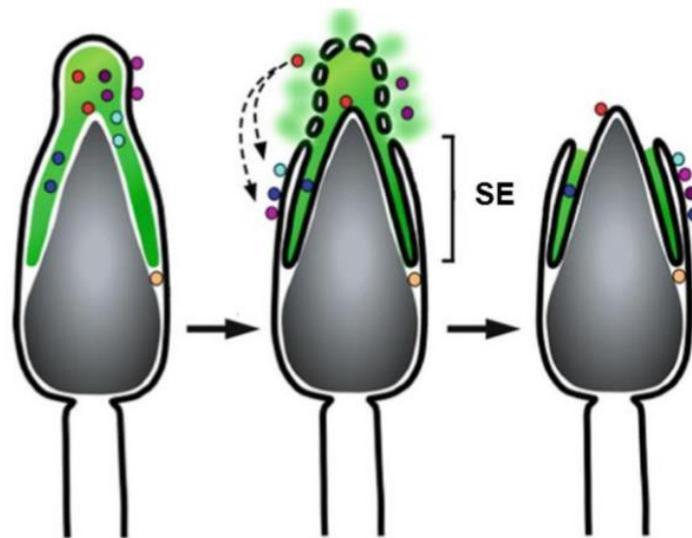
secundarios tales como el cAMP (Belmonte, Mayorga, and Tomes 2016). Como consecuencia de ello, se produce una serie de señales finamente reguladas que incluyen la activación de la cascada cAMP, la acción de GTPasas, la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del acrosoma y, finalmente, el ensamblado de la maquinaria de fusión (Tomes 2015).

Tradicionalmente, se pensaba que las enzimas contenidas dentro del acrosoma eran las encargadas de digerir tanto la matriz extracelular de las células del cúmulus como la ZP, y permitir al espermatozoide abrirse camino hasta el ovocito al cual llegaría ya reaccionado (Yanagimachi 1994). Esta hipótesis se vio modificada por evidencias demostrando que, al menos en el ratón, la RA ocurría, principalmente, cuando el espermatozoide contacta con la ZP (Saling and Storey 1979; Wassarman et al. 1985), y que los espermatozoides reaccionados eran incapaces de penetrar el cúmulus (Talbot 1985). Unos años más tarde, se confirmó que solo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. De acuerdo a este modelo, una vez unidos a la ZP, los espermatozoides sufrirían la RA, produciéndose la liberación de los contenidos del acrosoma, los cuales serían importantes para la posterior penetración de la ZP (Saling & Storey, 1979; Yanagimachi 1994). Posteriormente, los Dres. Kim y Gerton (2001) propusieron un modelo denominado “exocitosis acrosomal”, en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito (Kim, Foster, and Gerton 2001). Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP, pero no iniciado por la misma. Según este modelo, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP. A favor de esta teoría, más recientemente, se demostró que la mayoría de los espermatozoides que fertilizan a los ovocitos, comenzarían a reaccionar en el cúmulus o antes de ingresar a esta matriz y no sobre la ZP (Jin et al. 2011). Esta idea fue apoyada por el hecho de que los espermatozoides perivitelinos, ya reaccionados y sin capuchón acrosomal, son capaces de fertilizar ovocitos con cúmulus y ZP *in vitro* (Inoue et al. 2011). Más aún, tres grupos, independientemente, han observado que la gran mayoría de los espermatozoides de ratón que llegan al sitio de fertilización *in vivo* ya perdieron el acrosoma (Hino et al. 2016; Muro et al. 2016; La Spina et al. 2016). (Figura 13)



**Figura 13 Sitios de ocurrencia de la reacción acrosomal.** Los escenarios 1 a 4 ilustran los posibles lugares en los cuales los espermatozoides pueden experimentar la excitosis acrosomal mientras viajan al sitio de fertilización. (Buffone, Hirohashi, and Gerton 2014).

Además de ser importante para la penetración de la ZP, la RA sería un evento crucial para la fusión de las gametas. Los espermatozoides con acrosomas intactos pueden unirse al oolema, pero son incapaces de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi 1994). Existen evidencias indicando que ciertas enzimas acrosomales como la acrosina y las metaloproteasas, liberadas durante la RA, afectarían a la membrana del segmento ecuatorial otorgándole fusogenicidad (Díaz-Pérez and Meizel 1992; Díaz-Pérez, Thomas, and Meizel 1988; Takano, Yanagimachi, and Urch 1993). A pesar de que este proceso aún no es del todo conocido, los mecanismos que están implicados en la adquisición de la fusogenicidad parecerían involucrar tanto la acción de proteínas que modifican el citoesqueleto y las moléculas de la membrana plasmática, así como una reorganización de las proteínas acrosomales y de la membrana plasmática (Cuasnicú et al. 2016). (Figura 14).



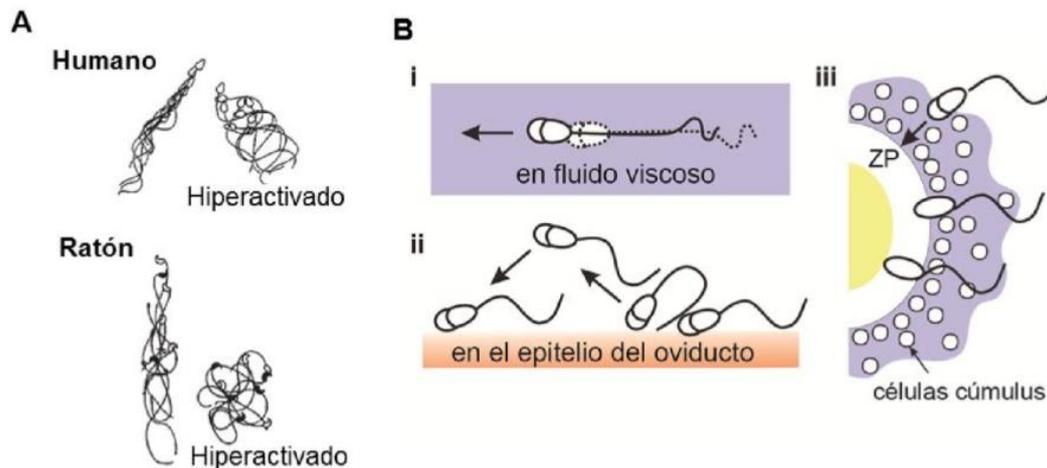
**Figura 14 Adquisición de la fusogenicidad del segmento ecuatorial durante la RA.** Diagrama que representa diferentes proteínas del espermatozoide que estarían involucradas en la adquisición de la fusogenicidad del segmento ecuatorial por alterar el citoesqueleto (como TSSK6, en naranja); o por modificar proteínas presentes en el SE (como acrosina en rojo o SPESP1 en azul oscuro) o por relocalizarse en el segmento ecuatorial y participar en la fusión de gametas (como IZUMO1 en celeste, o CRISP1 en rosa, o CRISP2 en magenta). SE: segmento ecuatorial. (Cuasnicú et al. 2016).

### Hiperactivación

La HA (Figura 15) es un patrón de motilidad característico descrito por primera vez en el hámster (Yanagimachi 1970), que consiste en un movimiento flagelar vigoroso observado tanto *in vivo*, en el sitio de la fertilización, como *in vitro*, en todas las especies estudiadas (Yanagimachi 1994). El movimiento hiperactivado se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución en la linealidad, y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, sumados a movimientos del flagelo similares a latigazos en medios de baja viscosidad (Suarez 1996; Suarez and Dai 1992).

Se han sugerido varios roles potenciales para este tipo de motilidad. Por un lado, el espermatozoide hiperactivado penetra más eficientemente las sustancias viscoelásticas (Suarez 1996), permitiéndole penetrar el medio ambiente viscoso del fluido oviductal y, posteriormente, durante la interacción con el ovocito, penetrar a través de la matriz extracelular del cumulus oophorus y de la ZP. Por otro lado, la HA podría ayudar a los

espermatozoides a ascender desde el oviducto al sitio de fertilización, permitiéndoles disociarse de la adhesión transitoria que establecen con el epitelio oviductal (Ho, Collin A Wolff, and Suarez 2009; Suarez 1996; Yanagimachi 1994). Además, debido a la mayor amplitud del movimiento, la HA aumentaría la probabilidad de encuentro entre los espermatozoides y el ovocito dentro de la ampulla (Darszon et al. 2011; Yanagimachi 1994).



**Figura 15 Hiperactividad espermática.** **A.** Representación de los patrones de movimiento de un espermatozoide humano (Arriba) o de ratón (Abajo) progresivo o hiperactivado en un medio de baja viscosidad. **B.** La HA sería relevante i. para avanzar en un medio viscoso como el tracto reproductor femenino, ii. para liberarse del epitelio del oviducto y avanzar por la ampulla (sitio de fertilización), y iii. para la penetración del cúmulus y la ZP. (Darszon et al. 2011).

Si bien se supone que la HA podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino en el momento de la fertilización, aún hoy no hay consenso respecto a la identidad de dichos factores. Asimismo, las cascadas de señales que regulan la HA tampoco han sido completamente descritas, aunque se sabe que la alcalinización de los espermatozoides, el cAMP y el  $\text{Ca}^{2+}$  serían fundamentales para desencadenar dicho proceso. Por otra parte, se han descrito varias enzimas y canales que podrían estar involucrados en este proceso a juzgar por el hecho de que los ratones mutantes para algunos de dichos factores tales como el canal CatSper y la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa son incapaces de desencadenar la HA (Mariano G Buffone et al. 2012; Ho, Collin A. Wolff, et al. 2009).

## Quimiotaxis

Las gametas, antes de establecer el contacto físico requerido para la fertilización, establecen un contacto químico a distancia. Dentro de este último tipo de comunicación, se encuadra la espermo-quimiotaxis, la que se define como el movimiento direccional de los espermatozoides guiado por un gradiente de concentración de moléculas atractantes, producidas por el ovocito o el microambiente. La quimiotaxis espermática hacia factores del ovocito o del tracto reproductor femenino, se ha observado en especies marinas, en anfibios y en mamíferos (Eisenbach and Kasper 1994). Existen evidencias que indican que los espermatozoides de humano (Eisenbach 1999), y de ratón (Giojalas and Rovasio 1998; Oliveira et al. 1999), entre otros, responden quimiotácticamente hacia factores presentes en el fluido folicular. El fenómeno quimiotáctico se observa, generalmente, en una subpoblación de espermatozoides de entre 10%-20%, dependiendo de la especie, cuando el fluido folicular se encuentra diluido entre 1.000 y 10.000 veces (Fabro et al. 2002). Este grupo de células quimiotácticas está constituido sólo por espermatozoides capacitados, siendo dicho estado quimiotáctico-capacitado de carácter transitorio. Aunque se desconoce la identidad del (los) atrayente(s) presente(s) en el fluido folicular, se ha sugerido como posibles candidatos, al aldehído aromático bourgeonal que activa los receptores olfatorios OR1D2 en el espermatozoide (Gakamsky, Armon, and Eisenbach 2009; Spehr et al. 2003), a péptidos pequeños de hasta 8 kDa denominados quemoquinas, tales como RANTES, CCL7 (Isobe et al. 2002; Tamba et al. 2008) y a la hormona esteroidea progesterona (Guidobaldi et al. 2012; Teves et al. 2006). En ese sentido, es sabido que la progesterona regula los canales de calcio “CatSper” presentes en el flagelo de los espermatozoides humanos, abriendo la posibilidad de que dichos canales también estén involucrados en la regulación de las señales de calcio del flagelo durante la quimiotaxis (Lishko et al. 2011). Más recientemente, nuestro laboratorio describió que la proteína CRISP1 exhibe capacidad de orientar a los espermatozoides como así también de inhibir CatSper y la HA (Ernesto et al. 2015). Esto se describe en más detalle en la sección correspondiente a las proteínas CRISP.

## FERTILIZACIÓN

Una vez que el espermatozoide logra alcanzar al ovocito, se desencadena el proceso de fertilización, el cual, en mamíferos, ocurre generalmente en la ampulla del oviducto. En dicho lugar, el ovocito se encuentra rodeado por la ZP y por las células del cumulus. El espermatozoide capacitado deberá atravesar las diferentes envolturas para contactarse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Dicho proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-cumulus oophorus y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culmina con la fusión de las membranas y la formación de un nuevo individuo. En la Figura 16 se esquematizan estas etapas.

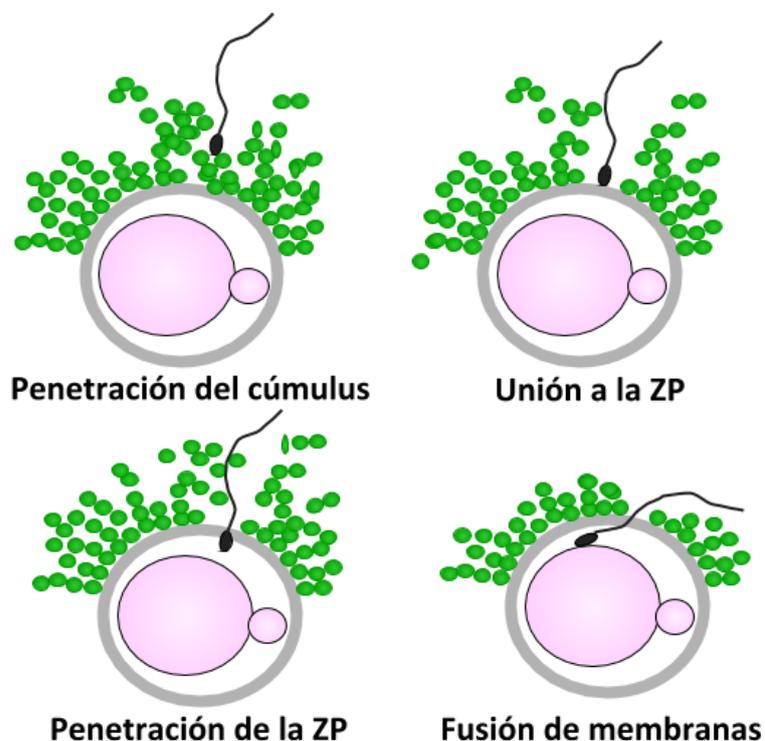


Figura 16 Etapas de la fertilización.

### Penetración del cumulus oophorus

Como se describiera anteriormente, los componentes predominantes de la matriz del cúmulus son el ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos que le proveerían a dicha estructura las propiedades viscoelásticas que lo caracterizan. Por lo tanto, los

espermatozoides que se aproximan al ovocito durante la fertilización deben avanzar a través de la matriz presente entre las células del cúmulus para alcanzar al ovocito.

Aún existe controversia respecto a los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la penetración del cúmulus. Algunas evidencias han sugerido que los espermatozoides poseerían hialuronidasas asociadas a la superficie de los mismos, y que estas enzimas serían las que ayudarían al pasaje a través del cúmulus (Florman and Fissore 2014; Talbot 1985). En este sentido, se ha descrito que SPAM1 (sperm adhesion molecule 1, originalmente denominada PH-20), de origen testicular, presenta actividad de hialuronidasa en las diferentes especies en las que ha sido detectada (Cherr et al. 1996; Gmachl et al. 1993; Lin et al. 1994; Primakoff, Hyatt, and Myles 1985). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada en vista de que los ratones KO para SPAM1 son fértiles a pesar de sufrir un retardo en la dispersión del cúmulus respecto de los animales controles (Baba et al. 2002). En ese trabajo, se reveló la presencia de otra proteína con actividad hialuronidasa denominada HYAL5, presente en las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios de ratón. Posteriormente, los autores postularon la existencia de una redundancia en cuanto a la función de SPAM1 y HYAL5 por la cual HYAL5 estaría compensando la función de SPAM1 en los animales KO antes descritos (Kim et al. 2005). Más aún, la reciente generación de ratones doble KO para SPAM1 y las serinproteasas TESP5 o acrosina sugieren que ambas proteínas actuarían cooperativamente junto a SPAM1 en la penetración del cúmulus (ZHOU, KANG, and BABA 2012). El modelo de exocitosis acrosomal descrito anteriormente postula que, durante el avance de los espermatozoides hacia el ovocito, se produciría una liberación parcial de enzimas acrosomales, previa a la vesiculización completa del acrosoma, que sería responsable de degradar la matriz y permitir al espermatozoide avanzar entre las células del cúmulus. Por otra parte, y tal como se mencionara anteriormente, la HA podría ser importante para que los espermatozoides puedan moverse a través de la matriz extracelular del cúmulus y lograr penetrarlo hasta, finalmente, llegar al ovocito (Puga Molina et al. 2018).

### **Interacción espermatozoide-zona pelúcida**

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

Actualmente, existe controversia en lo que respecta a la etapa de unión del espermatozoide a la ZP. Basándose en evidencias provenientes de estudios en el ratón, originalmente se había propuesto un modelo de adhesión entre el espermatozoide y la ZP que constaba de dos etapas (Wassarman 1988a): 1) una unión primaria del espermatozoide intacto con la ZP, más específicamente a través de los carbohidratos de ZP3, desencadenándose así la RA, y 2) una unión secundaria del espermatozoide reaccionado, a través de ZP2. Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado por otros autores que proponen un nuevo mecanismo de interacción entre el espermatozoide y una estructura supramolecular compuesta por ZP2 y ZP3, en lugar de la interacción con una única glicoproteína en particular (Hoodbhoy and Dean 2004; Rankin et al. 2003). Observaciones posteriores mostraron que solo el estado de la ZP2 sería importante para penetrar la ZP. De esta manera, una ZP2 intacta facilitaría el paso del espermatozoide a través de la ZP mientras que una ZP2 clivada impediría dicha penetración (Avella, Baibakov, and Dean 2014; Avella, Xiong, and Dean 2013). Más aún, y como se mencionara anteriormente, las evidencias actuales apoyan la idea de que el espermatozoide sufriría la RA antes de alcanzar la ZP, llegando ya reaccionado a interactuar con la ZP.

En cuanto a las moléculas del espermatozoide responsables de la unión con la ZP, se han sugerido algunas proteínas tales como SPAM1 (Myles and Primakoff 1997; Yudin et al. 1999) y proacrosina/acrosina (Furlong et al. 2000; Lea et al. 1996). Estudios con animales KO para acrosina han replanteado el papel de esta enzima en el proceso de fertilización ya que los machos carentes de la misma son fértiles (Baba et al. 1994). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis que la interacción proacrosina/acrosina con ZP2 sería importante para la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, postulando la existencia de otras proteasas que pudieran reemplazar a proacrosina/acrosina en los animales KO (Howes and Jones 2002).

Otra de las proteínas implicadas en la unión del espermatozoide a la ZP es ADAM3, la cual forma parte de la familia de proteínas denominada ADAM (a disintegrin and a metalloprotease domain), compuesta por alrededor de 40 miembros (Kim et al. 2006). Si bien los estudios previos *in vitro* postulaban a esta proteína como mediadora del proceso de fusión, los ratones macho KO exhibieron una capacidad de fusión normal pero resultaron infértiles debido a una unión deficiente entre los espermatozoides y la ZP (Nishimura et al. 2004; Shamsadin et al. 1999) y fallas en la migración de los espermatozoides al oviducto (Yamaguchi et al. 2006). Otros estudios indican que el complejo ADAM1a/ADAM2 sería esencial para la correcta localización de ADAM3 en la superficie del espermatozoide, y ADAM3 sería la molécula requerida para la unión espermatozoide-ZP (Kim et al. 2006). Sin embargo, se ha reportado que los espermatozoides KO para estas proteínas ADAM tienen la capacidad de fertilizar ovocitos rodeados de cúmulus al inseminarlos directamente dentro de la ampulla, salteando la migración de la unión UTJ, indicando que la etapa de unión a la ZP podría no ser importante en la interacción espermatozoide-ovocito *in vivo* (Okabe 2013). El mismo fenotipo se ha descrito para ratones KO para la proteína epididimaria RNasa 10 (Krutskikh et al. 2012).

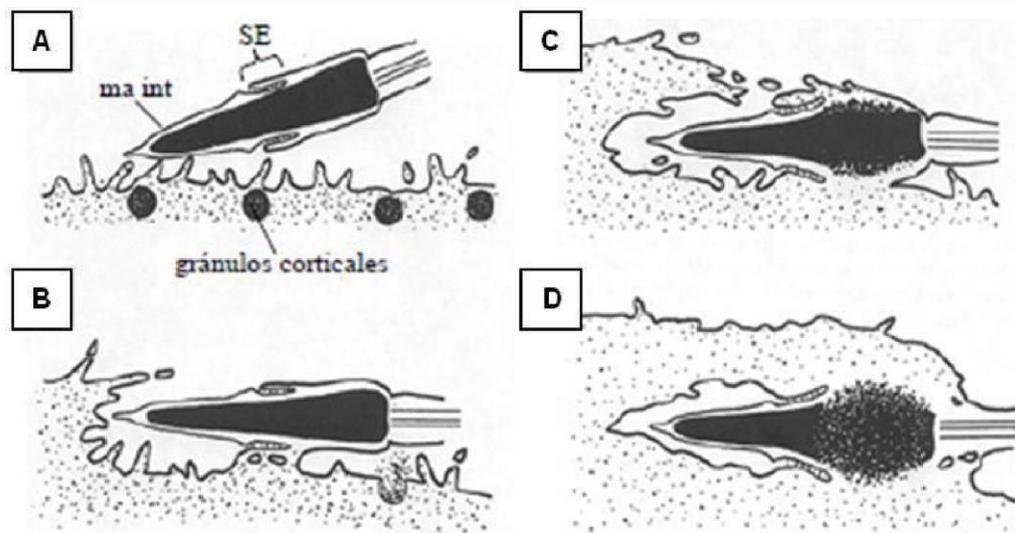
La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP para la cual se han propuesto dos hipótesis (Yanagimachi 1994). Una de ellas, la hipótesis “enzimática”, sostiene que el pasaje a través de la ZP sería dependiente de la acción de enzimas presentes en el acrosoma. Según esta teoría, la mayoría de dichas enzimas serían liberadas sobre la superficie de la ZP durante la RA, provocando la hidrólisis de la porción de la ZP que rodea al espermatozoide y haciendo más permeable a la misma. Otras enzimas permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de procesar a las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se hubiera unido, permitiendo así el avance a través de la ZP. La segunda hipótesis, denominada “mecánica” propone que el contacto con la ZP llevaría a la exposición del perforatorium, una estructura rígida del espermatozoide que, conjuntamente con la fuerza mecánica aportada por la HA, permitiría la penetración de la ZP. Esta hipótesis ha sido respaldada fuertemente por las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos euterianos, incluyendo la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil filoso del perforatorium y la rigidez de la membrana acrosomal interna (J. Michael Bedford 2004).

La penetración de la ZP es la etapa más especie-específica del proceso de fertilización ya que un espermatozoide es capaz de penetrar solo la ZP de un ovocito de la misma especie. Si bien se conoce la existencia de casos de mamíferos híbridos provenientes de dos especies diferentes (león y tigre, asno y caballo, entre otros), en general la reproducción interespecífica no tiene lugar tanto por factores comportamentales y anatómicos como por las barreras celulares tales como la ZP (Hanada and Chang 1972). Al respecto, en el modelo de animales quiméricos donde ZP2 y ZP3 del ratón han sido reemplazadas por las proteínas humanas, se observó que los ovocitos fueron fertilizados por espermatozoides de ratón pero no así de humanos, sugiriendo que los oligosacáridos unidos, más que la secuencia peptídica en sí misma, serían los responsables de la especie especificidad (Rankin et al. 2003). Por otra parte, cada vez existe más consenso de que la unión a la ZP y la especie-especificidad no están dadas por una sola proteína sino por varias, concepto también apoyado por la observación de la agregación de varias proteínas que participan en la interacción espermatozoide-ZP localizadas en la región de la cabeza del espermatozoide por donde ocurre dicha interacción (Reid et al. 2011).

### **Fusión del espermatozoide con el ovocito**

Una vez que el espermatozoide ha penetrado la ZP, rápidamente atraviesa el espacio perivitelino, microambiente que contiene vesículas membranosas secretadas por el ovocito que serían capaces de interactuar con el espermatozoide favoreciendo su capacidad fusogénica (Miyado et al. 2008). A continuación, tiene lugar la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito, solo luego de lo cual un ovocito puede considerarse fertilizado. La fusión espermatozoide-ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión, y una segunda de fusión, propiamente dicha. Este proceso comienza con la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito y, luego de un breve período que varía según la especie, se produce la fusión entre la membrana plasmática del segmento ecuatorial y las microvellosidades del oolema y una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola del espermatozoide (Gaddum-Rosse 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi and Phillips 1980). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de un proceso de

fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis. (Figura 17).



**Figura 17 Fusión espermatozoide-ovocito.** Se muestra un esquema de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. (A) Inicio de la interacción entre el segmento ecuatorial y el oolema, (B) Fusión de algunos puntos, (C) la membrana del ovocito rodea la parte anterior de la cabeza, (D) se incorpora el espermatozoide al ooplasma mediante fusión de la parte posterior de cabeza y la cola, y fagocitosis de la parte anterior. ma int: membrana acrosomal interna, SE: segmento ecuatorial (Yanagimachi 1994).

Los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambas gametas ya que no toda la membrana plasmática es fusogénica. Tal como se mencionara anteriormente, el ovocito de roedores se encuentra recubierto de microvellosidades en toda su superficie, con excepción del área que recubre al huso meiótico (Ebensperger and Barros 1984) y a través de la cual raramente ocurre la fusión (Ebensperger and Barros 1984; Johnson et al. 1975). En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial es la que primero se fusiona con el ovocito (Arts et al. 1993; Yanagimachi and Bhattacharyya 1988). Si bien se creía que la motilidad no era un requisito para la fusión, más recientemente se ha propuesto que un tipo de motilidad sutil sería necesaria para estimular la fusión de las membranas (Ravaux et al. 2016). Por otro lado, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión ya que solo luego de

dicha reacción, el segmento ecuatorial adquiere propiedades fusogénicas de modo que los espermatozoides no reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema (Yanagimachi 1994).

En cuanto a la especificidad de especie del proceso de fusión de gametas, la misma es menos restringida que para la penetración de la ZP. La fusión de gametas heterólogas es posible, en algunos casos, pero solo con gametas provenientes de determinadas especies, y no siempre en ambas direcciones. Como ejemplo, los ovocitos de rata pueden ser penetrados heterológamente por espermatozoides de ratón, pero los ovocitos de ratón no pueden ser penetrados por espermatozoides de rata (Yanagimachi 1994). En el caso del ovocito de hámster, al remover la ZP, el mismo puede ser penetrado por espermatozoides de distintas especies inclusive de la especie humana (OMS, 2010).

Si bien el proceso de fusión es un punto clave de la fertilización, es muy escasa la información disponible sobre los mecanismos moleculares involucrados en esta etapa. Al igual que ocurre para la unión a la ZP, la fusión está mediada por la interacción de moléculas complementarias localizadas en los dominios fusogénicos específicos de las membranas de ambas gametas. En cuanto a los componentes de la membrana del ovocito, las integrinas fueron las primeras moléculas postuladas como mediadoras del proceso de fusión, por tratarse de ligandos específicos de proteínas presentes en el espermatozoide ya involucradas en este proceso. La integrina  $\alpha 6 \beta 1$ , una de las principales en la superficie del ovocito, fue originalmente propuesta como la responsable de la unión espermatozoide-ovocito (Almeida et al. 1995; Bigler et al. 2000). Sin embargo, el hecho de que animales KO para esta integrina fueran fértiles, cuestionó la relevancia de la misma para la fertilización (Miller et al. 2000). Asimismo, la importancia de las integrinas para la fusión ha sido replanteada en vista de un estudio en el cual utilizando diferentes combinaciones de animales KO para integrinas y ensayos de fusión *in vitro* en presencia de anticuerpos, se demostró que ninguna de las integrinas conocidas en la superficie del ovocito (integrina  $\alpha 2$   $\alpha 5$   $\alpha 9$   $\alpha V$   $\beta 3$  y  $\beta 5$ ) sería esencial para este proceso (He et al. 2003).

La asociación entre la integrina  $\alpha 6 \beta 1$  y la tetraspanina CD9 en la membrana del ovocito de ratón (Chen et al. 1999), y el hecho de que esta tetraspanina haya sido implicada en la fusión de membranas en otros sistemas celulares (Tachibana and Hemler 1999), sugirió que

CD9 también podría cumplir alguna función en el proceso de fusión de gametas. Esta hipótesis fue confirmada por el estudio de animales KO para CD9 (Kaji et al. 2000; Miyado et al. 2000), demostrando que las hembras mutantes son estériles y que sus ovocitos, a pesar de unir espermatozoides, son incapaces de fusionarse con los mismos. De acuerdo a estos resultados, CD9 sería una de las moléculas del ovocito responsable del proceso de fusión con el espermatozoide. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fusión de gametas y para la fertilidad femenina.

Por otra parte, los animales KO para proteínas del ovocito unidas al oolema vía GPI también presentan ovocitos con la fusogenicidad altamente afectada (Alfieri et al. 2003). En este sentido, se ha identificado a la proteína receptor de folato 4 (JUNO), anclada a la membrana del ovocito por GPI, como esencial para la fertilización (Bianchi et al., 2014). Los autores observaron que la presencia de anticuerpos anti-JUNO bloqueaba la fertilización de ovocitos de ratón sin ZP. Asimismo, las hembras KO para esta proteína resultaron infértiles y sus ovocitos presentaron fallas en la interacción con la membrana del espermatozoide. Además, se observó que JUNO es liberada rápidamente del ovocito fertilizado contenida en vesículas, contribuyendo al mecanismo de bloqueo de polispermia (Bianchi et al. 2014). En este sentido, en los ovocitos activados partenogénicamente mediante la exposición a compuestos farmacológicos tales como el Sr<sup>2+</sup>, no se produce la salida de JUNO del interior celular.

Respecto a las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión hasta el momento solo IZUMO1 resultó ser completamente esencial para la fusión. La proteína IZUMO1, corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide (Inoue et al. 2005). La relevancia de esta proteína para la fertilidad y su rol en el proceso de fusión fueron confirmados mediante el análisis de los animales KO para IZUMO mostrando que los machos mutantes son estériles debido a que tienen comprometida la capacidad fusogénica de sus espermatozoides (Inoue et al. 2005). En este sentido, resultados utilizando ratones KO para Tssk6 (testis-specific serine kinase 6) mostraron que sus espermatozoides eran incapaces de fusionarse con el ovocito debido a que la proteína IZUMO no se redistribuía correctamente (Sosnik et al. 2009). Estudios posteriores identificaron a la proteína recién mencionada JUNO como receptor de IZUMO1 en la membrana del ovocito (Bianchi et al. 2014). La unión IZUMO1-

JUNO estaría conservada en distintas especies de mamíferos tales como humano y cerdo. La interacción entre estas dos proteínas sería de baja afinidad y ocurriría en los primeros pasos del proceso de fusión, que iniciaría la formación de un agregado molecular o clustering de alta afinidad y robusto entre ambas membranas formado por CD9 e IZUMO1. Por lo tanto, la correcta interacción entre las moléculas JUNO-IZUMO1 estaría fortalecida por la tetraspanina CD9 (Chalbi et al. 2014), la cual fue propuesta previamente como organizadora de las microdominios implicados en la fusión de membranas (Hemler 2005). Más aún, se ha demostrado que la proteína IZUMO de espermatozoides humanos tiene la capacidad de interactuar con la molécula JUNO presente en ovocitos de hámsters, siendo este el posible mecanismo por el cual los ovocitos de dicha especie pueden ser penetrados y fusionarse con espermatozoides humanos (Bianchi & Wright, 2015). Luego de ocurrida la fusión, se observa una pérdida progresiva de la marca correspondiente a IZUMO1 (Satouh et al. 2012).

Si bien, como se ha explicado, se han descrito proteínas de ambas gametas que son relevantes y/o esenciales para la etapa de fusión de gametas, ninguna de ellas es suficiente como para inducir la fusión de membranas (Wright and Bianchi 2016). Recientemente se ha identificado a HAP2 de plantas como el primer fusógeno sexual, formando parte de una super-familia de proteínas conservadas a lo largo de la evolución denominadas Fusexinas (fusion proteins essential for sexual reproduction and exoplasmic merger of plasma membranes) (Valansi et al. 2017) abriendo la posibilidad de que el fusógeno aún no identificado en mamíferos pertenezca a dicha familia.

Más allá del par IZUMO-JUNO, se han descrito varias proteínas del espermatozoide involucradas en el proceso de fusión (Cuasnicú et al. 2016) entre las cuales se encuentran las proteínas CRISP que se describen en detalle en la próxima sección.

## ACTIVACIÓN DEL OVOCITO Y DESARROLLO PREIMPLANTATORIO

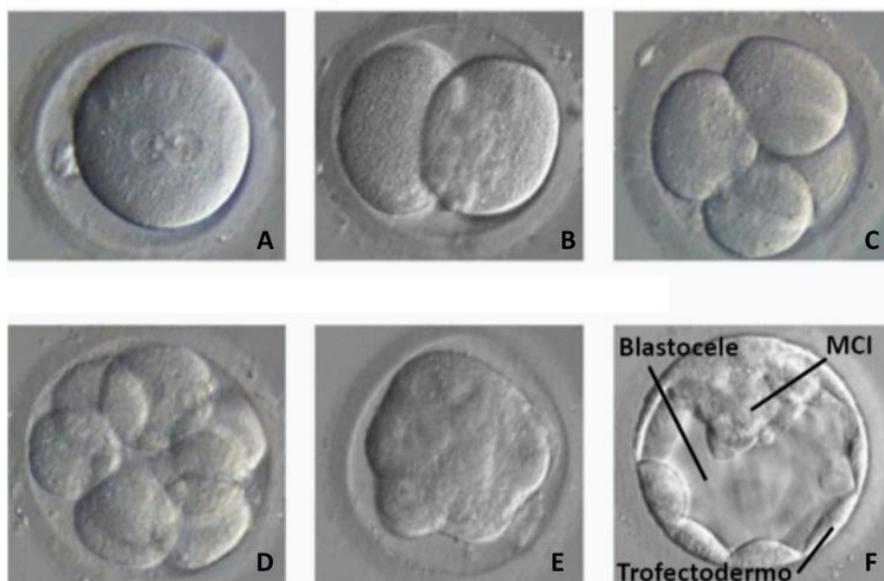
Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que involucran el reinicio de la actividad del mismo. Luego de este proceso denominado activación, le sigue el desarrollo embrionario preimplantatorio, el cual en una primera etapa ocurre bajo silencio transcripcional, e involucra la migración y fusión de los pronúcleos materno y paterno, la reprogramación genética y epigenética, la activación del genoma embrionario y una serie de divisiones mitóticas que resultan en la formación de una mórula compacta, que luego dará origen al blastocisto (Ramathal, Reijo Pera, and Chavez 2014). De forma más detallada, unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce un aumento transitorio de los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmático en el ovocito (Yanagimachi 1994) desencadenando la activación del mismo. Los indicadores más visibles de la activación son la exocitosis de los gránulos corticales y el reinicio de la meiosis.

En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana que contienen mucopolisacáridos y diversas enzimas (Ducibella 1991). Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales han sido expulsados por exocitosis (Ducibella 1991; Hoodbhoy and Dean 2004). Su función es modificar la ZP, como así también el oolema de forma tal de prevenir la polispermia. En este sentido, se ha descrito que la proteína ovastacina presente en estos gránulos, estaría involucrada en el clivaje de ZP2, generando en consecuencia, la modificación en la ZP (Burkart et al. 2012) mientras que, como se mencionara anteriormente, la proteína Juno se liberaría de la membrana plasmática del ovocito (Bianchi et al. 2014).

En paralelo, ocurre el reinicio de la meiosis, razón por la cual es liberado el segundo corpúsculo polar y el complemento haploide se transforma en el pronúcleo femenino. A su vez, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica.

La mitosis continúa durante el desarrollo preimplantatorio hasta que ocurre la compactación (en el estadio de 8 ó 16 células en el ratón o el humano, respectivamente)

para formar la mórula (Mulnard and Huygens 1978), siendo la primera indicación morfológica de una disrupción en la simetría radial durante el desarrollo. Una vez ocurrida la compactación y polarización, las divisiones subsecuentes y el destino de las células hijas están determinados por la orientación del plano de clivaje (Johnson and Ziomek 1981; Sutherland, Speed, and Calarco 1990). A través de divisiones simétricas y asimétricas se generan a continuación dos poblaciones celulares distintivas: las células interiores formarán el macizo celular interno (MCI), mientras que las exteriores contribuirán al trofotodermo. Este proceso termina con la formación del blastocisto que comprende una cavidad llena de líquido denominada blastocèle y el MCI rodeado de células del trofotodermo (Figura 18). Mientras que el MCI dará lugar al embrión, el trofotodermo formará las porciones fetales de la placenta más tarde en el desarrollo (Edwards et al. 1981). Finalmente, como parte de la preparación para su implantación en el útero, el blastocisto eclosiona de la ZP, permitiendo así el crecimiento y desarrollo del embrión, y el acceso de las células del trofotodermo al epitelio uterino para su adhesión.



**Figura 18 Desarrollo embrionario preimplantatorio.** Microfotografías correspondientes a embriones humanos de una (A), dos (B), cuatro (C) y ocho (D) células, mórulas (E) y blastocistos (F). MCI: Macizo celular interno. Los estadios mostrados son representativos de los mamíferos en general.

## LAS PROTEÍNAS CRISP Y SU ROL EN LA REPRODUCCIÓN

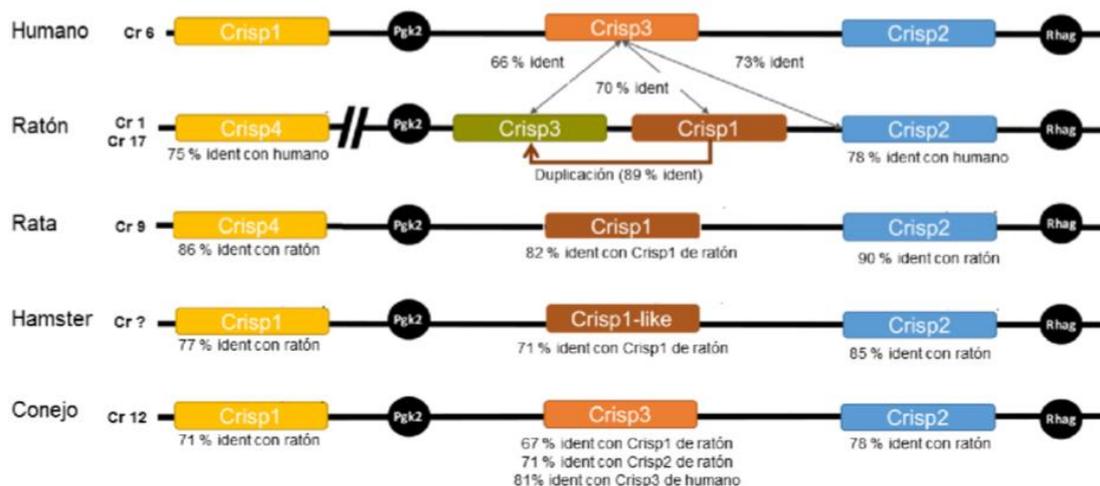
Como se mencionara anteriormente, una de las familias de proteínas propuestas como mediadoras del proceso de fertilización es la familia CRISP. Las CRISP (Cysteine-Rich Secretary Proteins), como su nombre lo indica, son proteínas secretorias ricas en cisteínas que se caracterizan por tener 16 cisteínas conservadas, 10 de las cuales se encuentran en el dominio C-terminal de la molécula (Gerard M Gibbs, Roelants, and O'Bryan 2008). Estudios de cristalografía indican que todos los miembros de la familia presentan una estructura general caracterizada por la presencia de dos dominios definidos: el dominio C-terminal denominado CRD (Cysteine Rich Domain), de aproximadamente 6 kDa, y el N-terminal llamado Pathogenesis Related 1 (PR-1) o dominio CAP de aproximadamente 21 kDa (Gibbs et al. 2006; Gerard M Gibbs et al. 2008; Guo et al. 2005). El CRD, a su vez, está compuesto por dos regiones: el Hinge y el ICR (Ion Channel Regulator). De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento, se ha sugerido que cada uno de los dos dominios tendría funciones biológicas independientes. Mientras se ha encontrado que el dominio CRD de varias proteínas CRISP, a través de su región ICR, presentaría la capacidad de regular canales iónicos (Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011; Guo et al. 2005), las evidencias indican que el dominio N-terminal participaría en la interacción entre membranas (Ellerman et al. 2006; Maeda, Nishida, and Nakanishi 1999). Por otra parte, el dominio CRD se conecta a través del Hinge con el PR-1, no existiendo ningún otro contacto ente el PR-1 y el ICR (Gerard M Gibbs et al. 2008). (Figura 19).



**Figura 19 Estructura de las CRISP.** Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas de la familia CRISP y su relación con las funciones propuestas.

Las familia CRISP junto a otras dos familias denominadas AG5 (Antigen 5) y PR-1 ( y PR-1 (Pathogenesis-Related Protein 1), conforman la superfamilia denominada CAP (CRISP, AG5, PR-1) cuyos miembros tienen en común al dominio PR-1, y están presentes desde procariontes hasta eucariotes, incluyendo hongos, plantas, y diversos grupos de animales como insectos, reptiles y mamíferos (Abraham and Chandler 2017; Gerard M Gibbs et al. 2008) donde se ha propuesto que cumplen roles en reproducción, en defensa contra patógenos y en toxicidad (Gerard M Gibbs et al. 2008).

La familia de proteínas CRISP surgió a partir de la adición del Hinge y del ICR al dominio PR-1 ancestral y se encuentra presente en algunos invertebrados tales como los insectos así como en toda clase de vertebrados (Abraham and Chandler 2017). Hasta el momento, las especies de mamíferos que han sido estudiadas presentan entre tres y cuatro genes distintos que codifican para proteínas CRISP. Dichos genes presentan un alto grado de conservación entre ellos en comparación con sus homólogos de reptiles (Sunagar et al. 2012). Si bien las relaciones evolutivas entre las CRISP de mamíferos aún se encuentran en debate, en un proyecto en colaboración con el Dr. Eduardo Roldan (España) hemos establecido parte de la historia evolutiva de la familia (Arevalo et al. n.d.). (Figura 20).



**Figura 20 Relación evolutiva entre proteínas CRISP en diferentes especies de mamíferos.** Esquema que indica la presencia de genes *Crisp* en diferentes especies de mamíferos, su localización en el genoma y porcentajes de identidad entre algunas de ellos. Los diferentes colores señalan los ortólogos directos (Arévalo et al., en revisión).

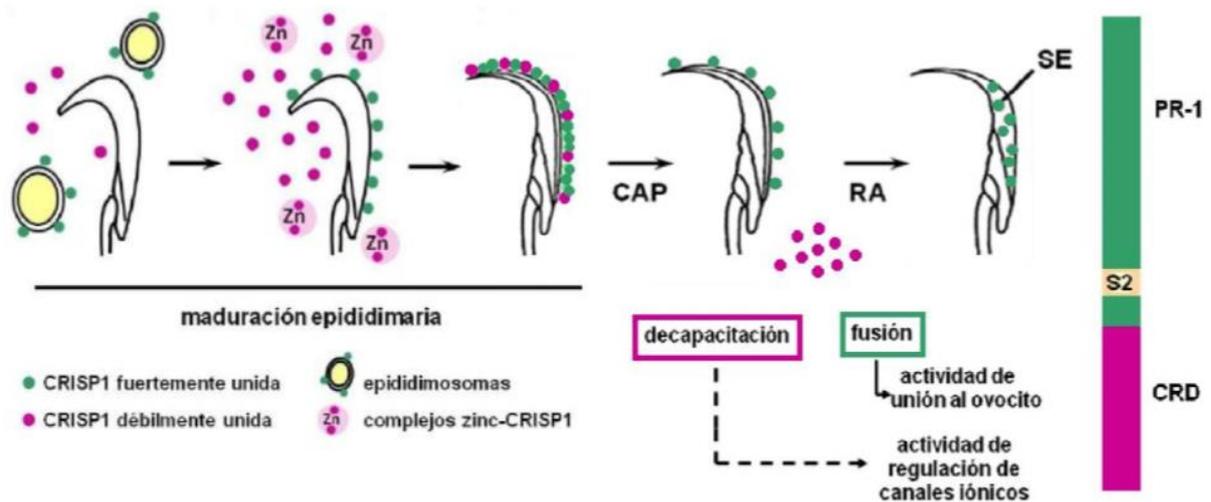
Las CRISP de mamíferos están presentes, mayoritariamente, en el tracto reproductor masculino: CRISP1 sintetizada en el epidídimo, CRISP2, de origen testicular, CRISP3, presente en órganos reproductivos y no reproductivos, y CRISP4 también de origen epididimario (Gerard M Gibbs et al. 2008). Las evidencias encontradas hasta el momento parecen indicar que las proteínas CRISP “escortarán” a los espermatozoides en todo momento desde su producción en el testículo, continuando con su maduración en el epidídimo, su contacto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación, su capacitación en el tracto femenino, su llegada al ovocito y, finalmente, su participación en las diferentes etapas del proceso de fertilización.

A continuación, haremos una descripción de cada una estas proteínas.

### **Proteína CRISP1**

La proteína CRISP1, el primer miembro descrito de la familia, ha sido identificada, caracterizada y purificada en nuestro grupo (Cameo and Blaquier 1976; Garberi et al. 1979; Garberi, Fontana, and Blaquier 1982) utilizando a la rata como modelo experimental. CRISP1, una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo en dicha especie, es sintetizada en forma andrógeno-dependiente (Kohane, Piñeiro, and Blaquier 1983) y se asocia a los espermatozoides a medida que los mismos transitan por el epidídimo (Kohane, Cameo, et al. 1980). Resultados posteriores de nuestro grupo indicaron la existencia de dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil, y una población minoritaria que se asocia con alta afinidad (Cohen, Rochwerger, et al. 2000). Además, otros resultados permitieron comprender mejor los mecanismos por los cuales las dos poblaciones de CRISP1 se asociarían a la membrana del espermatozoide durante la maduración epididimaria. La proteína CRISP1 fuertemente unida provendría de la transferencia de la misma desde los epididimosomas a los espermatozoides del caput epididimario (Maldera et al., 2006), y a medida que los mismos transitan por el epidídimo, se expondrían a concentraciones cada vez mayores de CRISP1 soluble presente en el lumen, la cual se uniría débilmente a la gameta por un mecanismo que involucra la formación de complejos entre la proteína y el

zinc (Maldera et al. 2011) (Figura 21). De esta manera, el espermatozoide maduro presentaría ambas poblaciones de CRISP1 en su superficie.

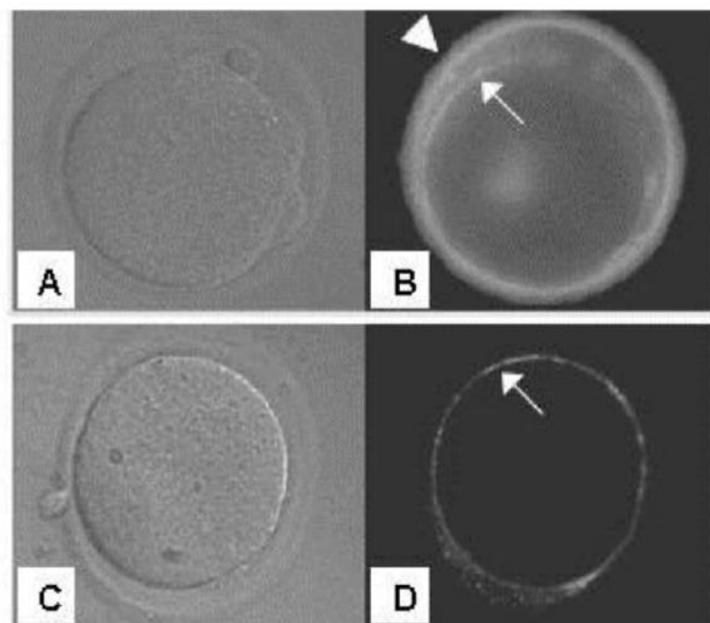


**Figura 21 Asociación de CRISP1 al espermatozoide.** Esquema de los mecanismos involucrados en la asociación de las dos poblaciones de CRISP1 al espermatozoide durante la maduración epididimaria y sus funciones. CAP: capacitación; RA: Reacción Acrosomal; SE: Segmento Ecuatorial.

Nuestras evidencias indican que durante la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes, se produce la liberación de una gran cantidad de CRISP1 (Cohen, Rochwerger, et al. 2000; Kohane, González Echeverría, et al. 1980), lo cual sugiere que esta proteína podría actuar como un factor decapacitante. En este sentido, Roberts y colaboradores (Roberts et al. 2003) han descrito que espermatozoides de rata capacitados en presencia de CRISP1 presentan una inhibición tanto en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como en la ocurrencia de la RA inducida por progesterona, ambos fenómenos asociados a la capacitación. Si bien una proporción de CRISP1 se libera durante la capacitación, estudios de microscopía electrónica detectaron la permanencia de una población de la misma en espermatozoides reaccionados (Cameo et al. 1986). Posteriormente, se observó que, luego de la capacitación tanto *in vitro* como *in vivo*, la proteína CRISP1 migra de la región dorsal de la cabeza del espermatozoide hacia el

segmento ecuatorial (Rochwerger and Cuasnicu 1992). Considerando que solo las proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación y/o RA pueden estar involucradas en la interacción con el ovocito, en nuestro laboratorio se realizaron diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP1 en la interacción de gametas. La exposición de espermatozoides de rata al anticuerpo anti-CRISP1 previo a la inseminación intrauterina produjo una disminución significativa en los porcentajes de ovocitos fertilizados (Cuasnicu et al. 1984). Este resultado constituyó la primera evidencia de la posible participación de CRISP1 en el proceso de fertilización. Estudios posteriores demostraron que la presencia de CRISP1 purificada durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados. La presencia de CRISP1 no afectó, sin embargo, la unión inicial de los espermatozoides al oolema, indicando que la proteína participaría en un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a la fusión de las membranas (Rochwerger and Cuasnicu 1992). Estos resultados sugerían la existencia de sitios de unión para CRISP1 en la membrana del ovocito, los cuales fueron detectados mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en toda la superficie del ovocito, exceptuando un área negativa correspondiente a la membrana plasmática que recubre el huso meiótico y por la cual raramente ocurre la fusión. Estudios posteriores, utilizando la proteína CRISP1 nativa deglicosilada, la proteína recombinante expresada en un sistema procariótico y una serie de fragmentos recombinantes, indicaron no solo que los carbohidratos no serían esenciales para el rol de la proteína en fusión (Ellerman et al. 2002) sino también que la región comprendida entre los aminoácidos 114-159 del dominio PR-1 mantendría la actividad biológica de la proteína completa. Un hallazgo muy interesante fue el hecho de que esta secuencia de 45 aminoácidos contuviera los dos motivos característicos de la familia CRISP, denominados Signature 1 y Signature 2. El uso de péptidos sintéticos correspondientes a estos dominios (denominados P1 y P2, respectivamente) en ensayos de IFI y de fertilización *in vitro* indicó que P2, pero no así P1, era capaz de unirse a la superficie del ovocito e interferir con la fusión de gametas. En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos altamente conservada de la familia CRISP, correspondiente al Signature 2 (Ellerman et al. 2006).

La proteína CRISP1 de ratón no solo presenta alta homología con la proteína CRISP1 de rata (Haendler et al. 1993; Mizuki and Kasahara 1992), sino también, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que se encuentra presente en la superficie del espermatozoide y participa en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito (Cohen, Ellerman, and Cuasnicú 2000; Da Ros et al. 2008). Más aún, ensayos de IFI mostraron la existencia de sitios complementarios para la proteína en la región fusogénica del ovocito murino, tal como previamente se había observado para la rata (Cohen, Ellerman, et al. 2000). Más allá de la participación de CRISP1 en la etapa de fusión de gametas, estudios posteriores evaluando el efecto de anti-CRISP1 y CRISP1 en el número de espermatozoides unidos por ovocito indicaron que la proteína participaría en el paso inicial de unión del espermatozoide a la ZP. Por otra parte, ensayos de IFI indicaron que mientras CRISP1 nativa era capaz de unirse al oolema y a la ZP (Figura 22), la proteína recombinante solo se unía al oolema, sugiriendo que la conformación de CRISP1, y no su glicosilación, sería importante para su unión a ZP (Busso, Goldweic, et al. 2007). En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 cumpliría una doble función en la interacción de gametas participando tanto en la etapa de fusión como en la de interacción espermatozoide-ZP a través de sitios complementarios en el ovocito.



**Figura 22 Localización de los sitios complementarios a CRISP1 en el ovocito.** Microfotografías de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP1 nativa (A y B) y de CRISP1 recombinante (C y D) tanto en la ZP (punta de flecha) como en el oolema (flecha) (Busso, Cohen, et al. 2007).

Por otro lado, se ha descrito una proteína humana denominada ARP o hCRISP1 (Hayashi et al. 1996; Krätzschar et al. 1996) con altos niveles de homología con CRISP1 de roedor. Resultados de nuestro grupo revelaron que hCRISP1 también se encuentra unida al espermatozoide humano y participa en la unión del mismo a la ZP y en la fusión de gametas (Cohen et al. 2001; Maldera et al. 2014). Pese a que hCRISP1 sería en realidad el ortólogo directo de CRISP4 de ratón y de rata, al momento de describir la proteína humana no se había identificado a CRISP4 de roedores por lo cual se le dio en nombre de hCRISP1. De todos modos, las evidencias sugieren que hCRISP1 cumpliría el papel de homólogo funcional tanto de CRISP1 como de CRISP4 de roedores. Considerando que los humanos poseen solo tres proteínas CRISP (hCRISP1, hCRISP2 y hCRISP3), se ha propuesto que hCRISP1, altamente expresada en el epidídimo, sería la equivalente a la combinación de las proteínas epididimarias de ratón CRISP1 y CRISP4 (Jalkanen, Huhtaniemi, and Poutanen 2005).

Además de su participación en el proceso de fertilización, CRISP1 resultó relevante para la fertilidad de un individuo a juzgar por experimentos indicando que la inmunización activa de ratas machos y hembras con CRISP1 era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Martinez, Conesa, and Cuasnicú 1995). Estudios posteriores indicaron que dicho efecto ocurriría a través de un mecanismo específico que involucra la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, su asociación a los espermatozoides, y la posterior inhibición de su capacidad fertilizante sin provocar efectos patológicos (Ellerman et al. 1998). Estos resultados indicaron la relevancia de CRISP1 para la fertilidad de un individuo como así también el potencial uso de esta proteína para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad. En este sentido, en nuestro grupo también evaluamos si la inmunización con hCRISP1 recombinante generaba una respuesta inmune específica en primates no humanos, observándose una respuesta inmune específica en monos de ambos sexos. Los sueros inmunes fueron capaces de reconocer a la proteína nativa de mono tanto en extractos proteicos de espermatozoides por WB como sobre espermatozoides frescos por IFI. Además, ensayos de ELISA e IFI indicaron que los anticuerpos anti-hCRISP1 no solo se encontraban presentes en el plasma seminal sino también unidos a los espermatozoides provenientes de animales inmunizados con hCRISP1, sin observarse efectos sobre el número, morfología y

motilidad de dichos espermatozoides, excluyendo así posibles efectos deletéreos de la inmunización (Ellerman et al. 2010). Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-hCRISP1 podrían estar involucrados en inmuno-infertilidad abriendo la posibilidad de utilizar a la proteína hCRISP1 para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad.

Con el fin de investigar más profundamente la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, en el laboratorio se generó una línea de ratones KO para dicha proteína mediante estrategias de recombinación homóloga. De esta manera, se logró establecer una colonia de animales deficientes en CRISP1 con un fondo genético mixto (129/SvEvxC57B/6) que constituyeron los primeros animales KO producidos para una proteína de la familia CRISP. El análisis del fenotipo de los animales carentes de CRISP1 mostró que los mismos eran normales en cuanto a su viabilidad y crecimiento, y no presentaban diferencias en su fertilidad respecto a los animales control. Sin embargo, el análisis de diversos parámetros funcionales de los espermatozoides reveló que, si bien los mismos presentaban una motilidad, viabilidad y RA normal, exhibían una marcada disminución en el nivel de pTyr, evento clave dentro del proceso de capacitación (Da Ros et al., 2008) así como en los porcentajes de HA (Weigel Muñoz et al. 2018). Además, los machos de una nueva colonia KO para CRISP1 (KO C1) con fondo genético homogéneo C57BL/6 presentaron defectos en otros parámetros tales como la motilidad y la RA inducida (Weigel Muñoz et al. 2018).

En relación a la capacidad fertilizante, se observó que los espermatozoides de los animales carentes de CRISP1, ya sea de fondo genético homogéneo o híbrido, fueron capaces de fertilizar *in vitro* un porcentaje de ovocitos similar al de los espermatozoides control cuando los ovocitos se encontraban rodeados de células de cúmulus. Sin embargo, al remover estas células, los espermatozoides KO mostraron una capacidad fertilizante significativamente menor que los controles, sin acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, apoyando la participación de CRISP1 en la interacción espermatozoide-ZP. Más aún, en concordancia con el rol propuesto para la proteína en la etapa de fusión de gametas, los ensayos de fertilización *in vitro* utilizando ovocitos sin ZP mostraron una disminución significativa en la capacidad fusogénica de los espermatozoides mutantes (Da Ros et al. 2008). Para explorar la posibilidad de que otras proteínas CRISP estuvieran compensando la ausencia de CRISP1 en el animal KO, se investigó el efecto inhibitorio *in vitro* tanto de la proteína CRISP1 de rata como de otras proteínas CRISP en la capacidad

fusogénica de espermatozoides KO. La idea de estos experimentos radicaba en que, si la presencia de la proteína CRISP soluble inhibía aún más la capacidad fusogénica del espermatozoide KO, dicho espermatozoide se estaría uniendo, probablemente, al mismo sitio complementario de CRISP1 en el oolema, pero a través de otra proteína del espermatozoide. El hallazgo de que las proteínas CRISP1 y CRISP2 pero no así la proteína hCRISP1, redujeran significativamente aún más la capacidad fusogénica de los espermatozoides KO, apoyó la idea de que otra proteína homóloga a CRISP1, y con un S2 muy similar tal como CRISP2 estaría involucrada en la fusión de gametas, cooperando funcionalmente con CRISP1. Tampoco se puede descartar que CRISP3 o CRISP4 se encontraran también compensando la falta de CRISP1.

Posteriores resultados obtenidos mediante registros electrofisiológicos en espermatozoides de ratón indicaron claramente que la proteína CRISP1 sería capaz de regular los canales de calcio TRPM8 y CatSper (Ernesto et al. 2015), siendo de esta forma CRISP1 el primer inhibidor fisiológico descrito para el principal canal de  $Ca^{2+}$  del espermatozoide. Más aún, se observaron menores niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en espermatozoides expuestos a CRISP1 a través de mediciones de microscopía en tiempo real utilizando una sonda sensible a dicho ion (Ernesto et al. 2015), consistente con las evidencias previas indicando que las CRISP de venenos de reptiles son capaces de regular una amplia variedad de canales iónicos (Gerard M Gibbs et al. 2008). En conjunto, los resultados nos han llevado a proponer que mientras la población de CRISP1 fuertemente unida al espermatozoide participaría en la interacción con el ovocito a través del dominio PR-1, la proteína CRISP1 débilmente unida al espermatozoide que se libera durante la capacitación cumpliría un rol como factor decapacitante regulando canales de  $Ca^{2+}$  TRPM8 y CatSper, muy probablemente, a través del dominio CRD.

Además de su presencia y función biológica en el tracto reproductivo masculino, CRISP1 se encontraría presente a lo largo del tracto femenino incluyendo útero, oviductos y ovarios (Ernesto et al. 2015; Gerard M Gibbs et al. 2008). Más aun, evidencias de nuestro laboratorio indican que CRISP1 se expresaría en el *cumulus oophorus* que rodea a los ovocitos y participaría en el proceso de fertilización cumpliendo un rol durante la etapa de penetración del cúmulus a juzgar por la menor capacidad de los espermatozoides de penetrar y fertilizar COC provenientes de hembras KO C1 (Ernesto et al. 2015). Más específicamente, hemos

observado que, al igual que lo reportado para la proteína CRISP homóloga en anfibios denominada “allurina” (Burnett et al. 2012), CRISP1 actuaría como quimioattractante de espermatozoides en mamíferos. Asimismo, la incubación de espermatozoides en presencia de CRISP1 provoca una disminución en los porcentajes de hiperactivación probablemente por la ya mencionada capacidad de CRISP1 de inhibir CatSper (Ernesto et al, 2015). Teniendo en cuenta estos resultados, y evidencias que indican que para que un espermatozoide pueda orientarse en respuesta a un quimiotractante debe bajar su HA (Armon and Eisenbach 2011; Boryshpolets, Pérez-Cereales, and Eisenbach 2015) postulamos que CRISP1 del cúmulo ejercería su función quimioattractante a través de la modulación de la HA de los espermatozoides a medida que penetran el cumulus, guiándolos hacia el ovocito (Ernesto et al. 2015). Por último, existen evidencias en roedores acerca de la expresión de CRISP1 en tejidos de secreción exocrina tales como las glándulas salivales y lacrimales (Eberspaecher et al. 1995; Haendler et al. 1993, 1999) como así también en órganos de importancia inmunológica tales como el bazo y el timo (Gerard M Gibbs et al. 2008; Reddy, Gerard M Gibbs, et al. 2008) lo cual se describirá en detalle en última sección acerca de las CRISP y el sistema inmune.

### **Proteína CRISP2**

En el año 1987, se reportó la identificación de una secuencia en el cromosoma 17 de ratón de expresión testicular (Kasahara, Figueroa, and Klein 1987), cuyo producto resultó tener una alta homología con la proteína de rata CRISP1 (Kasahara et al. 1989). La secuencia codificante predecía una proteína secretoria rica en residuos Cys en su porción C-terminal a la que se denominó Testicular Protein 1 (Tpx-1). Dada la similitud de Tpx-1 con CRISP1, posteriormente se propuso denominarla CRISP2 (Haendler et al. 1993). A lo largo de los años, la proteína ha sido identificada en varias especies y con un alto grado de conservación de secuencia aminoacídica entre ellas (Giese et al. 2002; Hardy et al. 1988; Kasahara et al. 1989; O’Bryan et al. 1998). Más aún, se ha demostrado que CRISP2 es la única CRISP que se expresa mayoritariamente en el testículo, no está glicosilada y su expresión no se encuentra regulada por andrógenos (Gerard M Gibbs et al. 2008).

CRISP2 se encuentra en la superficie de las células espermatogénicas en el testículo (Maeda et al. 1998) y en el interior de los espermatozoides de distintas especies (cobayo:

(Hardy et al. 1988; O'Bryan et al. 2001); ratón: (Busso, Goldweic, et al. 2007) y humano: (Busso et al. 2005). Más específicamente, se localiza dentro del acrosoma, en la pieza conectora del cuello y en las fibras densas externas de la cola (rata y ratón: (Gerard M Gibbs et al. 2008; O'Bryan et al. 1998, 2001)). Estudios de estructura-función demostraron que mientras el dominio N-terminal de la molécula exhibe actividad de unión entre células germinales y células de Sertoli (Maeda et al. 1999), la región C-terminal es capaz de regular el flujo del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales rianodínicos (Gibbs et al. 2006).

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo ha realizado diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP2 en la interacción de gametas. Mediante ensayos de extracción proteica y de IFI, se observó que, tanto en el ratón como en el humano, CRISP2 es una proteína acrosomal que se mantiene asociada al segmento ecuatorial del espermatozoide luego de la RA (Busso et al. 2005; Nimlamool, Bean, and Lowe-Krentz 2013). En concordancia con la localización de CRISP2 en el segmento ecuatorial, nuestro grupo mostró que esta proteína también participa en el proceso de fusión de gametas en roedores y en humano (Busso et al. 2005; Busso, Goldweic, et al. 2007; Muñoz et al. 2012) y en ambos casos a través de su unión a sitios complementarios en el ovocito. Más aun, se observó que CRISP2 se uniría a los mismos sitios en el ovocito a los que se une CRISP1 (Busso, Goldweic, et al. 2007). La participación de CRISP2 en fusión fue luego confirmada utilizando un modelo de ratones KO para CRISP2 (KO C2) desarrollado por nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr Okabe (Universidad de Osaka, Japon) (Brukman et al. 2016). Además de presentar deficiencias en su capacidad de fusión al ovocito, los espermatozoides carentes de CRISP2 tuvieron dificultades para penetrar la ZP asociadas a defectos en el desarrollo de la HA durante la capacitación. En este sentido, otro trabajo recientemente publicado donde utilizan animales KO C2 reveló que los espermatozoides de estos animales tendrían defectos de motilidad asociados a una rigidez de la pieza media del espermatozoide (Lim et al. 2019). Un análisis más minucioso reveló que la falta de CRISP2 generaba alteraciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular espermáticos que podrían explicar los defectos observados en la capacitación (Brukman et al. 2016). A pesar de su relevancia en varios procesos, los animales KO C2 resultaron fértiles en condiciones de apareo normales. Sin embargo, cabe mencionar que se observó una bajada significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vivo* cuando los machos KO C2 se apareaban con hembras superovuladas, lo cual representa una

condición más demandante que el apareo con hembras en estro. Más aun, cuando los animales eran sometidos a una vasectomía unilateral como modo de generar otro tipo de condición de exigencia, observamos que los machos KO C2 exhibían una subfertilidad no observada en los animales *Wild type* (WT) vasectomizados (Brukman et al. 2016), poniendo de manifiesto la relevancia de CRISP2 para la fertilidad. Además de nuestras observaciones en roedores, diferentes trabajos sugieren que CRISP2 también sería relevante para la fertilidad humana a juzgar por la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 en pacientes inmuno-infértiles con anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal (Domagała et al. 2007). Por otro lado, se han encontrado rearrreglos cromosómicos en la región donde se ubica el gen de *Crisp2* asociados con infertilidad en tres hermanos y en otros tres hombres no relacionados (Olesen 2001; Paoloni-Giacobino et al. 2000). Más aún, se hallaron menores niveles de la proteína CRISP2 y alteraciones en su localización en hombres infértiles con azoospermia o oligo-astenoteratozoospermia (Du et al. 2006) o astenozoospermia (Jing et al. 2011). Más recientemente, un estudio retrospectivo demostró que una disminución en la expresión de CRISP2 correlacionaba con una menor motilidad progresiva y una mala morfología de los espermatozoides (Zhou et al. 2015). En conjunto, estas evidencias sugieren que los defectos en fertilidad de los pacientes con expresión aberrante de CRISP2 podrían ser consecuencia de una menor funcionalidad de los espermatozoides.

### **Proteína CRISP3**

El tercer miembro de la familia CRISP fue originalmente identificado en la glándula salival del ratón, donde se observó que el promotor del gen presentaba dos elementos de respuesta a andrógenos (Schwidetzky, Haendler, and Schleuning 1995). A continuación, se describió la expresión del mensajero de CRISP3 en las células linfoides pre-B en el ratón (Pfisterer et al. 1996) y, se detectó su expresión en órganos tanto reproductivos (próstata, útero) como no reproductivos (timo, bazo) (Evans et al. 2015; Reddy, Gerard M. Gibbs, et al. 2008). Posteriormente, se identificó una glicoproteína de aproximadamente 28 kDa homóloga a CRISP2 en la matriz de los gránulos de los neutrófilos humanos (Udby, Calafat, et al. 2002; Udby, Cowland, et al. 2002). Casi simultáneamente, se caracterizó la expresión y distribución de los mensajeros que codifican para CRISP1, CRISP2 y CRISP3 en los tejidos humanos, observándose que CRISP3 se expresaba predominantemente en glándula salival, páncreas y próstata, y en menor

proporción en el epidídimo, ovario, timo y colon (Krätzschar et al. 1996). A pesar de que las nuevas evidencias indican que CRISP3 humana sería más cercana a CRISP1 de ratón, el hecho de que CRISP3 de ambas especies compartieran un patrón de expresión más amplio, que involucra órganos del sistema inmunológico, llevó a considerarlas homólogas funcionales.

En el caballo se ha observado que CRISP3, originalmente denominada HSP-3, es una proteína abundante del plasma seminal (aproximadamente 1 mg / ml) la cual se produce, principalmente, en la ampolla del conducto deferente y en las vesículas seminales (Magdaleno et al. 1997). CRISP3 equina no se encuentra glicosilada y se localiza en la región post-acrosomal y pieza media de los espermatozoides (Magdaleno et al. 1997). Asimismo, la existencia de polimorfismos en el gen de *Crisp3* asociados a diferencias en la fertilidad de los caballos que presentan estos polimorfismos indica la relevancia de la proteína para la fertilidad en esta especie (Ferlin et al. 2007).

En el humano, CRISP3 se encuentra en altas concentraciones en saliva y plasma seminal, y en menor medida en plasma sanguíneo y sudor (Udby, Cowland, et al. 2002). En todos los fluidos, se encuentran dos formas de la proteína madura, una N-glicosilada que presenta un peso molecular aparente de entre 29-31 KDa, y otra no glicosilada con un peso molecular aparente de entre 27-29 KDa (Udby, Cowland, et al. 2002). Se ha observado que, tanto en plasma sanguíneo como en el plasma seminal, CRISP3 se encuentra formando un complejo con las proteínas  $\alpha$ 1 $\beta$ glicoprotein y  $\beta$ -microseminoprotein (MSP), respectivamente (Udby 2005; Udby et al. 2004). Si bien la importancia de dichas interacciones se desconoce, se ha observado la existencia de una interacción específica de alta afinidad entre MSP y el dominio PR-1 de la proteína CRISP3 (Gerard M Gibbs et al. 2008). Por otra parte, se ha descrito la expresión de CRISP3 en el epitelio secretor de todo el tracto reproductor masculino, desde el testículo hasta la próstata. Curiosamente, si bien se detectó una altísima expresión en el cauda epididimario, no se encontraron diferencias en la concentración de CRISP3 en el plasma seminal de los pacientes vasectomizados respecto a los controles por lo cual los autores sugieren que la mayor fuente de CRISP3 del plasma seminal provendría de los órganos que se encuentran río abajo del epidídimo (Udby 2005). Asimismo, posteriores evidencias aportadas por nuestro laboratorio indican que CRISP3 se encuentra presente en los espermatozoides humanos eyaculados y se mantiene unida a los mismos incluso después

de la RA (Da Ros et al. 2015). Pese a que estas evidencias sugieren que la proteína hCRISP3 también podría estar participando en el proceso de fertilización como fuera mencionado anteriormente para hCRISP1 y hCRISP2, no se ha logrado inhibir la fusión de gametas al incubar a los espermatozoides humanos con un anticuerpo anti-CRISP3 (Da Ros et al. 2015). Por otro lado, si bien el rol de CRISP3 en la unión de los espermatozoides a la ZP aún no ha sido estudiado, se ha propuesto que la proteína MSP, que interactúa con CRISP3, participaría en esta etapa de la fertilización (Franchi et al. 2008; Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Con respecto al ratón, las evidencias son aún más escasas. y se limitan a la descripción de la presencia de CRISP3 en algunos órganos del aparato reproductor masculino y femenino tales como próstata y útero (Evans et al. 2015; Reddy, Gerard M Gibbs, et al. 2008), no habiéndose generado aun KO para esta proteína.

#### **Proteína CRISP4**

CRISP4 es el último miembro descrito de la familia, habiéndose identificado en ratón y rata en los años 2005 y 2006, respectivamente (Jalkanen et al. 2005; Nolan et al. 2006). Al igual que CRISP1, la proteína CRISP4 se expresa predominantemente en el epidídimo de forma andrógeno-dependiente y se une a los espermatozoides durante la maduración epididimaria (Jalkanen et al., 2005; Nolan et al., 2006). A diferencia de las otras CRISP, el gen que la codifica en ratón se encuentra localizado en el cromosoma 1 lejos del cluster que contiene a *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3* en el cromosoma 17. Por lo tanto *Crisp4*, segrega de manera independiente del resto de los miembros de la familia, y no así *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3*, que al encontrarse a menos de 200kb de distancia, las mismas segregan prácticamente como si fueran un único gen, siendo la probabilidad de recombinación homóloga casi nula. Este hecho es particularmente relevante en esta Tesis ya que se trabajó con animales múltiples KO para las proteínas CRISP.

La información disponible hasta el momento acerca de CRISP4 es menor en comparación a la disponible para CRISP1 y CRISP2. Dos grupos de investigadores desarrollaron, en forma independiente, animales KO para esta proteína (Gibbs et al. 2011; Turunen et al. 2012) obteniendo las primeras evidencias de la participación de CRISP4 en el proceso de fertilización. El análisis fenotípico de los machos KO para *Crisp4* (KO C4) mostró que los mismos producían espermatozoides con una deficiente capacidad para unirse a la ZP y sufrir

la RA en respuesta a progesterona (Gibbs et al. 2011; Turunen et al. 2012). La importancia de CRISP4 para la capacidad fertilizante del espermatozoide ha sido demostrada más recientemente en ensayos *in vitro* en los que el agregado de CRISP4 recombinante a espermatozoides WT de animales obesos con menores niveles de CRISP4 revirtió defectos de fertilización que presentaban los animales (Borges et al. 2017). En este trabajo, los autores asocian la infertilidad de ratones en un modelo de obesidad producida por una dieta rica en grasas, con una reducción en los niveles de CRISP4 y la capacidad fertilizante de sus espermatozoides.

Al igual que CRISP1, CRISP4 es capaz de inhibir canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo TRPM8 (Gibbs et al. 2011). Los estudios realizados sobre CRISP4 indicarían que la capacidad de modular canales de  $\text{Ca}^{2+}$  estaría delimitada al extremo C-terminal de la proteína, tal como se observó para otras CRISP. Además, se observó que el agregado de CRISP4 recombinante a espermatozoides WT es capaz de revertir el efecto inhibitorio del mentol, inductor del canal TRMP8, sobre la RA inducida por progesterona (Gibbs et al. 2011). En este sentido, la regulación de TRPM8 parecería ser el mecanismo de acción por el que CRISP4 modula la RA. Sin embargo, a pesar de las evidencias recién mencionadas, y tal como ocurriera con los KO individuales de CRISP1 y de CRISP2, los animales que carecen de CRISP4 son fértiles.

En conjunto, las distintas evidencias recopiladas en esta sección muestran que las CRISP participan en más de una etapa del proceso de fertilización y que en cada una de estas etapas participa más de una proteína CRISP, apoyando la existencia de una redundancia funcional y de una cooperación entre proteínas CRISP homologas para asegurar el éxito de la fertilización y la fertilidad del individuo. (Figura 23).

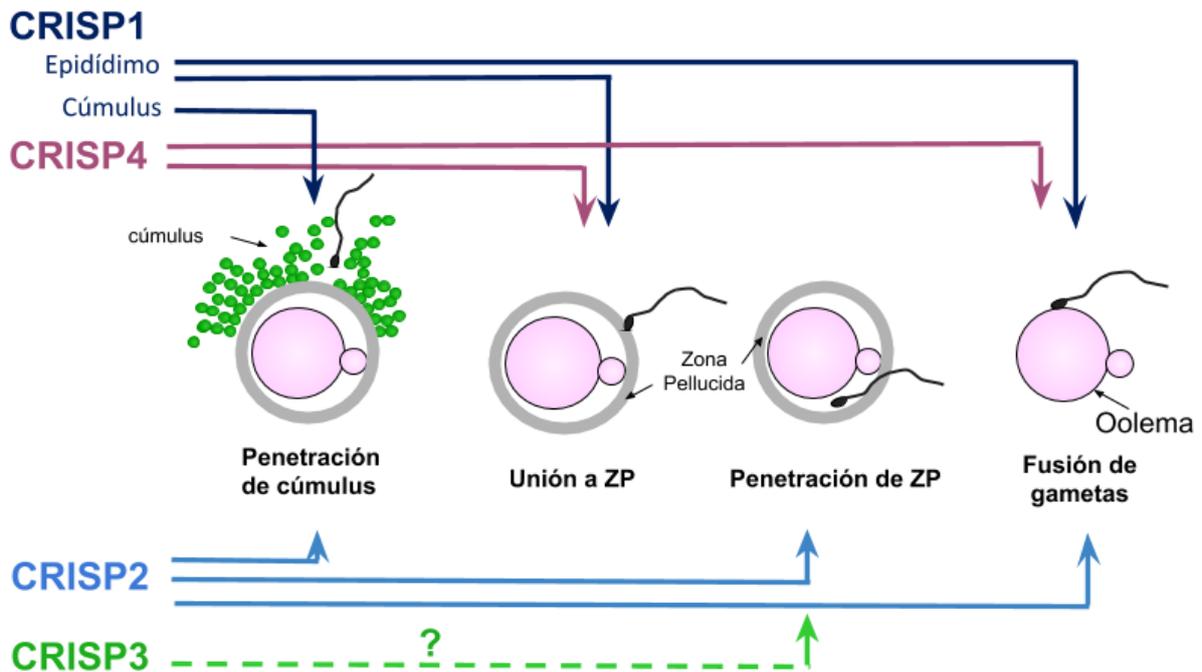


Figura 23 Participación de las proteínas de la familia CRISP en el proceso de fertilización.

## LAS PROTEINAS CRISP Y EL SISTEMA INMUNE

Como fuera mencionado anteriormente, existen numerosas evidencias indicando que las proteínas CRISP, principalmente, CRISP1 y CRISP3, se expresan no solo en el tracto reproductivo sino también en órganos y células del sistema inmune. Más aun, para el caso de CRISP1, las evidencias indican que la misma estaría asociada al desarrollo de la Alopecia Areata, una enfermedad autoinmune que afecta el folículo piloso (Peterson et al. 2005; Sundberg et al. 2014). CRISP3, por su parte, ha sido identificada como una proteína que modifica su expresión en diversas patologías. Sin embargo, no se conoce si esta característica es causa o consecuencia de dichas enfermedades. Es así que si bien CRISP3 se expresa en bajos niveles en el tejido prostático normal, es una de las proteínas que más aumenta su expresión en pacientes con cáncer prostático (Bjartell et al. 2006, 2007; Kosari et al. 2002) y relacionada con una mayor tendencia a la recidiva y un peor pronóstico (Al Bashir et al. 2014; Grupp et al. 2013). Por el contrario, la expresión de MSP (posible ligando de CRISP3) se encuentra disminuida en este tipo de cáncer (Chan et al. 1999). Se ha reportado además que CRISP3, que normalmente se expresa en forma andrógeno-dependiente en las glándulas salivales y lacrimales en ratón y en humano, se encuentra

disminuida en mujeres que padecen la enfermedad auto-inmune conocida como síndrome de Sjogren. Esta enfermedad se caracteriza por presentar modificaciones en la distribución y en la función de un canal iónico (acuaporina-5) con lo cual se cree que podría existir, como ocurre en otras CRISP, una actividad reguladora de canales en el ICR de CRISP3 involucrada en la enfermedad (Laine et al. 2007). Asimismo, se ha observado una modificación en la expresión de CRISP3 en pancreatitis y en cáncer de lengua (Friess et al. 2001; Ko et al. 2012; Liao et al. 2003; Ye et al. 2008) como así también en metástasis en ganglios linfáticos y hueso (Al Bashir et al. 2014; Grupp et al. 2013).

Teniendo en cuenta todas las evidencias apoyando el posible rol inmunológico de las proteínas CRISP, nuestro laboratorio inicio hace unos años, una colaboración con el grupo del Dr G. Rabinovich (IBYME), reconocido a nivel internacional por su contribución al estudio de las galectinas y el sistema inmune. En ese sentido, al igual que las galectinas, las CRISP son también proteínas secretorias que se expresan en células inmunes y tumorales, y presentan una expresión modificada en ciertos tipos de cánceres y enfermedades autoinmunes tal como se acaba de describir. Los resultados obtenidos en colaboración indican que CRISP1 y CRISP3 se expresan en una importante célula del sistema inmune tal como lo es la CD, apoyando que las CRISP podrían estar cumpliendo un rol importante en la regulación del sistema inmune. En ese sentido, es importante recordar que las CD, junto a los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células asesinas naturales (natural killers), están involucradas en la llamada inmunidad innata y se caracteriza por ser la primer barrera de defensa del organismo que se manifiesta con rapidez y de forma poco específica. Por el contrario, la inmunidad adaptativa emplea como sistema de reconocimiento un repertorio amplio, variado y muy específico de receptores antigénicos distribuidos en células específicas denominadas linfocitos T (LT) y Linfocitos B (LB) (Janeway, C, 2005).

Actualmente, está establecido que la inmunidad innata orienta el perfil inmunológico de la respuesta adaptativa y, en este contexto, cobran especial relevancia las CD, dado que son las únicas con la capacidad de estimular LT vírgenes q iniciar una respuesta inmune primaria (Steinman 1991). Las CD presentan dos estadios en los cuales difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad: las CD inmaduras (CDi) y las CD maduras (CDm). Las células en su estado inmaduro, en ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, se encuentran recorriendo y censando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio y linfático y

los órganos linfoides secundarios (Guermonprez et al. 2002) y tienen una alta capacidad endocítica y de procesamiento antigénico. Por otro lado las CDm son denominadas de este modo ya que, una vez que reconocen un patógeno, cuerpo extraño o señal de daño, inician un programa de diferenciación llamado maduración a través del cual se convertirán en células presentadoras de antígenos profesionales capaces de activar LT vírgenes y, en consecuencia, desencadenar la respuesta inmune adaptativa. Durante el proceso de maduración, las CD reducirán su capacidad endocítica a través de una disminución en la expresión de receptores antigénicos y se incrementará la expresión de receptores de quimioquinas, moléculas expresadas por las células de los órganos linfáticos secundarios donde ocurrirá el encuentro entre la CD y los LT vírgenes y, en consecuencia, la presentación de antígeno y activación de los LT. La interacción de CD con LT vírgenes puede perfilar la respuesta inmune hacia diferentes fenotipos o incluso inducir tolerancia dependiendo del subtipo de CD, los receptores estimulados, del tipo y dosis del antígeno, la vía de inmunización y el microambiente circundante de la CD (Guermonprez et al. 2002).

Teniendo en cuenta el importante rol de las CD en la respuesta inmune, la expresión de CRISP1 y CRISP3 en dichas células apoya fuertemente el rol de las CRISP en la regulación del sistema inmune.

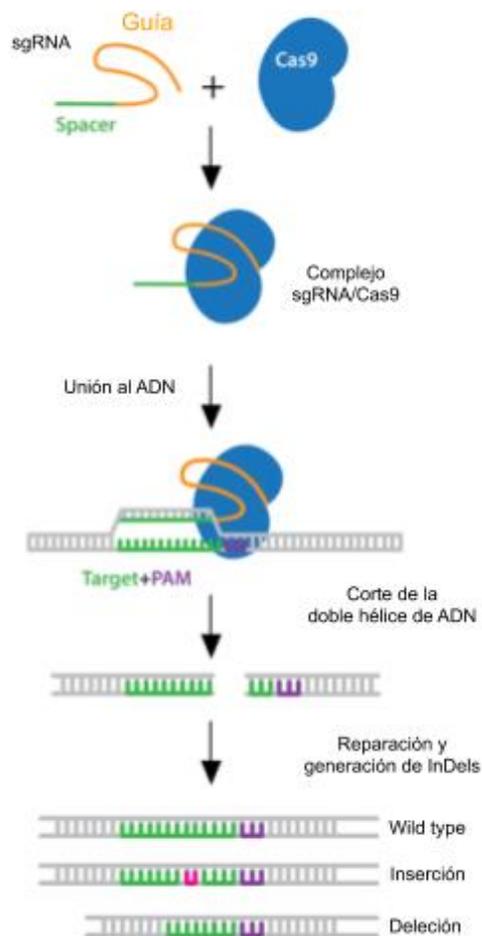
## **ANIMALES GENETICAMENTE MODIFICADOS**

En los últimos años, el empleo de animales modificados genéticamente, en particular los animales KO ha sido una de las principales herramientas utilizadas para el estudio de la función y relevancia de las proteínas para diversos procesos biológicos. La posibilidad de utilizar esta herramienta surgió, en la década del 80, a partir de que se describieran las células madres embrionarias de la masa interna del blastocisto (Robertson et al., 1986) y se demostrara que un gen específico puede ser interrumpido por medio de recombinación homóloga (Capecchi 1989, 2005).

Hasta hace unos años, la principal técnica utilizada para la generación de ratones KO, involucraba la recombinación homóloga. Esta técnica, consistía en transfectar *in vitro* células embrionarias con un vector cuya expresión tiene como objetivo modificar al gen blanco y

producir la mutación deseada a través de la recombinación homóloga. Luego, aquellas células que presenten la modificación, obtenidas utilizando algún agente de selección, son inyectadas dentro de blastocistos, los cuales son transferidos a hembras receptoras. De las crías quiméricas nacidas, solo en algunas de ellas la línea germinal habrá sido originada por las células embrionarias modificadas. Por lo tanto, luego de realizarse algunos apareos pertinentes, es posible obtener una colonia de ratones con deficiencia en el gen de interés. Sin embargo, todo este proceso puede llevar varios meses o incluso años. Actualmente, la revolucionaria técnica biotecnológica denominada CRISPR/Cas9, desarrollada a principios del 2013, es una de las más utilizadas ya que permite la modificación del genoma de una forma mucho más rápida y sencilla (Wang et al. 2013). Más aun, la misma es aplicable a diversas especies (Hsu, Lander, and Zhang 2014) a diferencia de la tradicional técnica por recombinación homóloga. Este novedoso método es un sistema de edición génica adaptado del sistema de defensa contra patógenos de la bacteria *Streptococcus pyogenes* para poder ser utilizado en células de mamíferos (Gasiunas et al. 2012). CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) funciona en conjunto con una endonucleasa Cas9 (CRISPR-associated 9) (Young, Aitken, and Ikawa 2015). El sistema adaptado está compuesto por la endonucleasa y un ARN guía (sgARN) compuesto principalmente por la secuencia de 20 nucleótidos homóloga al sitio que se desea mutar (Spacer), otorgándole la especificidad al sistema, seguido de la secuencia que recluta la Cas9. Para el diseño del sgRNA debe tenerse en cuenta que la secuencia de 20 nucleótidos seleccionada debe tener a continuación la secuencia consenso (NGG) o PAM (protospacer adjacent motif) que será reconocida por la Cas9 y es necesaria para su actividad de endonucleasa, es decir para realizar el corte de la doble hélice de ADN (Mali et al., 2013). Tanto el sgARN como el ARNm correspondiente a la Cas9 son transcriptos *in vitro* y microinyectados en el citoplasma de cigotas. Una vez sintetizada la enzima, el complejo sgRNA/Cas9 recorre el genoma hasta encontrar el sitio homólogo donde producirá un corte de la doble hebra del ADN (Wang et al. 2013). Este daño es corregido por los sistemas de reparación endógeno de la célula introduciendo pequeñas inserciones o deleciones (InDels) al azar, las cuales pueden producir cambios en el marco de lectura del gen y la aparición de codones stop prematuros (Ran et al. 2013). (Figura 24). Finalmente, las cigotas son transferidas a hembras receptoras analizándose el genotipo de las crías. Debido a la eficiencia de la mutagénesis, se pueden obtener animales KO incluso en la primera generación. Sin embargo, dado que los animales obtenidos de la microinyección

pueden tener diferentes grados de mosaiquismo (Zhu et al. 2014), resulta prudente trabajar con animales de generaciones subsiguientes.



**Figura 24 Representación esquemática del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9.**

Hasta el desarrollo de la técnica de CRISPR/Cas9, la obtención de animales deficientes en más de una proteína era posible mediante la cruce de los animales simples KO. Sin embargo, esta metodología tiene el impedimento de que si los genes de interés se encuentran muy cercanos en el cromosoma, tal como ocurre con *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3*, la frecuencia de recombinación entre ellos será muy baja y, por lo tanto, muy baja la probabilidad de obtener los animales múltiples KO. Actualmente, es posible mutar más de un gen en simultáneo de forma más sencilla y rápida, mediante CRISPR/Cas9 (Wang et al. 2013). En resumen, la técnica de CRISPR/Cas9 representa una revolucionaria metodología no solo para la generación de ratones KO para el estudio de la función de genes sino, para establecer la interacción existente entre varios genes.

## OBJETIVOS

---

---

Con el fin de continuar nuestros estudios destinados a esclarecer la relevancia de las proteínas CRISP como reguladores tanto de la fertilidad como del sistema inmune de un individuo, en la presente Tesis se plantearon los siguientes objetivos:

Tal como se mencionara anteriormente, evidencias obtenidas por nuestro grupo indican que la proteína CRISP1 presente tanto en el espermatozoide como en las células del cúmulus que rodean al ovocito participa en el proceso de fertilización y exhibe capacidad de regular a CatSper, el principal canal de calcio del espermatozoide, esencial para la fertilidad masculina. En base a ello, el primer objetivo de esta Tesis consistió en **continuar investigando la actividad de CRISP1 como regulador de CatSper y mediador del proceso y explorar su posible empleo para el desarrollo de un método anticonceptivo masculino no hormonal. (CAPÍTULO I)**

La normal fertilidad de los machos simples KO para las proteínas CRISP1, CRISP2 y CRISP4 generados en nuestro laboratorio, junto a la recientemente observada subfertilidad de los machos carentes de dos proteínas CRISP (CRISP1 y CRISP4) simultáneamente, apoyan la existencia de mecanismos de compensación entre los diferentes miembros de la familia CRISP. En base a ello, y considerando la no disponibilidad del ratón simple KO para la proteína CRISP3, el segundo capítulo de esta Tesis, estuvo enfocado al **desarrollo y caracterización tanto del animal KO para CRISP3 como de animales múltiples KO para diferentes CRISP a través del empleo de la técnica CRISPR/Cas9. (CAPÍTULO II)**

Finalmente, numerosas evidencias indican que las proteínas CRISP estarían involucradas en la regulación no solo del sistema reproductivo sino también del sistema inmune a juzgar por su expresión en órganos y células de importancia inmunológica y su expresión diferencial en diversas patologías con base inmunológica. En base a estas evidencias y a observaciones de nuestro grupo indicando la presencia de CRISP1 y CRISP3 en una importante célula del sistema inmune como lo es la célula dendrítica, el tercer objetivo de esta Tesis consistió en **investigar el rol inmunoregulador de las proteínas CRISP1 y CRISP3 a través del empleo de animales KO para ambas proteínas. (CAPÍTULO III)**

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

## Animales

Los ratones utilizados para los distintos estudios descritos en esta Tesis fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) bajo ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad y con acceso a alimento y agua ad libitum. En todos los casos, los experimentos con animales fueron llevados a cabo siguiendo la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicada por National Institutes of Health (NIH, EEUU). Los protocolos empleados cuentan con la aprobación del Comité de Bioética del IBYME.

Para la mayoría de los experimentos se utilizaron tanto machos como hembras adultas de 2 a 5 meses, a excepción de algunos ensayos en particular donde se utilizaron hembras prepúberes de 25-40 días de edad. La línea KO para CRISP1, generada en un fondo genético homogéneo C57BL/6N, ya se encontraba disponible en el laboratorio al momento de comenzar la Tesis. La línea que da origen a triples KO (TKO) y cuádruples KO (CKO) fue generada en el laboratorio en animales con un fondo genético mixto C57BL/6N y DBA/2J (B6D2) en paralelo a la generación de las dos líneas que formaron parte de la presente Tesis. Cabe aclarar que algunos animales de la colonia TKO y CKO son además transgénicos para el gen de EGFP fusionado al péptido señal de pro-acrosina bajo el control del promotor de actina, razón por la cual los espermatozoides intactos pueden visualizarse bajo microscopio de epifluorescencia. Los animales KO para CRISP3 y doble KO (DKO) para CRISP1 y CRISP3 fueron generados en un fondo genético homogéneo C57BL/6N. Los mismos se generaron utilizando la técnica CRISPR/Cas9, en colaboración con el Dr. Marcelo Rubinstein, tal como se detalla más adelante en esta sección.

## Materiales específicos

**Inhibidores y drogas:** NNC 55-0396 (Inhibidor de canales de Ca<sup>2+</sup>), HC-056456 (inhibidor de CatSper, VitasMLab), 4-AP (Activador canales de Ca<sup>2+</sup>, Sigma), H89 (inhibidor de PKA, Calbiochem), ionóforo de Ca<sup>2+</sup> (A23187, Sigma), progesterona (inductor de la RA, Sigma), , Fluo 3-AM y Fluo 4- AM (sensor de Ca<sup>2+</sup>, Invitrogen) GM-CSF (Factor de diferenciación de granulocitos y macrófagos, Peprotech), CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen)

**Anticuerpos:** Anticuerpos primarios: Suero anti-ARP (hCRISP1) (1/250) anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -pY, 1/4000, clone 4G10, Upstate Biotechnology), anti-tubulina (1/5000, clone D66, Sigma), anti-actina (1/2000; Santa Cruz sc-8432), anti-CRISP1 (1/1000; #AF4675; R&D), anti-CRISP1 (1/500, anticuerpo policlonal desarrollado en el laboratorio mediante la inmunización de conejos con la proteína epididimaria de rata CRISP1 purificada., anti-CRISP2 (1/1000, Proteintech), anti-CRISP4 (1/1000; #AF5017; R&D), anti-CD11c-PE (1/10; BD Becton-Dickinson, clon HL3), anti-CD86-FITC (1/10; BD Becton-Dickinson, clon GL1), anti- IgG 2b1 k-FITC (1/10; BD Becton-Dickinson); anti- IgG-PE (1/10;BD Becton-Dickinson), anti-CD4-FITC (0,25 mg/tubo; eBioscience, clon RM4-5); anti-CD25-PE (0,2 mg/tubo, BD Pharmingen, clon PC61.5); anti-Foxp3-APC (1 mg/tubo, eBioscience, clon FJK-16s), anti-CD3 (5g/ml, eBioscience). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories), anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories), anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (1/4000, Santa Cruz) y anti-IgG de oveja acoplado a peroxidasa (1/4000, Sigma).

### **Mutagénesis de *Crisp1* y *Crisp3* a través de CRISPR/Cas9**

Se diseñaron los sgARN dirigidos contra *Crisp1* y *Crisp3* utilizando el soporte bioinformático diseñado por el grupo del Dr. Zhang (MIT, EEUU) (<http://crispr.mit.edu/>) tanto para la determinación de las secuencias como para la verificación de los posibles sitios off-targets. Las secuencias correspondientes a los sgARN utilizados fueron:

1º tanda. *Crisp3* exón 5:

5'-GAATCCAAAGGTCTTATATT-3'

2º tanda: *Crisp1/3* exón 2:

(I): 5'-CAGCACAAGCATTAAATGCCA-3'

(II): 5'-GTTATCTTGAAGAAGGGATG-3'

Los oligonucleótidos mencionados se obtuvieron mediante síntesis (Genbiotech, Argentina) clonándose, luego, en el plásmido DR274 ([www.addgene.org/42250/](http://www.addgene.org/42250/)). Dichos

sgARNs, junto al ARNm que codifica para la endonucleasa Cas9 (contenido en el plásmido MLM3613 ([www.addgene.org/42251/](http://www.addgene.org/42251/))), fueron obtenidos mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit comercial MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del proveedor.

Por otra parte, se colocaron en apareo hembras pre-púberes estimuladas hormonalmente con machos ambos del fondo genético homogéneo C57BL/6N, recuperándose los embriones del oviducto al día siguiente. Se realizó una microinyección de aproximadamente 1  $\mu$ l de una solución de 50 ng/ $\mu$ l de cada uno de los sgARNs y 80 ng/ $\mu$ l del ARNm Cas9 en agua en el citoplasma de las cigotas en estadio de pronúcleos. Para dicha microinyección se utilizaron micropipetas de sujeción y de inyección preparadas a partir de capilares de borosilicato mediante un estirador vertical de micropipetas (Vertical Pipette Puller, Model 720, KOPF, David Kopf Instruments, EEUU), y un micromanipulador manual (Leica, Alemania) acoplado a un microscopio con óptica de contraste de interferencia diferencial (FS Labovert, Leica, Alemania). Los embriones microinyectados se mantuvieron en medio M2 a 37 °C y 5 % v/v de CO<sub>2</sub> hasta ser transferidos al oviducto de hembras pseudopreñadas por apareo con machos vasectomizados.

La presencia de las mutaciones en los animales obtenidos de las microinyecciones se analizó a través de PCR (ver primers en Tabla 1) a partir de ADN genómico obtenido de muestras de orejas, y el producto sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % m/v. Para ello, el producto de PCR fue incubado a 94°C por 5 min induciendo la desnaturalización del ADN, seguido de una re-naturalización lenta a temperatura ambiente. Luego, la formación de estructuras secundarias en el ADN debido a la presencia de mutaciones fue evaluada por medio de electroforesis en gel de acrilamida 15 % m/v (Zhu et al., 2014). Finalmente, las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación mediante el método Sanger (Macrogen, Corea del Sur). Evaluándose la formación de estructuras secundarias en el ADN debido a la presencia de mutaciones (Zhu et al., 2014). Finalmente, las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación mediante el método Sanger (Macrogen, Corea del Sur).

**Tabla 1: Secuencia de los primers utilizados para la determinación del genotipo de los animales obtenidos mediante la técnica de CRISPR/Cas9.**

Gen	Exón	Tamaño del producto	Primers Forward (5'-3')	Primers Reverse (5'-3')
<i>Crisp3</i>	5	682 pb	TCCCTCACACGTTTTTCACAC	GGCTCTATTTGACAGTGGCC
		229 pb	TGCTTTGTATAGCCCCTCCC	CCTGAGTATGATGTCCAACCAC
<i>Crisp1</i>	2	202 pb	TTGTGTTTCTCTGAACCCAATG	GCTCATAACCCTCGTAGCTG
		612 pb	ATGGAAATAACTGGAAGCTATTGG	GCTACAAGTTCTTTTGCCACAAC
<i>Crisp3</i>	2	214 pb	CGTCTCAGAGAATTTGTAGGTGTG	GCCTTCATACCAGCATAAATTG
		594 pb	TGGTAATAACTGGAAGCCCTTG	TGACAAGTTCTTTTGCCACAAC

Se detallan las secuencias de los diferentes pares de primers para amplificar los diferentes exones de *Crisp1* o *Crisp3*, indicándose además, el tamaño del producto obtenido.

Una vez establecida la colonia a partir de animales con las mutaciones deseadas, se analizó de forma rutinaria el genotipo de los ratones, sometiendo a electroforesis en gel de agarosa 2% el producto de PCR obtenido a partir de ADN genómico utilizando los primers correspondientes a cada gen detallados anteriormente.

### Genotipificación de ratones KO

**Extracción de ADN genómico:** A partir de muestras de orejas de los animales, se extrajo el ADN genómico por la técnica HotSHOT (Truett et al. 2000). Brevemente, el tejido fue sumergido en 75 µl de una solución de lisis (25 mM de NaOH, 0,2 mM de EDTA, pH 12) y calentado a 95°C por 30 min, agregándole, luego, 75 µl de una solución de neutralización (40 mM de Tris-HCl, pH=5). Las muestras fueron guardadas a 4°C hasta su utilización.

**PCR (reacción en cadena de la polimerasa):** El genotipo de los animales fue determinado por la técnica de PCR. La reacción fue realizada en un buffer conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada primer específico y 1 U de la polimerasa GoTaq (Promega, EEUU) en un volumen final de 20 µl (pH=8,5). Las secuencias de los primers utilizados para cada colonia de animales KO fueron los siguientes:

**Colonia KO para CRISP1:*****Crisp1***

Fwd: 5'-AGACAAAGAGACCACCAACAGATT-3'

Rvs WT: 5'-AGTACAGCAGCCAAGAAGAACAG-3'

Rvs KO: 5'-CTACCCGCTTCCATTGCTC-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 894 pb. Alelo mutado, 611 pb.

**Colonia KO CRISP3*****Crisp3***

Fwd: 5'-CGTCTCAGAGAATTTGTAGGTGTG-3'

Rvs: 5'-GCCTTCATACCAGCATAAATTG-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 214 pb. Alelo mutado, 178 pb

**Colonia DKO CRISP1/CRISP3:*****Crisp1***

Fwd: 5'-TTGTGTTTCTCTGAACCCAATG-3'

Rvs: 5'-GCTCATAACCCTCGTAGCTG-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 202 pb. Alelo mutado, 147 pb.

***Crisp3***

Fwd: 5'-CGTCTCAGAGAATTTGTAGGTGTG-3'

Rvs: 5'-GCCTTCATACCAGCATAAATTG-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 214 pb. Alelo mutado, 141 pb.

**Colonia TKO y CKO:*****Crisp1***

Fwd: 5'-ATGGAAATAACTGGAAGCTATTGG-3'

Rvs: 5'-GCTACAAGTTCTTTTGCCACAAC-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 612 pb. Alelo mutado, 451 pb

***Crisp2***

Fwd: 5'-GTCTTCTGTAAGCATGTGTCAAGC-3'

Rvs WT: 5'-CATGTGGGAGATATGCACTTGAATAAGC-3'

Rvs KO: 5'-CACAACGGGTCTTCTGTAGTCC-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 380 pb. Alelo mutado, 540 pb

***Crisp3***

Fwd: 5'-CGTCTCAGAGAATTTGTAGGTGTG-3'

Rvs: 5'-GCCTTCATACCAGCATAAATTG-3'

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 214 pb. Alelo mutado, 142 pb

***Crisp4***

Fwd: 5'-ACCCTCACCTATCCTTGCTGGCAG -3'

Rvs WT: 5'-CTTTAGAATACCATGATACCCGCA -3'.

Rvs KO: 5'- CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC -3'.

Tamaño del producto: Alelo salvaje, 470 pb. Alelo mutado, 650 pb

Para todos los casos, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 2 minutos a 95°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 1 min a 72°C y extensión final por 5 minutos a 72°C, a excepción de los primers de Crisp1 de la colonia TKO y CKO donde los 35 ciclos fueron: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C, 1 min a 72°C. En todos los casos, el resultado de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 2 % m/v y tinción con bromuro de etidio (0,02 mg/ml).

**Evaluación de la fertilidad**

Para los ensayos de fertilidad se colocaron en una jaula el macho o la hembra a evaluar con su pareja control durante cuatro noches controlando todas las mañanas la presencia de tapón vaginal como indicador de la ocurrencia exitosa de apareo. Una vez transcurrido el tiempo de gestación, se determinaron diferentes parámetros asociados a la fertilidad tales como el número de crías por camada y el porcentaje de preñez.

**Determinación del ciclo estral de las hembras y superovulación**

El estadio del ciclo estral en ratones hembra fue determinado a través del análisis de extendidos vaginales (Caligioni 2009). Las células epiteliales de la vagina fueron colectadas en aproximadamente 30 µl de PBS, transferidas a portaobjetos y examinadas bajo microscopio óptico. Los diferentes estadios (proestro, estro, metaestro y diestro) fueron clasificados basados en la proporción de los distintos tipos celulares (leucocitos y células epiteliales cornificadas o nucleadas).

Para la estimulación de la ovulación, las hembras adultas fueron tratadas con una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina coriónica equina (PMSG, Syntex) en cualquier estadio del ciclo seguida, a las 48-72 hs, por una inyección de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Syntex). Alternativamente, hembras pre-púberes fueron sujetas al mismo protocolo de superovulación para los estudios en los que se especifica el uso de las mismas.

### **Ensayos de fertilización *in vivo* y desarrollo embrionario *in vitro***

Cada ratón a ser evaluado, ya sea macho o hembra, fue colocado en apareo por una noche con su pareja control. El uso de hembras en estro natural o estimulado hormonalmente se detalla en cada caso. Para los ensayos con hembras en estro, las mismas fueron colocadas en apareo la noche del pro-estro (Nakamura et al. 2011), mientras que en el caso del uso de hembras superovuladas, las mismas se colocaron en apareo luego de la inyección con hCG. La mañana siguiente, una vez confirmado el éxito del apareo por presencia de tapón vaginal, los ovocitos/cigotos fueron recuperados del oviducto (por punción) en medio KSOM (Erbach et al. 1994) e incubados *in vitro*, por 18 hs a 37°C y 5% v/v CO<sub>2</sub> en una estufa con gaseo automático, permitiendo el desarrollo de los ovocitos fertilizados a dos células. El porcentaje de fertilización fue determinado, utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60) (Nikon), como el número de embriones de dos células sobre el total de ovocitos incubados. En los casos donde se evaluó el desarrollo embrionario, los ovocitos recuperados de la ampulla y que alcanzaron el estadio de dos células *in vitro*, continuaron su incubación durante 4 días en medio KSOM a 37°C y 5% v/v CO<sub>2</sub> en una estufa con gaseo automático para determinar el porcentaje de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto.

### **Ensayos de migración de espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino**

Machos provenientes de la colonia transgénica para EGFP, ya sea control o mutados, fueron apareados con hembras control GFP negativas superovuladas de forma tal de poder

observar los espermatozoides intactos (conteniendo a EGFP en el acrosoma) dentro del oviducto, tal como fuera descrito previamente (La Spina et al. 2016). Brevemente, 12 h después de la inyección de hCG, la hembra fue colocada en apareo con el macho a evaluar. Pasados 30 minutos, se comprobó el éxito del apareamiento mediante la presencia del tapón vaginal y se separaron los animales. Luego de 4 hs, se recuperaron los tractos reproductores femeninos, los oviductos fueron lavados en medio capacitante (Fraser and Drury 1975), se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos y se observaron inmediatamente bajo un microscopio confocal (Olympus IX83 motorizado con módulo Confocal por Disk Spinning Unit (DSU)). El número de espermatozoides fluorescentes dentro del oviducto se evaluó subjetivamente. Por otra parte, se recuperaron los espermatozoides del útero cortando el órgano y dejando caer el fluido uterino en un portaobjetos, el cual, sin diluir, fue observado bajo microscopio óptico para evaluar la presencia y la motilidad de los espermatozoides.

### **Obtención y capacitación de espermatozoides**

**Ratón:** Para la obtención de espermatozoides epididimarios, los animales adultos fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical y los epidídimos expuestos a través de un corte efectuado en la región escrotal. Una vez liberados de grasa y sangre, los caudas epididimarios fueron sumergidos en una gota de 300 µl de medio en una cápsula bajo aceite, cortados en 3 puntos e incubados por un período de 10 min a 37°C y 5 % v/v CO<sub>2</sub> para permitir la dispersión de las células (swim out).

La capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser and Drury 1975), suplementado con 0,3 % m/v BSA. La misma fue llevada a cabo en gotas de 300 µl de medio bajo aceite a una concentración final de 0,1-1,0 x 10<sup>7</sup> espermatozoides/ml, durante un período de incubación de 90 min a 37°C y 5 % v/v CO<sub>2</sub> en una estufa con gaseo automático.

**Humano:** Los espermatozoides humanos se obtuvieron de muestras de semen de donantes sanos (cuyas características seminales iniciales concordaban con el criterio de normalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010)). En todos los casos, se

solicitó un período de 48 hs de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado.

### **Inseminación intrauterina**

Para los ensayos de inseminación intrauterina, se superovularon hembras pre-púberes tal como fuera mencionado anteriormente. Una vez transcurridas 8 hs de la inyección de hCG, las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de xilacina/ketamina (10:100 mg/kg). Una vez dormido el animal, se realizó una incisión en el abdomen exponiéndose ambos cuernos uterinos. Con una jeringa se tomaron 50  $\mu$ l de una suspensión de espermatozoides recuperados del cauda epididimario ( $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml), la cual había sido expuesta previamente a HC 10  $\mu$ M durante 0, 30 o 60 min. Los espermatozoides fueron introducidos en uno de los cuernos uterinos seguido inmediatamente del ligado del mismo. El cuerno contralateral se utilizó como control inyectando espermatozoides incubados en DMSO. Luego de aproximadamente 15 hs, se recuperaron los ovocitos de la ampulla, los cuales fueron teñidos con 10  $\mu$ g/ml de Hoescht 33342 y montados en portaobjetos. Los ovocitos se consideraron fertilizados cuando se observó al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o dos pronúcleos en el citoplasma evaluado bajo microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot (Nikon) (x200). El porcentaje de fertilización se calculó como el número de ovocitos fertilizados sobre el total de ovocitos examinados.

### **Ensayos de fertilización *in vitro***

Los ensayos de fertilización *in vitro* se realizaron tal como se describió anteriormente (Da Ros et al., 2008). Los COC de ratón fueron obtenidos de hembras estimuladas hormonalmente mediante punción de la ampulla en el medio de capacitación. Para los ensayos con ovocitos sin cúmulus, los COC fueron tratados con hialuronidasa 0,1 % m/v (type IV) a temperatura ambiente mientras que para la obtención de ovocitos sin ZP, los ovocots libres de cúmulus fueron incubados durante apenas 20 segundos con una solución

ácida Tyrode (pH=2,5). Los COC y los ovocitos sin cúmulus pero con ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados (concentración final:  $1-5 \times 10^5$  células/ml) y las gametas co-incubadas en medio de capacitación por 3 hs a 37°C y 5 % v/v CO<sub>2</sub> en una estufa con gaseo automático. Para los ensayos de fusión, ovocitos sin ZP fueron co-incubados con espermatozoides capacitados (concentración final:  $1-5 \times 10^4$  células/ml) por 1 h a 37°C en una atmósfera de 5 % v/v CO<sub>2</sub> 5 % v/v en una estufa con gaseo automático. Una vez transcurrido el tiempo de co-incubación, los ovocitos fueron fijados en paraformaldehído (PFA) 2 % v/v en PBS, lavados, expuestos a 10 µg/ml de Hoescht 33342 y montados en portaobjetos. Los ovocitos fueron considerados fertilizados cuando se observó al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o dos pronúcleos en el citoplasma evaluado bajo microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot (Nikon) (x200). En algunos casos, se evaluó la fertilización por la formación de embriones de dos células luego de una incubación de 18 hs, utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60) (Nikon). El porcentaje de fertilización se calculó como el número de ovocitos fertilizados sobre el total de ovocitos recuperados.

### **Obtención de ADNc y transcripción reversa (RT)**

El ARN total de las distintas muestras, ya sean tejidos o células, se aisló utilizando Trizol (Gibco) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Con el fin de generar ADNc, 2µg del ARN total se incubó a 65°C durante 5 min, y luego en hielo. Por otro lado, una mezcla de reacción conteniendo 300U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega); 2,5 µM de un oligonucleótido de timidinas (oligo dT), utilizado como "primer"; 80 UI de un inhibidor de RNasas (Promega) y 0,3 mM de dNTPs (Invitrogen), se llevó a un volumen final de 15 µl con el buffer otorgado por el fabricante de la enzima. La mezcla de reacción, junto con el ARN, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por 1 h a 37°C y 5 min a 94°C.

### **Estudio de la expresión génica por PCR y PCR en tiempo real (qPCR)**

Para estudiar la expresión del ARN mensajero (ARNm) de distintos genes se utilizaron las técnicas de PCR convencional o qPCR, según corresponda, utilizando el ADNc obtenido tal

como fuera mencionado en el punto anterior. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes en todos los casos: desnaturalización inicial por 10 min a 94°C, 35 ciclos de, 15 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 30 seg a 72°C y extensión final por 7 min a 72°C. El producto obtenido por PCR convencional fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 2%. Los estudios de qPCR se realizaron utilizando el FastStart Universal SYBR Green Master (Sigma-Aldrich) en un ciclador térmico iCycler (Bio-Rad). La expresión del gen a estudiar se cuantificó comparando el ciclo umbral (CT) con el de la ciclofilina mediante el uso del método de CT comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ).

Para evaluar los distintos genes se utilizaron los siguientes primers de secuencias complementarias a diferentes exones:

Crisp1 humana: Fwd: 5'-GTGAAGCCTGCCCAAGTAAC-3' Rvs: 5'-GGTTGCATCCCAGATAATGG-3'  
 Crisp3 humana: Fwd: 5'-TTCACCCTTCTTCCCAAATCA-3' Rvs: 5'-CCTCCTTGAGTGGAGGGTATT-3'  
 Gapdh: Fwd: 5'-GCGACTTCAACAGCAACTC-3' Rvs: 5'-GGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'  
 Crisp1 ratón: Fwd: 5'-CATGGCATTAAATGCTTGTGCT-3' Rvs: 5'-GGTTGAAAGTTTCTCAAGACG-3'  
 Crisp3 ratón: Fwd: 5'-GGCCCAAAGCAAAATGTTAG-3' Rvs: 5'-AAGCTAGGTATGGCCTGCTTG-3'  
 Ciclofilina: Fwd: 5'-GACCCTCCGTGGCCAACGAT-3' Rvs: 5'-ACGACTCGTCTACAGATTCATCTC-3'

### Obtención de extractos proteicos

Las muestras provenientes ya sea de órganos o de células del cúmulus humano, fueron homogeneizados en buffer de lisis frío (5 mM de EDTA, 1 % v/v de IGEPAL CA360, 0,5 % m/v de deoxicolato de sodio, 0,1 % m/v de SDS, 1 % v/v de Tritón X-100, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES, 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en PBS, pH 7,2). Luego de 30 min de incubación a 4°C, las muestras fueron centrifugadas a 15000 x g por 20 min a 4°C, y su concentración determinada por la técnica de Bradford (Bio Rad). Para el posterior análisis por electroforesis y WB, se tomaron alícuotas del sobrenadante y se diluyeron en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% v/v glicerol, 2% m/v SDS y azul de bromofenol) (Laemmli 1970). Los espermatozoides de ratón (1-2x10<sup>6</sup> células/ml) fueron lavados con PBS y resuspendidos en buffer de siembra (Laemmli 1970). En todos los casos, las muestras en el buffer de siembra fueron hervidas y centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos para la posterior recuperación del sobrenadante. Para la determinación de la fosforilación de proteínas en tirosina, los sobrenadantes fueron hervidos por segunda vez en presencia de 70 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida y WB**

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 1,5 mm de espesor al 7,5% -15% m/v según el caso, preparados siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli 1970). La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin y colaboradores (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). La transferencia fue realizada en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % v/v metanol, a voltaje constante (15V) durante 1 h. Previo al WB, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1 % m/v en ácido acético 5% v/v y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua deionizada. Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de WB, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada 2% m/v en PBS 0,1 % v/v Tween 20 (PBS-Tween), seguida de una incubación con anticuerpo primario en PBS-Tween a la correspondiente dilución en agitación durante 18hs a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a peroxidasa y diluido 1/4000 en PBS-Tween con agitación durante 1-2 hs a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente, eliminando luego el Tween 20 mediante 1 lavado adicional con PBS. Por último, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL prime (GE Healthcare) y G:BOXGENI (Syngene, Synoptics) según las instrucciones del fabricante.

### **Evaluación del número y la viabilidad de los espermatozoides**

El número de espermatozoides fue determinado bajo microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer. Con el fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides de ratón, alícuotas de 10 µl de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C. A continuación, se agregó un volumen de 0,5 % m/v de eosina en

solución fisiológica. Mientras que los espermatozoides vivos excluyen el colorante y no se colorean, los espermatozoides muertos incorporan el colorante y se tiñen de rosa. El porcentaje de viabilidad se evaluó por microscopía óptica (x400) sobre un mínimo de 200 células.

### **Evaluación de la RA**

Para evaluar la RA, los espermatozoides fueron recuperados y fijados en PFA 4 % m/v en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con acetato de amonio 0,1 M pH:9 por centrifugación, y extendidos sobre portaobjetos. Los mismos fueron luego lavados por inmersión sucesiva en agua, metanol y agua (5 min en cada uno), y posteriormente, incubados durante 5 min en una solución de 0,22 % m/v Coomassie Brilliant Blue en 50% v/v metanol y 10% v/v ácido acético. Por último, los portaobjetos fueron lavados con agua, montados con glicerol y examinados inmediatamente bajo el microscopio óptico (x400). Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y como reaccionados cuando la región no presentaba color (Da Ros et al. 2008).

La inducción de la reacción acrosomal se realizó por exposición de los espermatozoides de ratón a 15 $\mu$ M progesterona o 10 $\mu$ M de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich), 15 min antes del final de la capacitación

### **Evaluación de la motilidad de los espermatozoides**

Alícuotas de 15  $\mu$ l de las suspensiones de espermatozoides fueron colocadas entre portaobjetos y cubreobjetos (22 x 22 mm, para crear una cámara de 30  $\mu$ m de profundidad) precalentados a 37°C. El análisis subjetivo de motilidad se realizó contabilizando el número de espermatozoides móviles progresivos y los no progresivos utilizando un microscopio óptico en un aumento de 400x. El análisis objetivo fue realizado utilizando sistema ISASw (Integrated Semen Analysis System) v1.2 CASA (computer-assisted sperm analysis) system (Proiser R&D, S.L., España). Se analizaron por lo menos 200 células por muestra distribuidas

en 20 campos distintos tomándose 30 imágenes a 60 Hz para cada medición. Los parámetros analizados fueron los siguientes: velocidad promedio de la trayectoria (average path velocity, VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad curvilínea (curvilinear velocity, VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria (straight line velocity, VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), linealidad (linearity, LIN, %, VSL/VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (amplitude of lateral head displacement, ALH,  $\mu\text{m}$ ), rectilineidad (straightness, STR, %, VSL/VAP), y frecuencia de batido de la cabeza (beat cross frequency, BCF, Hz). Los espermatozoides fueron considerados mótils cuando presentaban  $VCL > 0$ , y con motilidad hiperactivada cuando mostraban  $VCL \geq 271$ ,  $LIN < 23,6$  % y  $ALH \geq 5$ . Estos puntos de corte fueron obtenidos para nuestras condiciones experimentales basados en recomendaciones reportadas previamente (Bray et al. 2005).

### **Orientación espermática**

Los ensayos se realizaron en una cámara Zigmond modificada que consta de dos pocillos separados por una pared de 2 mm la cual forma un puente entre ambos pocillos (Fabro et al. 2002). Uno de los pocillos fue cargado con los espermatozoides capacitados mientras que el segundo fue cargado con el medio solo o conteniendo el compuesto al cual se quiere evaluar su actividad quimioattractante. Luego de 15 minutos de incubación, tiempo suficiente para que se genere el gradiente en el puente entre ambos pocillos, se registró el movimiento de los espermatozoides en el puente a 30 cuadros/s durante 4 minutos con una cámara Coolpix L20 (Nikon) adosada al microscopio (Eclipse TS100, Nikon). Las trayectorias de los espermatozoides se analizaron luego con el software ImageJ (versión 1.38; National Institutes of Health) y el complemento MtrackJ. El porcentaje de "espermatozoides orientados" se calculó para 200 trayectorias analizadas por tratamiento con el software SpermTrack (versión 4.0, Universidad Nacional de Córdoba). La orientación hacia el pocillo que contenía el compuesto se calculó como una relación entre las distancias recorridas sobre los ejes X e Y ( $\Delta X / |\Delta Y|$ ). Cuando el valor de la relación fue  $> 1$ , el espermatozoide se consideró orientado.

### **Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

**Espermatozoides de ratón por citometría de flujo:** Los espermatozoides fueron incubados durante 90 minutos en medio Whitten (Wertheimer et al. 2008) en condiciones capacitantes o no capacitantes (sin bicarbonato y sin BSA) conteniendo 2µM Fluo-4 AM (sonda sensible a Ca<sup>2+</sup>, Invitrogen) y 0,05 % v/v ácido plurónico (Pluronic F-127, Invitrogen) durante los últimos 30 min, seguido de lavados con medio fresco libre de BSA para eliminar el exceso de sonda (Mata-Martínez et al. 2013). Los espermatozoides cargados con la sonda Fluo 4-AM fueron expuestos a 2,5µg/ml de yoduro de propidio, y la fluorescencia evaluada inmediatamente por citometría de flujo utilizando un equipo BD FACSCanto™ II. La emisión de la fluorescencia de Fluo 4-AM se detectó por el canal de FITC (516nm) mientras que la del yoduro de propidio se hizo por el canal PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex, 675nm). Los resultados fueron evaluados utilizando el programa FlowJo v10 (FlowJo LLC, EEUU).

**Espermatozoides humanos por microscopía en tiempo real:** Los espermatozoides humanos fueron incubados con la sonda Fluo-3 AM 2 µM y ácido plurónico al 0,05% durante 30 minutos en medio fueron fijados por la cabeza sobre cubreobjetos tratados con laminina (1mg/ml), permitiendo el movimiento del flagelo. El cubreobjetos se montó en una cámara de 500ul (aparato Hardvardmib) y se colocó en la platina de un microscopio invertido (Eclipse TE 300; Nikon). El LED se montó en un ensamblaje FlashCube40 con un espejo dicróico (M40-DC400; Rapp Opto Electronic; anchos de banda: excitación, 450–490 nm; espejo dicróico de 505 nm; y emisión, 520–560 nm). La salida de LED se sincronizó con la señal de Exposición de salida de una cámara CCD iXon 888 a través de la caja de control para producir un solo flash de 2 ms de duración por exposición individual. El tiempo de exposición de la cámara se ajustó a la duración del flash (2 ms). Las imágenes se recogieron cada 500 ms utilizando el software iQ (Andor Technology) y analizadas mediante el programa ImageJ. Al final de cada medición se realizó un tratamiento con ionomicina 20 µM seguido de otro con MnCl<sub>2</sub> 5 mM para obtener la fluorescencia máxima y mínima, respectivamente. La viabilidad de los espermatozoides fue determinada por la motilidad del flagelo y por la capacidad de responder a ionomicina al final de las mediciones.

### **Obtención de CD de ratón**

Las CD se diferenciaron a partir de precursores mieloides de médula ósea. Brevemente, se obtuvo la médula ósea de fémures y tibias de ratones hembras, tanto control como KO, entre 6-14 semanas de edad. El tejido fue disgregado mediante suaves pasajes a través de una aguja de 21 G en solución fisiológica y posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados con buffer ACK (NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4). Las células obtenidas se cultivaron en una concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI completo [RPMI 1640 GLu + suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) v/v (todo de Gibco), Penicilina-Estreptomicina (1/100, Sigma), 50 μM 2b-mercaptoetanol y 10 mM HEPES] suplementado con el factor de diferenciación de monocitos GM-CSF 20 ng/ml (Peprotech), durante 7 días con 2 agregados de medio y un cambio completo de medio. La maduración de las CD se efectuó exponiéndolas a 1μg/ml de LPS de E.Coli (cepa 0111:B4; Sigma) por 18h.

### **Citometría de flujo**

Las células se centrifugaron y se resuspendieron en PBS suplementado con SFB 1% v/v (PBS/SFB1%). Para realizar la marcación de superficie, las células se incubaron durante 30 min a 4 °C con los anticuerpos monoclonales (o sus controles de isotipo) conjugados a sus respectivos fluorocromos, los cuales fueron detallados anteriormente. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/SFB 1% y se resuspendieron en p-formaldehído 1% en PBS hasta su análisis en el citómetro FACS CANTO (BD Biosciences) utilizando el software FlowJo.

### **Detección de citoquinas por ELISA**

Se utilizaron sets de ELISA de captura comerciales de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En líneas generales, se incubaron (18 h a 4 °C) placas de 96 pocillos (Costar) con el anticuerpo de captura disuelto en buffer carbonato pH 9,6 o buffer fosfato pH 6,5. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4; 0,01% Tween-20 (PBS-T 0,01%) y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS/10% SFB) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las muestras y la curva estándar por duplicado (18 h; 4 °C). Se realizaron 4

lavados con PBST 0,01% y se agregó la solución de detección conteniendo el anticuerpo secundario biotinilado junto a la estreptavidina-HRP (2 h; temperatura ambiente). Finalmente, se realizaron 6 lavados con PBS-T 0,01% y se procedió al revelado con una solución del sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer fosfato-citrato (0,1 M ácido cítrico; 0,1 M Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, determinando la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa (Labysystems Multiskan).

### **Co-cultivo de células dendríticas y esplenocitos**

**Obtención de esplenocitos:** Los esplenocitos fueron obtenidos a partir del procesamiento en esterilidad de bazo provenientes de ratones C57BL/6.

**Proliferación esplenocitos:** Se evaluó la proliferación de los esplenocitos en co-cultivo con CD por análisis de la dilución del colorante CFDA SE, utilizando el Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. Este compuesto difunde pasivamente dentro de las células, quedando retenido dentro de las mismas para luego ser heredado por las células hijas luego de la mitosis, donde cada una de ellas recibe la mitad de marca fluorescente. Para llevar a cabo el marcado de los esplenocitos, las células fueron resuspendidas en PBS con una concentración 1,5 μM de CFDA SE e incubadas durante 7 minutos a 37°C. Luego, fueron lavadas y sembradas junto con las CD (en una relación 4:1) en una placa de 96 pocillos con fondo en U la cual habían sido pre-incubadas con anticuerpo anti-CD3 en 40 μl de PBS 1x por 2hs a 37°C en cámara húmeda. El medio de cultivo utilizado fue RPMI suplementado con SFB 10% v/v, en un volumen final de 200 μl por well durante 3 días a 37°C. La proliferación celular se determinó a partir de la dilución de CFDA SE al tercer día del cultivo por citometría de flujo utilizando el citómetro FACS CANTO (BD Biosciences) y la herramienta de proliferación del software FlowJo. Además del estudio de proliferación por dilución de la sonda CFDA SE, se estudió el porcentaje de LT regulatorios diferenciados y los índices de proliferación de los linfocitos T CD4 y CD8 marcando las células con anticuerpos específicos previo al pasaje de las mismas por el citómetro. Los protocolos para la identificación de las distintas poblaciones de LT fueron los siguientes:

**LT regulatorios:** se incubaron las células con los anticuerpos de superficie anti-CD4-FITC y CD25-PE. Posteriormente, se procedió a la fijación y permeabilización de los LT utilizando el Fixation/Permeabilization Buffer (eBioscience), incubando las células durante 30 min-18 hs a 4°C en cámara húmeda. A continuación, se realizó la marcación intra-citoplasmática de Foxp3 incubando las células por 1 h a 4°C con anti-Foxp3-APC en Permeabilization Buffer (eBioscience).

**LT CD8:** se incubaron las células con los anticuerpos de superficie anti-CD8-APC y anti-CD3-PE. Las células fueron incubadas durante 30 min 4°C previo a la fijación.

**LT CD4:** se incubaron las células con los anticuerpos de superficie anti-PE y anti CD3 FITC. Las células fueron incubadas durante 30 min 4°C previo a la fijación.

Por último, una vez que las células fueron marcadas, las mismas se fijaron y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PFA 1% v/v hasta su posterior análisis por citometría de flujo (BD FACS Canto). Los medios condicionados fueron colectados para el posterior análisis de citoquinas.

### **Células Tumorales**

La línea celular MA-10 de tumores de leydig de ratón (Ascoli 1981) fue generosamente cedida por el laboratorio del Dr. Omar Pignataro (IBYME CONICET) quien previamente los recibió del Dr Mario Ascoli (University of Iowa, Iowa City, IA, USA). Esta línea celular es singénicas con ratones C57BL/6 y fue mantenida en cultivo con medio DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 4.76g/L de HEPES, 1.2g/L de bicarbonato de sodio, 1ml/L de geneticina (en solución, Gibco, Invitrogen) y 15% suero de caballo, en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

### **Inyección tumores**

Las células tumorales de la línea MA-10 ( $1 \times 10^4$  células), fueron inyectadas de forma subcutánea en el flanco izquierdo de los animales. Al cabo de 15 días, se inició el monitoreo

del crecimiento tumoral día por medio midiendo los diámetros perpendiculares de la masa tumoral con un calibre métrico. El volumen tumoral fue estimado a través de la siguiente fórmula ( $d^2 \times D \times 0,5$ ), en donde  $d$  es el diámetro menor y  $D$  el mayor del tumor evaluado. Por razones éticas los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen  $\geq 2,5$  cm.

### **Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular en CD**

Las CD tanto inmaduras como maduras fueron incubadas con 2  $\mu$ M Fluo-4, AM y 0,05 % v/v ácido plurónico por 30 minutos en solución de Kreb's [145 mM NaCl ; 5 mM KCl; 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM glucose; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM HEPES; 0.1% (p/v) BSA; pH 7.4]. Posteriormente, las células fueron lavadas con medio fresco (solución de Kreb's) para eliminar el exceso de sonda y colocadas en placas de 96 well y la fluorescencia de la sonda Fluo 4-AM detectada a través de un espectrofluorímetro. Las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular se obtuvieron de la siguiente ecuación:  $[Ca^{2+}] = K_d(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , donde  $K_d = 354$  nM. Las fluorescencias  $F_{max}$  y  $F_{min}$  se determinaron para cada muestra luego del agregado de ionóforo de Ca<sup>2+</sup> o MnCl<sub>2</sub>, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Prism 6.0 (GraphPad, EEUU). Los resultados de experimentos con dos grupos experimentales fueron evaluados por la prueba t de Student. Para aquellos experimentos que involucraron más de 2 grupos se utilizó la prueba ANOVA de una vía y el post-test de Fisher's LSD para comparar con el control. Al compararse dos factores se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y el post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para el análisis de correlación se utilizó el test de Pearson. Finalmente, los análisis de contingencia se realizaron mediante el test Fisher's LSD. En todos los casos la significancia estadística se indica en la leyenda de las figuras y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo.

# RESULTADOS

---

---

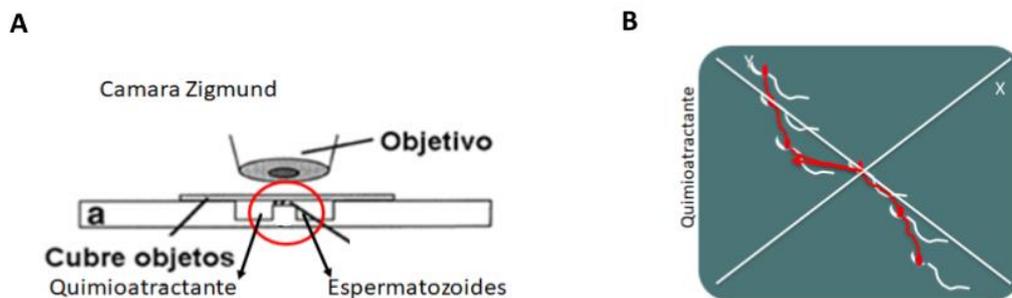
## Capítulo I

### **Estudio del rol de CRISP1 como regulador de CatSper y su potencial empleo para el desarrollo de un método anticonceptivo**

Como fuera mencionado en la introducción, numerosas evidencias de nuestro grupo indican que la proteína CRISP1 asociada a los espermatozoides durante la maduración participaría en diferentes etapas del proceso de a través de sitios complementarios localizados en el ovocito (Rochwerger et al, 1992, Cohen et al, 2000, 2001, Busso et al 2007, Da Ros et al, 2008, Maldera et al., 2014, Weigel et al, 2018). Sumado a ello, recientes evidencias muestran que CRISP1 se expresaría no solo en el epidídimo sino también a lo largo del tracto femenino incluyendo las células del cúmulus que rodean a los ovocitos. Más específicamente, hemos observado que CRISP1 actuaría como quimioattractante de espermatozoides modulando su HA, muy posiblemente a través de su capacidad de regular CatSper (Ernesto y Weigel Muñoz et al, 2015), el principal canal de calcio del espermatozoide esencial para la fertilidad. En base a ello, el primer objetivo de esta Tesis consistió en continuar explorando el rol de CRISP1 como regulador de CatSper y explorar su potencial empleo para el desarrollo de un método anticonceptivo no hormonal.

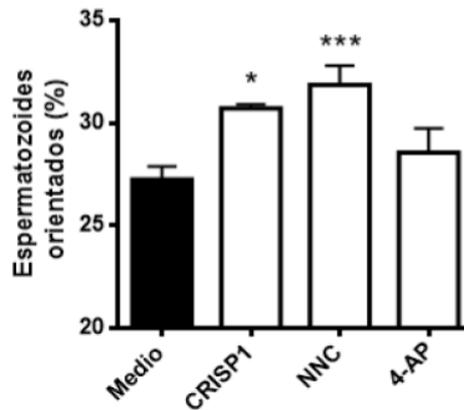
Si bien los resultados obtenidos hasta el momento en ratón indicaban que CRISP1 era capaz de quimioatraer y orientar a los espermatozoides como así también de inhibir a CatSper, restaba asociar estos dos conceptos y confirmar nuestra hipótesis de que la capacidad orientadora de espermatozoides de CRISP1 estaba mediada por su capacidad de inhibir al canal CatSper. Por esta razón, en primer lugar, realizamos un estudio en el cual se evaluó el efecto tanto de un antagonista de CatSper como lo es el NNC 55-0396 (NNC), como del agonista 4-aminopiridina (4-AP), sobre la capacidad quimioattractante de espermatozoides, utilizando la cámara de Zigmond modificada (Figura I.1 A) empleada en nuestros estudios previos. La premisa de este experimento consistía en que, si efectivamente la inhibición de CatSper por CRISP1 disminuía la HA de los espermatozoides, aumentando así su capacidad de ser orientados (Eisembach), un antagonista del canal podría replicar dicho efecto y lograr orientar a los espermatozoides. De ese modo, uno de los dos pocillos de la cámara de Zigmond fue cargado con los espermatozoides capacitados mientras

que el segundo pocillo fue cargado con el medio conteniendo el compuesto a evaluar. Luego de 15 minutos de incubación, tiempo suficiente para que se genere el gradiente en el puente entre ambos pocillos, se capturaron imágenes durante 4 minutos a través de una cámara de video adosada al microscopio. Utilizando el complemento MtrackJ del image J, se analizaron las trayectorias y la orientación de los espermatozoides de manera tal que si los mismos estuvieran orientados al azar, la distribución entre los diferentes cuadrantes de la cámara (Figura I.1 B) sería equitativa (25% aproximadamente) mientras que la detección de un desvío hacia el cuadrante cercano al pocillo conteniendo el compuesto, indicaría la existencia de una quimioatracción u orientación de los espermatozoides.



**Figura I.1 Metodología utilizada para medir orientación espermática.** **A.** Esquema de una cámara de Zigmund utilizada para medir quimiotaxis. El círculo rojo señala el puente entre ambas pocillos. **B.** División en cuadrantes del campo observado por microscopia.

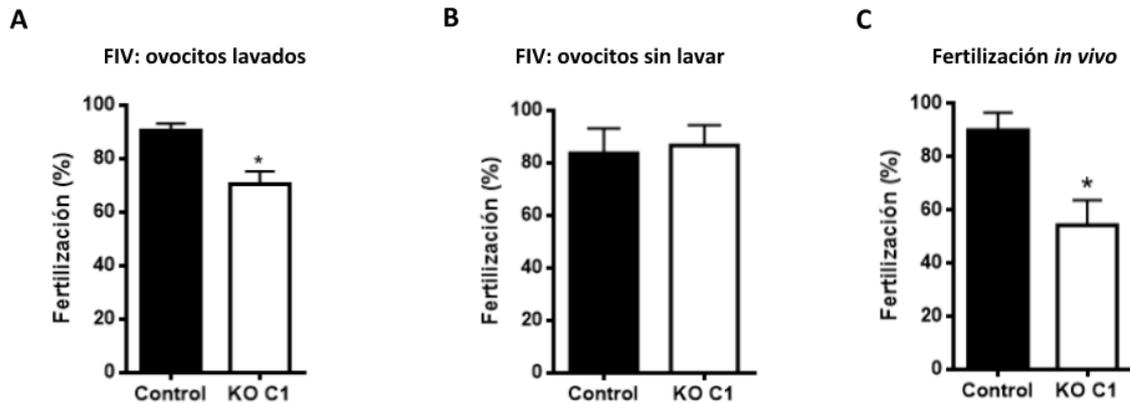
Los resultados mostraron que mientras que el inhibidor NNC fue capaz de quimioatraer a los espermatozoides al igual que CRISP1, el agonista 4-AP no tuvo actividad, apoyando la idea de que la quimioatracción inducida por CRISP1 se encontraría mediada por la inhibición de CatSper (Figura I.2).



**Figura I.2 Estudio de la capacidad quimioattractante de un agonista y un antagonista de CatSper.** Los espermatozoides capacitados se colocaron en un pocillo de la cámara Zigmond mientras que el segundo pocillo fue cargado con NNC (1  $\mu$ M) o 4-AP (2 mM) , utilizando medio libre de compuestos como control negativo y CRISP1 (10  $\mu$ M) como control positivo. Después de 15 minutos, se analizaron las trayectorias de los espermatozoides y se calculó el porcentaje de espermatozoides orientados hacia los compuestos. En todos los casos, los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes en los que se analizaron > 150 trayectorias de espermatozoides por experimento. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$  vs. Medio.

Las evidencias encontradas hasta el momento confirman la capacidad de CRISP1 de regular a CatSper, molécula clave para la fertilidad masculina (Ren et al. 2001). De este modo, el hecho de haber detectado la expresión de CRISP1 en el tracto femenino apoya la importancia de continuar estudiando el rol de CRISP1 de la hembra para la fertilización y la fertilidad femenina. Al respecto, y tal como fuera mencionado anteriormente, si bien los ensayos de fertilización *in vitro* utilizando COC KO para CRISP1 habían mostrado la participación de esta proteína en la etapa de penetración del cúmulus (Ernesto et al, 2015), la fertilidad de las hembras KO para CRISP1 resultó normal. Con el fin de investigar más profundamente estas observaciones, llevamos a cabo ensayos de fertilización *in vitro* bajo dos esquemas experimentales diferentes en ambos de los cuales se co-incubaron COC provenientes de hembras KO para CRISP1 (KO C1) o control con espermatozoides control. En un caso, los ovocitos fueron recuperados a las 3 hs de co-incubación, lavados por pipeteo para separarlos de los espermatozoides, e incubados *in vitro* durante toda la noche para determinar el porcentaje que había alcanzado el estadio de dos células. En el otro caso, las gametas continuaron la co-incubación hasta el día siguiente, evaluándose también el

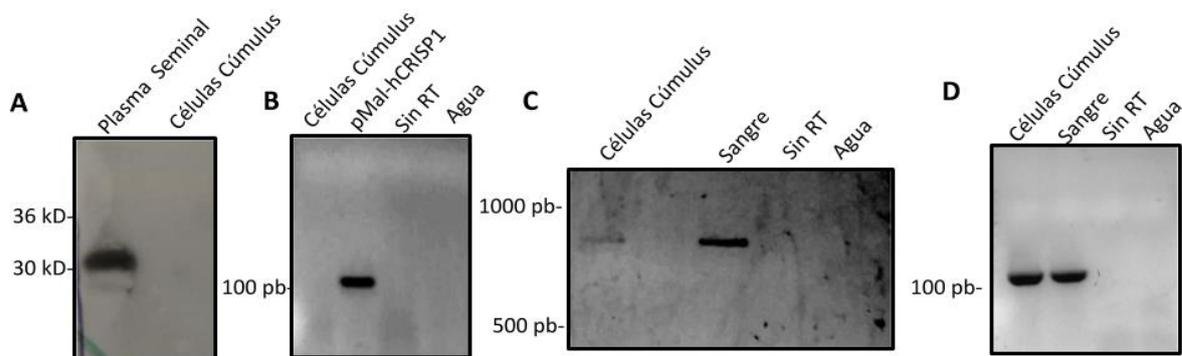
porcentaje de ovocitos en dos células. Los resultados mostraron que mientras los ovocitos separados de los espermatozoides a las 3 hs de co-incubación presentaban una bajada significativa en el porcentaje de fertilización respecto al control (Figura I.3 A), la co-incubación de las gametas hasta el día siguiente conducía a porcentajes de fertilización no significativamente diferentes a los controles (Figura I.3 B). Estos resultados indicaban que los defectos en fertilización observados a tiempos cortos de co-incubación podían ser compensados por un mayor tiempo de co-incubación de las gametas. Si bien estos resultados podían explicar la normal fertilidad que se observa para las hembras KO C1 debido al mayor tiempo de exposición de las gametas *in vivo*, existía la posibilidad que los defectos de los COC KO C1 observados *in vitro* pudieran evidenciarse *in vivo* bajo una condición más demandante tal como lo es el apareo con hembras superovuladas (Brukman et al, 2016). En base a ello, con el fin de analizar esta posibilidad, hembras superovuladas tanto KO C1 como control fueron apareadas con machos control. Al día siguiente, en aquellas hembras en las cuales se confirmó el éxito del apareo por presencia de tapón vaginal, los ovocitos fueron recuperados de la ampulla e incubados *in vitro* durante toda la noche para determinar el porcentaje de los mismos que había alcanzado el estadio de dos células. Como se muestra en la Figura I.3 C, los resultados revelaron una bajada significativa en el porcentaje de fertilización correspondiente a las hembras KO C1 respecto al control, confirmando la relevancia de la proteína CRISP1 femenina para el proceso de fertilización *in vivo*.



**Figura I.3 Efecto de la ausencia de CRISP1 del tracto reproductor femenino sobre la fertilización.** **A y B.** Porcentaje de fertilización de COC provenientes de hembras KO C1 o controles que fueron incubados *in vitro* con espermatozoides de ratón control durante 3 hs (lavados) (A) o durante toda la noche (sin lavar) (B). FIV: Fertilización *in vitro*. **C.** Porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de hembras KO C1 o control apareadas con machos control. En todos los casos, los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

Habiendo confirmado la relevancia de la proteína CRISP1 femenina para la fertilización en un modelo de ratón, resultaba de interés investigar si estas observaciones podían extenderse al modelo humano. Para ello, decidimos estudiar la expresión de CRISP1 en el *cumulus oophorus* que rodea al ovocito humano a partir de células de granulosa humanas provenientes de material de descarte provistas por la Lic. F. Raffo del centro de fertilización asistida Fertilab. Dichas muestras fueron utilizadas para la preparación de un extracto proteico y posterior análisis de la presencia de CRISP1 por WB, utilizando un anticuerpo contra CRISP1 humana (hCRISP1). Sin embargo, luego de numerosos intentos, no logramos detectar a CRISP1 mediante esta técnica (Figura I.4 A). Teniendo en cuenta que resultados previos en el modelo de ratón indicaban que CRISP1 se expresa en bajos niveles en las células del cúmulus, existía la posibilidad de que la falta de detección de CRISP1 en las muestras humanas se debiera a una muy baja expresión de la misma sumado a un problema de baja detección del anticuerpo. En base a ello, el resto de las muestras fueron utilizadas para la extracción de ARNm de forma tal de analizar la presencia del mensajero de Crisp1 por RT-PCR. El empleo de esta aproximación, sin embargo, tampoco fue exitosa (Figura I.4 B). Por tal razón, dada la alta homología en secuencia entre CRISP1 de ratón y CRISP3

humana como así también que se ha descripto la expresión de CRISP3 en tejido ovárico humano (Krätzschar et al. 1996), nos planteamos la posibilidad de que fuera CRISP3 la proteína que se estuviera expresando en las células del cúmulus humano. Los resultados obtenidos por RT-PCR (Figura I.4 C), la secuenciación de la banda obtenida mediante el método Sanger (Macrogen, Corea del Sur) (Figura I.5), y el posterior estudio de Blast con la base de datos del NCBI (Figura I.6) confirmaron la presencia del mensajero de Crisp3 en extractos de cúmulus humanos.



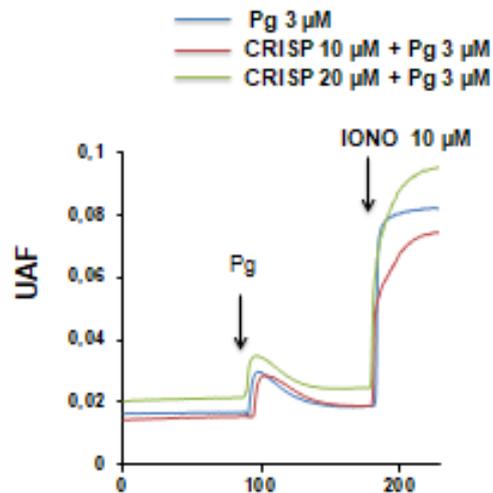
**Figura I.4 Estudio de la expresión de las CRISP en células de cúmulus humano.** **A.** Extractos proteicos de muestras de células de cúmulus humano fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por WB utilizando un suero anti-CRISP1 humana y muestras de plasma seminal como control positivo. **B y C.** El RNA total de células de cúmulus fue utilizado como molde para determinar la presencia de Crisp1 (**B**) o Crisp3 (**C**) por RT-PCR, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. En el caso de Crisp1, se utilizó como control positivo de la funcionalidad de los primers, un vector cargado con el cDNA de Crisp1 humana (pMal-hCRISP1) mientras que el control positivo para Crisp3 fue RNA proveniente de células de sangre humana. **D.** Control de carga de las muestras de células de cúmulus y de sangre utilizando primers específicos contra Gapdh. Las figuras son representativas de al menos 3 repeticiones.



Score	Expect	Identities	Gaps
1640 bits(888)	0.0	908/917(99%)	4/917(0%)
Query 700	ATATG-TCCCTTATGAACAAGGAGCACCTTGTGCCAGTTGCCAGATAACTGTGACGATG		758
Sbjct 11	ATATGTTCCCTTATG-AC-AGGAGCACCTTGTGCCAGTTGCCAGATAACTGTGACGATG		68
Query 759	GACTATGCACCAATGGTTGCAAGTACGAAGATCTCTATAGTAACTGTAAAAGTTGAAGC		818
Sbjct 69	GACTATGCACCAATGGTTGCAAGTACGAAGATCTCTATAGTAACTGTAAAAGTTGAAGC		128
Query 819	TCACATTAACCTGTAAACATCAGTTGGTCAGGGACAGTTGCAAGGCCTCCTGCAATTGTT		878
Sbjct 129	TCACATTAACCTGTAAACATCAGTTGGTCAGGGACAGTTGCAAGGCCTCCTGCAATTGTT		188
Query 879	CAAACAGCATTTATTAATAACGCATTACACACCGAGTAGGGCTATGTAGAGAGGAGTCAG		938
Sbjct 189	CAAACAGCATTTATTAATAACGCATTACACACCGAGTAGGGCTATGTAGAGAGGAGTCAG		248
Query 939	ATTATCTACTTAGATTTGGCATCTACTTAGATTTAACATATACTAGCTGAGAAATTGTAG		998
Sbjct 249	ATTATCTACTTAGATTTGGCATCTACTTAGATTTAACATATACTAGCTGAGAAATTGTAG		308
Query 999	GCATGTTTGATACACATTTGATTTCAAATGTTTTCTTCTGGATCTGCTTTTTATTTTAC		1058
Sbjct 309	GCATGTTTGATACACATTTGATTTCAAATGTTTTCTTCTGGATCTGCTTTTTATTTTAC		368
Query 1059	AAAAATATTTTTCATACAAATGGTTAAAAAGAAACAAAATCTATAACAACAACCTTTGGAT		1118
Sbjct 369	AAAAATATTTTTCATACAAATGGTTAAAAAGAAACAAAATCTATAACAACAACCTTTGGAT		428
Query 1119	TTTTATATATAAACTTTGTGATTTAAATTTACTGAATTTAATTAGGGTGAAAATTTTGAA		1178
Sbjct 429	TTTTATATATAAACTTTGTGATTTAAATTTACTGAATTTAATTAGGGTGAAAATTTTGAA		488
Query 1179	AGTTGTATTCTCATATGACTAAGTTCACTAAAACCTGGATTGAAAGTGAAAATTATGTT		1238
Sbjct 489	AGTTGTATTCTCATATGACTAAGTTCACTAAAACCTGGATTGAAAGTGAAAATTATGTT		548
Query 1239	CCTAGAACAAAATGTACAAAAGAACAATATAATTTTCACATGAACCTTGGCTGTAGTT		1298
Sbjct 549	CCTAGAACAAAATGTACAAAAGAACAATATAATTTTCACATGAACCTTGGCTGTAGTT		608
Query 1299	GCCTTTCCTAGCTCCACTCTAAGGCTAAGCATCTTCAAAGACGTTTTCCCATATGCTGTC		1358
Sbjct 609	GCCTTTCCTAGCTCCACTCTAAGGCTAAGCATCTTCAAAGACGTTTTCCCATATGCTGTC		668
Query 1359	TTAATCTTTTCACTCATTACCCTTCTTCCCAATCATCTGGCTGGCATCCTCACAATTG		1418
Sbjct 669	TTAATCTTTTCACTCATTACCCTTCTTCCCAATCATCTGGCTGGCATCCTCACAATTG		728
Query 1419	AGTTGAAGCTGTTCCCTCCTAAAACAATCCTGACTTTTATTTTGCCAAAATCAATACAATC		1478
Sbjct 729	AGTTGAAGCTGTTCCCTCCTAAAACAATCCTGACTTTTATTTTGCCAAAATCAATACAATC		788
Query 1479	CTTTGAATTTTCTCTGCATAAATTTTACAGTAGAATATGATCAAACCTTCATTTTAA		1538
Sbjct 789	CTTTGAATTTTCTCTGCATAAATTTTACAGTAGAATATGATCAAACCTTCATTTTAA		848
Query 1539	ACCTCTCTTCTCTTTGACAAAACCTTCCTTAAAAAAGAATACAAGATAATATAGGTAAATA		1598
Sbjct 849	ACCTCTCTTCTCTTTGACAAAACCTTCCTTAAAAAAGAATACCAGATAATATAGGT-AATA		907
Query 1599	CCCTCCACTCAAGGAGG	1615	
Sbjct 908	CCCCCCCCCGAGGAGG	924	

**Figura I.6** Alineamiento de la secuencia obtenida anteriormente (Figura I.5) y de la secuencia del mensajero de Crisp3 humana que se encuentra en la base de datos del NCBI.

El hecho de que en el modelo de ratón la proteína CRISP1 nativa y no así la recombinante bacteriana tenga capacidad de orientar a los espermatozoides, y que la proteína nativa desnaturalizada tampoco sea capaz de regular CatSper en experimentos de electrofisiología (Ernesto et al. 2015) apoyan la idea de que el correcto funcionamiento de CRISP1 depende de la conformación de la proteína. Estas observaciones indican la necesidad de contar con la proteína CRISP3 humana nativa purificada o bien expresada en un sistema eucariota para llevar a cabo los estudios funcionales en el humano. No disponiendo por el momento de dicho material y en colaboración con el Dr. Alberto Darszon (UNAM, México), exploramos la posibilidad de que la proteína CRISP1 nativa de rata tuviera algún efecto inhibitorio sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por progesterona a través de CatSper en espermatozoides humanos. Para ello, los espermatozoides fueron incubados con la sonda Fluo 3-AM para luego medir, por microscopía, la intensidad de fluorescencia emitida por las células antes y después del agregado de progesterona, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de CRISP1. Los resultados mostraron que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por CatSper en espermatozoides humanos no se vio afectada por la presencia de CRISP1 de roedor (Figura I.7), probablemente debido a la baja identidad de secuencias aminoacídicas (41%) entre CRISP3 humana y de rata o bien a la diferente regulación de la actividad de CatSper humano que puede ser estimulada por progesterona (Lishko et al. 2011).



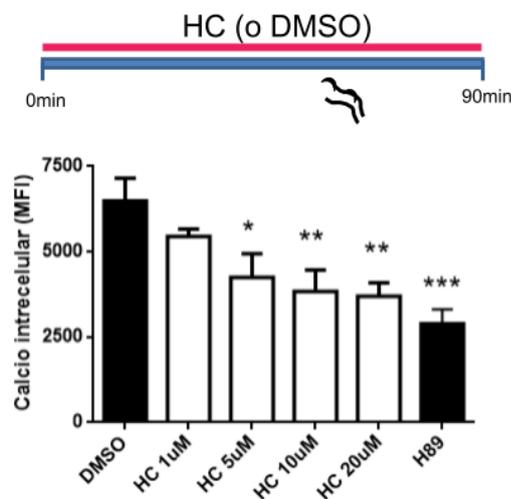
**Figura I.7 Efecto de CRISP1 nativa de rata sobre la actividad de CatSper humano.** Espermatozoides humanos no capacitados fueron cargados con Fluo-3 AM, midiéndose la intensidad de fluorescencia antes y después del agregado de progesterona (Pg) 3 uM en presencia de dos concentraciones distintas de CRISP1 de rata (10 y 20 uM) o en ausencia de la misma como control. La intensidad de fluorescencia fue medida por microscopía. La ionomicina (IONO) 10 uM fue agregada como control de respuesta al calcio UAF: unidad arbitraria de fluorescencia.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento en el modelo murino apoyan el rol de la proteína CRISP1 tanto en la regulación de CatSper como en el proceso de fertilización mientras que la identificación del mensajero de CRISP3 en células del cúmulus humanas apoyan la posibilidad de que las observaciones obtenidas en ratón puedan extenderse al modelo humano.

Teniendo en cuenta que CatSper es indispensable para la fertilidad masculina y que CRISP1 es un inhibidor natural del mismo, nos planteamos la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo no hormonal basado en la actividad inhibitoria de CRISP1 sobre el canal. Al respecto, cabe mencionar que nuestro laboratorio se encuentra desde hace años explorando activamente la posibilidad de utilizar a las proteínas CRISP como blancos o modelos de estudio para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad tanto en animales como en el hombre. Dado que uno de los inhibidores farmacológicos de CatSper utilizados por nuestro grupo, HC-056456 (HC), mostro tener una actividad inhibitoria muy similar a la de CRISP1 en el modelo de roedor (Ernesto et al. 2015), nos propusimos llevar a

cabo los estudios mencionados utilizando HC con el fin de obtener primeramente una prueba de concepto de nuestra hipótesis.

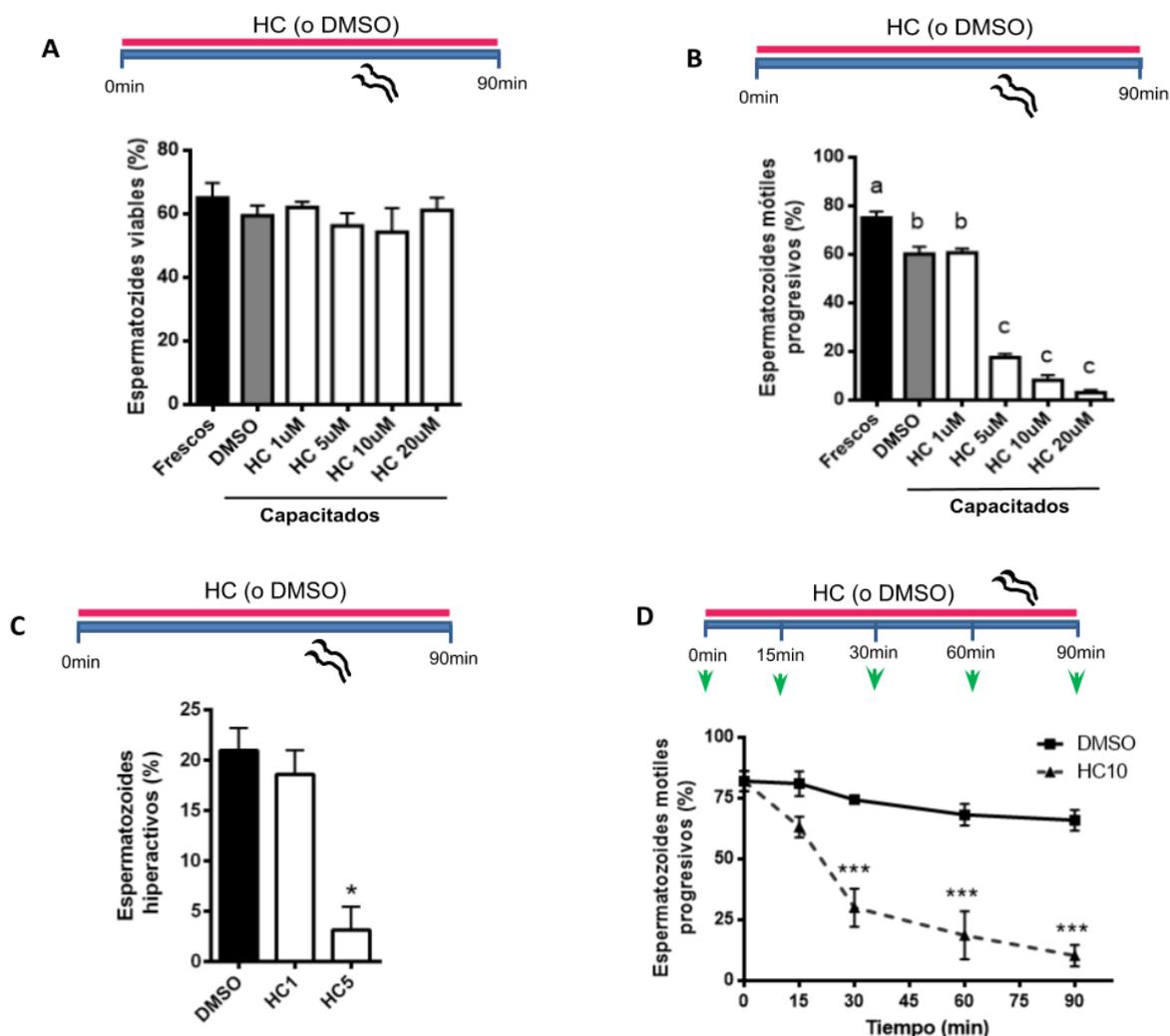
El primer paso consistió en analizar la capacidad de HC de inhibir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en el espermatozoide durante la capacitación. Para ello, se incubaron espermatozoides de ratón en condiciones capacitantes durante 90 minutos en presencia de diferentes concentraciones de HC (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ), del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo de la inhibición de  $\text{Ca}^{2+}$ , o de H89 (inhibidor de PKA) como control positivo de la inhibición. Al finalizar la incubación, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron analizados mediante la técnica de citometría de flujo, utilizando la sonda Fluo 4-AM. Los resultados mostraron que la exposición de los espermatozoides a HC durante la capacitación produjo una bajada significativa y concentración-dependiente de los niveles de fluorescencia a partir de una concentración 5  $\mu\text{M}$ , siendo 10  $\mu\text{M}$  la concentración mínima que producía el máximo efecto (Figura I.8).



**Figura I.8 Efecto de HC sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor.** Niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular medidos por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (MFI) del Fluo 4-AM en espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes durante 90 minutos en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20  $\mu\text{M}$ ) o DMSO como control. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*,  $p < 0,0005$  vs. DMSO.

Una vez confirmada la capacidad de HC de inhibir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los espermatozoides al estar presente durante la capacitación, se analizó el efecto del HC sobre distintos parámetros espermáticos asociados a dicho proceso. Estos estudios mostraron que la exposición de espermatozoides a las distintas concentraciones de HC durante la capacitación no afectó la viabilidad de los mismos (Figura I.9 A) pero produjo una fuerte bajada en el porcentaje de motilidad progresiva analizada subjetivamente por observación al microscopio óptico (Figura I.9 B). El análisis objetivo de la motilidad utilizando el sistema computarizado CASA no solo confirmó el efecto de HC sobre la motilidad progresiva a 5  $\mu\text{M}$  y no a 1  $\mu\text{M}$  (HC 5  $\mu\text{M}$   $8,9 \pm 2,1$ ; HC 1  $\mu\text{M}$   $31,3 \pm 1,0$ ; DMSO  $33,5 \pm 2,6$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=6$ ), sino también reveló que la concentración 5  $\mu\text{M}$  producía una bajada significativa en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados (Figura I.9 C). Este análisis no pudo realizarse utilizando las mayores concentraciones de HC (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) ya que el efecto de las mismas sobre la motilidad de los espermatozoides descrito anteriormente (Figura I.9B) no permitía disponer del mínimo de 200 células móviles progresivas que se requiere para llevar a cabo el análisis por CASA.

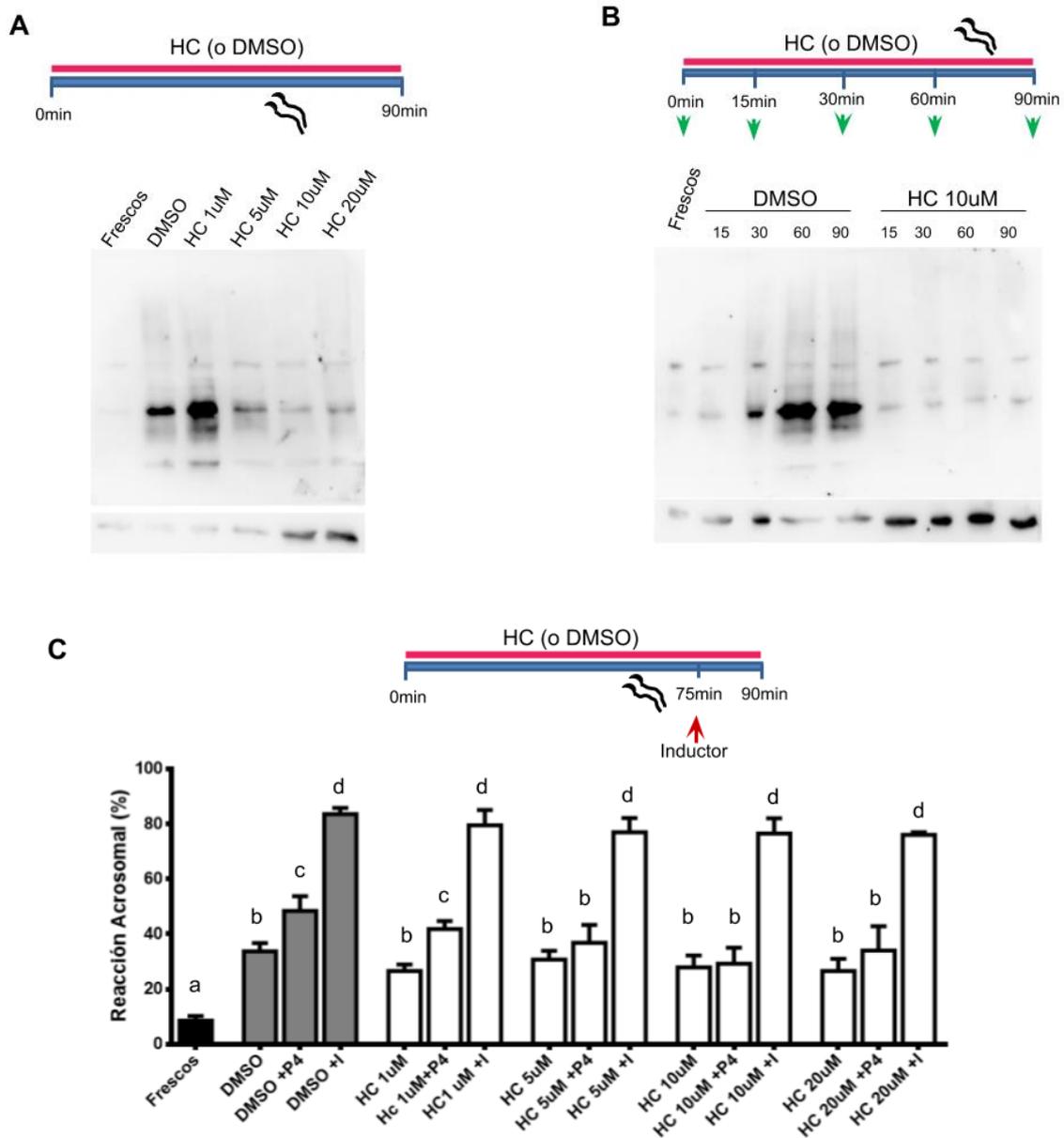
Posteriormente, se realizó un estudio cinético para determinar en qué momento durante la capacitación, el HC era capaz de ejercer su efecto inhibitorio sobre la motilidad de los espermatozoides. Para tal fin, los espermatozoides se incubaron bajo condiciones capacitantes en presencia de la concentración mínima de HC que había mostrado mayor efecto inhibitorio sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ), recuperándose alícuotas de espermatozoides a distintos tiempos cuya motilidad fue analizada en forma subjetiva. Los resultados mostraron una bajada significativa en la motilidad espermática a partir de los 30 minutos de incubación, alcanzando niveles inferiores al 5% al final de la capacitación (90 minutos) (Figura I.9 D).



**Figura 1.9 Efecto de la presencia de HC durante la capacitación sobre distintos parámetros espermáticos.** **A.** Porcentaje de espermatozoides viables capacitados durante 90 min en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20 uM) o sin capacitar (frescos), evaluado por tinción vital con eosina. **B.** Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos capacitados en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20 uM) o sin capacitar (frescos), analizado bajo microscopio óptico en un aumento de 400x. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. **C.** Porcentaje de espermatozoides hiperactivados al finalizar la capacitación en presencia de HC 1 o 5 uM analizado por CASA. **D.** Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos a distintos tiempos de capacitación en presencia de HC 10 uM, analizado bajo microscopio óptico en un aumento de 400x. En todos los casos, se empleó DMSO como control y los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 3s experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$  vs. Control.

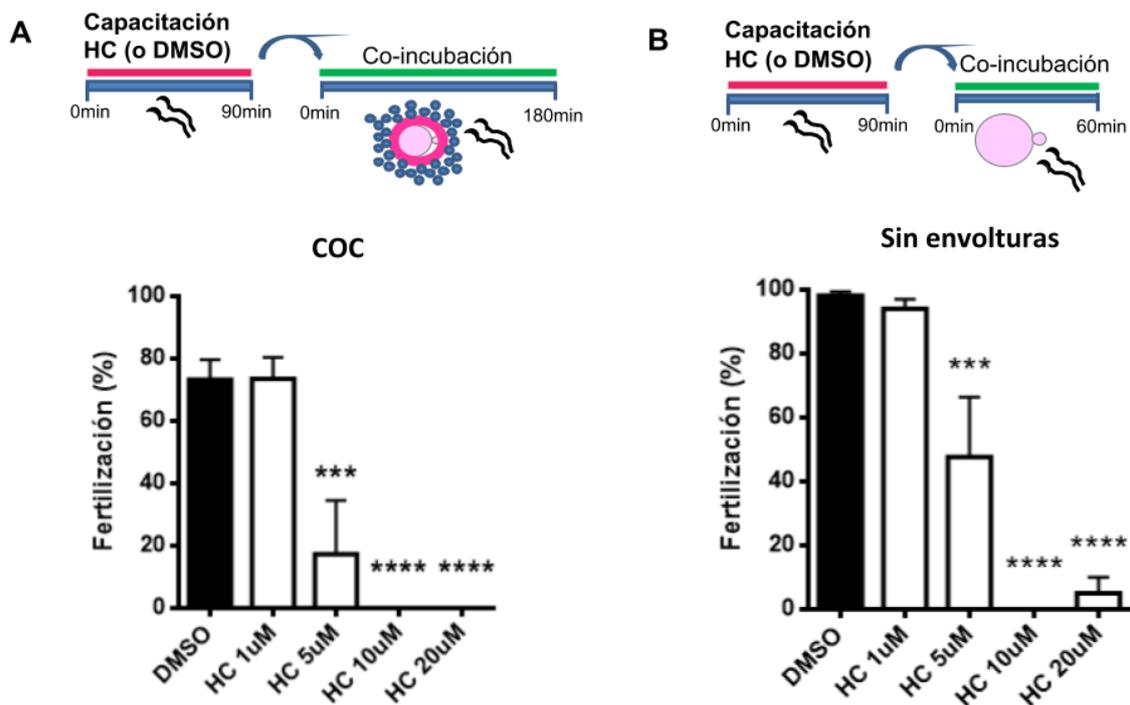
Teniendo en cuenta el ampliamente descrito aumento de los niveles de fosforilación en residuos tirosina que tiene lugar durante la capacitación, el cual se sabe es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , decidimos evaluar el efecto de HC sobre este parámetro espermático. Para ello, extractos proteicos obtenidos de espermatozoides capacitados durante 90 minutos en presencia de diferentes concentraciones de HC (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de poliacrilamida y revelados por WB, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Los resultados mostraron una clara disminución en los niveles de fosforilación a concentraciones superiores a 5  $\mu\text{M}$  (Figura I.10 A). Asimismo, el análisis de fosforilación en tirosina a distintos tiempos durante la capacitación, utilizando una concentración fija de HC (10  $\mu\text{M}$ ), reveló que el inhibidor producía su efecto a partir de los 30 minutos de incubación (Figura I.10 B).

Teniendo en cuenta que otro de los eventos que tiene lugar durante la capacitación y que es crítico para diferentes etapas del proceso de fertilización es la ocurrencia de la reacción acrosomal (RA), el próximo paso consistió en evaluar el efecto de HC sobre este evento excitotico. Dado que la RA puede ser tanto espontánea como inducida por agentes tanto fisiológicos (ej. progesterona) como farmacológicos (ej. ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ), los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de diferentes concentraciones de HC, exponiendo a los mismos ya sea a progesterona o a ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los últimos 15 minutos de capacitación. Los resultados indicaron que si bien el HC no produjo efectos sobre la RA espontánea o inducida por ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  a ninguna concentración, el mismo afectó significativamente los niveles de RA inducida por progesterona a partir de una concentración de 5 $\mu\text{M}$ . (Figura I.10 C).



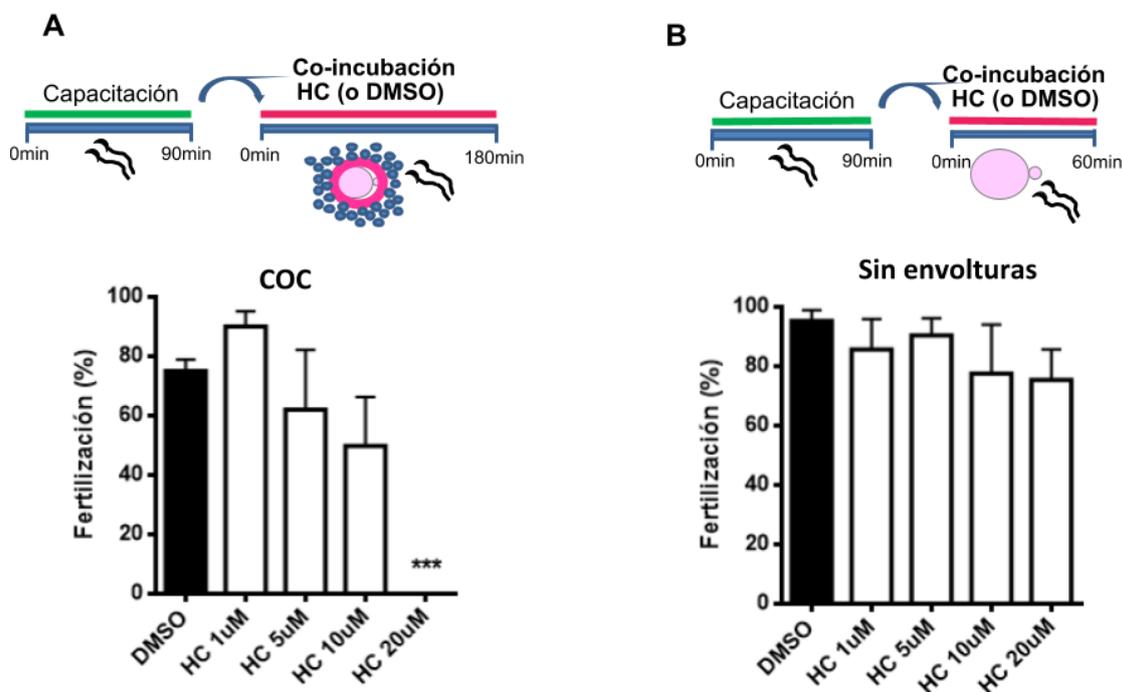
**Figura 1.10 Efecto de HC sobre distintos parámetros espermáticos asociados a la capacitación.** **A.** Fosforilación de proteínas en tirosina en espermatozoides capacitados en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20 uM) o DMSO como control, o sin capacitar (frescos), analizada por electroforesis y WB utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Se muestra una imagen representativa. **B.** Fosforilación de proteínas en tirosina a distintos tiempos de capacitación en presencia de HC 10 uM o DMSO como control. **C.** Porcentaje de espermatozoides que han sufrido la RA al ser capacitados en presencia de concentraciones crecientes de HC (1, 5, 10 o 20 uM) y expuestos a progesterona (P4), ionóforo de calcio (I) o DMSO (vehículo) durante los últimos 15 minutos de incubación. La RA fue evaluada por medio de tinción con Coomassie Blue. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Habiendo encontrado efectos de HC sobre diferentes parámetros asociados a la capacitación tales como fosforilación en tirosina, HA y RA inducida, a continuación, exploramos el efecto del inhibidor sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides a través de ensayos de fertilización *in vitro* utilizando diferentes tipos de ovocitos. En primera instancia, se co-incubaron COC con espermatozoides previamente capacitados en presencia de las diferentes concentraciones de HC (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ). Tal como se esperaba, estos experimentos mostraron porcentajes de fertilización significativamente menores que los controles al emplear HC 5  $\mu\text{M}$  y una completa inhibición a 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  (Figura I.11 A). Los mismos resultados se obtuvieron al utilizar ovocitos sin cúmulus ni ZP (Figura I.11 B).



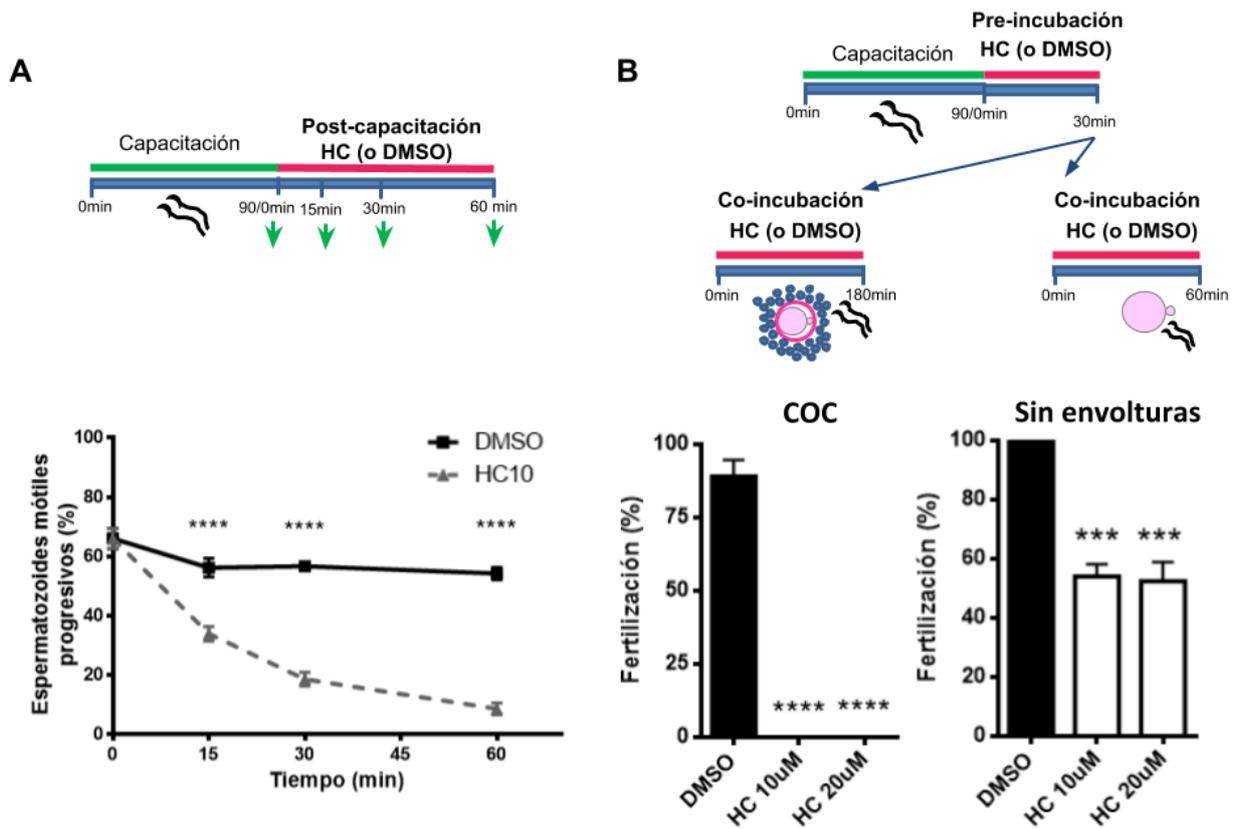
**Figura I.11 Efecto de HC sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor.** Complejos cúmulus ovocitos (A) u ovocitos sin cúmulus ni ZP (B) fueron co-incubados con espermatozoides capacitados en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20  $\mu\text{M}$ ) o DMSO como control. Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que presentaran dos pronúcleos o núcleo descondensado en el citoplasma al ser teñidos con Hoescht. En los esquemas la barra rosa indica presencia de HC y la barra verde ausencia de inhibidor. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*\*\*,  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  vs. DMSO.

Habiendo observado que el HC era capaz de afectar la capacidad fertilizante de espermatozoides que se capacitan en presencia del inhibidor, nos preguntamos si el mismo efecto podría darse sobre espermatozoides ya capacitados, para lo cual el HC fue agregado solo durante la co-incubación de las gametas. Bajo estas condiciones, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de fertilización para ninguna de las condiciones evaluadas (COC y ovocitos sin cumulus ni ZP) excepto para el caso de la co-incubación de COC y espermatozoides en presencia de la máxima concentración de HC (Figura I.12 A y B).



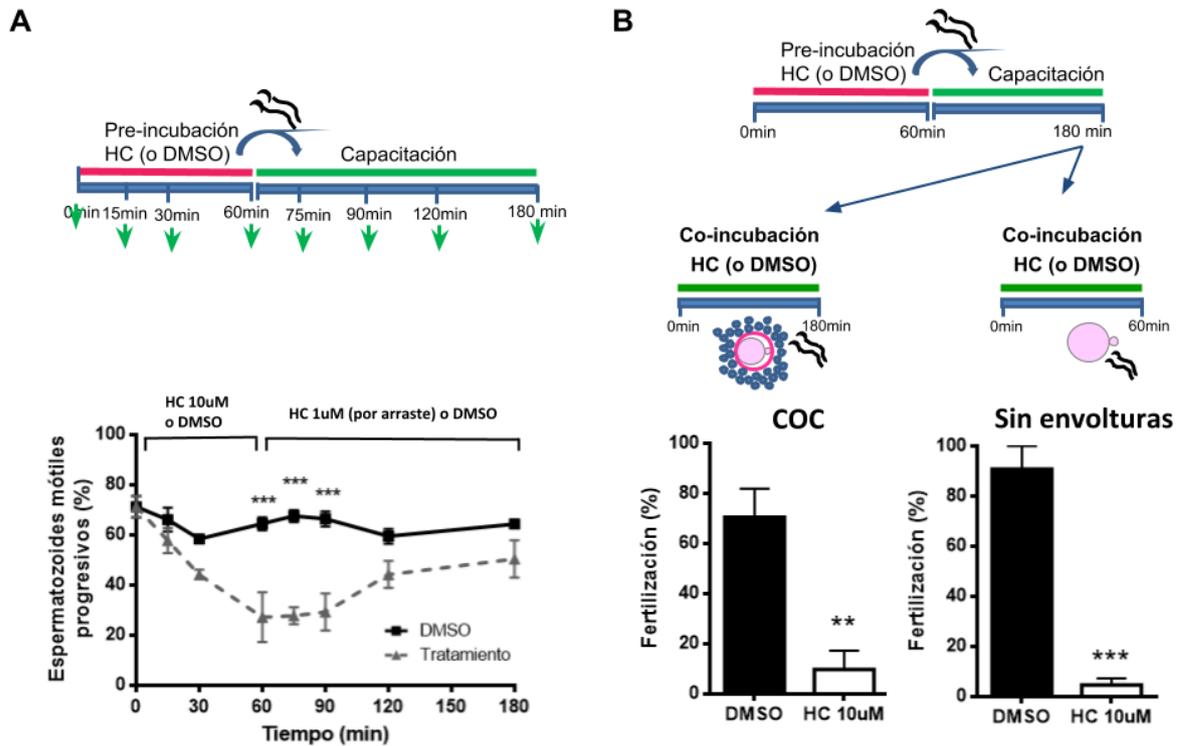
**Figura I.12 Efecto de HC sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides expuestos al inhibidor durante la co-incubación de las gametas.** Espermatozoides capacitados bajo condiciones control fueron co-incubados con COC (A) por 3 hs o con ovocitos sin envolturas por 1 hora (B) en presencia de distintas concentraciones de HC (1, 5, 10 o 20 uM), determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados al finalizar cada incubación. Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que mostraron cabeza de espermatozoide descondensada o dos pronúcleos en el citoplasma por tinción con Hoescht. En los esquemas la barra rosa indica presencia de tratamiento y la barra verde ausencia de inhibidor. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*\*\*,  $p < 0,0005$  vs. DMSO.

Si bien no se observaron efectos importantes sobre la fertilización, la motilidad de los espermatozoides analizada subjetivamente parecía verse severamente afectada al final del período de co-incubación (180 minutos para COC o 60 minutos para fusión), razón por la cual decidimos estudiar el efecto de HC sobre la motilidad. Nuestros resultados mostraron que los espermatozoides capacitados por 90 minutos en condiciones control y luego expuestos a HC 10 uM durante 60 minutos exhibían una motilidad significativamente menor a la de los controles (Figura I.13 A) y similar a la observada cuando los espermatozoides eran capacitados en presencia del inhibidor (ver Figura I.9 D). Estos resultados sugerían que la ausencia de efecto sobre la fertilización a pesar del marcado efecto sobre la motilidad podía deberse a la necesidad de un tiempo de exposición de los espermatozoides al HC previo a contactar con los ovocitos. Con el fin de evaluar esta posibilidad, espermatozoides ya capacitados en condiciones control fueron incubados con HC 10 o 20 uM durante 30 minutos previo a su co-incubación con los ovocitos también llevada a cabo en presencia de la misma concentración del inhibidor. Bajo estas condiciones, pudo observarse una bajada significativa de la fertilización tanto para COC como para ovocitos sin ZP (Figura I.13 B), apoyando la necesidad de un tiempo de exposición de los espermatozoides al inhibidor antes de contactar con los ovocitos, ya sea durante o luego de la capacitación.



**Figura I.13 Efecto de la pre-incubación con HC, luego de la capacitación, sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides.** A. Espermatozoides capacitados bajo condiciones control fueron luego expuestos a HC 10 uM o DMSO (control) durante 30 minutos, analizándose la motilidad de los mismos a diferentes tiempos durante la capacitación. El análisis fue realizado subjetivamente por observación bajo microscopio óptico a 400x B. Espermatozoides capacitados bajo condiciones control fueron expuestos a HC 10 uM, 20 uM o DMSO (control) durante 30 min y luego co-incubados con COC u ovocitos sin envolturas por 180 minutos o 60 minutos, respectivamente, en presencia del inhibidor. Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que mostraron cabeza de espermatozoide descondensada o dos pronúcleos en el citoplasma por tinción con Hoescht. En los esquemas, la barra rosa indica presencia de HC y la barra verde ausencia del inhibidor. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*\*\*,  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  vs. DMSO.

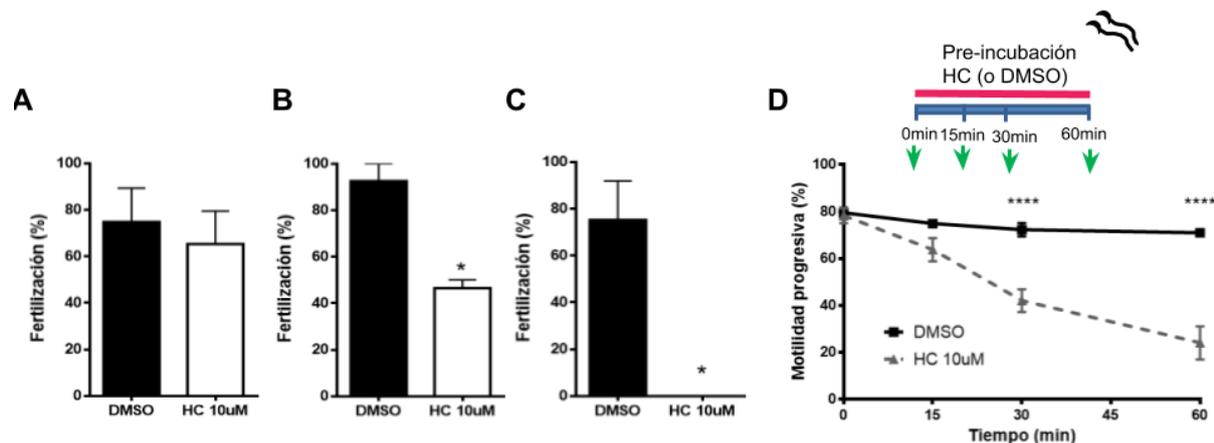
Los resultados descritos hasta el momento muestran los efectos de HC sobre los espermatozoides al ser agregado tanto durante la capacitación espermática como durante la co-incubación de las gametas, condiciones *in vitro* que representarían lo que podría ocurrir *in vivo* en caso de usarse el HC como un anticonceptivo femenino. Teniendo en cuenta que el objetivo de nuestros estudios era evaluar el potencial empleo de un inhibidor de CatSper como un posible método anticonceptivo no hormonal principalmente masculino, decidimos estudiar qué ocurriría en una condición que simulara mejor la administración del inhibidor al macho. Para ello, espermatozoides epididimarios en concentración  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml, que se sabe no es capacitante, fueron incubados durante una hora en presencia de HC 10  $\mu\text{M}$ , luego de lo cual una alícuota de esta suspensión fue diluida 1/10 de forma tal de obtener una concentración espermática capacitante y una concentración final del inhibidor que carece de efecto (1 $\mu\text{M}$ ). Los resultados revelaron que durante la hora de incubación en presencia de HC, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos decreció hasta alcanzar un valor aproximado de 20%, el cual, luego de la dilución, aumentó hasta alcanzar valores similares al control (Figura I.14 A). Si bien estas observaciones indicaban que el efecto inhibitorio de HC sobre la motilidad progresiva podía revertirse, el análisis de la capacidad fertilizante de estos espermatozoides *in vitro* en un medio libre de HC mostro que la misma continuaba inhibida tanto al emplear COC como ovocitos desnudos (Figura I.14 B).



**Figura I.14 Efecto de la pre-incubación con HC (previa a la capacitación) sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. A.** Los espermatozoides fueron pre-incubados con HC 10 uM o DMSO (control) durante 60 minutos, luego capacitados en ausencia de HC durante 120 minutos, analizándose la motilidad espermática a diferentes tiempos durante la capacitación). El análisis de motilidad fue realizado por observación al microscopio óptico (400x). **B.** Los espermatozoides fueron pre-incubados con HC 10 uM o DMSO (control) durante 60 minutos, capacitados por 120 minutos en ausencia de HC, y luego co-incubados con COC u ovocitos sin envolturas por 180 ó 60 minutos, respectivamente, evaluándose el porcentaje de fertilización. Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que mostraron cabeza de espermatozoide descondensada o dos pronúcleos en el citoplasma por tinción con Hoescht. En los esquemas la barra rosa indica presencia de HC y barra verde ausencia de inhibidor. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*,  $p < 0,0005$  vs. DMSO.

Una vez probada la efectividad de HC de inhibir la capacidad fertilizante de los espermatozoides *in vitro* decidimos evaluar si el inhibidor era también capaz de afectar la fertilización bajo condiciones *in vivo*. Para ello, espermatozoides recuperados del cauda epididimario y en concentración no capacitante ( $1 \times 10^7$ /ml), fueron expuestos a HC 10 uM durante 0, 30 o 60 minutos, y luego introducidos en uno de los cuernos uterinos de hembras prepúberes superovuladas, utilizando al cuerno contralateral con espermatozoides incubados con DMSO como control. Luego de aproximadamente 15 hs, se recuperaron los

ovocitos de la ampulla, y se evaluó el porcentaje de fertilización a través de la tinción de los mismos con Hoescht. Estos experimentos mostraron una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados por espermatozoides tratados con HC durante 30 minutos y una fertilización nula para aquellos tratados con el inhibidor durante 60 minutos (Figura I.15 A-C), indicando la capacidad de HC de ejercer su efecto también bajo condiciones *in vivo*. El análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados a alta concentración ( $1 \times 10^7$ /ml) (que no permite la capacitación), y expuestos a HC volvió a mostrar que la misma se veía afectada por el inhibidor siendo significativamente diferente del control a partir de los 30 minutos de exposición (Figura I.15 D).



**Figura I.15 Efecto de HC sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides *in vivo*.** A-C. Porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla de hembras superovuladas inseminadas con espermatozoides pre-incubados *in vitro* por 0, 30 o 60 minutos (A, B y C, respectivamente) con HC 10 uM o DMSO como control. Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que mostraron cabeza de espermatozoide descondensada o dos pronúcleos en el citoplasma por tinción con Hoescht. D. Porcentaje de espermatozoides epididimarios con motilidad progresiva a distintos tiempos de exposición a HC 10uM (o DMSO) incubados en una alta concentración ( $1 \times 10^7$  /ml aproximadamente) no capacitante. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  vs. DMSO.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el inhibidor específico de CatSper, HC, es capaz de afectar tanto la motilidad progresiva como la capacidad fertilizante de los espermatozoides independientemente de su estado de capacitación, requiriendo un tiempo

de acción sobre los espermatozoides previo a la exposición de los mismos al ovocito. Dicha inhibición no sería debida a un efecto tóxico del HC a juzgar por la normal viabilidad de los espermatozoides tratados y la reversibilidad de los efectos sobre la motilidad.

En conjunto, los resultados de la primera parte de este capítulo apoyan el rol de CRISP1 en la regulación de CatSper y de CRISP1 del cumulus en la fertilización abriendo, además, la posibilidad de que la proteína CRISP3 cumpla dicho rol en el humano. Por su parte, los resultados de la segunda parte de este capítulo muestran que el inhibidor de CatSper HC es capaz de afectar la capacidad fertilizante de los espermatozoides tanto *in vitro* como *in vivo*, representando una prueba de concepto a favor de la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo masculino no hormonal basado en la actividad inhibitoria de CRISP1 sobre CatSper.

## Capítulo II

### Generación y caracterización de animales carentes de CRISP3 y de más de dos CRISP simultáneamente

Si bien hasta el momento se encuentran disponibles los ratones KO para CRISP1 (Da Ros et al, 2008), CRISP2 y CRISP4 generados y caracterizados tanto por nuestro laboratorio como por otros grupos de investigación (Brukman et al. 2016; Carvajal et al. 2018; Gibbs et al. 2011; Lim et al. 2019; Turunen et al. 2012), aún no se ha desarrollado el animal KO para la proteína CRISP3. Como se mencionara anteriormente, CRISP3 tiene una distribución más amplia que las restantes CRISP, encontrándose presente en órganos y tejidos tanto reproductivos como no reproductivos, algunos de los cuales son de importancia inmunológica. Los estudios de fertilidad llevados a cabo en los KO simples para las diferentes CRISP mostraron que los mismos exhibían una fertilidad normal a pesar de que los espermatozoides presentaran defectos para fertilizar *in vitro*. Estos resultados, junto con el reciente hallazgo de que machos deficientes en CRISP1 y CRISP4 (DKO C1C4) eran subfértiles (Carvajal et al. 2018) respaldaron la existencia de mecanismos compensatorios entre los miembros de la familia. En base a ello, el segundo objetivo de esta Tesis consistió no solo en la generación y posterior caracterización del ratón KO para la proteína CRISP3 a nivel reproductivo sino también en continuar los estudios de la relevancia de las proteínas CRISP para la fertilidad masculina mediante la caracterización de animales múltiples KO.

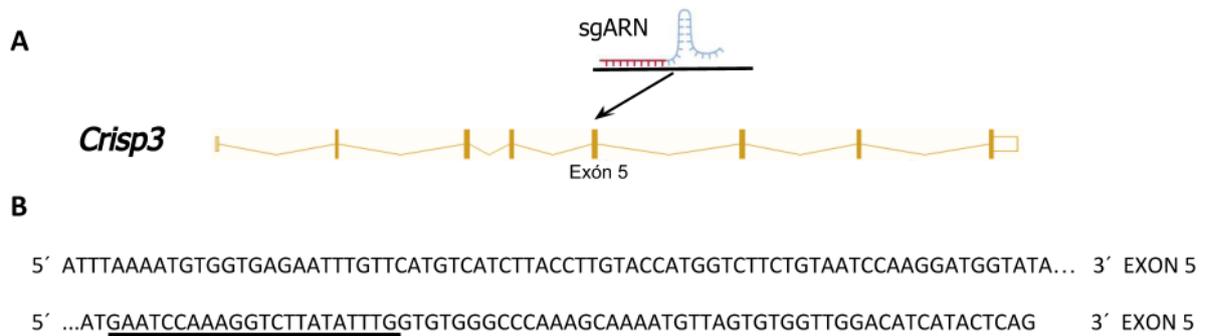
Para la generación de animales deficientes en la proteína CRISP3, decidimos utilizar la novedosa técnica CRISPR/Cas9 (Wang et al. 2013). Brevemente, la misma consiste en microinyectar en cigotas los sgRNA homólogos al sitio que se desea mutar, junto con el mensajero de la endonucleasa Cas9 la cual, una vez sintetizada, generará un corte de la doble hélice de ADN al ser reclutada por los sgRNA. Este daño es reconocido por los sistemas endógenos de reparación de la célula, produciéndose pequeñas inserciones y deleciones al azar (InDels). Las cigotas microinyectadas son luego transferidas a hembras pseudopreñadas y, una vez nacidas las crías, se identifica en las mismas la presencia de mutaciones en el ADN genómico por PCR y electroforesis (Figura II.1). Si bien el diseño y la selección de los sgRNA a utilizar se realizan mediante aproximaciones informáticas basadas, principalmente, en

minimizar la posibilidad de que los mismos reconozcan otros lugares del genoma, la eficiencia de mutagénesis de cada uno de los sgRNA debe ser probada experimentalmente.



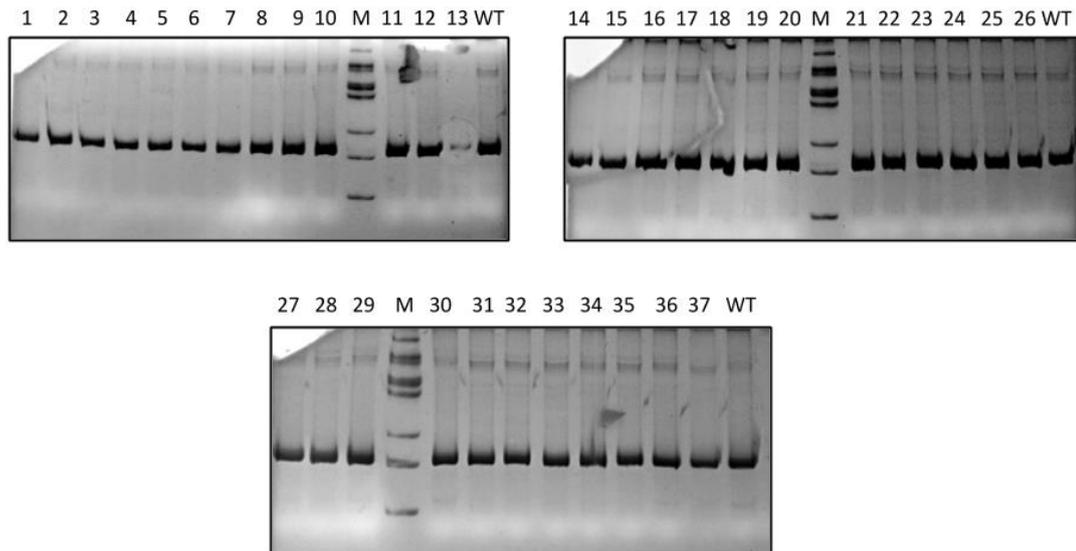
**Figura II.1 Esquema de la técnica CRISPR/Cas9 utilizada para generar ratones deficientes en CRISP3.** sgARN: ARN guía homologa al sitio que se desea mutar. Cas9 mRNA: mensajero de la endonucleasa Cas9 responsable del clivado de la doble hélice de ADN. Indels: abreviatura de inserciones y deleciones.

En nuestro caso en particular, teniendo en cuenta que los genes *Crisp1* y *Crisp3* de ratón presentan un alto grado de identidad en su secuencia, se diseñó *in silico* un sgRNA capaz de reconocer únicamente a *Crisp3*, para lo cual se buscó la región con menor homología entre ambas secuencias y que corresponde al exón 5 (Figura II.2) Una vez diseñado el sgRNA, el grupo dirigido por el Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI) fue el encargado de realizar la transcripción *in vitro* del mismo y del ARNm correspondiente a la enzima Cas9, como así también de la microinyección y transferencia a hembras pseudopreñadas de embriones WT provenientes de apareos de animales C57BL/6. Nuestro laboratorio se encargó, posteriormente, del análisis de la presencia de mutaciones en las crías nacidas como así también de los posteriores estudios funcionales destinados a caracterizar el modelo a nivel reproductivo.



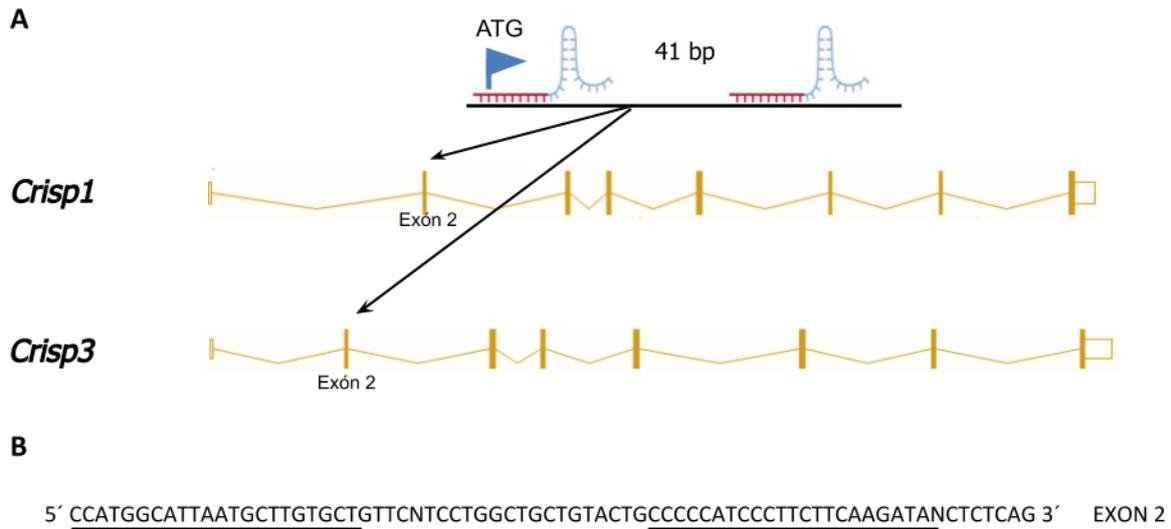
**Figura II.2 Estrategia utilizada para generar ratones deficientes en CRISP3. A.** Esquema del gen *Crisp3* indicando la región hacia la cual está dirigido el sgRNA utilizado. Las líneas verticales representan los exones del gen y las líneas finas horizontales los intrones del mismo. **B.** Secuencia del exón 5 del gen *Crisp3* donde la línea negra marca la región homóloga al sgRNA utilizado.

Se realizaron dos tandas de microinyección en las cuales se inyectaron un total de 280 cigotas, de las cuales 198 fueron transferidas a 10 hembras pseudopreñadas. Luego de los 21 días de gestación, se obtuvieron un total de 37 crías vivas (F0) y se procedió a determinar la presencia o ausencia de mutación en estos animales a partir de ADN genómico. Para ello, se extrajo el ADN de muestras provenientes de las orejas de los animales y se realizó una PCR con primers específicos que flanquearan la región homóloga al sgRNA. Luego de ello, el producto de PCR fue sometido a una ronda de desnaturalización a 95°C y renaturalización a temperatura ambiente de forma tal que, en caso de haber mutación, la hibridación de los fragmentos no fuera perfecta y permitiera detectar un patrón de bandas distinto al control al analizar las muestras por electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis de estos estudios reveló que ninguno de los 37 animales presentaba mutación en el gen de *Crisp3* (Figura II.3).



**Figura II.3 Análisis de la presencia de mutaciones en el gen *Crisp3* en los animales F0.** PCR a partir del ADN genómico proveniente de las 37 crías nacidas producto de la transferencia de las cigotas microinyectadas (F0), utilizando primers específicos que flanquean el exón 5 de *Crisp3*, seguido por un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en geles de poliacrilamida. Como control, se muestra un animal WT. M: marcador de peso molecular.

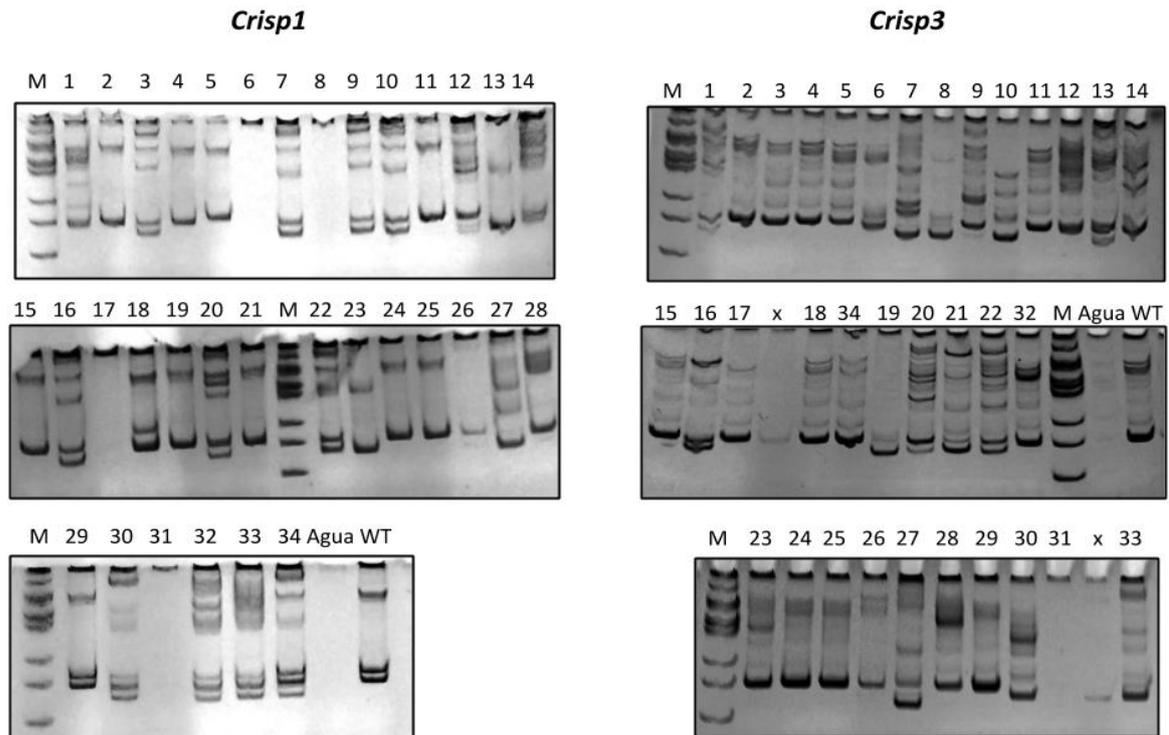
Dada la ausencia de resultados positivos, decidimos realizar algunas modificaciones con respecto a la estrategia utilizada. Por un lado, en lugar de emplear un solo sgRNA, se emplearon dos sgRNA separados por 41pb, aumentando así considerablemente las probabilidades de obtener una deleción más grande y, por ende, deletérea. Por otro lado, decidimos aprovechar el alto porcentaje de identidad entre *Crisp1* y *Crisp3* de forma tal que, en una misma tanda de microinyección, podríamos obtener no solo KO simples para CRISP3 sino también animales dobles KO (DKO) para CRISP1 y CRISP3. Teniendo en cuenta estas dos modificaciones, se diseñaron dos sgRNA que reconocían al exón 2 de ambos genes. Cabe mencionar que uno de los sitios de clivaje de uno de los sgRNA se encontraba muy próximo al sitio de inicio de la traducción, abriendo la posibilidad de que el mismo sea eliminado. En la figura II.4 se resume la estrategia descripta.



**Figura II.4 Segunda estrategia utilizada para generar ratones KO CRISP3 y DKO CRISP1/CRISP3.** **A.** Esquema de los genes *Crisp1* y *Crisp3* indicando las regiones de los mismos hacia las cuales están dirigidos los sgRNA utilizados. Las líneas verticales representan los exones del gen y las líneas finas horizontales los intrones del mismo. **B.** Secuencia del exón 2 de los genes *Crisp1* y *Crisp3* donde las líneas negras marcan las regiones homólogas a los sgRNA utilizados.

Una vez diseñados los sgRNA, se realizaron dos tandas de microinyección en las cuales se inyectaron un total 259 cigotas, de las cuales 168 fueron transferidas a 9 hembras pseudopreñadas, obteniéndose un total de 34 crías vivas (F0). El análisis por PCR y electroforesis en poliacrilamida reveló que 2 de los 34 animales presentaban mutación en *Crisp3*, 7 en *Crisp1*, 12 en ambos genes, 9 no parecerían presentar mutación alguna y 4 no pudieron ser determinados (Figura II.5). Dada la disponibilidad de la colonia de animales KO para CRISP1, nos enfocamos en la obtención del animal KO simple para CRISP3 y DKO CRISP1/CRISP3. Sabiendo que la técnica CRISPR/Cas9 conduce a un alto grado de mosaicismos (Mehravar et al. 2019; Mizuno et al. 2014; Oliver et al. 2015), los 2 ratones que presentaban mutación únicamente en *Crisp3* (#19 y #21 de la figura II.5) y 4 de los 12 animales que presentaban mutación en ambos genes (#1 #27 #30 #33 de la figura II.5), se colocaron en apareo con animales WT de forma tal de confirmar la presencia de la mutación en la línea germinal. El criterio de selección de los 4 animales con mutación en ambos genes se basó en que los mismos parecían presentar mutaciones de gran tamaño que podían ser resueltas en un gel de agarosa, lo cual representaba una ventaja tanto técnica como

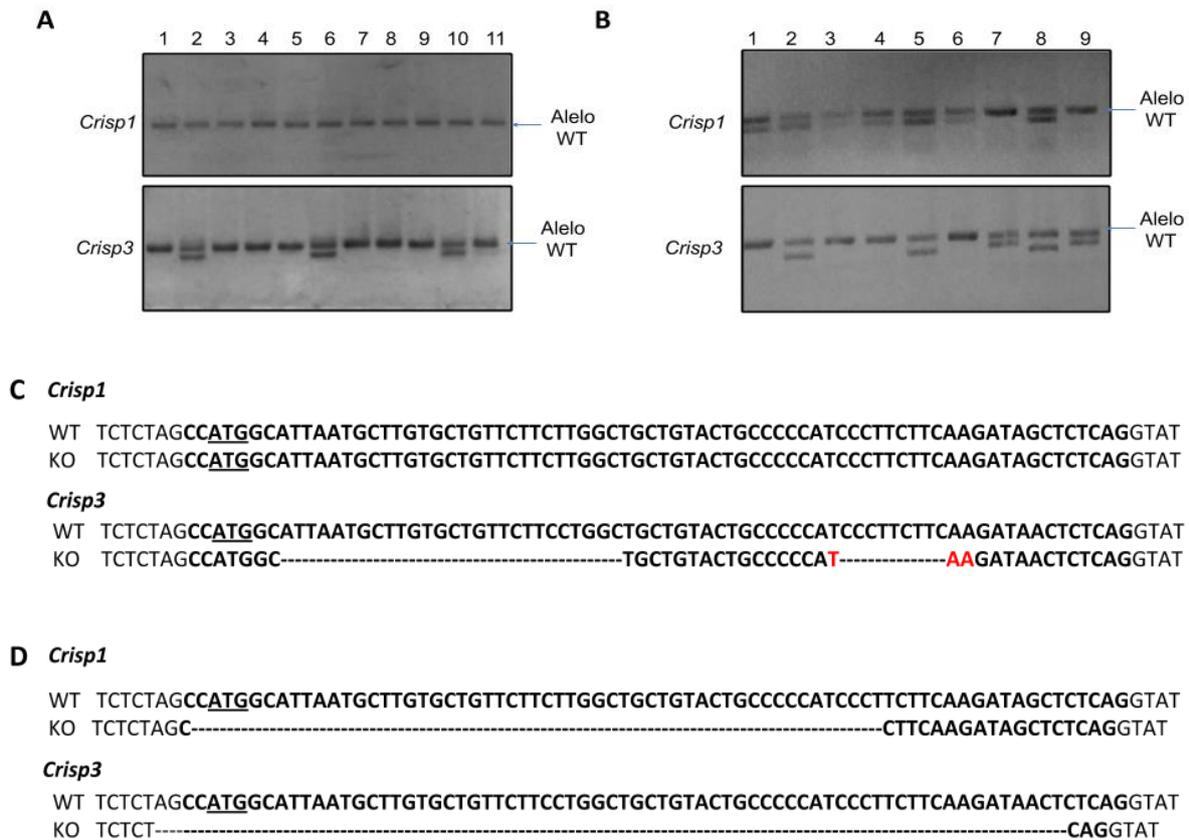
económica. De este modo, la identificación de las mutaciones en estas crías (F1) y la posterior genotipificación de los animales de la colonia fue llevada a cabo por PCR y electroforesis en gel de agarosa.



**Figura II.5 Análisis de la presencia de mutaciones en los genes *Crisp1* y *Crisp3* en los animales F0 correspondientes a la segunda tanda de microinyección.** PCR a partir del ADN genómico de las 34 crías nacidas vivas producto de la transferencia de las cigotas microinyectadas (F0), utilizando primers específicos que flanquean el exón 2 de *Crisp1* (paneles izquierdos) o *Crisp3* (paneles derechos), seguido por un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en geles de poliacrilamida. Como control, se muestra un animal WT.

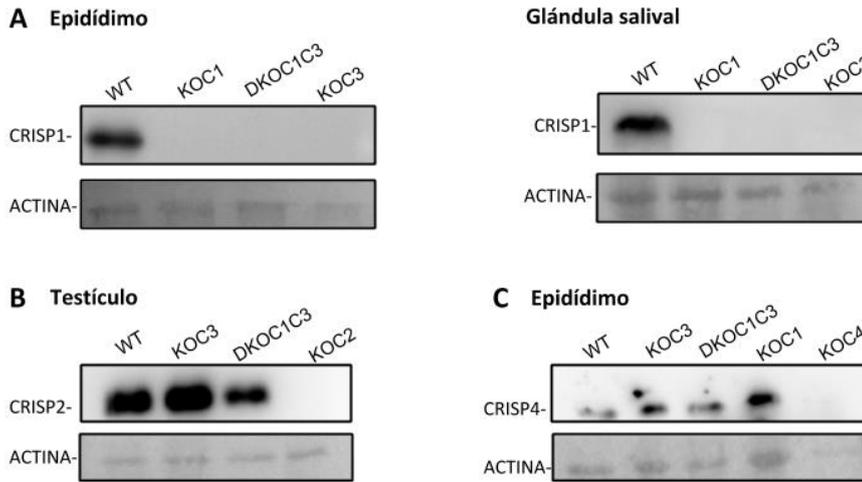
Tal como se esperaba, el análisis de las crías obtenidas mostró diferentes mutaciones para *Crisp1* y *Crisp3*, confirmando la presencia de un alto nivel de mosaiquismo en la línea germinal de ratones F0. En la figura II.6 A y B se muestran las imágenes correspondientes a la corrida electroforética de las crías nacidas del animal #21 que presentaba mutación únicamente en *Crisp3* (A), y del animal #27 con mutación en ambos genes (B). De estas crías, se seleccionó el animal #6 del panel A y el #5 del panel B para confirmar, por secuenciación,

que las mutaciones fueran deletereas. En el caso del ratón #6, la secuenciación reveló que, efectivamente, el gen de *Crisp3* presentaba una delección de 27 pb y otra de 9 pb, las cuales generaban un codón stop prematuro (Figura II.6 C), y confirmó que la secuencia de *Crisp1* se mantuvo intacta. En el animal #5, se detectó una delección de 73 pb en *Crisp3* y otra de 55 pb en *Crisp1* que, en ambos casos, incluían el sitio de inicio de la traducción (Figura II.6 D). Estos animales fueron los seleccionados para establecer ambas colonias.

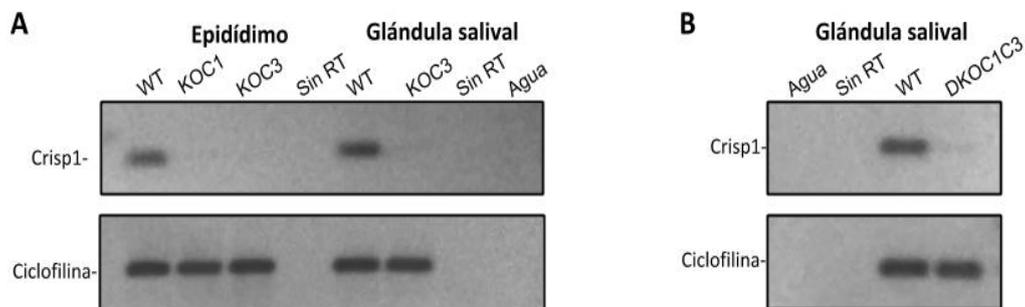


**Figura II.6 Análisis de las mutaciones en *Crisp1* y *Crisp3* de los animales F1. A y B.** PCR a partir del ADN genómico de las crías nacidas del apareo del animal #21 (A) (que presentaba mutación únicamente en *Crisp3*), y del animal #27 (B) (que presentaba mutación en ambos genes) con un animal WT, utilizando primers específicos que flanquean el exón 2 de *Crisp1* o *Crisp3*, seguido por electroforesis en gel de agarosa. **C y D.** Resultados de la secuenciación de ADN genómico del animal # 6 del panel A (C) elegido para establecer la colonia simple KO de CRISP3 y el animal # 5 del panel B (D), elegido para establecer la colonia DKO CRISP1/CRISP3. El codón de inicio de la traducción se encuentra subrayado y en rojo se señala el codón stop prematuro formado por la delección.

El próximo paso consistió en estudiar la expresión proteica de los distintos miembros de la familia CRISP en los animales KO de ambas colonias. Para nuestra sorpresa, encontramos que tanto machos como hembras de ambas colonias no expresaban la proteína CRISP1 (Figura II.7 A), lo cual era de esperar para la colonia DKO CRISP1/CRISP3 pero no así para la colonia simple KO para CRISP3. Por su parte, observamos expresión normal tanto de CRISP2 (Figura II.7 B) como de CRISP4 (Figura II.7 C) en ambas colonias. Con respecto a la presencia de la proteína CRISP3, se realizaron numerosos ensayos utilizando una serie de anticuerpos comerciales contra la proteína CRISP3 tanto murina como humana sin lograr obtener resultados positivos en ningún caso ya sea porque los anticuerpos no detectaban a la proteína o porque los mismos presentaban una reacción cruzada con otras proteínas que no correspondían a CRISP3. De todos modos, dado que la confirmación de la mutación por secuenciación aseguraba que la expresión proteica de *Crisp3* era prácticamente imposible, el próximo paso consistió en investigar el motivo de la ausencia de CRISP1 en estos animales analizando la presencia del mensajero (ARNm) de *Crisp1* por RT-PCR a partir de muestras de tejido epididimario y glándula salival. Los resultados mostraron que, además de la falta de la proteína CRISP1, el ARNm correspondiente a *Crisp1* también se encontraba ausente (Figura II.8A), sugiriendo que *Crisp3* podría estar cumpliendo un rol regulatorio sobre la expresión de CRISP1. Más aun, la ausencia de expresión del ARNm de *Crisp1* en los animales con mutación en ambos genes (Figura II.8 B) indicaba que la regulación de *Crisp3* sobre la expresión de *Crisp1* no sería consecuencia de una mutación específica en la colonia que presentaba solo mutación en *Crisp3*. En conjunto, estos resultados indicaron que si bien ambas colonias carecían de las proteínas CRISP1 y CRISP3, una de las mismas presentaba mutaciones en ambos genes (DKO C1C3) mientras que la otra presentaba mutaciones solo en *Crisp3* y contenía el gen completo de *Crisp1* (KO C3).



**Figura II.7 Estudio de la expresión de la familia CRISP en los animales KO C3 y DKO C1C3.** Análisis de la presencia de CRISP1 (A), CRISP2 (B) y CRISP4 (C) en extractos proteicos de distintos órganos de animales KO C3 y DKO C1C3 evaluada por WB, utilizando anticuerpos anti-CRISP1, anti-CRISP2 y anti-CRISP4, respectivamente. Para cada uno de los anticuerpos se utilizó como control positivo extractos de animales WT y como control negativo extractos de animales KO simples para cada proteína analizada. Como control de carga se reveló la muestra con un anticuerpo anti-Actina. Se muestran figuras representativas de al menos tres animales distintos.



**Figura II.8 Estudio de la expresión del mensajero de Crisp1 en los animales KO C3 y DKO C1C3.** Análisis de la expresión de Crisp1 por PCR a partir de muestras de cDNA de distintos tejidos de animales KO C3 (A) y DKO C1C3 (B), utilizando primers específicos contra el mensajero de Crisp1. WT: control positivo. SIN RT: control negativo de la RT-PCR, donde la reacción se llevó a cabo sin enzima, utilizando como molde muestras de RNA de tejidos de animales WT. Agua: control negativo de la PCR. En todos los casos, para el control de carga se utilizaron primers específicos contra el mensajero de ciclofilina. Se muestran figuras representativas de al menos tres animales distintos.

A continuación, dado que CRISP1 y CRISP3 se expresan en el tracto reproductor masculino y femenino (Ernesto et al. 2015; Evans et al. 2015; Reddy, Gerard M. Gibbs, et al. 2008), decidimos estudiar la relevancia funcional de estas proteínas a nivel reproductivo en ambos sexos. Los estudios de fertilidad se llevaron a cabo colocando en una jaula el macho o la hembra a evaluar junto con su pareja control durante cuatro noches controlando, todas las mañanas, la presencia de tapón vaginal como indicador de la ocurrencia del apareo. Una vez transcurrido el tiempo de gestación, se registraron el número de crías y el peso de las mismas.

En el caso de los machos, los estudios revelaron que si bien los porcentajes de hembras preñadas apareadas con los animales KO de ambas colonias no presentaban diferencias significativas respecto a los controles, el promedio del número de crías por camada fue significativamente menor para los animales KO que para los animales control en ambas colonias, revelando una subfertilidad en los machos deficientes de las proteínas CRISP1 y CRISP3 (Tabla II.1).

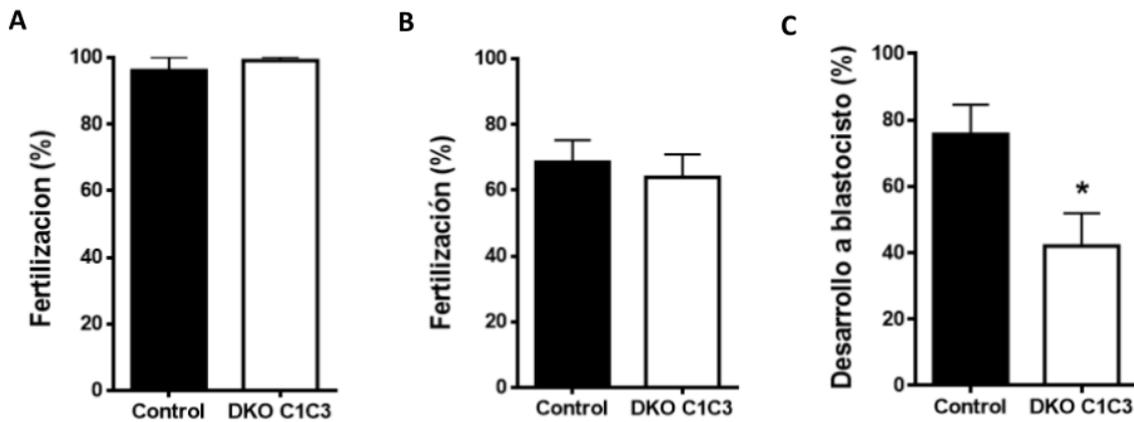
**Tabla II.1 Estudios de fertilidad de machos KO C3 y DKO C1C3.**

	Control (n=20)	KO C3 (n=6)	DKO C1C3 (n=7)
<b>Fertilidad (Nro crías/camada)</b>	7,9 ± 0,3	6,2 ± 0,8 *	5,7 ± 0,7 **
<b>Preñez (%)</b>	94,4 ± 5,6	100,0 ± 0,0	86,0 ± 9,1

La fertilidad se expresa como promedio de crías por camada donde cada macho fue evaluado al menos dos veces. El porcentaje de preñez corresponde al porcentaje de hembras que, habiendo presentado tapón vaginal, parieron al menos una cría. Los resultados se expresan como la media ± SEM. \*, p <0,05; \*\*, p <0,01 vs. Control.

Con el objetivo de investigar los mecanismos subyacentes a las menores tasas de fertilidad encontradas para los machos de ambas colonias, se realizaron una serie de ensayos *in vivo* e *in vitro* que se describen a continuación. Dado que ambas colonias carecían de las dos proteínas, los estudios se llevaron a cabo utilizando solo los animales de la colonia DKO C1C3 con claras mutaciones en ambos genes de modo tal de poder realizar una mejor

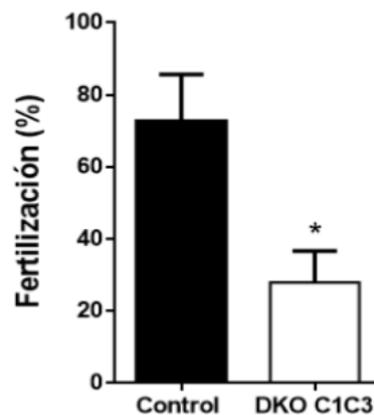
interpretación de los resultados. Para los estudios de fertilización *in vivo*, los machos mutantes DKO C1C3 se pusieron en apareo durante toda una noche con hembras tanto en estro natural (Figura II.9 A) como superovuladas (Figura II.9 B), siendo esta última una condición más exigente que permite evidenciar problemas en la capacidad fertilizante de los espermatozoides que quedan enmascarados al emplear hembras en estro (Brukman et al. 2016; Vasen et al. 2015). A la mañana siguiente del apareo (confirmado por presencia de tapón vaginal), los ovocitos fueron recuperados de la ampulla e incubados *in vitro* durante toda la noche, determinándose el porcentaje de fertilización como el número de embriones de dos células sobre el total de ovocitos incubados. Para nuestra sorpresa, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de fertilización respecto a los controles en ninguna de las dos condiciones empleadas, indicando que la bajada en la fertilidad podría deberse a problemas en eventos posteriores a la fertilización. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se repitió el esquema del estudio anterior con la diferencia que los ovocitos recuperados de la ampulla incubados *in vitro* hasta alcanzar el estadio de dos células continuaron su incubación durante 4 días más con el fin de analizar su capacidad de desarrollar a blastocistos. Los resultados mostraron que el porcentaje de desarrollo correspondiente a los machos DKO C1C3 fue significativamente menor al del control (Figura II.9 C) revelando, por primera vez, un posible rol de CRISP1 y/o CRISP3 en el desarrollo embrionario temprano.



**Figura II.9** Análisis de la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides DKO C1C3 y posterior desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos fertilizados. **A y B.** Porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla de hembras control en estro (A) o superovuladas (B) apareadas con machos DKO C1C3 o control. Los ovocitos recuperados al día siguiente del apareo fueron cultivados *in vitro* durante una noche, determinándose el porcentaje de fertilización como el número de embriones de dos células respecto al total de ovocitos incubados. **C.** Porcentaje de embriones de dos células (provenientes de las fertilizaciones *in vivo*) que llegan al estadio de blastocisto luego de 4 días de cultivo *in vitro* en medio KSOM. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 5 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

Las evidencias reportadas hasta el momento indican que existen diversos factores que pueden afectar el desarrollo temprano de los embriones. En ese sentido, se han descrito problemas de desarrollo debidos a un retraso en la llegada de los espermatozoides al oviducto (factor masculino), lo cual puede, además, conducir a la fertilización de ovocitos envejecidos (factor femenino) (Orgebin-Crist 1968; Orgebin-Crist et al. 1967; Orgebin-Crist and Jahad 1977). Para evaluar esta posibilidad, llevamos a cabo ensayos de fertilización *in vivo* en los cuales hembras superovuladas eran apareadas con los machos mutantes o control 12-14 hs luego de la inyección de hCG (tiempo al cual ocurre la ovulación), recuperándose los ovocitos de la ampulla solo 4hs después del apareo. La premisa de este experimento era que si, efectivamente, los espermatozoides presentaban un retraso para llegar al oviducto, el análisis de los ovocitos recuperados a corto tiempo post-apareo debería mostrar un porcentaje menor de fertilización para los animales DKO C1C3 que para los controles. Los resultados revelaron una diferencia significativa en la tasa de fertilización *in vivo* para los ratones DKO C1C3 en comparación a los WT (Figura II.10). Dado que los porcentajes de fertilización *in vivo* luego del apareo durante toda la noche no diferían entre

ambos genotipos (Figura II.9 A y B), estas observaciones sugerían que los espermatozoides DKO C1C3 necesitarían más tiempo para alcanzar los ovocitos. Al momento de sacrificar las hembras para recuperar los ovocitos, se recuperó también el fluido uterino conteniendo los espermatozoides, el cual fue directamente analizado bajo microscopio con el fin de examinar el estado de los espermatozoides. Los resultados mostraron que, mientras los espermatozoides provenientes de machos control estaban en su mayoría motiles (Video 1), aquellos provenientes de machos DKO C1C3 se encontraban mayoritariamente inmóviles (Video 2). Más aun, la incubación de las suspensiones uterinas con eosina con el fin de evaluar si los espermatozoides se encontraban muertos, reveló que los mismos se encontraban atrapados en agregados viscosos en los que no lograba entrar el colorante para el análisis de la viabilidad espermática.



**Figura II.10 Análisis de la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides DKO C1C3 durante las primeras 4 hs post apareo.** Porcentajes de ovocitos fertilizados recuperados 4hs después de confirmado el apareo por presencia de tapón vaginal. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control

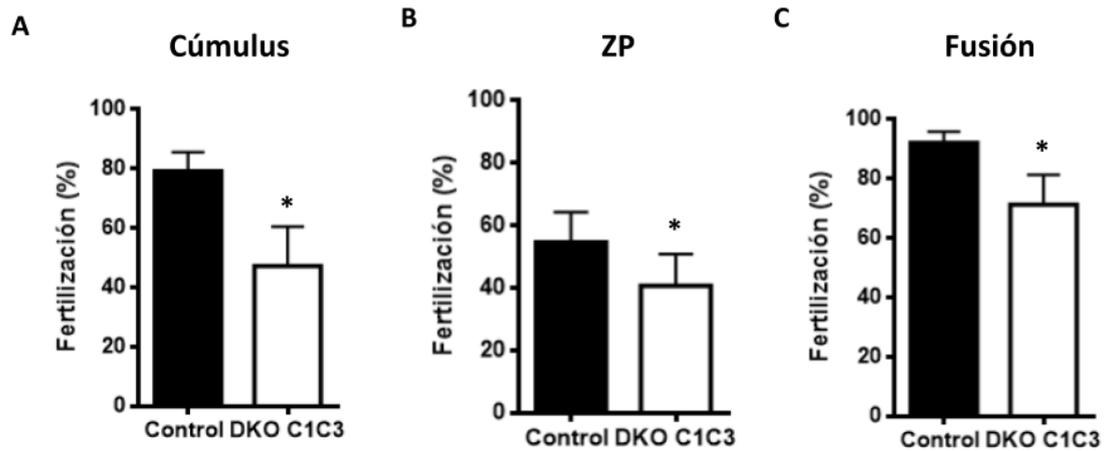
Si bien estos resultados indicaban que las menores tasas de desarrollo embrionario correspondientes a los animales DKO C1C3 podrían deberse a un retraso en la fertilización asociado a la baja motilidad de los espermatozoides en el útero, no se podía descartar que los espermatozoides presentaran, además, defectos en su capacidad fertilizante ya reportados al menos para el animal simple KO para CRISP1 (Da Ros et al. 2008; Weigel Muñoz et al. 2018). En base a ello, decidimos estudiar la capacidad fertilizante de los

espermatozoides DKO C1C3 a través de ensayos de fertilización *in vitro* utilizando una vez más ovocitos rodeados o no de sus envolturas. Los resultados indicaron que si bien el número de espermatozoides recuperados del epidídimo así como la viabilidad y motilidad progresiva de espermatozoides tanto frescos como capacitados eran normales (Tabla II.2), los espermatozoides DKO C1C3 presentaban ciertas deficiencias para fertilizar ovocitos rodeados de cúmulus y ZP, solo de ZP o libres de toda envoltura (Figura II.11 A, B y C, respectivamente).

**Tabla II.2 Análisis de distintos parámetros en espermatozoides epididimarios de machos DKO C1C3.**

	Control		DKO C1C3	
	Frescos	CAP	Frescos	CAP
Número espermatozoides ( $10^6$ / ml)	48,35 $\pm$ 3,83	-	59,87 $\pm$ 12,03	-
Espermatozoides vivos (%)	66,22 $\pm$ 5,25	61,04 $\pm$ 2,78	65,54 $\pm$ 2,29	58,21 $\pm$ 4,31
Espermatozoides móviles progresivos (%)	63,99 $\pm$ 1,14	57,91 $\pm$ 2,39	62,65 $\pm$ 2,37	54,27 $\pm$ 3,19

El número de espermatozoides fue calculado utilizando una cámara de Neubauer, la viabilidad por tinción con eosina y la motilidad por observación subjetiva al microscopio óptico. El número de espermatozoides capacitados no se incluye en ningún caso porque corresponde a una suspensión de concentración fija. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 5 experimentos independientes.



**Figura II.11 Análisis de la capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides DKO C1C3.** Espermatozoides capacitados de machos DKO C1C3 o control fueron co-incubados con COC por 3 horas (A), ovocitos con ZP por 3 horas (B) u ovocitos sin ZP por 1 hora (C). Al final de cada incubación, se determinó el porcentaje de fertilización analizándose la presencia de al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o la presencia de dos pronúcleos en el citoplasma por tinción con Hoescht. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  vs Control.

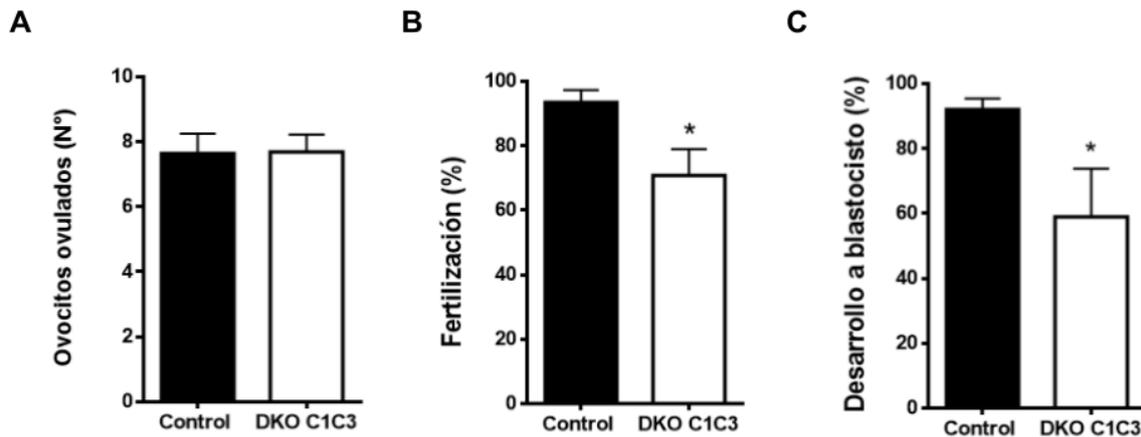
A continuación, y tal como había sido mencionado anteriormente, investigamos el rol fisiológico de CRISP1 y CRISP3 en la fertilidad de las hembras. De la misma forma que para el caso de los machos, los estudios de fertilidad se realizaron tanto en la colonia KO C3 como en la DKO C1C3. Estos estudios mostraron que si bien los porcentajes de preñez no presentaron diferencias significativas respecto a los controles, las hembras de ambas colonias eran subfértiles (Tabla II.4), mostrando, por primera vez, la relevancia de las CRISP para la fertilidad femenina.

**Tabla II.4 Estudios de fertilidad de hembras KO C3 y DKO C1C3.**

	Control (n=16)	KO C3 (n=8)	DKO C1C3 (n=17)
Fertilidad (Nro crías/camada)	7,9 ± 0,4	5,7 ± 1,1 *	6,2 ± 0,6 *
Preñez (%)	100,0 ± 0,0	83,2 ± 10,6	81,3 ± 9,2

La fertilidad de expresa como promedio de crías por camada donde cada hembra fue evaluada al menos dos veces. El porcentaje de preñez corresponde al porcentaje de hembras que, habiendo presentado tapón vaginal, parieron al menos una cría. Los resultados se expresan como la media ± SEM. \*, p <0,05; \*\* vs. Control.

Al igual que se describiera para el caso de los machos, los posteriores estudios realizados con el fin de dilucidar el motivo de las menores tasas de fertilidad en las hembras mutantes, fueron llevados a cabo utilizando únicamente animales de la colonia que presentaba mutación en ambos genes. Para ello, hembras DKO C1C3 en estro fueron apareadas con machos control, analizándose el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla. Los resultados indicaron que mientras el número de ovocitos recuperados no fue significativamente diferente al de las hembras control (Figura II.12 A), sugiriendo la ausencia de defectos en la ovulación, el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vivo* recuperados de hembras DKO C1C3 resultó significativamente menor que el de las hembras WT (Figura II.12 B). Asimismo, cuando los ovocitos fertilizados por espermatozoides DKO C1C3 fueron incubados *in vitro* por 5 días, el porcentaje de los mismos que alcanzó el estadio de blastocisto fue significativamente menor al de los controles, apoyando la idea de que la subfertilidad de las hembras estaría dada por una combinación de defectos en la fertilización *in vivo* y en el desarrollo embrionario temprano (Figura II.12 C).



**Figura II.12 Análisis de la fertilización *in vivo* en hembras DKO C1C3 y posterior desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos fertilizados.** **A.** Número de ovocitos ovulados recuperados de la ampulla de hembras DKO C1C3 o control en estro. **B.** Porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla de hembras DKO C1C3 en estro apareadas con machos control. Los ovocitos recuperados al día siguiente del apareo fueron incubados *in vitro* durante una noche, determinándose el porcentaje de fertilización como el número de embriones de dos células respecto al total de ovocitos incubados. **C.** Porcentaje de embriones de dos células (provenientes de las fertilizaciones *in vivo*) que alcanzaron el estadio de blastocisto luego de 4 días de cultivo *in vitro* en medio KSOM. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 7 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

En conjunto, nuestras observaciones indican que la ausencia de CRISP1 y CRISP3 afecta la fertilidad tanto de los machos como de las hembras debido a una combinación de defectos en la fertilización *in vivo* y posterior desarrollo embrionario temprano. La subfertilidad de los machos DKO C1C3 descrita en esta Tesis junto a las ya reportadas subfertilidad de los machos DKO C1C4 y normal fertilidad de los animales KO para cada CRISP, confirman la existencia de mecanismos de compensación entre los miembros de la familia CRISP. En base a ello, nos propusimos estudiar la fertilidad de animales carentes de más de dos proteínas CRISP simultáneamente, utilizando nuevamente la técnica de CRISPPR/Cas9. La estrategia elegida consistió en microinyectar los mismos sgRNA utilizados para la generación de los DKO C1C3 pero esta vez en cigotas provenientes de animales DKO C2C4 generados en nuestro laboratorio y que resultaron fértiles. Dado que CRISP1/CRISP2/CRISP3 se encuentran muy cercanos en el mismo cromosoma segregando como si fueron un único gen, y que CRISP4 se encuentra localizada en un cromosoma diferente, esta estrategia permitía generar tanto a animales triples KO para CRISP1/CRISP2/CRISP3 (TKO) como cuádruples KO para los

cuatro miembros de la familia (CKO). El desarrollo de esta colonia se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. M. Rubinstein (INGEBI) y constituyó parte de la Tesis Doctoral de Dr. N. Brukman (2018), restando llevar a cabo la caracterización reproductiva de estos animales que fue realizada como parte de la presente Tesis Doctoral.

Los estudios de la fertilidad revelaron que los machos TKO y CKO eran prácticamente infértiles a juzgar por el número de crías y porcentajes de preñez significativamente menores que los controles y la gran proporción de animales estériles observada en cada caso (Tabla II.5). Cabe destacar que, al igual que lo reportado para la colonia DKO C1C4 (Carvajal et al. 2018), una cierta proporción de los animales TKO y CKO presentaban un fenotipo de epidídimo-orquitis con espermatozoides no viables en el cauda epididimario. Cuando se realizó un nuevo análisis de fertilidad excluyendo los animales que presentaban dicha patología, observamos que tanto los machos TKO como los CKO continuaban siendo prácticamente infértiles a juzgar por un promedio de crías por camada menor a uno y la presencia de un alto porcentaje de animales estériles a pesar de exhibir epidídimos normales conteniendo espermatozoides viables en el cauda. (Tabla II.6).

**Tabla II.5 Estudios de fertilidad de machos TKO y CKO.**

	Control (n=18)	TKO (n=15)	CKO (n=20)
<b>Fertilidad (Nro crías/camada)</b>	6,98 ± 0,51	0,40 ± 0,23 ****	0,39 ± 0,19****
<b>Preñez (%)</b>	92,98 ± 3,89	16,67 ± 7,97****	10,49 ± 3,99****
<b>Machos estériles (0 crías)</b>	0 (0%)	11 (73,3%)	15 (75%)

La fertilidad se expresa como promedio de crías por camada donde cada macho fue evaluado al menos dos veces. El porcentaje de preñez corresponde al porcentaje de hembras que, habiendo presentado tapón vaginal, parieron al menos una cría. Se consideró machos estériles a aquellos cuyas parejas no tuvieron crías. Los resultados se expresan como la media ± SEM. \*\*\*\*, p<0,0001 vs. Control.

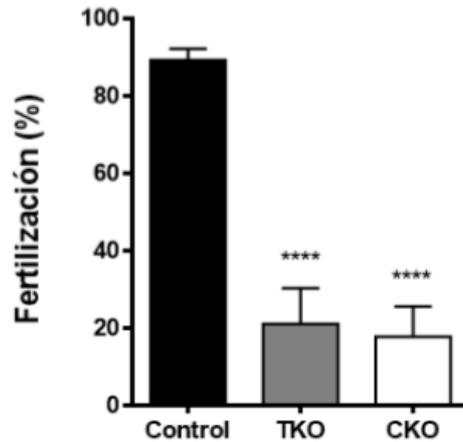
**Tabla II.6 Estudios de fertilidad de machos TKO y CKO que no presentaban epidídimo-orquitis.**

	Control (n=18)	TKO (n=6)	CKO (n=8)
Fertilidad (Nro crías/camada)	6,98 ± 0,51	0,92 ± 0,52****	0,94 ± 0,42****
Preñez (%)	92,98 ± 3,89	33,33 ± 16,67****	27,77 ± 9,21****
Machos estériles (0 crías)	0 (0%)	3 (50%)	4 (50%)

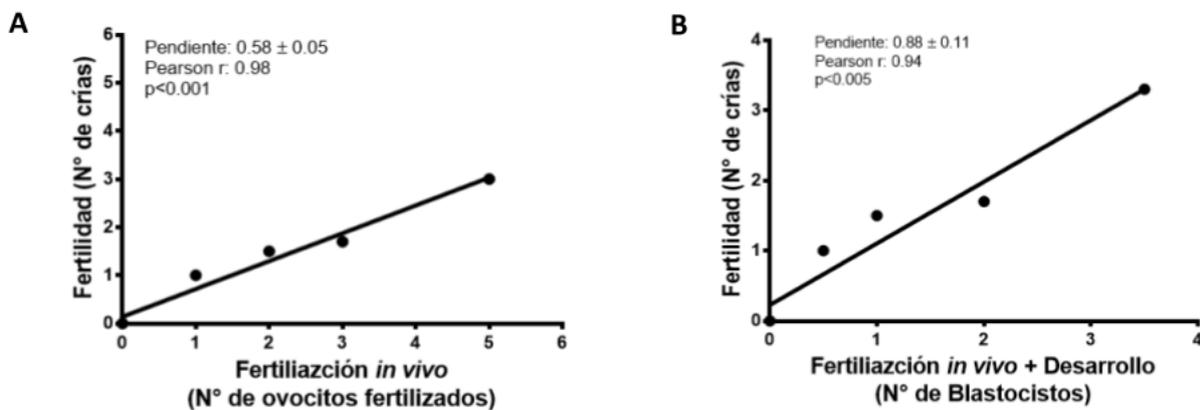
La fertilidad se expresa como promedio de crías por camada donde cada macho fue evaluado al menos dos veces. El porcentaje de preñez corresponde al porcentaje de hembras que, habiendo presentado tapón vaginal, parieron al menos una cría. Se consideró machos estériles a aquellos cuyas parejas no tuvieron crías. Los resultados se expresan como la media ± SEM. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  vs. Control.

Si bien resulta de sumo interés analizar las causas que originan el fenotipo de epidídimo-orquitis observado en nuestras colonias, decidimos enfocarnos a investigar los mecanismos que conducían a los defectos de fertilidad en aquellos animales que exhibían órganos reproductivos normales conteniendo espermatozoides viables.

Consistente con la severa bajada en la fertilidad de los animales TKO y CKO, los porcentajes de fertilización *in vivo* observados luego del apareo de estos animales con hembras controles en estro fueron significativamente más bajos que los controles (Figura II.13) y mostraron una correlación positiva con los valores de fertilidad (Figura II 14 A). Sin embargo, el valor de la pendiente de la línea de correlación entre el número de crías nacidas y el número de ovocitos fertilizados ( $0,58 \pm 0,05$ ) sugería que algún factor adicional a la fertilización estaría influyendo en la fertilidad de los animales (Figura II.14 A). En base a ello, y teniendo en cuenta los defectos en desarrollo observados en los animales DKO C1C3, decidimos analizar la posible existencia de defectos de desarrollo para los animales TKO y CKO del mismo modo que lo habíamos llevado a cabo anteriormente para los machos DKO C1C3. Tal como se observa en la Tabla II.7, los resultados mostraron una bajada significativa en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de blastocisto respecto a los controles y una correlación con el número de crías mayor que la observada anteriormente con el número de ovocitos fertilizados ( $0,88 \pm 0,11$ ) (Figura II.14 B).



**Figura II.13 Análisis de la capacidad fertilizante *in vivo* de espermatozoides TKO y CKO.** Porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla de hembras control en estro apareadas con machos TKO, CKO o control. Los ovocitos recuperados al día siguiente del apareo fueron cultivados *in vitro* durante una noche, determinándose el porcentaje de fertilización como el número de embriones de dos células respecto al total de ovocitos incubados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Control.



**Figura II.14 Análisis de la correlación de la fertilidad con la fertilización *in vivo* y desarrollo de machos CKO.** **A.** Correlación entre el número de crías nacidas y el número de ovocitos fertilizados *in vivo* para cada macho CKO. **B.** Correlación entre el número de crías nacidas y el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto para cada macho CKO.

**Tabla II.7 Desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de hembras apareadas con machos TKO o CKO**

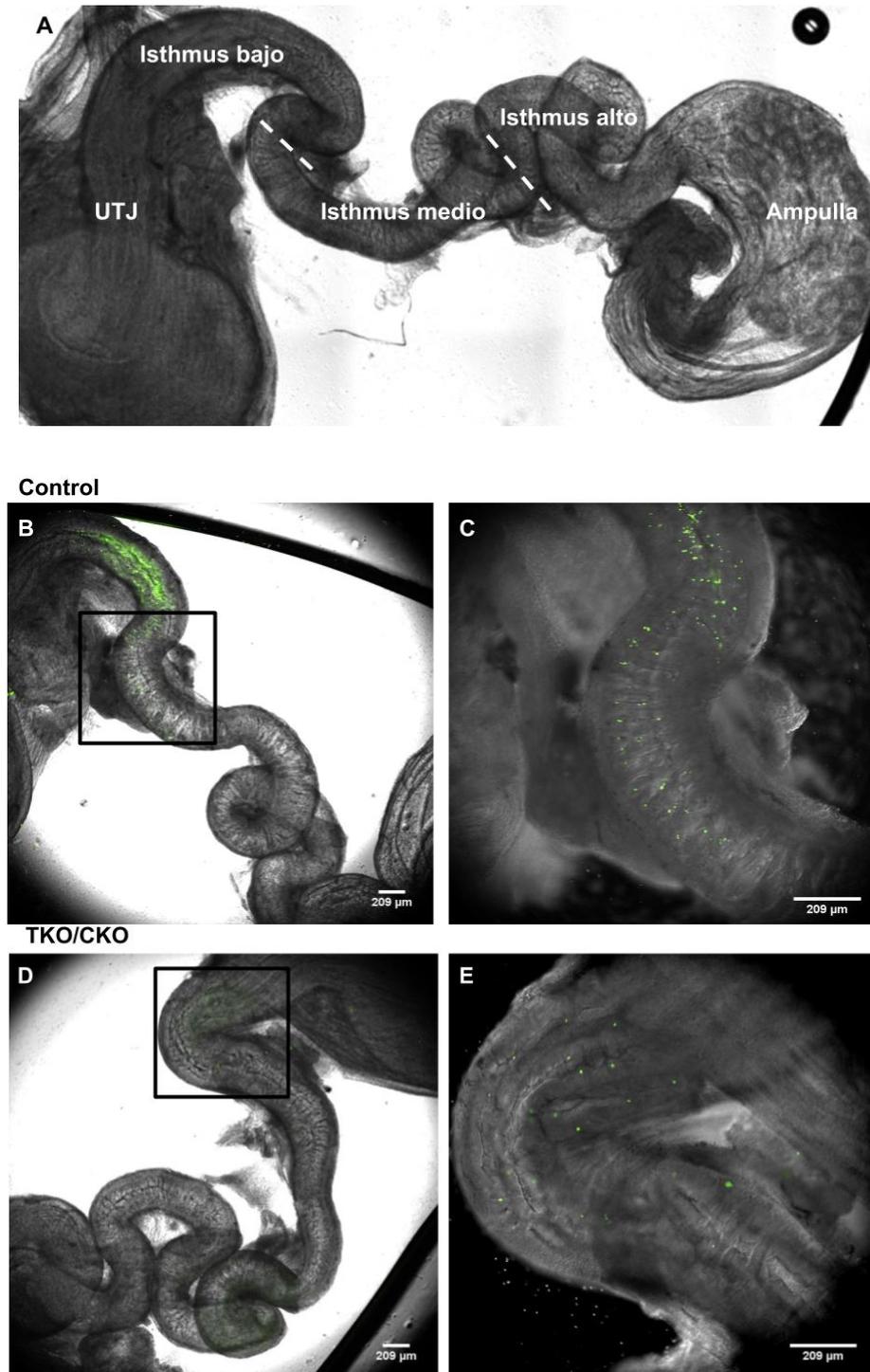
	Control	TKO	CKO
<b>Blastocisto (Nro)</b>	96	8	16
<b>Total (Nro)</b>	104	12	25
<b>Desarrollo (%)</b>	92.3	66.7 *	64.0 ***

Porcentaje de embriones que llegan al estadio de blastocisto luego de 4 días de cultivo *in vitro* en medio KSOM. Los resultados se expresan como porcentaje de blastocistos sobre el total de la sumatoria de al menos 5 experimentos independientes. Test de Fisher. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$  vs. Control.

Si bien estos resultados apoyaban la idea de que los defectos de desarrollo embrionario también contribuían a la bajada de fertilidad de los machos TKO y CKO, los severos defectos en fertilización *in vivo* indicaban que los mismos serían los principales responsables de los defectos en fertilidad. Dado que las bajas tasas de fertilización *in vivo* podrían ser consecuencia de defectos en los espermatozoides para alcanzar y/o fertilizar a los ovocitos, estudiamos tanto el transporte de espermatozoides dentro del tracto femenino, como la capacidad fertilizante de los mismos. Con el fin de estudiar el transporte de los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino, los machos TKO y CKO fueron apareados con hembras control estimuladas hormonalmente y, 4 horas luego de haberse confirmado el apareo por presencia de tapón vaginal, analizamos la motilidad de los espermatozoides recuperados del útero por observación bajo microscopio óptico y la presencia de espermatozoides dentro del oviducto por microscopía de fluorescencia aprovechando que los espermatozoides de esta colonia expresan la proteína fluorescente EGFP en sus acrosomas. Como control, se analizaron los mismos parámetros en hembras apareadas con machos WT. La observación subjetiva de los espermatozoides uterinos mostro que mientras aquellos provenientes de machos control (Video 3) se encontraban mayoritariamente móviles, aquellos provenientes de machos TKO o CKO estaban en su mayoría inmóviles (Video 4) y atrapados en agregados o coágulos tal como se había observado anteriormente para los machos DKO C1C3. Asimismo, resulta interesante mencionar que los pocos espermatozoides TKO y CKO que presentaban motilidad en útero

exhibían, además, una rigidez en la pieza media no observada ni en los espermatozoides control ni en los espermatozoides DKO C1C3.

El análisis de los espermatozoides presentes en el oviducto realizado por microscopía de fluorescencia reveló que mientras las hembras apareadas con machos control presentaban una gran cantidad de espermatozoides móviles y fluorescentes en el lumen del oviducto (Figura II.15 B y C), aquellas apareadas con los machos TKO o CKO presentaban muy pocos espermatozoides fluorescentes dentro del oviducto detectables solo en la imagen amplificada (Figura II.15 D y E), indicando la existencia de defectos en la migración de los espermatozoides TKO y CKO en el tracto femenino.



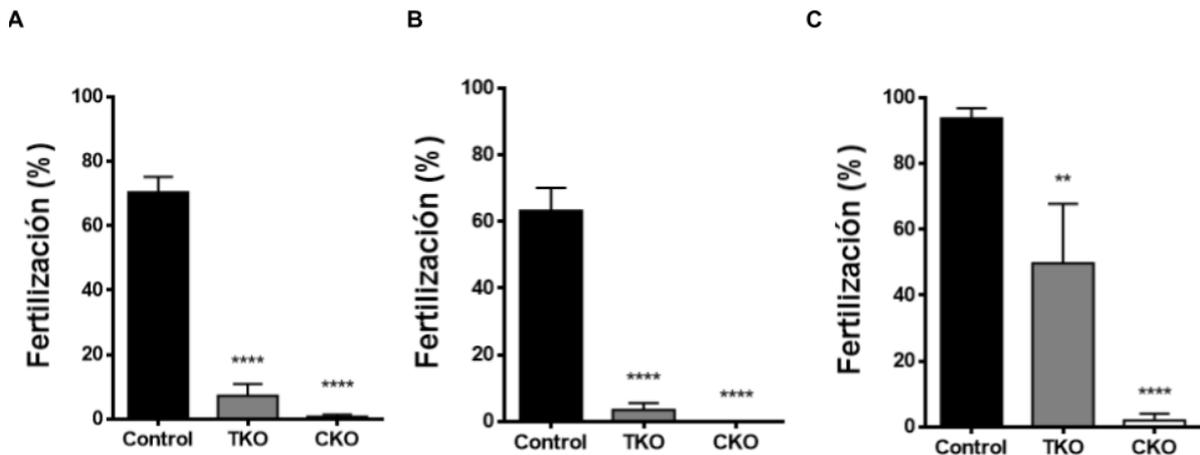
**Figura II.15 Estudio de migración al oviducto de espermatozoides TKO y CKO.** A. Diagrama representativo mostrando las diferentes regiones del oviducto. Hembras adultas superovuladas fueron puestas en apareo con machos mutantes (TKO o CKO) o control y, 4 horas después del apareo se analizaron los espermatozoides dentro del oviducto por microscopia de fluorescencia. El panel C es una ampliación de la región recuadrada en el panel B correspondiente al isthmus medio y el panel E es una ampliación de la región recuadrada en el panel D correspondiente al isthmus bajo. Las figuras son representativas de al menos 4 experimentos independientes.

Más allá de los defectos de migración observados, no podíamos descartar que aquellos espermatozoides TKO o CKO que pudieran llegar hasta la ampulla, no exhibieran, además, deficiencias en su capacidad de interactuar con los ovocitos. En vista de ello, llevamos a cabo ensayos de fertilización *in vitro* utilizando COC, ovocitos rodeados solo por la ZP u ovocitos desnudos de ambas envolturas. Los resultados indicaron que si bien el número, viabilidad y motilidad de los espermatozoides mutantes no fueron diferentemente significativos respecto a los controles (Tabla II.8), la capacidad fertilizante de los espermatozoides TKO y CKO se encontraba severamente comprometida respecto a los controles en todas las condiciones ensayadas (Figura II 16), apoyando la influencia de dichos defectos sobre la fertilidad.

**Tabla II.8 Análisis de distintos parámetros en espermatozoides epididimarios de machos CKO.**

	Control		CKO	
	Frescos	CAP	Frescos	CAP
Número espermatozoides ( $10^6$ / ml)	29,36 ± 5,22	-	27,17 ± 1,86	-
Espermatozoide vivos (%)	66,26 ± 2,91	69,15 ± 2,78	64,00 ± 2,16	70,07 ± 4,07
Espermatozoides móviles progresivos (%)	59,90 ± 2,19	64,23 ± 6,58	58,38 ± 6,79	63,53 ± 4,33

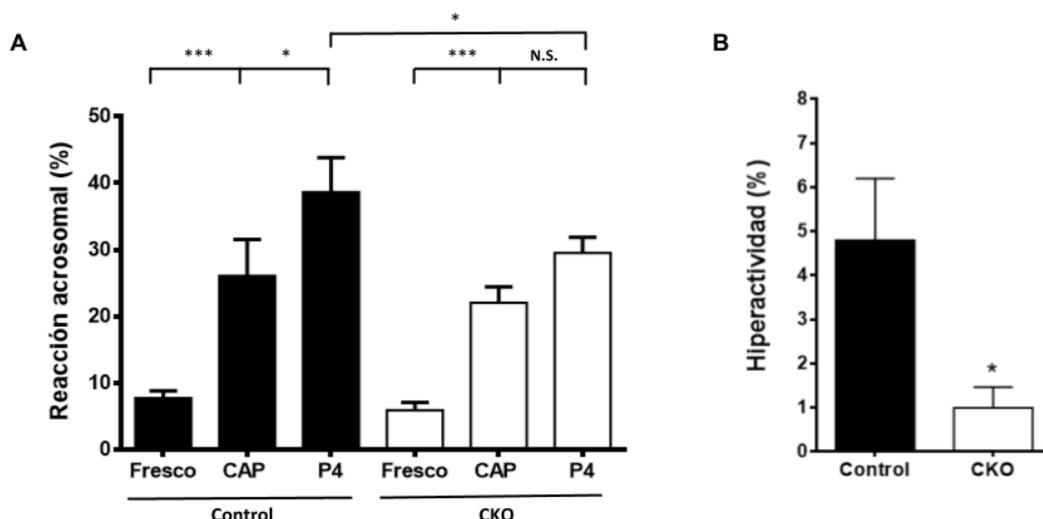
El número de espermatozoides fue calculado utilizando una cámara de Neubauer, la viabilidad por tinción con eosina y la motilidad por observación subjetiva al microscopio óptico. Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos 4 experimentos independientes.



**Figura II.16 Análisis de la capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides TKO y CKO.**

Espermatozoides capacitados TKO o CKO fueron co-incubados con COC por 3 horas (A), con ovocitos con ZP por 3 horas (B) o con ovocitos sin cumulus ni ZP por 1 hora (C). Al final de cada incubación, se determinó el porcentaje de fertilización analizando la presencia de al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o la presencia de dos pronúcleos en el citoplasma. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0005$  vs Control.

Con el fin de comprender los mecanismos que conducen a los defectos de la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides TKO y CKO, el próximo paso consistió en analizar la ocurrencia de la RA y el desarrollo de la HA en espermatozoides de esta colonia. Estos estudios, realizados empleando los espermatozoides carentes de las cuatro proteínas CRISP, revelaron que si bien los espermatozoides CKO fueron capaces de reaccionar espontáneamente durante la capacitación de igual forma que la población control, los mismos presentaron defectos para responder a la inducción con progesterona (Figura II.17 A). Por su parte, el análisis de la motilidad de los espermatozoides capacitados mediante el sistema CASA, si bien no mostró diferencias en los porcentajes de motilidad general (CKO:  $66,6 \pm 6,2$  % vs Control  $57,0 \pm 4,4$  % media  $\pm$  SEM  $n=3$ ; n.s.), reveló diferencias significativas respecto a los controles en varios parámetros espermáticos (Tabla II.9) como así también una bajada significativa en el porcentaje total de espermatozoides hiperactivados (Figura II.17 B).



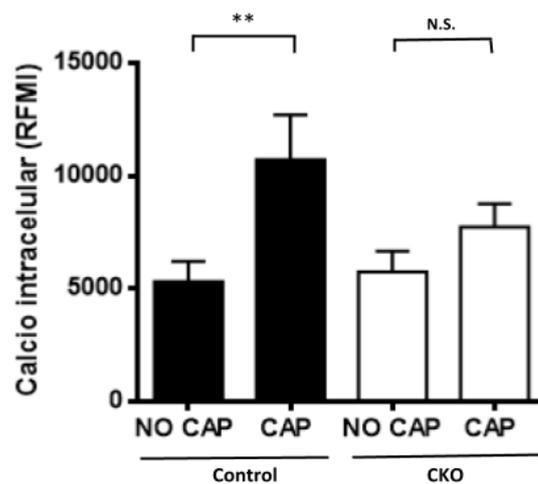
**Figura II.17 Estudio de la ocurrencia de reacción acrosomal y desarrollo de hiperactividad durante la capacitación de espermatozoides CKO.** **A.** Espermatozoides CKO o control se incubaron en condiciones capacitantes durante 90 minutos, evaluándose luego el porcentaje de RA por tinción con Coomassie Blue en espermatozoides expuestos a progesterona (P4) o DMSO solo (CAP) durante los últimos 15 minutos de incubación, o en espermatozoides sin capacitar (Fresco). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de al menos 7 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; **B.** Porcentaje de espermatozoides con motilidad hiperactivada evaluada por CASA. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ .

**Tablas II. 9 Análisis por CASA de la motilidad de espermatozoides CKO capacitados.**

Capacitados	vcl	vsl	vap	lin	STR	alh	BCF
Control	133,6 $\pm$ 2,7	35,3 $\pm$ 0,3	75,3 $\pm$ 4,8	21,9 $\pm$ 0,5	42,2 $\pm$ 3,6	2,9 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,6
CKO	135,2 $\pm$ 2,4	48,7 $\pm$ 4,6**	74,9 $\pm$ 2,8	31,1 $\pm$ 2,9*	54,9 $\pm$ 4,2**	3,0 $\pm$ 0,03	10,8 $\pm$ 0,5

Espermatozoides capacitados CKO o control fueron analizados por CASA, evaluándose diferentes parámetros de motilidad. VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ ), LIN: linealidad (%), STR: rectilineidad (%), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs Control.

Dada la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  para la ocurrencia de la RA y el desarrollo de la HA y, por ende, para la capacidad fertilizante de los espermatozoides, y teniendo la reportada capacidad de las CRISP de regular diversos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011; Guo et al. 2005; Morrissette et al. 1995; Yamazaki, Brown, and Morita 2002), el próximo paso consistió en analizar los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides CKO mediante citometría de flujo utilizando la sonda Fluo 4-AM. Mientras que los espermatozoides CKO frescos mostraron niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  no diferentemente significativos al control, los espermatozoides CKO capacitados no exhibieron el característico aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre durante la capacitación (Figura II.18), apoyando la relevancia de las CRISP para la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.



**Figura II.18 Análisis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en espermatozoides CKO.** Niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular medidos por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (RFMI) del Fluo4-AM en espermatozoides provenientes de animales CKO o control no capacitados (NO CAP) y capacitados (CAP). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. n=5. \*\*,  $p < 0,01$ .

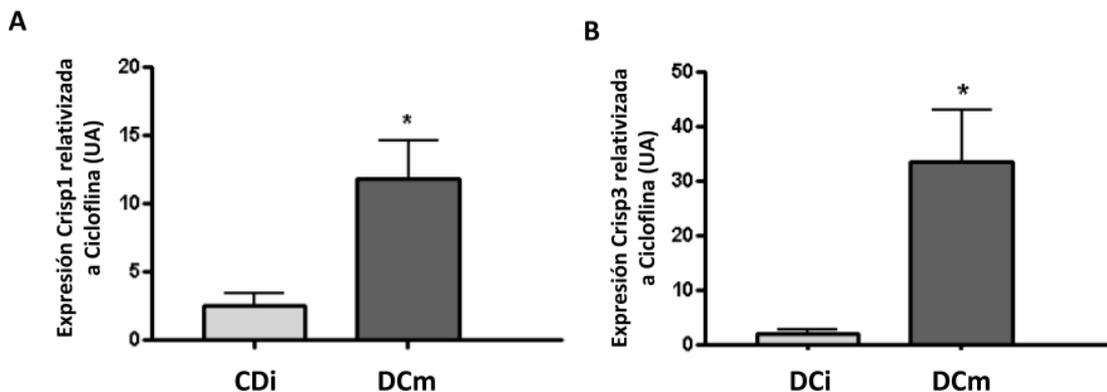
En resumen, los resultados de este segundo capítulo indican que la ausencia de más de dos proteínas CRISP simultáneamente afecta severamente la fertilidad de los machos como consecuencia de una combinación de defectos en la migración de los espermatozoides al oviducto, en su capacidad fertilizante y en el posterior desarrollo embrionario temprano, confirmando el rol esencial de las proteínas CRISP para la fertilidad masculina.

### Capítulo III

#### Estudio de la participación de CRISP1 y CRISP3 en la regulación del sistema inmune

Tal como se mencionara en la Introducción, numerosas evidencias indican que las proteínas CRISP1 y CRISP3 podrían estar involucradas en la regulación del sistema inmune. Apoyando esta idea, resultados de nuestro grupo, obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. G. Rabinovich (IBYME), revelaron la expresión de CRISP1 y CRISP3 en una importante célula del sistema inmune tal como lo es la célula dendrítica. En base a ello, como último objetivo de esta Tesis Doctoral, nos propusimos estudiar la participación de las proteínas CRISP1 y CRISP3 en la regulación del sistema inmune.

Dado que la expresión de CRISP1 y CRISP3 en CDi y maduras por estimulación con lipopolisacárido (LPS) había sido determinada a través de la técnica de RT-PCR (Tesis doctoral Weigel Muñoz), en primer lugar evaluamos la expresión de ambas proteínas a través de ensayos de PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que la expresión tanto de CRISP1 como CRISP3 aumentaba significativamente luego del estímulo con LPS (Figura III.1).

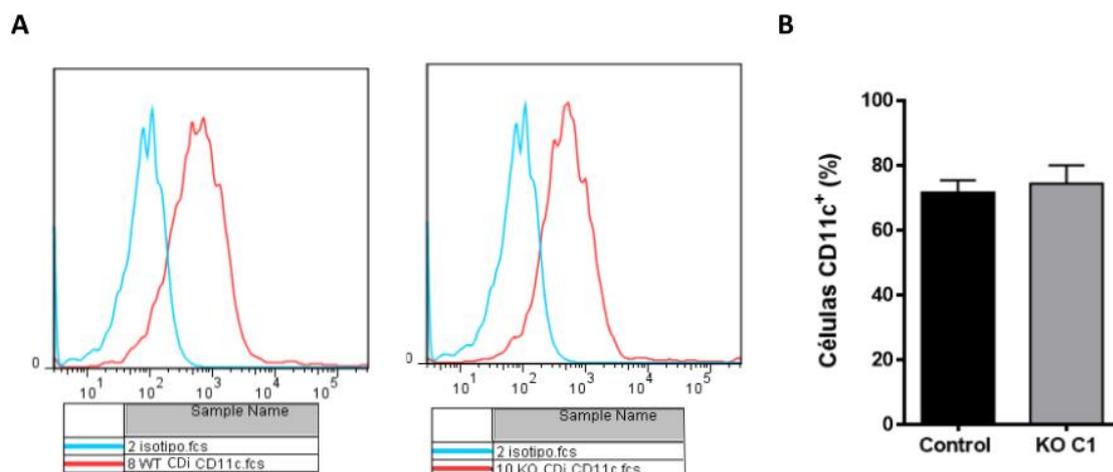


**Figura III.1 Expresión de Crisp1 y Crisp3 en células dendríticas.** Niveles de expresión de Crisp1 (A) y de Crisp3 (B), relativizado a ciclofilina medidos por PCR en tiempo real tanto en CD WT inmaduras (CDi) como maduras con LPS (DCm). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. DCi.

Habiendo confirmado la expresión de CRISP1 y CRISP3 en CD, nos propusimos explorar el rol funcional de ambas proteínas en dichas células, utilizando los animales deficientes en CRISP1 (KO C1) ya disponibles en el laboratorio, como así también los animales carentes de CRISP1 y CRISP3 (DKO C1C3) cuya generación fue descrita en el capítulo 2 de esta Tesis.

Cabe destacar que los estudios se iniciaron con los animales KO para CRISP1 mientras que en paralelo se generaba la colonia DKO C1C3.

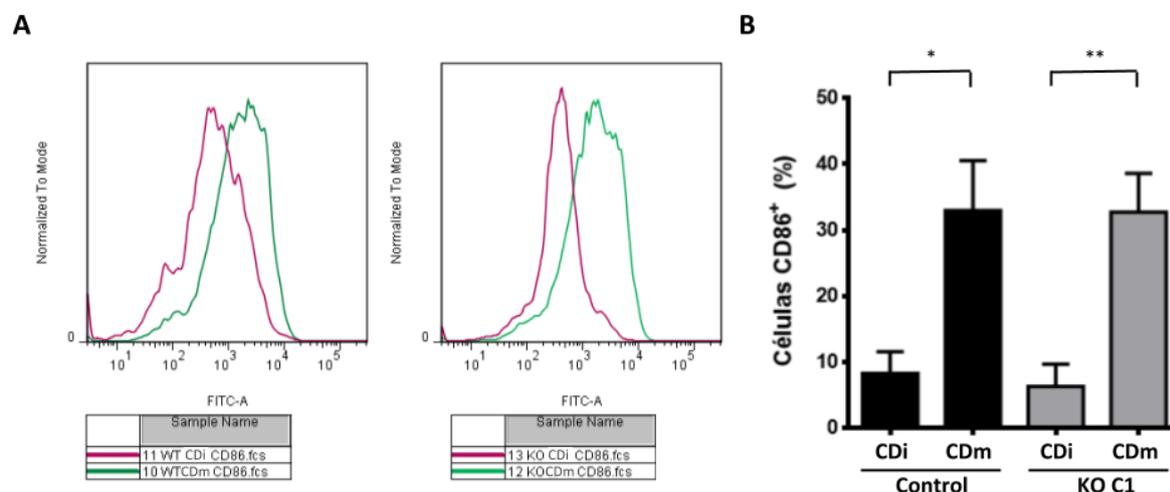
Para poder llevar a cabo los estudios funcionales, las células hematopoyéticas pluripotenciales provenientes de la médula ósea de ratones KO C1 y control fueron cultivadas *in vitro* en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF. Luego del período de incubación, se determinó el porcentaje de células diferenciadas evaluando la expresión del marcador molecular de superficie de CD de ratón, CD11c, a través de la técnica de citometría de flujo (Figura III.2). Al respecto, cabe aclarar que el desplazamiento de la curva hacia mayores intensidades de fluorescencia indica la existencia de una población de células positivas para el marcador de superficie que se está analizando. Los resultados mostraron que tanto para los animales KO C1 como para los animales control, el 70% de las células fueron capaces de diferenciarse a CDi (Figura III.2), indicando que CRISP1 no estaría involucrada en la diferenciación de estas células.



**Figura III.2 Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre la diferenciación de células de médula ósea a CD. (A)** Histogramas representativos de la expresión de CD11c en CD KO C1 o WT. **(B)** Porcentaje de células control y KO C1 positivas para CD11c luego de su exposición a GM-CSF en cultivo durante 7 días. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.

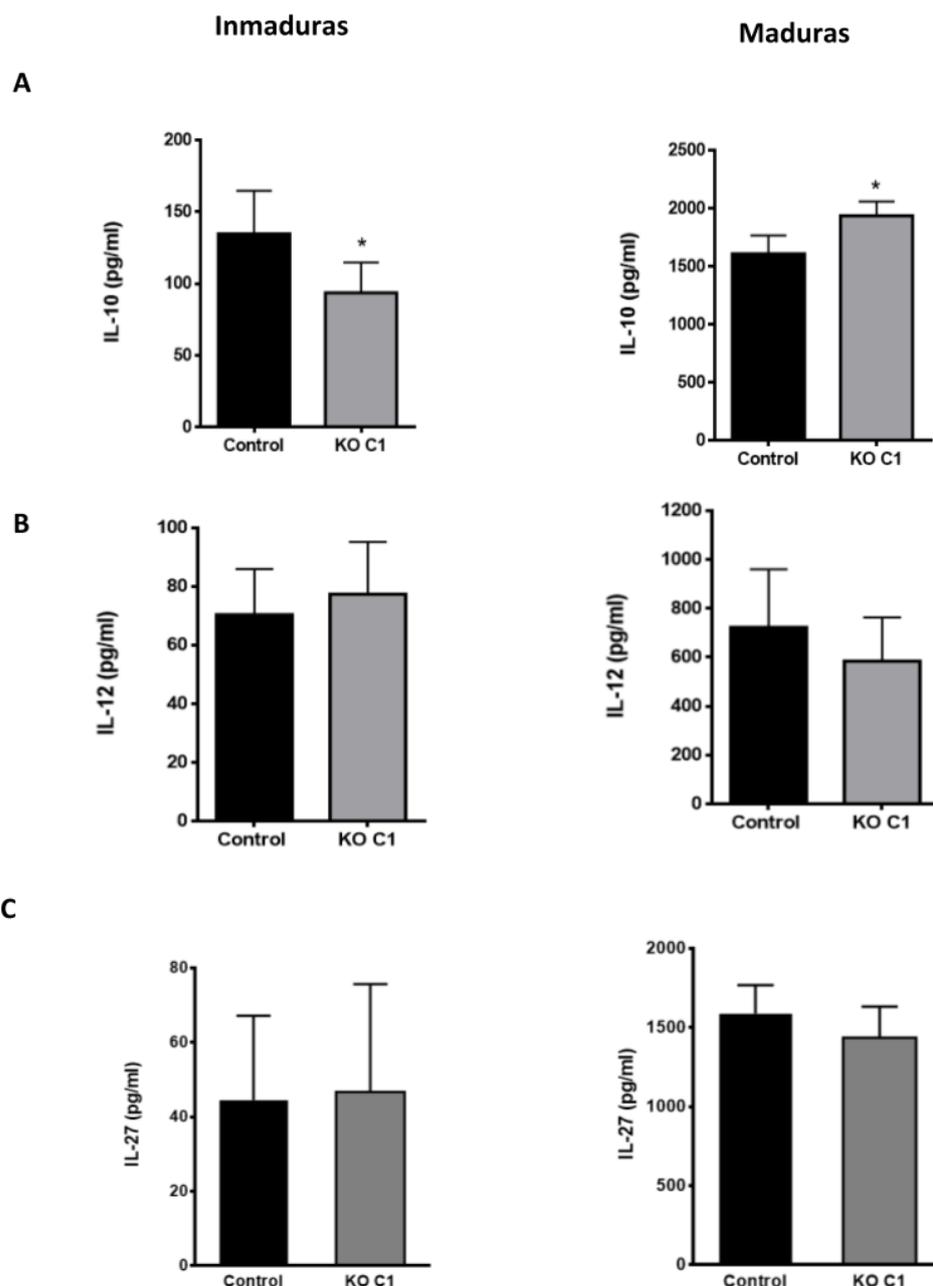
Asimismo, para caracterizar el fenotipo de superficie de las CD luego de la estimulación con LPS, evaluamos el marcador CD86 (altamente expresado en las CD activadas) por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el LPS fue capaz de inducir la maduración

de las CDi sin observarse diferencias significativas en el fenotipo de superficie de ambos genotipos (Figura III.3).



**Figura III.3 Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre la maduración de las CD.** **A.** Histogramas representativos de la expresión de CD86 en CD KO C1 (KO) o control (WT) tanto inmaduras (CDi) como maduras (CDm). **B.** Porcentaje de CD WT y KO C1 tanto inmaduras como maduras por exposición a LPS que resultaron positivas para CD86. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  vs. CDi.

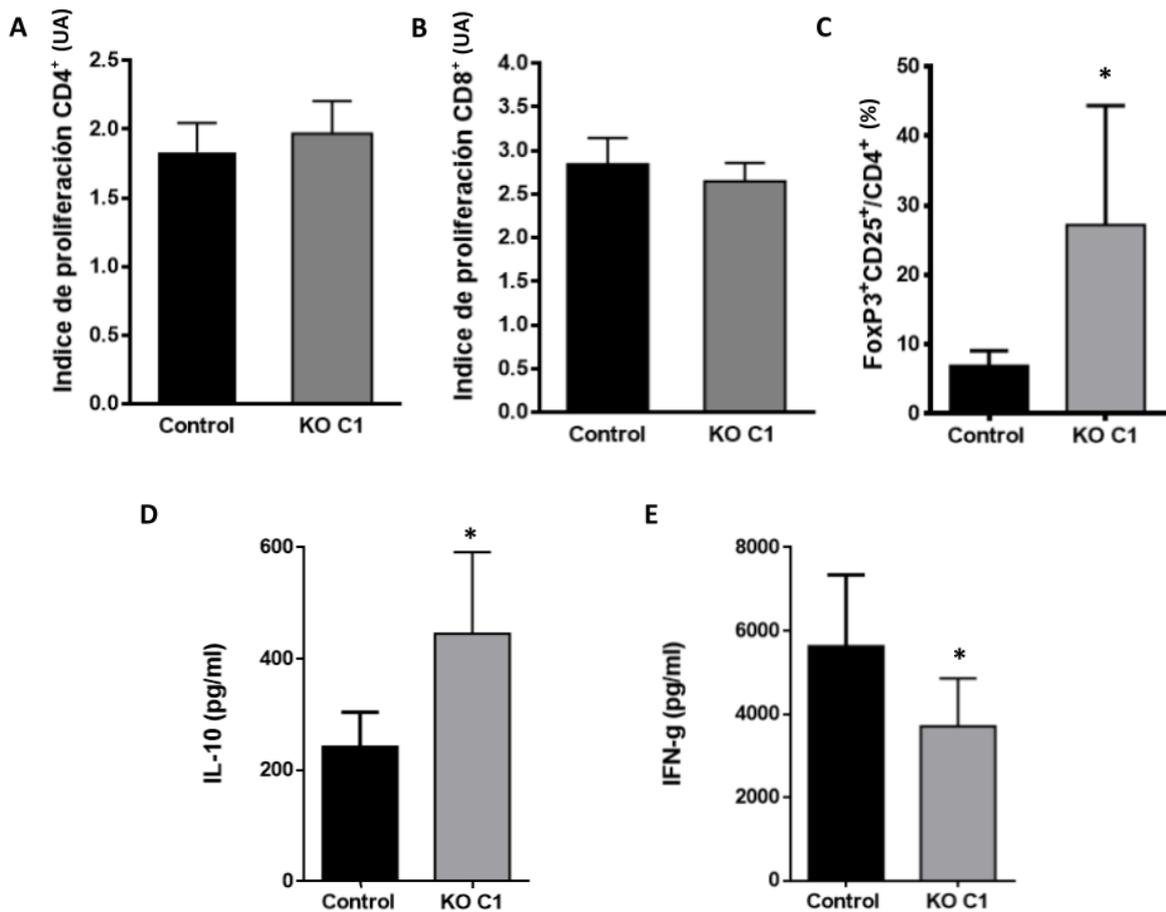
Con el fin de continuar la caracterización de las CD carentes de CRISP1, analizamos su perfil inmunológico evaluando, por ELISA, la secreción de citoquinas al medio extracelular correspondiente a las CDi y CDm de ambos genotipos. En este caso, pudimos observar que la ausencia de CRISP1 alteraba el perfil secretorio de las CD a juzgar por las diferencias significativas observadas en los niveles de IL-10 (citoquina inmunosupresora por excelencia) de las CD KO C1 respecto a las CD control. Estas diferencias se observaron tanto para las CDi, donde la concentración de IL-10 en el medio de cultivo fue menor a la de las células control, como para las CDm, donde la concentración se encontraba significativamente aumentada (Figura III.4 A), apoyando la participación de CRISP1 en la fisiología de la CD. Asimismo, se evaluó la producción de IL-12 (citoquina inmunoestimuladora) e IL-27 (citoquina inmunosupresora), no observándose diferencias significativas entre genotipos para ninguna de estas dos citoquinas (Figura III.4 B y C, respectivamente).



**Figura III.4 Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre la capacidad de secreción de citoquinas de las CD.** Concentración de IL-10 (A), IL-12 (B) e IL-27 (C) medida por ELISA en el sobrenadante de CDi y CDm de ambos genotipos. En todos los casos, los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

Habiendo observado una diferencia en el perfil de citoquinas de las células KO C1 con respecto a las células control, y teniendo en cuenta que la interacción de las CD con linfocitos T vírgenes define el tipo de respuesta inmune de los mismos, decidimos estudiar la respuesta T inducida por CD carentes de CRISP1. Para ello, se realizó un co-cultivo *in vitro* de

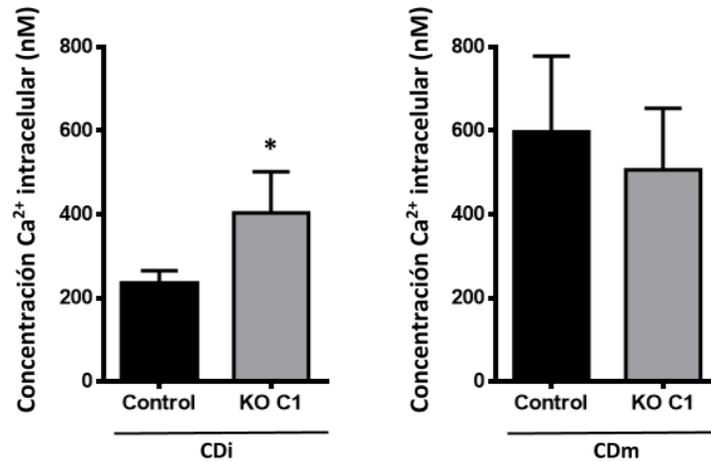
CD de ambos genotipos con esplenocitos provenientes del bazo de animales control, los cuales fueron marcados previamente con la sonda CFSE con el fin de evaluar la proliferación celular. Luego de 3 días de co-incubación, se analizaron tanto los índices de proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como la frecuencia de LT regulatorios (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>). Más aún, se estudió el perfil de la respuesta T desencadenada, analizando las citoquinas presentes en el medio de cultivo luego de 5 días de co-incubación. En particular, se evaluó la producción de IL-10 e IFN- $\gamma$  ya que estas citoquinas dan indicio del tipo de respuesta que se desencadena. Mientras una mayor expresión de IL-10 indica una respuesta de tipo tolerogénico, es decir inhibitoria de la respuesta inmune, una mayor expresión de IFN- $\gamma$  indica una respuesta pro-inflamatoria. Los resultados mostraron que si bien los índices de proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> correspondientes al co-cultivo con CD KO C1 no presentaban diferencias respecto a los controles (Figura III.5 A y B), se observaba un aumento significativo en la frecuencia de linfocitos FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> positivos en la población de LT co-cultivados con DC KO C1 respecto al control (Figura III.5 C), sugiriendo que la ausencia de CRISP1 en las CD es capaz de producir un desbalance en la respuesta inmune hacia un perfil tolerogénico. Más aún, y en concordancia con lo observado, los resultados obtenidos por ELISA revelaron que el medio extracelular correspondiente al co-cultivo de esplenocitos con CD KO C1 presentaba mayores niveles de IL-10 y menores niveles de INF- $\gamma$  respecto a los controles (Figura III.5 D y E, respectivamente).



**Figura III.5 Estudio del efecto de la ausencia de CRISP1 en la modulación de la respuesta T.** **A y B:** Índice de proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) luego de 3 días de co-cultivo con CD maduras. **C.** Frecuencia de linfocitos T regulatorios luego de 3 días de co-cultivo con CD maduras KO C1 o control. **D y E.** Concentración de IL-10 (D) e INF- $\gamma$  (E) en el sobrenadante del co-cultivo de esplenocitos co-incubados durante 3 días con CD maduras KO C1 o control. En todos los casos, los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

Teniendo en cuenta la capacidad de las proteínas CRISP de regular canales de Ca<sup>2+</sup> (Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011), y dada la importancia del Ca<sup>2+</sup> para la maduración, activación, migración y secreción de citoquinas de las CD (Feske, Wulff, and Skolnik 2015), decidimos analizar los niveles de Ca<sup>2+</sup> en las CD provenientes de animales KO C1. Cabe destacar que la viabilidad de las CD en cultivo, a diferencia de lo que ocurre con los espermatozoides, es mayor al 90%, lo cual nos permitió realizar la medición del Ca<sup>2+</sup> intracelular mediante fluorimetría utilizando la sonda fluo 4-AM. Los resultados obtenidos mostraron que mientras las CDm KO C1 presentaban los mismos niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular

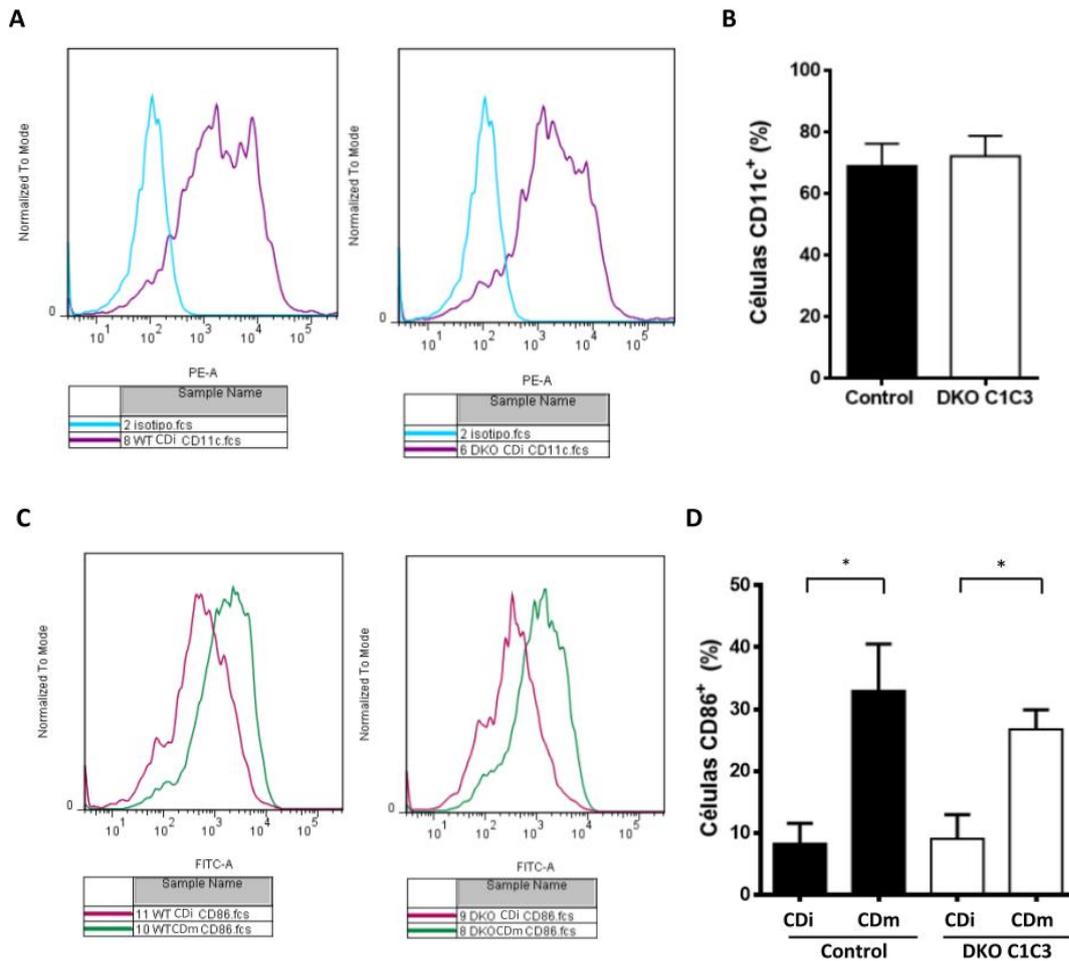
que las CD control, las CDi KO C1 presentaban niveles significativamente mayores que los controles (Figura III.6), indicando que la ausencia de CRISP1 afectaría la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en dichas células.



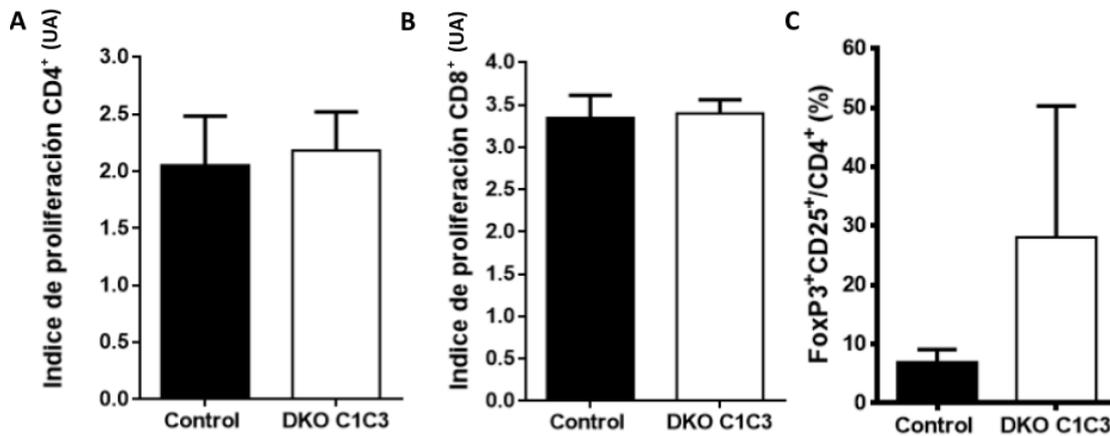
**Figura III.6 Estudio del efecto de la ausencia de CRISP1 sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las CD.** Niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de CD tanto inmaduras (CDi) como maduras (CDm) de animales KO C1 o control, medidos por fluorimetría, utilizando la sonda Fluo 4-AM. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$  vs. Control.

Como fuera mencionado anteriormente, en paralelo a los estudios realizados con los animales KO C1, se llevó a cabo la generación del animal DKO C1C3, modelo que resulta de sumo interés para estudiar la participación de las proteínas CRISP en el sistema inmune ya que los animales carecen simultáneamente de dos proteínas presentes en órganos y células inmunes. Tal como se observó en las CD KO C1, el estudio de los marcadores moleculares de superficie CD11c y CD86, por citometría de flujo, no mostró diferencias significativas en los porcentajes de células  $\text{CD11c}^+$  y  $\text{CD86}^+$  de las CD DKO C1C3 con respecto al genotipo control (Figura III.7), indicando que la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 tampoco fue capaz de alterar el fenotipo de superficie de las células tanto inmaduras como maduras por LPS. Por su parte, los co-cultivos realizados entre las CD DKO C1C3 y los esplenocitos, revelaron la ausencia de diferencias significativas entre los índices de proliferación de  $\text{LT CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  en comparación a los controles (Figura III.8 A y B, respectivamente) como así también una marcada tendencia a un aumento en la frecuencia de linfocitos  $\text{FoxP3}^+\text{CD25}^+/\text{CD4}^+$  positivos en la población de LT (Figura III.8 C), similar a lo observado para las CD KO C1. Por último, el

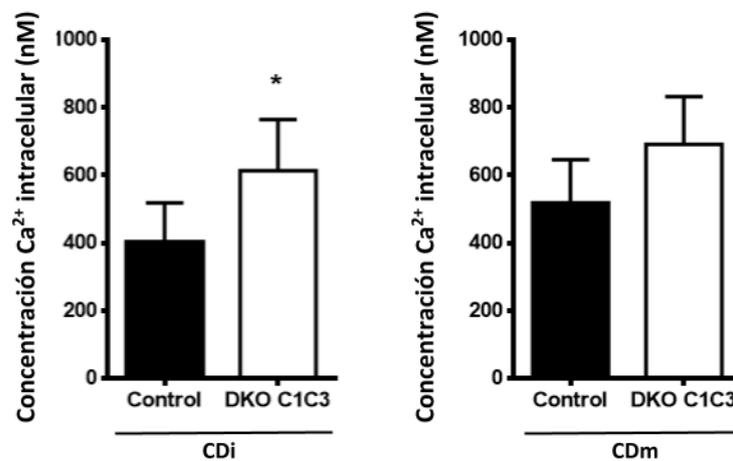
estudio del  $Ca^{2+}$  intracelular por fluorimetría reveló que mientras las CD DKO C1C3 activadas con LPS no mostraban diferencias significativas en la concentración intracelular del ion respecto a los controles, las CDi DKO C1C3 exhibían un aumento significativo en los niveles de  $Ca^{2+}$  respecto al grupo control (Figura III.9), tal como se había observado para las CD KO C1.



**Figura III.7 Efecto de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 sobre la diferenciación y maduración de CD derivadas de médula ósea. A.** Histogramas representativos de la expresión de CD11c en CD DKO C1C3 o WT. **B.** Porcentaje de células DKO C1C3 o control CD11c<sup>+</sup> luego de su exposición a GM-CSF en cultivo durante 7 días. **C.** Histogramas representativos de la expresión de CD86 en CDi y CDm DKO C1C3 o control. **D.** Porcentaje de células CD86<sup>+</sup> correspondientes a CDi y CDm DKO C1C3 o control. En todos los casos, los resultados representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*, p < 0,05 vs. Control.

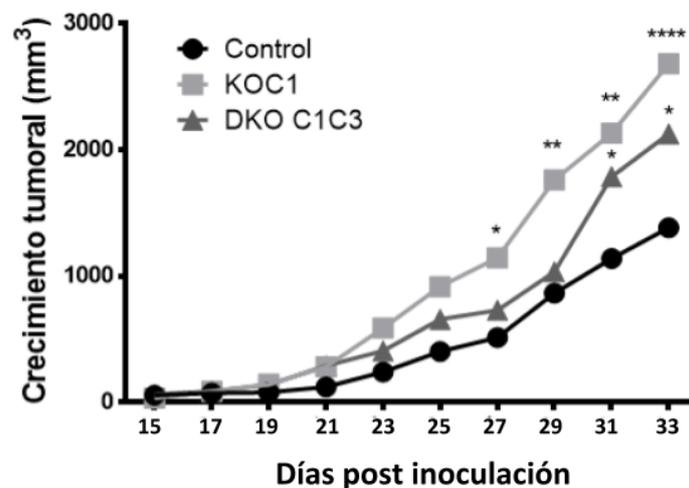


**Figura III.8 Estudio de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 en la modulación de la respuesta T. A y B:** Índice de proliferación de LT CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) luego de 3 días de co-cultivo con CD maduras DKO C1C3 o control. **C.** Porcentaje de diferenciación de linfocitos T regulatorios luego de 3 días de co-cultivo con CD maduras DKO C1C3 o control. En todos los casos, los resultados representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes.



**Figura III.9 Estudio de los efectos de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 sobre los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular de las CD.** Niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular de CD tanto inmaduras (iDC) como maduras (mDC) derivadas de médula ósea de animales DKO C1C3 o control, medido por fluorimetría, utilizando la sonda Fluo 4-AM. Los resultados representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*, p<0,05 vs. Control.

Por último, a fines de investigar la capacidad regulatoria de CRISP1 y CRISP3 en un modelo *in vivo* con relevancia fisiopatológica, los ratones KO C1 y DKO C1C3 fueron desafiados con células tumorales, analizándose el efecto de la ausencia de las proteínas CRISP sobre la progresión tumoral. Para ello, células tumorales de la línea MA-10, derivadas de un tumor de células de Leydig de ratón fueron inyectadas de forma subcutánea en el flanco izquierdo de los animales. Al cabo de 15 días, tiempo aproximado de aparición de los tumores, se inició el monitoreo del crecimiento de los mismos midiendo, día por medio, los diámetros perpendiculares de la masa tumoral con un calibre métrico. Los resultados revelaron un mayor crecimiento tumoral en los animales mutantes que en los animales control (Figura III.10), apoyando la idea que la ausencia de las CRISP induciría un perfil más tolero génico tal como había sido observado en los estudios *in vitro*.



**Figura III.10 Estudio del efecto de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 sobre el crecimiento tumoral.** Crecimiento tumoral en ratones KO C1, DKO C1C3 o control inyectados con  $1 \times 10^4$  células tumorales de la línea MA-10, derivadas de un tumor de células de Leydig de ratón. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0005$  vs. Control.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la ausencia de las proteínas CRISP1 y CRISP3 produce alteraciones en diferentes parámetros asociados al funcionamiento de las CD, confirmando la relevancia de estas proteínas para la regulación del sistema inmune.

## DISCUSIÓN

---

---

## Capítulo I

### **Estudio del rol de CRISP1 como regulador de CatSper y su potencial empleo para el desarrollo de un método anticonceptivo**

Como se mencionara en la introducción, existen numerosas evidencias indicando que las proteínas CRISP se expresan principalmente en el tracto reproductor masculino, encontrándose presentes en el espermatozoide. Para el caso particular de CRISP1, se ha visto que la misma no solo se expresa en el tracto reproductor masculino sino también a lo largo del tracto reproductor femenino (útero, oviducto y ovario) incluyendo las células del cúmulus donde participaría en el proceso de fertilización (Ernesto et al. 2015). Nuestros resultados sugieren que CRISP1 es capaz de orientar a los espermatozoides hacia el ovocito durante la penetración del cúmulus, muy posiblemente modulando su HA a través de su capacidad de inhibir CatSper, el principal canal de calcio del espermatozoide, esencial para el desarrollo de la HA y la fertilidad (Ren et al. 2001). Con el fin de confirmar esta hipótesis, realizamos estudios de orientación en presencia de un agonista y un antagonistas de CatSper, observando que mientras la exposición de los espermatozoides a un gradiente de NNC 55-0396, un inhibidor de CatSper y de la hiperactivación espermática (Alasmari, Barratt, et al. 2013), era capaz de aumentar la orientación de los espermatozoides su exposición a un gradiente de un activador de CatSper (Navarro, Kirichok, and Clapham 2007) y de la hiperactivación (Chang and Suarez 2011b), tal como la 4-Aminopiridina, no logro orientar a los espermatozoides. En conjunto, estas evidencias apoyan la idea de que CRISP1 orientaría a los espermatozoides a través de su capacidad de inhibir CatSper y la HA espermática. Consistente con esta idea, los COC provenientes de hembras KO C1 co-incubados por 3 hs con espermatozoides control, presentaron menores porcentajes de fertilización que los COC de hembras control tal como fuera reportado por nuestro grupo previamente. Sin embargo, cuando las gametas fueron co-incubadas durante toda la noche, los porcentajes de fertilización no difirieron de los obtenidos para el control, indicando que el retraso en la fertilización observado a tiempos cortos podía ser compensado por un mayor tiempo de co-incubación de las gametas. Estos resultados, en principio, podrían explicar la normal fertilidad observada para las hembras KO C1 ya que los COC carentes de CRISP1 estarían expuestos por tiempos más largos a los espermatozoides contenidos en el tracto. Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo indican que el apareo de hembras en estro puede enmascarar

ciertas deficiencias detectadas solo al emplear una condición más demandante tal como lo es el empleo de hembras superovuladas (Brukman et al. 2016). En base a ello, analizamos el porcentaje de fertilización *in vivo* obtenido al aparear hembras KO C1 superovuladas con machos control. Bajo estas condiciones, pudo detectarse una bajada en el porcentaje de ovocitos recuperados de la ampulla que logro alcanzar el estadio de dos células, consistente con los menores porcentajes de ovocitos en dos células observados bajo condiciones *in vitro*. Estos resultados podrían deberse a los descritos efectos de la superovulación tanto sobre los ovocitos como sobre el ambiente del tracto femenino (Van der Auwera 2001; Evans and Armstrong 1984; Vogel and Spielmann 1992). Consistente con esta hipótesis, se ha reportado que las hembras fértiles de una cepa de ratones con mutaciones en distintos genes (T-stock) presentan menores tasa de fertilización *in vivo* cuando son superovuladas, posiblemente debido a defectos en las propiedades del ambiente uterino y oviductal (Zudova et al. 2004). Más aun, considerando que CRISP1 se expresa también en el útero y en el oviducto (Ernesto et al. 2015) donde podrían regular el transporte y la capacitación espermática, no podemos descartar que su ausencia tenga un mayor impacto en las hembras KO C1 superovuladas que en las hembras KO C1 en estro. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de la proteína CRISP1 femenina murina en el proceso de fertilización, abriendo la posibilidad de que estas observaciones puedan extenderse al humano.

En ese sentido, se ha reportado que las proteínas CRISP humanas no solo se expresan en el tracto reproductor masculino, sino también en tejidos del tracto reproductor femenino tales como el endometrio (Horne et al. 2009) y el ovario (Krätzschar et al. 1996). Sin embargo, prácticamente no existen evidencias acerca del rol funcional que podrían estar cumpliendo las CRISP en el humano. En base a ello, nos planteamos extender nuestras observaciones en ratón al humano investigando la expresión de CRISP1 en las células del cúmulus humanas. Los resultados obtenidos indicando la ausencia de la proteína CRISP1 en las muestras de células de la granulosa humanas y la presencia del mensajero de CRISP3, sugieren que sería la proteína CRISP3 y no la proteína CRISP1 la que se expresaría en estas células. Consistente con estas observaciones, se ha reportado la expresión de CRISP3 en ovario humano (Henricksen et al, 2012). Más aun, mientras existen numerosas evidencias indicando que CRISP3 se sobreexpresa en cáncer prostático humano (Bjartell et al. 2006, 2007; Kosari et al. 2002), recientes evidencias de nuestro grupo indican que una línea celular murina de cáncer

prostático expresa la proteína CRISP1 de ratón en lugar de expresar la proteína CRISP3. En conjunto, estas evidencias sugieren que CRISP1 murina (mCRISP1) sería la proteína funcionalmente homóloga a CRISP3 humana (hCRISP3). Al respecto cabe mencionar que, según el alineamiento de secuencias de la base de datos del NCBI, la identidad de secuencia aminoacídica entre mCRISP1 y hCRISP3 (55%) es mayor que la existente entre mCRISP3 y hCRISP3 (48%). Más aun, en colaboración con el laboratorio del Dr. Roldan, hemos llevado a cabo un análisis evolutivo de las proteínas CRISP que sugiere que el gen de *Crisp3* de ratón podría haber surgido de una reciente duplicación del gen de *Crisp1* (Arevalo et al. n.d.) tal como también fuera sugerido por un trabajo recientemente publicado (Vicens and Treviño 2018). De todos modos, no podemos descartar que en realidad sea la combinación de CRISP1 y CRISP3 murinas la que represente el homólogo de hCRISP3. Apoyando esta posibilidad, se ha reportado que la glándula salival de ratón expresa tanto CRISP1 como CRISP3 (Haendler et al. 1993) mientras que la glándula salival humana solo expresa hCRISP3 (Krätzschmar et al. 1996).

El hecho de haber identificado a hCRISP3 en células de cúmulus humano, junto a nuestras observaciones en ratón, apoya la idea de que la misma sea la principal candidata dentro de la familia CRISP para regular a CatSper y orientar a los espermatozoides humanos durante la penetración del cúmulus. Teniendo en cuenta que la proteína CRISP1 nativa de rata, pero no así la recombinante bacteriana, fue capaz de regular CatSper en ratón, y no contando con la proteína CRISP3 nativa humana purificada, como una aproximación experimental evaluamos el efecto de CRISP1 nativa de roedores sobre la entrada de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide humano en colaboración con el Dr Darszon (UNAM, México), reconocido investigador en el área de electrofisiología de espermatozoides de mamíferos tanto murinos como humanos. A diferencia de lo observado en el ratón, CRISP1 nativa de roedor no tuvo efectos sobre el ingreso de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide humano, sugiriendo que esto podría deberse a las diferencias en la secuencia entre ambas proteínas. En este sentido, se ha descrito que la actividad reguladora de canales iónicos de las CRISP presentes en el veneno de reptiles puede verse fuertemente afectada por algunos cambios de aminoácidos en el dominio CRD (Gibbs and O'Bryan 2007; Suzuki et al. 2008; Yamazaki et al. 2002). Asimismo, teniendo en cuenta que la regulación de CatSper humano difiere en algunos aspectos al del canal de roedor, ya que solo el primero es activado por progesterona (Lishko et al. 2011; Strünker et al. 2011), no

podemos descartar que la falta de actividad de la CRISP1 de roedores sobre el espermatozoide humano se deba a los diferentes mecanismos de regulación operando en cada especie. La disponibilidad de una proteína CRISP3 nativa humana (ej. purificada de plasma seminal o saliva) contribuirá, sin dudas, a esclarecer estas diferentes posibilidades.

Los resultados obtenidos hasta el momento utilizando la proteína CRISP1 purificada indican la capacidad de esta proteína de inhibir CatSper y la HA. Mientras CRISP1 uterina podría contribuir a regular el proceso de capacitación para evitar el desarrollo de la HA antes de llegar al oviducto, CRISP1 del cúmulus inhibiría CatSper y la HA, orientando a los espermatozoides hacia el ovocito durante la fertilización. En el macho, la población de CRISP1 epididmaria unida débilmente al espermatozoide, estaría actuando como un factor decapacitante, inhibiendo a CatSper para evitar el desarrollo de una HA prematura en el tracto masculino (Ernesto et al. 2015). Estas observaciones, junto al gran interés desde hace muchos años de nuestro laboratorio de desarrollar un anticonceptivo masculino, nos llevaron a plantear la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo no hormonal basado en la actividad inhibitoria natural de CRISP1 sobre CatSper. En este sentido, cabe mencionar que CatSper cumple varios de los requisitos de un target anticonceptivo ya que se localiza en la superficie de los espermatozoides siendo accesible al ataque de drogas o anticuerpos, se encuentra presente solo en espermatozoides, sugiriendo que su inhibición sería específica, y es una molécula indispensable para la fertilidad masculina (Ren et al. 2001; Smith et al. 2013). En base a ello, y como prueba de concepto de la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo basado en la inhibición de CatSper, realizamos una serie de estudios utilizando el inhibidor de CatSper HC-056456 (HC), el cual había sido identificado a través del screening de una biblioteca de compuestos (Carlson et al. 2009), y había demostrado tener una actividad inhibitoria sobre el canal muy similar a la de CRISP1 (Ernesto et al. 2015). La primer condición evaluada consistió en el agregado del inhibidor durante la capacitación espermática, condición bajo la cual pudimos observar notorios efectos sobre la fosforilación en residuos tirosina, la RA, e HA espermática no debidos a efectos tóxicos a juzgar por la viabilidad normal observada a todas las concentraciones de HC ensayadas. El hecho de haber observado efectos inhibitorios de HC sobre los diferentes eventos mencionados es consistente con el requerimiento de  $Ca^{2+}$  para la ocurrencia de los mismos. El mayor efecto de HC fue aquel observado sobre la motilidad progresiva y la

hiperactivación cuando el inhibidor se encontraba presente en distintas concentraciones durante toda la capacitación. Estos resultados son comparables a lo observado en los espermatozoides KO para las distintas subunidades de CatSper los cuales, además de exhibir problemas de hiperactivación (Qi et al. 2007; Quill et al. 2003; Ren et al. 2001) presentan una disminución gradual de los porcentajes de motilidad progresiva a medida que transcurre el tiempo de capacitación (Qi et al. 2007). Estas observaciones apoyan la idea de que los efectos de HC durante la capacitación espermática se deberían a una inhibición específica de CatSper. Por su parte, el efecto inhibitorio de HC sobre la fosforilación de residuos tirosina fue diferente al reportado en los espermatozoides KO para las subunidades de CatSper 1, 3, 4 y  $\delta$ , ya que mientras en nuestro caso la presencia de HC disminuyó los niveles de fosforilación respecto al control, en el caso de los KO de CatSper los niveles se encontraban aumentados (Chung et al. 2014). La diferencia en los resultados podría deberse a los diferentes modelos empleados ya que en los KO el canal está completamente ausente mientras que en nuestros estudios se está tratando de inhibir un canal presente que podría permitir una pequeña entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células. En este sentido, las evidencias indican que el  $\text{Ca}^{2+}$  regularía las vías de fosforilación de AMP y de tirosina en forma bifásica (Navarrete et al. 2015). De este modo, mientras se ha observado que la ausencia completa del ion por agregado del quelante EGTA induce un aumento de fosforilación en tirosina tal como lo observado en los KO de CatSper, la presencia de pequeñas trazas del catión, provoca una disminución de los niveles de fosforilación, tal como lo que observamos al inhibir el canal con HC.

Teniendo en cuenta que existen evidencias indicando que el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa por la cola del espermatozoide también afecta los niveles  $\text{Ca}^{2+}$  de la cabeza del mismo (Xia and Ren 2009), no podíamos descartar que HC afectara los niveles de RA. Los estudios indicaron que si bien los niveles de RA tanto espontánea como inducida por ionóforo no mostraron diferencias significativas respecto al control, la presencia de HC afectó la inducción de RA por progesterona. Este efecto resultó llamativo ya que, como se mencionó anteriormente, la progesterona es capaz de activar al canal CatSper en humanos pero no así en roedores. Sin embargo, nuestra observación concuerda con resultados de un trabajo en el cual la inyección de ratones machos con un alcaloide (matrine) con actividad inhibitoria de canales, provocó una menor actividad CatSper y acompañado de menores porcentajes de motilidad

espermática y RA inducida por progesterona (Luo et al. 2016). Por otro lado, dado que HC es capaz de inhibir al canal de potasio SLO3 a una concentración mayor que la necesaria para inhibir CatSper (Carlson et al. 2009), tampoco podemos descartar que la inhibición sobre la RA se deba a algún efecto de HC sobre SLO3 cuya ausencia en el animal KO produce una disminución en la RA inducida (Santi et al. 2010).

Los notorios efectos de HC sobre la motilidad y, en consecuencia, sobre la HA, se vieron reflejados en la incapacidad de los espermatozoides expuestos a HC 10 y 20  $\mu$ M durante la capacitación, de fertilizar COC tal como se ha reportado para los espermatozoides KO de CatSper (Quill et al. 2003; Ren et al. 2001). Sin embargo, para nuestra sorpresa, si bien es sabido que la HA no es necesaria para la fusión de gametas (Yanagimachi) y que los espermatozoides KO para CatSper son capaces de fusionar con ovocitos sin ZP (Quill et al. 2003; Ren et al. 2001; Ren and Xia 2010), los espermatozoides capacitados en presencia de HC presentaron defectos en su capacidad de fusión a juzgar por los menores porcentajes de fertilización de ovocitos sin ZP respecto a los controles. Nuevamente, esta diferencia podría deberse a un posible efecto de HC sobre SLO3 ya que los espermatozoides KO para este canal son incapaces de fusionar con ovocitos desnudos (Santi et al. 2010). Por otro lado, estos resultados también podrían apoyar la idea de que los espermatozoides requieren tener una cierta motilidad oscilatoria para lograr fusionarse con la membrana plasmática del ovocito tal como ha sido reportado previamente (Ravaux et al. 2016).

Habiendo observado y caracterizado el efecto de HC sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides cuando el inhibidor es agregado durante la capacitación, estudiamos si el mismo también tenía efectos sobre la motilidad y la capacidad fertilizante de espermatozoides ya capacitados para lo cual los espermatozoides fueron expuestos a HC solo durante el periodo de co-incubación de las gametas. Si bien bajo estas condiciones, observamos que el HC afectaba la motilidad espermática del mismo modo que cuando estaba presente durante la capacitación, no lograba inhibir la capacidad de los espermatozoides de fertilizar tanto COC como ovocitos sin ninguna envoltura. Sin embargo, una exposición de los espermatozoides ya capacitados a HC 10 y 20  $\mu$ M por 60 min previo a su co-incubación con los ovocitos fue suficiente para inhibir la capacidad fertilizante de los mismos al emplear tanto COC como ovocitos sin ZP. En conjunto, estos resultados indican que para observar un

efecto de HC sobre la capacidad fertilizante se requiere que los espermatozoides tengan un tiempo de exposición al inhibidor previo a contactar con los ovocitos.

Los resultados discutidos anteriormente, destinados a caracterizar el efecto de HC sobre la capacitación y la co-incubación de gametas son condiciones *in vitro* que estrían simulando de algún modo el efecto que tendría HC en caso de ser administrado a las hembras donde tienen lugar los procesos de capacitación y fertilización. Teniendo en cuenta que el objetivo primero de nuestros estudios era evaluar el potencial empleo de un inhibidor de CatSper tal como lo es CRISP1, como un posible método anticonceptivo no hormonal masculino, evaluamos qué ocurriría en una condición que simulara mejor una administración en el macho. Para ello, se incubaron los espermatozoides en una concentración espermática alta no capacitante con HC durante 60 minutos, (simulando administración en macho) luego de lo cual los espermatozoides fueron capacitados y co-incubados con los ovocitos sin inhibidor, simulando lo que ocurriría posteriormente en el tracto femenino libre de HC. Los resultados revelaron que si bien la motilidad se vio afectada luego de los 60 minutos de incubación con HC, el efecto se revertía una vez transcurrida una hora de capacitación sin el inhibidor. Sin embargo, a pesar de la reversión de la motilidad, la capacidad de los espermatozoides para fertilizar COC y ovocitos desnudos se mantuvo afectada, indicando la posibilidad de tener un efecto anticonceptivo administrando el inhibidor en el macho. La no reversión de la capacidad de fertilizar ovocitos con sus envolturas a pesar de la reversión en la motilidad podría explicarse por una reversión de la motilidad progresiva pero no así de la HA con lo cual los espermatozoides carecerían de la fuerza necesaria para penetrar las envolturas, en particular la ZP. Para el caso de los ovocitos desnudos, si bien no se requiere el desarrollo de HA, no podemos descartar que la motilidad que se recupera no sea la descrita como necesaria para permitir la fusión entre las membranas de las gametas (Ravaux et al. 2016). Nuevamente, tampoco podemos descartar que el HC esté afectando irreversiblemente a algún otro canal o vía regulatoria importante para la fusión como por ejemplo a SLO3 ya que, como fuera mencionado, los espermatozoides KO para este canal son incapaces de fusionarse con ovocitos desnudos (Santi et al. 2010).

Por último, habiendo observado que los espermatozoides incubados con HC a alta concentración previo a su capacitación o co-incubación con los ovocitos eran incapaces de fertilizar *in vitro*, evaluamos si este efecto se podría observar también al exponer los

espermatozoides a HC previo a su inseminación uterina. Bajo estas condiciones, observamos una bajada en los porcentajes de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla cuando los espermatozoides habían sido expuestos a HC por 30 o 60 minutos previos a su inseminación. Más aún, observamos que las bajadas en las tasas de fertilización correlacionaban con las bajadas de motilidad observadas a cada tiempo indicando la necesidad de la exposición de los espermatozoides al inhibidor previo a contactar con los ovocitos bajo condiciones *in vivo*. Estas observaciones cobran relevancia al momento de considerar los tiempos para una futura administración sistémica del inhibidor en los machos previo al apareo.

En conjunto, los estudios presentados confirman la posibilidad de inhibir la capacidad fertilizante de los espermatozoides tanto *in vitro* como *in vivo* a través de su exposición a un inhibidor específico de CatSper, principal canal de  $Ca^{2+}$  del espermatozoide. Estos resultados constituyen una prueba de concepto apoyando el posible empleo de un inhibidor de este canal para el desarrollo de un anticonceptivo masculino no hormonal. Esta posibilidad resulta de sumo interés ya que actualmente la única opción de control de la fertilidad masculina es el condón o preservativo, ya que la vasectomía es un procedimiento quirúrgico reversible solo en el 50% de los casos y, por ende, considerado una esterilización. Más aun, los anticonceptivos no hormonales presentan la ventaja de evitar los efectos secundarios asociados a la administración de hormonas tales como la disminución de la libido, aumento de la agresividad, y los largos períodos (aprox. 3 meses) requeridos tanto para inhibir totalmente la producción de espermatozoides como para su posterior recuperación. Sumado a lo anterior, dado que CatSper se inhibe en el trato masculino pero se activa posteriormente en el tracto femenino, los resultados mostrando el efecto inhibitorio de HC tanto sobre espermatozoides no capacitados como espermatozoides capacitándose o ya capacitados abren la posibilidad del empleo de esta estrategia para el desarrollo de anticonceptivos tanto masculinos como femeninos, constituyendo lo que se denomina un método anticonceptivo unisex. Más aun, podría plantearse el empleo conjunto del inhibidor en ambos miembros de la pareja con el fin de potenciar aún más el efecto anticonceptivo. Dado que HC ejerce su efecto relativamente rápido sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides se podría considerar la inhibición de CatSper para el desarrollo de un método anticonceptivo de tipo pericoital.

Finalmente, dada la capacidad de CRISP1 de inhibir a CatSper en roedores y la existencia de homólogos funcionales a CRISP1 en el humano tales como hCRISP1 en epidídimo (Cohen et al. 2001) o hCRISP3 en células del cúmulus (esta Tesis), el estudio de las proteínas CRISP podría brindar importante información para el desarrollo de los métodos anticonceptivos mencionados. En ese sentido, teniendo en cuenta que CRISP1 es un inhibidor natural de CatSper que se une débilmente al canal durante la maduración para luego liberarse y permitir la activación del CatSper en la hembra, sería interesante identificar el sitio por el cual CRISP1 interactúa con el canal de modo tal de desarrollar una molécula capaz de unirse irreversiblemente al mismo sitio al que se une el inhibidor natural CRISP1 y así evitar posibles efectos deletéreos no deseados.

## Capítulo II

### Generación y caracterización de animales carentes de CRISP3 y de más de dos CRISP simultáneamente

El uso de animales modificados genéticamente, en particular los animales KO ha sido en los últimos años una de las principales herramientas utilizadas para el estudio de la función y relevancia de las proteínas para diversos procesos biológicos. En este sentido, de los cuatro miembros de la familia CRISP, hasta el momento, se encuentran disponibles los ratones KO para CRISP1, CRISP2 y CRISP4, generados y caracterizados tanto por nuestro laboratorio (Brukman et al. 2016; Carvajal et al. 2018; Da Ros et al. 2008) como por otros grupos de investigación (Gibbs et al. 2011; Lim et al. 2019; Turunen et al. 2012), restando aun desarrollar el KO para CRISP3. Asimismo, el hecho de que los animales KO para CRISP1, CRISP2 y CRISP4 resultaran fértiles a pesar de exhibir defectos para fertilizar *in vitro* (Brukman et al. 2016; Carvajal et al. 2018; Gibbs et al. 2011; Lim et al. 2019; Da Ros et al. 2008; Turunen et al. 2012) y que los animales DKO C1C4 fueran subfértiles (Carvajal et al. 2018) apoyaba la existencia de mecanismos compensatorios entre los miembros de la familia CRISP. En base a estas observaciones, el segundo capítulo de esta Tesis, estuvo enfocado al desarrollo y caracterización tanto del animal KO para CRISP3 como de animales múltiples KO para diferentes CRISP a través del empleo de la técnica CRISPR/Cas9. Esta técnica, desarrollada en los últimos años, permite la modificación del genoma de una forma mucho más sencilla, rápida, económica y altamente eficiente en comparación a otras técnicas (Wang et al. 2013). Sin embargo, a pesar de la diversidad de herramientas bioinformáticas disponibles hasta el momento, el diseño y selección de sgRNA eficientes y específicos continua siendo uno de los mayores desafíos de esta técnica (Cui et al. 2018). En nuestro caso, el diseño de un sgRNA capaz de reconocer a *Crisp3* implicaba un desafío extra dado que *Crisp3* presenta una alta identidad de secuencia con *Crisp1*.

La primer estrategia empleada consistió en diseñar un sgRNA que fuera homólogo al exón 5 de *Crisp3* ya que es uno de los exones que presenta mayor diferencia nucleotídica con *Crisp1*. Los resultados revelaron que, a pesar de que el sgRNA utilizado era correcto a nivel bioinformática, ninguno de los 37 animales nacidos empleando este sgRNA presentaba mutaciones en *Crisp3*. En ese sentido, el hecho de que la técnica CRISPR/Cas9 hubiera sido

empleada con éxito por nuestro colaborador, el Dr. Rubinstein (INGEBI) para producir mutaciones en otros genes, indicaba que muy probablemente el problema proviniera de la elección del sgRNA. A pesar de que es difícil dilucidar las razones por las cuales un sgRNA resulta ineficiente, se han descrito varios motivos que pueden afectar la efectividad del mismo y que incluyen la secuencia de la región variable del sgRNA, la cual se encuentra limitada a la secuencia del sitio que se desea mutar, el contenido de GC (Guanina y Citocina), la afinidad de dominio de interacción de la endonucleasa Cas9 con las diferentes variantes del PAM (secuencia consenso reconocida por la Cas9) (TGG, AGG, CGG o GGG) o la presencia de nucleótidos específicos en posiciones particulares del mismo (Doench et al. 2014; Farboud and Meyer 2015; Hsu et al. 2013; Jiang et al. 2015; Xu et al. 2015). Tampoco pueden descartarse problemas durante la síntesis *in vitro* del sgRNA, ya que se ha visto que la presencia de timidinas en el extremo 3' de la secuencia variable pueden producir variables erróneas (Doench et al. 2014), la estructura de la cromatina del gen blanco (Jensen et al. 2017; Uusi-Mäkelä et al. 2018) o la formación de estructuras secundarias del ARN, las cuales son muy difíciles de predecir y, por ende, no están contempladas en las herramientas bioinformáticas utilizadas para el diseño de los sgRNA (Xu et al. 2015).

Para la elección de la segunda estrategia, nos basamos en un trabajo que concluía que el uso de dos sgRNAs dirigidos a sitios adyacentes en el mismo gen aumenta significativamente la probabilidad de obtener deleciones que resulten deletéreas (Zhou et al. 2014). Asimismo, en esta oportunidad, decidimos tomar ventaja de la alta homología entre *Crisp1* y *Crisp3* seleccionando sgRNA que reconocieran a ambos genes, de forma tal de lograr obtener animales con mutación solo en *Crisp3* (KO C3) y con mutaciones *Crisp1* y *Crisp3* (DKO C1C3). En ese sentido, cabe mencionar que esta colonia DKO para CRISP1 y CRISP3 no había sido desarrollada hasta ese momento y no podía generarse por apareo de los KO simples correspondientes debido a que la gran cercanía entre ambos genes en el mismo cromosoma hacen mínima la probabilidad de recombinación homóloga. Bajo esta nueva estrategia, logramos un alto porcentaje de eficiencia de mutagénesis (25/34 animales con al menos una mutación) tal como fuera reportado por Wang et al. (2013) y Yuen et al. (2017). Más aún, el análisis de presencia de mutaciones en las crías de algunos de estos animales reveló un alto grado de mosaiquismo en concordancia con lo descrito en numerosos trabajos (Mehrvavar et al. 2019; Mizuno et al. 2014; Oliver et al. 2015). Por último, la secuenciación del producto de

PCR de muestras de ADN genómico de dos de las crías confirmó la existencia tanto de un animal con mutación únicamente en *Crisp3* como de un animal con mutaciones en ambos genes. Sin embargo, una vez establecidas ambas colonias, el estudio de la expresión proteica de los distintos miembros de la familia CRISP reveló que, los animales de ambas colonias expresaban las proteínas CRISP2 y CRISP4 y carecían de la proteína CRISP1, dando origen a dos colonias carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP3. Si bien la falta de CRISP1 era esperable para la colonia que presentaba mutación en ambos genes, no lo era para la colonia que presentaba mutación en *Crisp3* y el gen de *Crisp1* intacto, sugiriendo la existencia de algún mecanismo de regulación de *Crisp3* sobre la expresión de *Crisp1*. Resultados similares han sido reportados para animales KO para otros genes tales como CatSper (Carlson et al. 2005) o miembros de la familia ADAM (Kim et al. 2006; Nishimura et al. 2001) en los cuales la ausencia de una de las proteínas de la familia afectaba la expresión o regulación de otro miembro de la misma. Al respecto, es sabido que la expresión de una proteína se encuentra regulada a nivel del mensajero, controlando la transcripción o el procesamiento, transporte, degradación o localización del mensajero dentro del citosol como así también a nivel proteico, a través del control de la traducción, la degradación o compartimentalización de la proteína por modificaciones post-traduccionales (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al 2002). En este sentido, la ausencia del ARNm de *Crisp1* en los animales KO indica que la mutación en *Crisp3* estaría afectando la expresión de *Crisp1* a nivel transcripcional. Si bien no se puede descartar la posibilidad de que la ausencia de CRISP1 en la colonia KO C3 se deba a un efecto inespecífico, el hecho de que en la colonia DKO C1C3, en la cual la ausencia de la proteína CRISP1 era esperable debido a la pérdida del codón de inicio de la traducción, también observamos la ausencia del ARNm de *Crisp1*, apoya la existencia de una regulación de *Crisp3* sobre *Crisp1*. Dado que las CRISP carecen de dominio de unión a ADN, y que *Crisp1* y *Crisp3* se encuentran muy próximos en el cromosoma, existe la posibilidad de que la región eliminada de *Crisp3* contenga alguna secuencia de regulación a distancia tal como un enhancer (Kleinjan and Van Heyningen 2005; Narlikar and Ovcharenko 2009) o que la misma sea importante para la formación de las estructuras tridimensionales que se forman durante la expresión génica (Fraser and Bickmore 2007; Göndör and Ohlsson 2009). Si bien el hallazgo de la falta de CRISP1 en la colonia KO para *Crisp3* resulta de sumo interés y será motivo de futuros estudios, los restantes estudios fueron llevados a cabo en la colonia con mutaciones en ambos genes para una mejor interpretación de nuestras observaciones.

La caracterización a nivel reproductivo de animales de ambas colonias reveló que los machos carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP3 eran subfértiles apoyando la existencia de mecanismos de compensación entre los miembros de la familia CRISP tal como se había observado para los animales DKO C1C4 (Carvajal et al. 2018). Asimismo, el hecho de que esta subfertilidad no se hubiera observado anteriormente en ratones KO para CRISP1 generados en dos fondos genéticos diferentes (Da Ros et al. 2008; Weigel Muñoz et al. 2018), abre la posibilidad de un rol para CRISP3 en la fertilidad masculina. Esta posibilidad está apoyada por varios trabajos en equinos indicando la asociación entre la expresión de CRISP3 y la fertilidad de los machos (Hamann et al. 2007; Novak et al. 2010; Usuga, Rojano, and Restrepo 2018).

El hallazgo de que, a pesar de la subfertilidad observada, las tasas de fertilización *in vivo* correspondientes a los machos DKO C1C3 fueran normales, sugería que la bajada en la fertilidad podría deberse a problemas en eventos posteriores a la fertilización. Esta hipótesis fue confirmada al observarse que los ovocitos fertilizados *in vivo* por espermatozoides DKO C1C3 exhibían menores tasas de desarrollo a blastocisto *in vitro*, revelando, por primera vez, un posible rol de CRISP1 y/o CRISP3 en el desarrollo embrionario temprano. En este sentido, numerosas evidencias indican la existencia de diversos factores paternos que pueden llegar a afectar el desarrollo embrionario tales como defectos en la maduración de los espermatozoides y retrasos en la fertilización (Conine et al. 2018; Orgebin-Crist 1968; Orgebin-Crist et al. 1967; Shaver and Carr n.d.), daños en el ADN, modificaciones epigenéticas y reprogramación del pronúcleo paterno (Okada and Yamaguchi 2017; Scott 2000; Seli et al. 2004) y alteraciones en el ARN y proteínas provenientes del espermatozoide (Castillo, Jodar, and Oliva 2018; Conine et al. 2018; Godia, Swanson, and Krawetz 2018). En este sentido, nuestros resultados mostrando menores porcentajes de fertilización *in vivo* para los machos mutantes que para los controles cuando los ovocitos eran evaluados a tiempos cortos post-apareo indican que los espermatozoides DKO C1C3 tendrían un retraso para fertilizar los ovocitos que, tal como se mencionara anteriormente, podría llevar a los defectos en el desarrollo embrionario correspondientes a esta colonia. El hecho de que este retraso solo se haya detectado a tiempos cortos (4hs post-apareo) sugiere que el pool de ovocitos en dos células observados a tiempos largos luego del apareo podría corresponder a una población heterogénea que incluye ovocitos que han llegado a dicho estadio en

momentos diferentes. El largo tiempo en el que los ovocitos permanecen en estadio de dos células dentro del proceso de desarrollo embrionario temprano, apoya esta posibilidad.

Si bien el retraso en la fertilización podría explicar las menores tasas de desarrollo embrionario temprano correspondientes a los animales DKO C1C3, existen diversas causas que podrían llevar a dicho retraso. Una posibilidad es que los espermatozoides DKO C1C3 exhiban problemas en su maduración, lo cual está apoyado por la expresión epididimaria de CRISP1 en ratón y de CRISP3 en otras especies (Krätzschar et al. 1996; Udby 2005). En ese sentido, resulta muy interesante mencionar recientes estudios mostrando que la microinyección de espermatozoides murinos inmaduros del caput epididimario en los ovocitos da lugar a defectos de desarrollo embrionario no observados al microinyectar espermatozoides maduros del cauda. Más aun, cuando purifican ARN pequeños provenientes de epididimosomas del cauda y los microinyectan junto con los espermatozoide del caput logran revertir los defectos en el desarrollo embrionario temprano observados (Conine et al., 2018).

La posibilidad de que los espermatozoides DKO C1C3 tengan defectos en su maduración también está en parte apoyada por los menores porcentajes de fertilización *in vitro* observados para estos espermatozoides bajo las diferentes condiciones ensayadas. Sin embargo, el hecho de que dichos porcentajes fueran solo un poco más bajos que los de los controles y muy similares a los ya reportados para los ratones simples KO para CRISP1 (Da Ros et al. 2008; Weigel Muñoz et al. 2018) sugiere que CRISP3 tendría un rol menor en lo que respecta a la capacidad fertilizante de los espermatozoides tal como fuera reportado previamente por nuestro grupo para CRISP3 humana (Da Ros et al. 2015). De todos modos, no descartamos un posible rol de CRISP3 en la etapa de penetración del cumulus, a juzgar por la bajada en el porcentaje de fertilización observada al utilizar COC, no reportada para los espermatozoides simples KO para CRISP1 (Ernesto et al. 2015; Da Ros et al. 2008; Weigel Muñoz et al. 2018). Teniendo en cuenta que los ensayos *in vitro* se realizan utilizando espermatozoides epididimarios, la diferencia observada a nivel de penetración de COC apoyaría la expresión de CRISP3 murina a nivel epididimario tal como fuera reportado para otras especies (Krätzschar et al. 1996; Udby 2005). Más allá de los posibles defectos a nivel de la maduración epididimaria la detección de espermatozoides eyaculados inmóviles atrapados en agregados viscosos dentro del fluido uterino de hembras apareadas con

machos DKO C1C3, sugiere que este atrapamiento podría también contribuir al retraso en la fertilización observado para esta colonia. El hecho de que este fenotipo no fuera observado para los animales simples KO para CRISP1 apoya la idea de que la inmotilidad de los espermatozoides como así también la presencia de los agregados en el útero estaría asociada a la falta de CRISP3. En ese sentido, cabe mencionar que se ha descrito la expresión de CRISP3 en el plasma seminal humano (Udby 2005) y equino (Schambony et al. 1998), habiéndose reportado también diferentes roles para estas proteínas que podrían explicar el fenotipo observado. Por un lado, se ha reportado que CRISP3 equina interfiere en la interacción entre los espermatozoides y las células inmunes (Doty et al. 2011), sugiriendo que la ausencia de CRISP3 en el plasma seminal murino podría desproteger a los espermatozoides y conducir a los problemas de inmotilidad espermática observados en los animales DKO C1C3. Por otro lado, existen evidencias que indican que la ausencia de CRISP3 en células de cáncer de próstata humana disminuye la expresión de PSA, una enzima hidrolítica que cliva las semenogelinas (SMG1 y SMG2) sintetizadas en vesícula seminal y responsables de la coagulación del semen (Pathak et al. 2016).

Si CRISP3 murina cumpliera un rol similar en el ratón, su ausencia podría generar defectos en la licuefacción del semen dando lugar a la presencia de esos agregados viscosos conteniendo espermatozoides inmóviles que se observa en los úteros de hembras apareadas por machos DKO C1C3. En ese sentido, resulta interesante mencionar observaciones previas de nuestro laboratorio mostrando que CRISP1 contiene sitios de unión de zinc y es capaz de formar complejos de alto peso molecular en presencia de este catión tanto *in vitro* como *in vivo* (Maldera et al. 2011). La gran similitud de secuencia entre CRISP1 y CRISP3 sugiere que CRISP3 exhiba muy posiblemente las mismas propiedades. Asociado a estas observaciones, un reciente trabajo reporta que las proteínas CRISP tienen capacidad de inducir la formación de amiloides (Sheng et al. 2019), los cuales se encuentran presentes en forma natural en el semen y tienen la capacidad de unirse e inmovilizar espermatozoides defectuosos (Roan et al. 2017). En base a estas observaciones, es posible que la ausencia de CRISP3 pueda alterar la formación de estos amiloides fisiológicos, generando un atrapamiento anormal de los espermatozoides. En todos los casos, el desarrollo del KO simple para CRISP3 nos ayudara a esclarecer los posibles roles de esta proteína para la fertilización, el desarrollo embrionario y la fertilidad masculina.

La bajada de fertilidad en las hembras tanto KO C3 como DKO C1C3 demuestran, por primera vez, la importancia de las proteínas CRISP para la fertilidad femenina. Más aun, el hecho de que estos defectos de fertilidad no hayan sido observados en las hembras simples KO para CRISP1 (Da Ros et al. 2008), CRISP2 (Brukman et al. 2016) o CRISP4 (Tesis Guillermo Carvajal) apoya la relevancia específica de CRISP3 para la fertilidad femenina. Asimismo, los resultados mostrando que las hembras DKO C1C3 también exhibían menores tasas de fertilización *in vivo* y menores porcentajes de ovocitos alcanzando el estadio de blastocisto *in vitro* apoya la idea de que la subfertilidad de las hembras DKO C1C3 ocurriría como consecuencia de la combinación de defectos en los procesos de fertilización y desarrollo embrionario. Consistente con esta posibilidad, se ha descrito no solo la expresión de CRISP1 de ratón en el útero, ovario, oviducto y células del cúmulus que rodean al ovocito (Ernesto et al. 2015) sino también la participación de CRISP1 del cúmulus en el proceso de fertilización a través de su rol como quimioattractante de espermatozoides durante la etapa de penetración del cúmulus (Ernesto et al. 2015). Sumado al rol de CRISP1 del cúmulus en fertilización, se ha sugerido que CRISP1 uterina y oviductal podrían estar regulando el proceso de capacitación que ocurre en el tracto femenino evitando la ocurrencia prematura de la RA e HA necesaria para la fertilización en la ampulla (Ernesto et al. 2015), de hecho ensayos de fertilización *in vivo* de hembras superovuladas KO C1 presentan menores tasas de fertilización en comparación al control (Capítulo 1). Por su parte, dado que se ha descrito la expresión de CRISP3 en el útero de ratón y de humano (Evans et al. 2015) es posible que esta proteína cumpla diferentes roles a nivel uterino. Por un lado, y como se mencionara anteriormente, CRISP3 uterina podría estar participando de algún modo en los procesos de coagulación/licuefacción que tienen lugar inmediatamente luego de la eyaculación. Por otro lado, dada la capacidad de CRISP3 de interferir en la interacción de los espermatozoides con los polimorfunucleares dentro del útero (Doty et al. 2011), es posible que CRISP3 cumpla algún rol protector de los espermatozoides murinos a nivel uterino y que su ausencia contribuya a los defectos en fertilización *in vivo* y desarrollo embrionario observados en las hembras DKO C1C3. Más aun, teniendo en cuenta que CRISP3 induce la adhesión y proliferación de las células epiteliales del endometrio (Evans et al. 2015) y que la misma aumenta su expresión en embarazos ectópicos (Horne et al. 2009), no podemos descartar que la ausencia de CRISP3 genere también defectos a nivel implantatorio.

Tal como fuera mencionado anteriormente, la estrategia elegida para generar animales deficientes en más de dos CRISP simultáneamente por la técnica de CRISPR/Cas9 consistió en emplear los mismos sgRNA utilizados para la generación de los animales KO C3 y DKO C1C3 pero esta vez sobre cigotas provenientes de animales fértiles DKO C2C4 disponibles en el laboratorio. Dado que CRISP1/CRISP2/CRISP3 se encuentran muy cercanos en el mismo cromosoma segregando como si fueron un único gen, y que CRISP4 se encuentra localizada en un cromosoma diferente, esta estrategia puede dar origen tanto a animales triples KO para CRISP1/CRISP2/CRISP3 como cuádruples KO para los cuatro miembros de la familia.

El estudio de la fertilidad de los animales de esta colonia reveló que tanto los machos TKO como los CKO exhibieron una fertilidad severamente afectada incluyendo, en ambos casos, una alta proporción de machos estériles.

Tal como fuera observado para los machos de la colonia DKO C1C4 (Carvajal et al. 2018), observamos que una cierta proporción de los animales TKO y CKO presentaba un cuadro de epididimo-orquitis con espermatozoides epididimarios no viables. El hecho de que los animales que exhiben el fenotipo inflamatorio (DKO C1C4, TKO y CKO) compartieran el mismo fondo genético (C57/DBA), el cual es diferente a aquel de los animales simples KO C1 y DKO C1C3 sin evidencias de esta patología (C57) sugiere que el fondo genético podría estar generando una predisposición a desarrollar el cuadro inflamatorio que se observa en ausencia de las CRISP pero no así en los animales WT de estas colonias. Si bien el estudio de las razones que llevan al desarrollo del fenotipo inflamatorio resulta de sumo interés y será realizado en nuestro laboratorio, decidimos re-analizar los resultados de fertilidad de los machos TKO y CKO utilizando solo aquellos animales que exhibían órganos reproductivos normales de modo tal de investigar si la ausencia de las CRISP impactaba sobre la fertilidad independientemente de la presencia del cuadro de epididimo-orquitis. Los resultados de este análisis revelaron que la fertilidad de los machos TKO y CKO continuaba siendo marcadamente menor que los controles, incluyendo también un grupo de animales totalmente estériles. El hecho de que en la colonia DKO C1C4, los animales sin el cuadro inflamatorio presentaran una bajada sutil de su fertilidad en comparación con aquellos que exhibían epididimo-orquitis (Weigel Muñoz et al. 2018), apoya la idea de que la severa bajada de fertilidad en los TKO y CKO sería debida a la falta de más de dos proteínas CRISP simultáneamente.

Los estudios destinados a dilucidar los motivos de bajada en fertilidad de los machos TKO y CKO indicarían que la misma estaría asociada a la severa bajada en las tasas de fertilización *in vivo* tal como lo indica la correlación entre el número de crías y los porcentajes de ovocitos fertilizados en el oviducto. Más allá de los problemas de fertilización, el hecho de que los pocos ovocitos fertilizados por espermatozoides TKO o CKO tuvieran además problemas para alcanzar el estadio de blastocisto y que la fertilidad de los animales TKO y CKO correlacionara aún más con el número de blastocistos que de ovocitos fertilizados, apoya la idea de que la severa subfertilidad sería en realidad consecuencia de una combinación de defectos en la fertilización *in vivo* y posterior desarrollo embrionario. En ese sentido, dado que la disminución en los porcentajes de desarrollo observados para los animales TKO y CKO fue muy similar a la observada para los DKO C1C3 (aprox. 30%), es muy probable que los defectos de desarrollo correspondientes a los TKO y CKO provengan principalmente de la ausencia conjunta de CRISP1 y CRISP3. De todos modos, los severos defectos en la fertilización *in vivo* parecerían ser los principales responsables de la bajada de fertilidad de los animales TKO y CKO a diferencia de lo observado para los animales DKO C1C3 en los cuales la subfertilidad sería causada por los defectos en desarrollo a juzgar por los normales niveles de fertilización *in vivo* de esta colonia.

Tal como se mencionara en la sección Resultados, las bajas tasas de fertilización *in vivo* observadas para los machos TKO y CKO podrían ser consecuencia de defectos de los espermatozoides para llegar al sitio de fertilización en el oviducto y/o a defectos específicos en su capacidad de interactuar con los ovocitos.

Los estudios de transporte realizados 4 hs post apareo incluyeron el análisis de los espermatozoides presentes no solo en el útero, tal como fuera descrito para los machos DKO C1C3, sino también en el oviducto, haciendo uso de la posibilidad de detectar los espermatozoides TKO y CKO oviductales por microscopia debido a la presencia de marca fluorescente en sus acrosomas, ausente en la colonia DKO C1C3. La observación de los espermatozoides uterinos mostro un fenotipo muy similar al observado para los machos DKO C1C3, con la presencia de agregados viscosos atrapando espermatozoides inmóviles, y que claramente podría atribuirse a la falta de CRISP1 y CRISP3 que existe en los ratones TKO y CKO. El hecho de que este fenotipo se encontrara presente también en los machos DKO C1C3, los cuales exhibían normales niveles de fertilización *in vivo*, descartaría en principio

que esta fuera la causa principal de los bajísimos porcentajes de fertilización *in vivo* correspondientes a los animales TKO y CKO. Por su parte, los estudios de microscopia, revelaron claros defectos de migración al oviducto de los espermatozoides TKO y CKO a juzgar por la detección de una cantidad claramente menor de espermatozoides fluorescentes en las diferentes regiones del oviducto en comparación al control. Estos defectos en migración podrían estar asociados al fenotipo a nivel uterino observado tanto para los machos TKO y CKO como para los DKO C1C3, por lo cual sería muy interesante analizar si los espermatozoides DKO C1C3 también exhiben defectos en su migración al oviducto. Si bien estos estudios no pueden llevarse a cabo debido a la ausencia de GFP en la colonia DKO C1C3, la normal fertilización *in vivo* de los machos DKO C1C3 indica que si el fenotipo uterino fuera la causa de la deficiente llegada al oviducto, los pocos espermatozoides que llegaran serían suficientes para fertilizar a los ovocitos. En este escenario, los problemas de transporte no jugarían un rol importante dejando a los defectos en la capacidad fertilizante como la principal causa de los problemas de fertilización *in vivo* de los TKO y CKO. La otra posibilidad es que los espermatozoides DKO C1C3, a diferencia de los TKO y CKO, no exhiban problemas para llegar al oviducto, en cuyo caso los problemas de migración podrían ser los principales responsables de los defectos en fertilización *in vivo* de los TKO y CKO.

En este sentido, resulta importante recordar que los espermatozoides TKO y CKO recuperados del útero exhiben una rigidez en la pieza media de la cola no observada no solo en los controles sino tampoco en los espermatozoides uterinos DKO C1C3. La presencia de este fenotipo es consistente con resultados previos describiendo la rigidez de la pieza media en espermatozoides KO para la proteína testicular CRISP2 (Lim et al. 2019) la cual se encuentra ausente en los animales TKO y CKO. El hecho de que esta rigidez del flagelo no se haya observado en los espermatozoides DKO C1C3 apoya aún más que la ausencia de CRISP2 sería la causante de esta condición. Consistente con esto, se han reportado varios trabajos en humano mostrando que pacientes astenozoospermicos con problemas de motilidad espermática y fertilidad exhiben menores niveles tanto de la proteína CRISP2 como de su mensajero (Du et al. 2006; Jing et al. 2011; Olesen 2001; Paoloni-Giacobino et al. 2000; Zhou et al. 2015). Asimismo, resulta interesante mencionar que el mismo fenotipo de rigidez de pieza media también fue observado en espermatozoides de animales KO para otras

proteínas tales como Catsper z, EFCAB9, Ppp3cc, Ppp3r2 y Nsum 7 (Chung et al. 2017; Harris et al. 2007; Hwang et al. 2018; Miyata et al. 2015), todos los cuales presentan severos problemas de fertilidad y desregulación del calcio intracelular. Si bien la rigidez de la cola podría estar afectando la llegada de los espermatozoides al oviducto, es difícil que los defectos en migración sean los únicos responsables de las bajísimas tasas de fertilización *in vivo* observadas para los machos TKO y CKO ya que los espermatozoides de estos animales tienen la capacidad de atravesar la UTJ y llegar al oviducto a diferencia de lo reportado para los animales KO para otras proteínas (ej. ADAM 3 o RNase 10) que son infértiles debido a la incapacidad de los espermatozoides de atravesar la UTJ (Ryo Yamaguchi 2009, (Fujihara et al. 2019; Krutskikh et al. 2012; Okabe 2015; Yamaguchi et al. 2009). Esta conclusión está apoyada por un trabajo del Dr Ikawa (con quien colaboramos en la producción de animales KO para CRISP2 (Brukman et al. 2016) y DKO C1C4 (Carvajal et al. 2018) describiendo que si bien la ausencia de la proteína calcineurina produce rigidez de la pieza media y defectos en la migración al oviducto, dichos defectos no serían los principales responsables de la infertilidad de los animales a juzgar por la presencia de algunos espermatozoides en el oviducto (Miyata et al. 2015). Los autores indican, sin embargo, que la rigidez de la cola podría afectar seriamente el desarrollo de la HA de los espermatozoides que ocurre mientras los mismos se encuentran unidos al epitelio del isthmus y que les va a permitir luego despegarse del epitelio, migrar hacia la ampulla y penetrar las envolturas que rodean a ovocito (Suarez 2016). Teniendo en cuenta que los espermatozoides CKO capacitados presentan defectos en varios parámetros espermáticos asociados a la HA como así también en el porcentaje de células hiperactivadas, existe la posibilidad de que los defectos de migración de los espermatozoides TKO y CKO se deban a su incapacidad de desprenderse del epitelio oviductal tal como ocurre en los animales KO para CatSper (Ho, Collin A. Wolff, et al. 2009). En este trabajo, los autores reportan que si bien los espermatozoides KO para Catsper1 logran atravesar la UTJ del mismo modo que los controles resultan incapaces de despegarse del epitelio oviductal, detectando un número significativamente menor de espermatozoides mutantes en lumen del oviducto 4 hs post-apareo comparado con el control. En conjunto, si bien no podemos descartar que los defectos en el transporte de los espermatozoides TKO y CKO contribuyan a afectar la fertilización en la ampulla, la severa bajada de los porcentajes de fertilización *in vivo* observadas para estos animales parecerían

ser consecuencia principalmente de los defectos de los espermatozoides para interactuar con los ovocitos en el sitio de fertilización.

Esta conclusión está avalada por los bajísimos porcentajes de fertilización *in vitro* obtenidos para los espermatozoides TKO y CKO incubados con COC en contraposición con las sutiles bajadas en la fertilización *in vitro* correspondientes a los espermatozoides DKO C1C3. Más específicamente, nuestros resultados revelaron que los espermatozoides TKO y CKO presentaron porcentajes de fertilización prácticamente nulos al utilizar ovocitos rodeados de cúmulus y ZP, tal como ya había sido reportado para los animales simples KO para CRISP2 (Brukman et al. 2016) y para CRISP4 (Carvajal et al. 2018). Mientras que en el caso del animal KO para CRISP2, las reducidas tasas de fertilización bajo esa condiciones se han atribuido a los defectos de los espermatozoides para desarrollar la HA y, por ende, para penetrar las envolturas (Brukman et al. 2016), en los animales KO para CRISP4, la causa parecería radicar en la incapacidad de los espermatozoides no solo de penetrar las envolturas sino también de fusionarse con el ovocito (Carvajal et al. 2018). Estas observaciones explicarían la drástica bajada en los porcentajes de fertilización de COC y ovocitos con ZP obtenidas para los espermatozoides TKO y CKO ya que en ambos casos la falta de CRISP2 sería la que llevaría a la observada rigidez de la pieza media que impediría el correcto desarrollo de la HA y penetración de las envolturas. Por otro lado, se podrían explicar también los diferentes resultados obtenidos al co-incubar espermatozoides TKO y CKO con ovocitos sin ZP ya que mientras para los CKO, los muy bajos porcentajes de fertilización se deberían principalmente a que las células carecen de CRISP4, para los TKO, los moderados porcentajes de fertilización de ovocitos sin ZP se deberían a la presencia en los mismos de una proteína crítica para fusión como le es CRISP4.

Resulta interesante mencionar que, pese al diferente comportamiento *in vitro* de los espermatozoides TKO y CKO, las tasas de fertilidad y fertilización *in vivo* correspondientes a animales de ambos genotipos no fueron diferentes entre sí, lo cual se debería al hecho de que las severas deficiencias para penetrar las envolturas observados en ambos casos precederían a los defectos de fusión, haciendo que dichos defectos prácticamente no lleguen a impactar sobre los porcentajes de fertilización *in vivo*.

El estudio de las posibles causas de los defectos de la fertilización *in vitro* que, tal como vimos, parecerían ser los principales responsables de la deficiente fertilización *in vivo*,

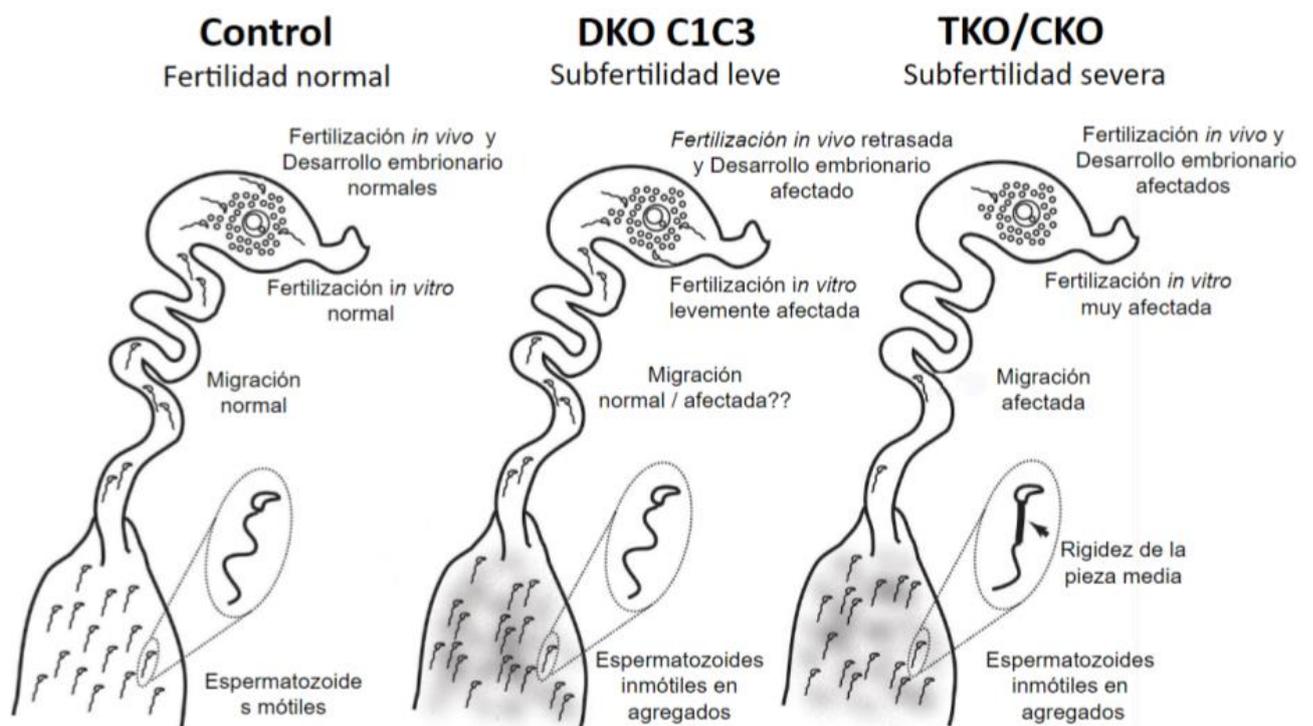
mostraron que los espermatozoides CKO exhibían niveles de RA inducida por progesterona significativamente menores que los controles, apoyando la idea de que los bajos niveles de penetración tanto de COC como de ovocitos con ZP podrían deberse en parte a los defectos en la ocurrencia de la RA, requisito indispensable para la penetración de la ZP. Si bien es sabido que la RA es crítica también para la fusión de gametas debido a la adquisición de capacidad fusogénica del segmento ecuatorial (Yanagimachi 1994), el hecho de que no se hayan observado defectos a nivel de la RA espontánea sugiere que los bajos porcentajes de fertilización de ovocitos sin ZP obtenidos para los espermatozoides CKO se deberían, muy probablemente, a la ausencia de aquellas CRISP que se sabe actúan como ligandos durante su interacción con sitios complementarios en el oolema (Busso, Goldweic, et al. 2007; Carvajal et al. 2018; Cohen, Ellerman, et al. 2000; Rochwerger, Cohen, and Cuasnicú 1992). Por otro lado, los estudios de CASA revelaron que los espermatozoides CKO exhibían una bajada significativa tanto en diversos parámetros de la motilidad espermática como en el porcentaje total de células hiperactivadas, apoyando nuestra hipótesis de que tanto los espermatozoides TKO como CKO tendrían defectos para hiperactivar principalmente debidos a la rigidez de su pieza media. Consistente con esta idea, se observó un aumento significativo en todos aquellos parámetros asociados a una motilidad lineal y progresiva (LIN, STR, VSL) sin que verse cambios en aquellos asociados al desarrollo de un movimiento hiperactivado (VCL, VAP, ALH).

Finalmente, dada la importancia del calcio para el desarrollo de la motilidad espermática, la RA y la HA, y sabiendo que las CRISP son proteínas reguladoras de diferentes canales de  $Ca^{2+}$  (Brown et al. 1999; Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011; Guo et al. 2005; Morrisette et al. 1995; Yamazaki et al. 2002), analizamos el contenido de calcio intracelular de los espermatozoides CKO con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en los diferentes defectos que exhiben los espermatozoides múltiples KO. Los resultados revelaron que los espermatozoides CKO no exhiben el característico aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular que ocurre durante con la capacitación. Estos resultados concuerdan con observaciones de nuestro grupo mostrando que los espermatozoides KO para CRISP4 también exhiben menores niveles de calcio intracelular que los controles al finalizar la capacitación (resultados no publicados) y difieren de lo observado para los espermatozoides KO para CRISP1 (Weigel Muñoz et al. 2018) y para CRISP2 (Brukman et al. 2016) para los

cuales no se observaron cambios o se detectaron inclusive aumentos en los niveles intracelulares de calcio respecto a los controles. Los diferentes efectos observados para cada CRISP son consistentes con su localización ya que mientras CRISP1 y CRISP4 son proteínas epididimarias periféricas que regulan a los canales de calcio TRPM8 y CatSper localizados en cabeza y cola, CRISP2 es una proteína localizada en los reservorios intracelulares del cuello del espermatozoide (O'Bryan et al. 2001) podría estar regulando a los canales rianodicos presentes en esta región dada su capacidad de regular dichos canales (Harper, Barratt, and Publicover 2004). Si bien se desconoce cuáles son los niveles de calcio intracelular de espermatozoides carentes solo de CRISP3 dada la no disponibilidad de este modelo, resultados preliminares de nuestro grupo muestran que el espermatozoide DKO C1C3, también exhibe mayores niveles de calcio que los controles al finalizar la capacitación. Teniendo en cuenta que la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  es compleja y está involucrada en diferentes vías regulatorias, podríamos concluir que la bajada en los niveles de calcio observada en los espermatozoides carentes de las cuatro proteínas CRISP sería en realidad la resultante de las diferentes modificaciones producidas por la falta de las diferentes CRISP durante la ocurrencia de diversos procesos tales como la maduración, eyaculación y/o capacitación de los espermatozoides. En conjunto, nuestras observaciones nos permiten confirmar que las proteínas CRISP son claves para la regulación de la homeostasis del calcio intracelular y que la ausencia de las mismas produce defectos a diferentes niveles que terminan impactando en una menor capacidad fertilizante de los espermatozoides y una menor fertilidad de los animales.

En resumen, los resultados encontrados a través del desarrollo y caracterización de animales múltiples KO para las proteínas CRISP indica que la falta de las mismas afecta severamente la fertilidad de los machos como consecuencia de una combinación de defectos en la migración de los espermatozoides al oviducto, en su capacidad fertilizante y en el posterior desarrollo embrionario temprano (Figura DII.1). Más específicamente, mientras la ausencia conjunta de CRISP1 y CRISP3 parecería ser principalmente responsable de los retrasos en la fertilización *in vivo* y los consecuentes defectos en el desarrollo embrionario, la falta de la proteína testicular CRISP2 generaría el deficiente desarrollo de la HA debido a la rigidez de la cola, con los consecuentes defectos en la migración y capacidad

fertilizante de los espermatozoides. El hecho que los animales TKO y CKO exhiban la misma bajada en su fertilidad sugiere que este fenotipo parecería requerir la ausencia de al menos tres grupos de proteínas: una de las dos proteínas epididimarias (CRISP1 o CRISP4), la proteína testicular CRISP2, y la proteína seminal CRISP3. Considerando que los genes *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3* humanos están localizados muy cercanamente en una región de 200kb dentro del mismo cromosoma, existe la posibilidad de que un reordenamiento cromosómico tal como el que ya fuera descrito para dicha región (Olesen 2001; Paoloni-Giacobino et al. 2000), afecte la expresión de todas las CRISP simultáneamente y sea responsable de algunos de los muchos problemas de infertilidad masculina sin causa aparente existentes en la actualidad. Desde este punto de vista, consideramos que nuestros resultados contribuirán a una mejor comprensión, diagnóstico y tratamiento de la infertilidad como así también al desarrollo de nuevos y más seguros métodos de regulación de la fertilidad humana.



**Figura DII.1 Defectos observados y posibles causas de las bajadas en la fertilidad en animales múltiples KO para las proteínas CRISP.**

### Capítulo III

#### Estudio de la participación de CRISP1 y CRISP3 en la regulación del sistema inmune

Tal como se mencionara en secciones previas, existen numerosas evidencias apoyando la idea que las CRISP regularían no solo el sistema reproductivo sino también el sistema inmune. Con el fin de investigar el posible rol inmunoregulator de las proteínas CRISP, nuestro laboratorio estableció hace unos años una colaboración con el grupo del Dr G. Rabinovich (IBYME), reconocido por sus contribuciones al área de la inmunología. Los resultados obtenidos indicaron la expresión de las proteínas CRISP1 y CRISP3 en las CD, las cuales, como se ha descrito en la Introducción, cumplen un rol clave en la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa (Abbas and Lichtman 2018). En base a estas observaciones, el tercer objetivo de esta Tesis ha sido investigar más profundamente la relevancia de la CRISP para el funcionamiento de las CD.

Los resultados obtenidos al medir cuantitativamente la expresión de los genes *Crisp1* y *Crisp3* en CD indicaron que los niveles de mensajeros correspondientes a ambas proteínas aumentaban significativamente cuando las células inmaduras eran expuestas a LPS, sugiriendo un posible rol de las CRISP en el funcionamiento de las CD.

Para investigar de qué forma las CRISP estarían participando en la fisiología de las CD, se llevaron a cabo diversos estudios empleando CD provenientes de los animales de la colonia KO C1 disponibles en el laboratorio. El análisis de los marcadores moleculares de superficie específicos evaluados mostró que las células provenientes de médula ósea de los animales KO C1 no solo fueron capaces de diferenciarse a CDi sino también de responder a la estimulación con LPS de forma similar a las células control, indicando que CRISP1 no estaría modulando el fenotipo de superficie de estas células. Sin embargo, el estudio del perfil de citoquinas secretado por dichas células mostró que, si bien no se encontraron diferencias respecto a los controles en los niveles de IL-12 e IL-27 secretados por las CD KO C1 tanto inmaduras como maduras, el hecho de que los niveles de IL 10 de las CD mutantes inmaduras y maduras hayan disminuido y aumentado, respectivamente, en comparación a los controles, indica que la ausencia de CRISP1 afecta el tipo de perfil inmunológico que la célula adquiere con la maduración, llevándolo hacia un perfil más tolerogénico. Teniendo en

cuenta que una de las funciones de las CD consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T (LT) vírgenes y posterior activación y proliferación de los mismos (Guermónprez et al. 2002), la diferencia en el perfil secretorio de las CD KO C1 podría a su vez desencadenar una respuesta en los LT vírgenes diferente a la que desencadenan las CD control. Para investigar esta posibilidad, llevamos a cabo el co-cultivo de CD mutantes con esplenocitos provenientes de bazos de animales control (población celular enriquecida en LT vírgenes) lo cual representa una excelente herramienta para estudiar la funcionalidad de las CD. Los resultados obtenidos revelaron que si bien la capacidad de la CD de inducir la activación y proliferación de los LT no se vio alterada, a juzgar por los similares índices de proliferación de los mismos, la población de LT se encontraba enriquecida en células FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, también denominadas LT regulatorios. Estos resultados, junto a los mayores niveles de IL-10 y menores de INF- $\gamma$  secretados por los esplenocitos co-cultivados con CD mutantes, indican que, efectivamente, la ausencia de CRISP1 en las CD desencadenaría una respuesta inmune con un perfil más tolerogénico.

En base a la extensa bibliografía indicando la capacidad de las proteínas CRISP de regular canales iónicos, en particular canales de Ca<sup>2+</sup> (Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011), nos preguntamos si la ausencia de CRISP1 podría afectar la funcionalidad de las CD a través de modificaciones en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares. Al respecto, cabe mencionar que numerosas evidencias indican la importancia de Ca<sup>2+</sup> para la funcionalidad de las CD habiéndose descrito su participación en procesos tales como la maduración, migración, quimiotaxis, fagocitosis y producción de diversas citoquinas (Mellado-Sanchez et al. 2014; Salter and Watkins 2009; Shumilina, Huber, and Lang 2011). El análisis de los niveles de Ca<sup>2+</sup> en las CD reveló que las CDi deficientes en CRISP1 presentaban niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular significativamente mayores a los de las CDi control, indicando que la ausencia de CRISP1 llevaría a una desregulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en dichas células. Sin embargo, al igual que ocurre para los espermatozoides, la técnica empleada mide los niveles totales del catión pero no permite evaluar modificaciones localizadas de la concentración (microdominios) ni variaciones intermedias que conducen a los niveles finalmente detectados. En este sentido, es sabido que la señalización fisiológica en la mayoría de las células ocurre a través de aumentos transientes u oscilaciones localizadas en microdominios del Ca<sup>2+</sup> intracelular y no a través de un aumento o disminución de larga

duración, cumpliendo estos cambios diferentes funciones (Valsecchi et al. 2017; Zippin et al. 2003). En el caso particular de las CD se ha visto que, al entrar en contacto con el antígeno, los distintos canales iónicos activados y la amplitud de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  producida definen el tipo de respuesta inmune que se va desencadenar posteriormente (Félix et al. 2013). Estas evidencias indican que una correcta regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sería crítica para el funcionamiento normal de la CD, sugiriendo que una desregulación en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  de las CD mutantes podría ser la causa del diferente perfil inmunológico de dichas células respecto al control. Si bien es muy probable que la actividad regulatoria del  $\text{Ca}^{2+}$  de las CRISP resida en la región CRD tal como se ha reportado para varias CRISP tanto de reptiles como de mamíferos (Brown et al. 1999; Ernesto et al. 2015; Gibbs et al. 2006, 2011; Guo et al. 2005; Morrissette et al. 1995; Yamazaki et al. 2002), no podemos descartar que los efectos observados estén asociados al rol que CRISP1 podría jugar como ligando mediado por el dominio PR-1 de la molécula. De hecho, como se mencionó anteriormente las proteínas CRISP presentan una gran similitud de secuencia con la familia Pr-1 (Pathogenesis-related 1) y AG5 carentes de CRD e involucradas en los mecanismos de defensa de plantas e insectos, respectivamente (Gerard M. Gibbs, Roelants, and O'Bryan 2008; van Loon, Rep, and Pieterse 2006). La expresión en forma recombinante de la proteína entera y de cada uno de los dos dominios, contribuirá a discriminar entre estas posibilidades.

Habiendo observado que la falta de CRISP1 producía claros efectos en el funcionamiento de las CD, y contando con los animales DKO C1C3 descritos en el capítulo anterior, decidimos investigar el impacto de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 sobre la fisiología de las CD esperando encontrar una exacerbación de los defectos. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los resultados mostraron que al igual que lo observado para las CD KO C1, la falta de ambas proteínas no afectaba ni la diferenciación ni la maduración de las DC mutantes, a nivel del fenotipo de superficie. A su vez, el co-cultivo de CD DKO C1C3 con esplenocitos control producía un aumento en el porcentaje de LT regulatorios, similar al observado para las DC control. Sumado a ello, las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las CD DKO C1C3 también fueron similares a las de CD carentes solo de CRISP1. Si bien se requeriría llevar a cabo estos mismos experimentos en animales carentes solo de CRISP3 no disponibles en el laboratorio, los resultados apoyan la idea de que, al menos en el ratón, la funcionalidad de las CD estaría regulada, principalmente por CRISP1 más que por CRISP3.

Consistente con esta hipótesis, el análisis filogenético de las proteínas CRISP indica que justamente sería la proteína CRISP1 de ratón el ortólogo funcional de la proteína CRISP3 humana involucrada en diversas patologías del sistema inmune (Bjartell et al. 2006, 2007; Kosari et al. 2002; Laine et al. 2007; Liao et al. 2003). Más aun, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican la expresión de CRISP1, y no de CRISP3, en células tumorales de próstata de ratón en cultivo. Estas observaciones, junto a la detección de hCRISP3 en vez de hCRISP1 en las células del cúmulus humano (Capítulo 1 de esta Tesis), apoyan la idea de que CRISP1 de ratón cumpliría el rol regulatorio del sistema inmune que cumple CRISP3 en el humano.

Por último, con el objetivo de estudiar de forma más integral la participación de las proteínas CRISP en la regulación del sistema inmune, realizamos ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* inyectando células tumorales MA-10 tanto en ratones KO C1 como DKO C1C3. Consistente con nuestras observaciones *in vitro*, los resultados mostraron un crecimiento tumoral significativamente mayor en los animales mutantes de ambos genotipos que en los animales control, apoyando la idea de que la ausencia de las proteínas CRISP habría desencadenado una respuesta tolerogénica que favorecería el mayor desarrollo tumoral.

En conjunto, los resultados obtenidos utilizando CD KO C1 y DKO C1C3 indican que las proteínas CRISP, principalmente CRISP1, contribuirían a desencadenar una respuesta estimuladora en las CD frente a un estímulo de tipo pro-inflamatorio mientras que su ausencia favorecería una respuesta de tipo tolerogénico, muy probablemente asociada a una desregulación de la homeostasis del calcio intracelular.

Así como las CRISP tendrían un rol estimulador en las CD, las mismas parecerían tener un rol inmunosupresor en el tracto reproductivo a juzgar por el hecho de que una cierta proporción de animales DKO C1C4 como así también TKO y CKO presentan un cuadro inflamatorio de epidídimo-orquitis (Carvajal et al. 2018); (Capítulo 2 de esta Tesis). En este sentido, tanto el testículo como el epidídimo son considerados órganos de privilegio inmunológico capaces de tolerar la presencia de antígenos extraños (los espermatozoides) sin desencadenar una respuesta inmune inflamatoria. Mientras que en el caso del testículo, este privilegio está asociado mayoritariamente a la presencia de una barrera sumamente

restrictiva conocida como barrera hemato-testicular, el epidídimo presenta una barrera más permeable y una alta tolerancia inmunológica que mantiene a los espermatozoides quiescentes e inmunológicamente silenciados durante la maduración y el almacenamiento en el cauda de este órgano (Yeung et al. 2004). Al respecto, si bien estudios previos de nuestro laboratorio indican que la ausencia de las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP4 afecta la expresión y la localización de diversas moléculas marcadoras de la barrera hemato-epididimaria (Claudina-1, Claudina-4, AQP9, V-ATPasa) razón por la cual, la inflamación observada a nivel del epidídimo podría ser una respuesta secundaria a la ruptura de dicha barrera (Carvajal et al. 2018), no podemos descartar que las proteínas CRISP tengan un rol inmunosupresor a nivel epididimario. Apoyando esta idea, se ha reportado que en equinos, la proteína CRISP3 presente en abundantes cantidades en el plasma seminal, es capaz de suprimir la interacción entre los espermatozoides y las células polimorfonucleares, regulando así la respuesta inflamatoria del tracto femenino en respuesta a los espermatozoides (Doty et al. 2011). En ese sentido, se ha reportado que las CD pueden ser flexibles en cuanto a la respuesta inmunológica que desencadenan frente a distintos estímulos dependiendo del ambiente inmunológico en el que se encuentren y las concentraciones de distintos factores (ej. citoquinas, antígenos, proteínas propias del ambiente tisular, etc.) (Kapsenberg 2003). Un ejemplo de ello lo constituye la proteína Galectina-1 la cual, dependiendo de su concentración relativa, podría tener un papel bifuncional actuando como señal tolerogénica o promoviendo una respuesta estimuladora de la maduración de las CD (Ilarregui et al. 2009). En base a ello, es posible que las CRISP cumplan un rol inmunosupresor cuando se encuentran en altas concentraciones en el fluido epididimario y en el plasma seminal y un rol inmunoestimulador cuando se encuentran en la CD.

Finalmente, teniendo en cuenta que tanto CRISP1 como CRISP3 están presentes en el espermatozoide y en el plasma seminal humano, existe la posibilidad de que las CRISP cumplan estos mismos roles inmunoregulatorios en el tracto reproductivo humano. Dado que en el humano, los genes *Crisp1* y *Crisp3* están localizados muy cerca uno de otro en una región de menos de 200 kB en el mismo cromosoma ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000124812;r=6:49833401-49877952](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000124812;r=6:49833401-49877952)), es posible que un reordenamiento como el ya descrito en esta

región (Olesen 2001; Paoloni-Giacobino et al. 2000) pueda afectar la expresión de ambas CRISP simultáneamente, llevando a la existencia de individuos con deficiencias en su fertilidad tal como se describiera en el Capítulo 2, y/o con alteraciones del sistema inmune debidas a la falta de las CRISP en las CD.

# CONCLUSIÓN

---

---

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido continuar nuestros estudios destinados a esclarecer la relevancia de las proteínas CRISP como reguladores tanto de la fertilidad como del sistema inmune de un individuo. Los resultados obtenidos utilizando una combinación de diversas estrategias y metodologías *in vivo* e *in vitro* como así también animales simples y múltiples KO para las CRISP forman parte de los tres capítulos que comprenden esta Tesis Doctoral.

En el primer capítulo, los resultados obtenidos en ensayos de quimotaxis apoyaron la idea que CRISP1 presente en el cúmulus orientaría a los espermatozoides durante la fertilización a través de su capacidad de inhibir a CatSper. Asimismo, mientras los estudios de fertilización *in vitro* e *in vivo* utilizando hembras KO para CRISP1 confirmaron la relevancia de la proteína del cúmulus para la fertilización, los estudios realizados empleando células del cúmulus humanas abrieron la posibilidad de que la proteína CRISP3 sea el homólogo funcional a CRISP1 de roedor en el cúmulus humano. Finalmente, los estudios realizados empleando HC, un compuesto capaz de inhibir específicamente a CatSper a niveles similares a CRISP1, revelaron la capacidad de este inhibidor de afectar la motilidad progresiva y la capacidad fertilizante de los espermatozoides tanto *in vitro* como *in vivo* apoyando la posibilidad de desarrollar un método anticonceptivo masculino no hormonal basado en la actividad inhibitoria de CRISP1 sobre CatSper.

El segundo capítulo estuvo enfocado a la generación y caracterización del animal simple KO para CRISP3, aun no disponible, como así también de animales múltiples KO para diferentes CRISP a través de la técnica de CRISPR/Cas9. Los estudios destinados a generar el animal simple KO para CRISP3 revelaron que la mutación de *Crisp3* afectaba la expresión del gen de *Crisp1*, llevando a la generación de una colonia doble KO deficiente tanto en CRISP1 como en CRISP3. La caracterización de los DKO C1C3 a nivel reproductivo mostró una bajada significativa de la fertilidad tanto de los machos como de las hembras, representando esta la primera evidencia de la relevancia de las CRISP para la fertilidad femenina. Más aun, observamos que la subfertilidad de esta colonia se debería, principalmente, a defectos en el desarrollo temprano de los embriones, revelando la importancia de las proteínas CRISP1 y/o CRISP3 para eventos posteriores a la fertilización. El hecho de que los espermatozoides DKO C1C3 recuperados del útero luego un apareo se encontraran inmóviles y atrapados en agregados/coágulos no detectados para machos control o carentes solo de CRISP1, sugiere

que este fenotipo estaría asociado a la falta de CRISP3. Por su parte, el estudio de la fertilidad de animales carentes de más de dos CRISP simultáneamente reveló que los machos TKO y CKO eran prácticamente infértiles confirmando la importancia de las proteínas CRISP para la fertilidad masculina. A diferencia de los animales DKO C1C3, los machos TKO y CKO presentaron porcentajes muy bajos de fertilización *in vivo* como así también severos defectos de los espermatozoides para migrar por el tracto e interactuar con los ovocitos, probablemente debidos a una notoria rigidez de la pieza media no observada en los espermatozoides DKO C1C3 y, por ende, asociada a la falta de la proteína testicular CRISP2. Sin embargo, al igual que los machos DKO C1C3, estos animales también presentaban espermatozoides inmóviles atrapados en coágulos y defectos en el desarrollo embrionario temprano, indicando que las severas bajadas de fertilidad de los machos TKO y CKO serían consecuencia de una sumatoria de defectos a diferentes niveles. Por último, el hecho de que los espermatozoides CKO no muestren el característico aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular que ocurre durante la capacitación indica la importancia de las CRISP para la regulación de la homeostasis del calcio y sugiere que este podría ser el mecanismo molecular responsable de muchos de los defectos observados en los espermatozoides mutantes.

Finalmente, en base a numerosas evidencias que indican que CRISP1 y CRISP3 se expresan en órganos y células inmunes incluyendo las células dendríticas (CD), en el tercer capítulo de esta Tesis exploramos el posible rol inmunoregulador de las CRISP utilizando los animales KO para CRISP1 y DKO C1C3 disponibles en el laboratorio. Los resultados indicaron que la ausencia de estas proteínas no afectó la diferenciación ni la maduración de las CD medida por marcadores de superficie, pero modificó el perfil de expresión de citoquinas de las mismas. Asimismo, el co-cultivo de las CD mutantes con Linfocitos T produjo un aumento en el porcentaje de LT regulatorios, indicando que la ausencia de CRISP1 y CRISP3, favorecería una respuesta inmune de perfil tolerogénico. La detección de mayores niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en las CD inmaduras mutantes respecto a los controles sugiere que los cambios observados podrían deberse a una desregulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular. Finalmente, consistente con nuestras observaciones *in vitro* indicando que la ausencia de las CRISP favorecería una respuesta de tipo tolerogénico, la inyección de células tumorales MA-

10 en los animales simples KO C1 y DKO C1C3 produjo tumores de mayor tamaño que en los animales control, apoyando el rol de las CRISP en la regulación del sistema inmune.

En resumen, los resultados obtenidos a través del desarrollo y caracterización de animales simples, dobles y múltiples KO para las proteínas CRISP indica que las mismas cumplen roles claves en la regulación tanto de la fertilidad como del sistema inmune. Nuestras observaciones cobran especial relevancia considerando que en el humano, los genes *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3* están localizados muy cercanamente dentro del mismo cromosoma, siendo posible que existan individuos carentes de varias proteínas CRISP simultáneamente.

Consideramos que nuestros estudios contribuirán una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de la fertilidad y del sistema inmune, abriendo la posibilidad de que las CRISP sean empleadas en el futuro como agentes diagnósticos y/o targets terapéuticos.

# ABREVIATURAS

---

---

ARNm	Mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
Cas9	CRISPR associated protein 9
CASA	Computer assisted sperm analysis
CatSper	Cation Channel of Spermatozoa
CD	Célula dendrítica
CDi	Célula dendrítica inmadura
CDm	Célula dendrítica madura
CKO	Quadruple knockout
COC	Complejo cúmulus-ovocito
CRISP	Cysteine Rich Secretory Proteins
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DKO	Doble knockout
DKO	C1C3 Doble knockout CRISP1/CRISP3
DKO	C1C4 Doble knockout CRISP1/CRISP4
DKO	C2C4 Doble knockout CRISP2/CRISP4
DMSO	Dimetilsulfóxido
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HA	Hiperactividad
hCRISP1	CRISP1 humana
hCRISP2	CRISP2 humana
hCRISP3	CRISP3 humana
hCRISP4	CRISP4 humana
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
Hv1	Voltage-gated proton channel 1
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
KO	Knockout
KO C1	Knockout para CRISP1
KO C2	Knockout para CRISP2
KO C3	Knockout para CRISP3
KO C4	Knockout para CRISP4

LB	Linfocito B
LPS	Lipopolisacarido
LT	Linfocito T
MCI	Macizo celular interno
mCRISP1	CRISP1 murina
MSP	Microseminoprotein
P4	Progesterona
PAM	Motivo adyacente de protoespaciador
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	Protein Kinase A
pTyr	Fosforilación en residuos tirosina
RA	Reacción acrosomal
RT	Transcripción reversa
qPCR	PCR en tiempo real
sgARN	ARN guía
sAC	Soluble Adenylate Cyclase
TKO	Triple knockout
TRP	Transient receptor potential
UTJ	Unión utero-tubarica
WB	Western Blot
WT	Wild Type
ZP	Zona pellúcida

## REFERENCIAS

---

---

- Abbas, Abul K. and Andrew H. Lichtman. 2018. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier.
- Abraham, Anup and Douglas E. Chandler. 2017. "Tracing the Evolutionary History of the CAP Superfamily of Proteins Using Amino Acid Sequence Homology and Conservation of Splice Sites." *Journal of Molecular Evolution* 85(3–4):137–57.
- Acevedo, Juan José, Irene Mendoza-Lujambio, José Luis de la Vega-Beltrán, Claudia L. Treviño, Ricardo Felix, and Alberto Darszon. 2006. "KATP Channels in Mouse Spermatogenic Cells and Sperm, and Their Role in Capacitation." *Developmental Biology* 289(2):395–405.
- Aitken, R. John and Brett Nixon. 2013. "Sperm Capacitation: A Distant Landscape Glimpsed but Unexplored." *Molecular Human Reproduction* 19(12):785–93.
- Alasmari, Wardah, Christopher L. R. Barratt, Stephen J. Publicover, Katherine M. Whalley, Erica Foster, Vanessa Kay, Sarah Martins da Silva, and Senga K. Oxenham. 2013. "The Clinical Significance of Calcium-Signalling Pathways Mediating Human Sperm Hyperactivation." *Human Reproduction (Oxford, England)* 28(4):866–76.
- Alasmari, Wardah, Sarah Costello, Joao Correia, Senga K. Oxenham, Jennifer Morris, Leonor Fernandes, Joao Ramalho-Santos, Jackson Kirkman-Brown, Francesco Michelangeli, Stephen Publicover, and Christopher L. R. Barratt. 2013. "Ca<sup>2+</sup> Signals Generated by CatSper and Ca<sup>2+</sup> Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm." *The Journal of Biological Chemistry* 288(9):6248–58.
- Alfieri, Jennifer A., Arlan D. Martin, Junji Takeda, Gen Kondoh, Diana G. Myles, and Paul Primakoff. 2003. "Infertility in Female Mice with an Oocyte-Specific Knockout of GPI-Anchored Proteins." *Journal of Cell Science* 116(Pt 11):2149–55.
- Almeida, E. A., A. P. Huovila, A. E. Sutherland, L. E. Stephens, P. G. Calarco, L. M. Shaw, A. M. Mercurio, A. Sonnenberg, P. Primakoff, D. G. Myles, and J. M. White. 1995. "Mouse Egg Integrin Alpha 6 Beta 1 Functions as a Sperm Receptor." *Cell* 81(7):1095–1104.
- Arevalo, Lena, Nicolas Brukman, Patricia S. Cuasnicu, and Eduardo R. S. Roldan. n.d. "Evolutionary Analysis of Genes Coding for Cysteine-Rich Secretory Proteins ( CRISPs ) in Mammals." *En Revision* 1–39.
- Armon, Leah and Michael Eisenbach. 2011. "Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation." *PLoS ONE* 6(12).
- Arts, E. G., J. Kuiken, S. Jager, and D. Hoekstra. 1993. "Fusion of Artificial Membranes with Mammalian Spermatozoa. Specific Involvement of the Equatorial Segment after Acrosome Reaction." *European Journal of Biochemistry* 217(3):1001–9.
- Ascoli, Mario. 1981. "Characterization of Several Clonal Lines of Cultured Ley Dig Tumor Cells: Gonadotropin Receptors and Steroidogenic Responses." *Endocrinology* 108(1):88–95.
- Asquith, Kelly L., Rosa M. Baleato, Eileen A. McLaughlin, Brett Nixon, and R. John Aitken. 2004. "Tyrosine Phosphorylation Activates Surface Chaperones Facilitating Sperm-Zona Recognition." *Journal of Cell Science* 117(16):3645–57.
- Aumüller, G., H. Renneberg, P. J. Schiemann, B. Wilhelm, J. Seitz, L. Konrad, and G. Wennemuth. 1997. "The Role of Apocrine Released Proteins in the Post-Testicular Regulation of Human Sperm Function." *Advances in Experimental Medicine and Biology*

- 424:193–219.
- Austin, C. R. 1952. "The Capacitation of the Mammalian Sperm." *Nature* 170(4321):326.
- Austin, CR. 1982. "The Egg." *Cambridge University Press* ....
- Austin, CR and R. Short. 1972. "Reproduction in Mammals."
- Van der Auwera, I. 2001. "Superovulation of Female Mice Delays Embryonic and Fetal Development." *Human Reproduction* 16(6):1237–43.
- Avella, Matteo A., Boris Baibakov, and Jurrien Dean. 2014. "A Single Domain of the ZP2 Zona Pellucida Protein Mediates Gamete Recognition in Mice and Humans." *The Journal of Cell Biology* 205(6):801–9.
- Avella, Matteo A., Bo Xiong, and Jurrien Dean. 2013. "The Molecular Basis of Gamete Recognition in Mice and Humans." *Molecular Human Reproduction* 19(5):279–89.
- Avenarius, Matthew R., Michael S. Hildebrand, Yuzhou Zhang, Nicole C. Meyer, Luke L. H. Smith, Kimia Kahrizi, Hossein Najmabadi, and Richard J. H. Smith. 2009. "Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein." *American Journal of Human Genetics* 84(4):505–10.
- Baba, Daichi, Shin-ichi Kashiwabara, Arata Honda, Kazuo Yamagata, Qing Wu, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, and Tadashi Baba. 2002. "Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg." *The Journal of Biological Chemistry* 277(33):30310–14.
- Baba, T., S. Azuma, S. Kashiwabara, and Y. Toyoda. 1994. "Sperm from Mice Carrying a Targeted Mutation of the Acrosin Gene Can Penetrate the Oocyte Zona Pellucida and Effect Fertilization." *The Journal of Biological Chemistry* 269(50):31845–49.
- Baldi, Elisabetta, Rosaria Casano, Costanza Falsetti, Csilla Krausz, Mario Maggi, and Gianni Forti. 1991. "Intracellular Calcium Accumulation and Responsiveness to Progesterone in Capacitating Human Spermatozoa." *Journal of Andrology* 12(5):323–30.
- Al Bashir, Samir, Mohammed Alshalalfa, Samar A. Hegazy, Michael Dolph, Bryan Donnelly, and Tarek A. Bismar. 2014. "Cysteine- Rich Secretory Protein 3 (CRISP3), ERG and PTEN Define a Molecular Subtype of Prostate Cancer with Implication to Patients' Prognosis." *Journal of Hematology and Oncology* 7(1):1–11.
- Battistone, M. A., A. Alvau, A. M. Salicioni, P. E. Visconti, V. G. Da Ros, and P. S. Cuasnicú. 2014. "Evidence for the Involvement of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Tyrosine Phosphorylation Downstream of Protein Kinase A Activation during Human Sperm Capacitation." *Molecular Human Reproduction* 20(11):1054–66.
- Battistone, M. A., V. G. Da Ros, A. M. Salicioni, F. A. Navarrete, D. Krapf, P. E. Visconti, and P. S. Cuasnicú. 2013. "Functional Human Sperm Capacitation Requires Both Bicarbonate-Dependent PKA Activation and down-Regulation of Ser/Thr Phosphatases by Src Family Kinases." *Molecular Human Reproduction* 19(9):570–80.
- Bedford, J. M. and H. H. Kim. 1993. "Cumulus Oophorus as a Sperm Sequestering Device, in Vivo." *Journal of Experimental Zoology* 265(3):321–28.
- Bedford, J Michael. 2004. "Enigmas of Mammalian Gamete Form and Function." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79(2):429–60.

- Bedford, J. Michael. 2004. "Enigmas of Mammalian Gamete Form and Function." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79(2):429–60.
- Belmonte, Silvia A., Luis S. Mayorga, and Claudia N. Tomes. 2016. "The Molecules of Sperm Exocytosis." Pp. 71–92 in *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. Vol. 220. Springer Verlag.
- Bianchi, Enrica, Brendan Doe, David Goulding, and Gavin J. Wright. 2014. "Juno Is the Egg Izumo Receptor and Is Essential for Mammalian Fertilization." *Nature* 508(7497):483–87.
- Bigler, Dora, Yuji Takahashi, Michelle S. Chen, Eduardo A. C. Almeida, Laurie Osbourne, and Judith M. White. 2000. "Sequence-Specific Interaction between the Disintegrin Domain of Mouse ADAM 2 (Fertilin  $\beta$ ) and Murine Eggs. Role of the A6 Integrin Subunit." *Journal of Biological Chemistry* 275(16):11576–84.
- Bjartell, Anders, Rebecka Johansson, Thomas Björk, Virgil Gadaleanu, Ake Lundwall, Hans Lilja, Lars Kjeldsen, and Lene Udby. 2006. "Immunohistochemical Detection of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 in Tissue and in Serum from Men with Cancer or Benign Enlargement of the Prostate Gland." *The Prostate* 66(6):591–603.
- Bjartell, Anders S., Hikmat Al-Ahmadie, Angel M. Serio, James A. Eastham, Scott E. Eggener, Samson W. Fine, Lene Udby, William L. Gerald, Andrew J. Vickers, Hans Lilja, Victor E. Reuter, and Peter T. Scardino. 2007. "Association of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 and Beta-Microseminoprotein with Outcome after Radical Prostatectomy." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13(14):4130–38.
- De Blas, Gerardo A., Alberto Darszon, Ana Y. Ocampo, Carmen J. Serrano, Laura E. Castellano, Enrique O. Hernández-González, Mayel Chirinos, Fernando Larrea, Carmen Beltrán, and Claudia L. Treviño. 2009. "TRPM8, a Versatile Channel in Human Sperm." *PLoS One* 4(6):e6095.
- Borges, Beatriz C., David Garcia-Galiano, Sanseray da Silveira Cruz-Machado, Xingfa Han, Galina B. Gavrilina, Thomas L. Saunders, Richard J. Auchus, Saher S. Hammoud, Gary D. Smith, and Carol F. Elias. 2017. "Obesity-Induced Infertility in Male Mice Is Associated With Disruption of Crisp4 Expression and Sperm Fertilization Capacity." *Endocrinology* 158(9):2930–43.
- Boryshpolets, Sergii, Serafín Pérez-Cerezales, and Michael Eisenbach. 2015. "Behavioral Mechanism of Human Sperm in Thermotaxis: A Role for Hyperactivation." *Human Reproduction (Oxford, England)* 30(4):884–92.
- Bray, Christopher, Jung-Ho Son, Priyadarsini Kumar, and Stanley Meizel. 2005. "Mice Deficient in CHRNA7, a Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Produce Sperm with Impaired Motility." *Biology of Reproduction* 73(4):807–14.
- Brown, R. Lane, Tammie L. Haley, Karen A. West, and John W. Crabb. 1999. "Pseudechetoxin: A Peptide Blocker of Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(2):754–59.
- Brukman, N. G., H. Miyata, P. Torres, D. Lombardo, J. J. Caramelo, M. Ikawa, V. G. Da Ros, and P. S. Cuasnicú. 2016. "Fertilization Defects in Sperm from Cysteine-Rich Secretory Protein 2 (Crisp2) Knockout Mice: Implications for Fertility Disorders." *Molecular*

- Human Reproduction* 22(4):240–51.
- Buffone, Mariano G., Noritaka Hirohashi, and George L. Gerton. 2014. “Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis.” *Biology of Reproduction* 90(5):112.
- Buffone, Mariano G, Takashi W. Ijiri, Wenlei Cao, Tanya Merdiushev, Haig K. Aghajanian, and George L. Gerton. 2012. “Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility.” *Molecular Reproduction and Development* 79(1):4–18.
- Buffone, Mariano G., Takashi W. Ijiri, Wenlei Cao, Tanya Merdiushev, Haig K. Aghajanian, and George L. Gerton. 2012. “Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility.” *Molecular Reproduction and Development* 79(1):4–18.
- Burkart, Anna D., Bo Xiong, Boris Baibakov, Maria Jiménez-Movilla, and Jurrien Dean. 2012. “Ovastacin, a Cortical Granule Protease, Cleaves ZP2 in the Zona Pellucida to Prevent Polyspermy.” *Journal of Cell Biology* 197(1):37–44.
- Burnett, Lindsey A., Catherine A. Washburn, Hitoshi Sugiyama, Xueyu Xiang, John H. Olson, Bader Al-Anzi, Allan L. Bieber, and Douglas E. Chandler. 2012. “Allurin, an Amphibian Sperm Chemoattractant Having Implications for Mammalian Sperm Physiology.” Pp. 1–61 in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol. 295. Elsevier Inc.
- Busso, D., D. J. Cohen, M. Hayashi, M. Kasahara, and P. S. Cuasnicú. 2005. “Human Testicular Protein TPX1/CRISP-2: Localization in Spermatozoa, Fate after Capacitation and Relevance for Gamete Interaction.” *Molecular Human Reproduction* 11(4):299–305.
- Busso, Dolores, Débora J. Cohen, Julieta A. Maldera, Andrea Dematteis, and Patricia S. Cuasnicu. 2007. “A Novel Function for CRISP1 in Rodent Fertilization: Involvement in Sperm-Zona Pellucida Interaction.” *Biology of Reproduction* 77(5):848–54.
- Busso, Dolores, Nadia M. Goldweic, Masaru Hayashi, Masanori Kasahara, and Patricia S. Cuasnicú. 2007. “Evidence for the Involvement of Testicular Protein CRISP2 in Mouse Sperm-Egg Fusion.” *Biology of Reproduction* 76(4):701–8.
- Cai, Xinjiang, Xiangbing Wang, Sandip Patel, and David E. Clapham. 2015. “Insights into the Early Evolution of Animal Calcium Signaling Machinery: A Unicellular Point of View.” *Cell Calcium* 57(3):166–73.
- Caligioni, Claudia S. 2009. “Assessing Reproductive Status/Stages in Mice.” *Current Protocols in Neuroscience* Appendix 4:Appendix 4I.
- Cameo, M. S. and J. A. Blaquier. 1976. “Androgen-Controlled Specific Proteins in Rat Epididymis.” *The Journal of Endocrinology* 69(1):47–55.
- Cameo, Monica S., Fernanda Gonzalez Echeverria, J. A. Blaquier, and M. H. Burgos. 1986. “Immunochemical Localization of Epididymal Protein DE on Rat Spermatozoa: Its Fate after Induced Acrosome Reaction.” *Gamete Research* 15(3):247–57.
- Capecchi, Mario R. 1989. “The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting.” *Trends in Genetics* 5(C):70–76.
- Capecchi, Mario R. 2005. “Gene Targeting in Mice: Functional Analysis of the Mammalian Genome for the Twenty-First Century.” *Nature Reviews Genetics* 6(6):507–12.

- Carlson, Anne E., Lindsey A. Burnett, Donato del Camino, Timothy A. Quill, Bertil Hille, Jayhong A. Chong, Magdalene M. Moran, and Donner F. Babcock. 2009. "Pharmacological Targeting of Native CatSper Channels Reveals a Required Role in Maintenance of Sperm Hyperactivation." edited by H. H. H. W. Schmidt. *PLoS One* 4(8):e6844.
- Carlson, Anne E., Timothy A. Quill, Ruth E. Westenbroek, Sonya M. Schuh, Bertil Hille, and Donner F. Babcock. 2005. "Identical Phenotypes of CatSper1 and CatSper2 Null Sperm." *Journal of Biological Chemistry* 280(37):32238–44.
- Carlson, Anne E., Ruth E. Westenbroek, Timothy Quill, Dejian Ren, David E. Clapham, Bertil Hille, David L. Garbers, and Donner F. Babcock. 2003. "CatSper1 Required for Evoked Ca<sup>2+</sup> Entry and Control of Flagellar Function in Sperm." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):14864–68.
- Carvajal, Guillermo, Nicolás Gastón Brukman, Mariana Weigel Muñoz, María A. Battistone, Vanesa A. Guazzone, Masahito Ikawa, Miyata Haruhiko, Livia Lustig, Sylvie Breton, and Patricia S. Cuasnicu. 2018. "Impaired Male Fertility and Abnormal Epididymal Epithelium Differentiation in Mice Lacking CRISP1 and CRISP4." *Scientific Reports* 8(1):17531.
- Castillo, Judit, Meritxell Jodar, and Rafael Oliva. 2018. "The Contribution of Human Sperm Proteins to the Development and Epigenome of the Preimplantation Embryo." *Human Reproduction Update* 24(5):535–55.
- Chalbi, Myriam, Virginie Barraud-Lange, Benjamin Ravaux, Kevin Howan, Nicolas Rodriguez, Pierre Soule, Arnaud Ndzoudi, Claude Boucheix, Eric Rubinstein, Jean Philippe Wolf, Ahmed Ziyat, Eric Perez, Frédéric Pincet, and Christine Gourier. 2014. "Binding of Sperm Protein Izumo1 and Its Egg Receptor Juno Drives Cd9 Accumulation in the Intercellular Contact Area Prior to Fusion during Mammalian Fertilization." *Development (Cambridge, England)* 141(19):3732–39.
- Chan, Peter S. F., L. W. Chan, Jim W. Xuan, Joseph L. Chin, H. L. Choi, and Franky L. Chan. 1999. "In Situ Hybridization Study of PSP94 (Prostatic Secretory Protein of 94 Amino Acids) Expression in Human Prostates." *The Prostate* 41(2):99–109.
- Chang, Haixin and Susan S. Suarez. 2011a. "Two Distinct Ca<sup>2+</sup> Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice<sup>1</sup>." *Biology of Reproduction* 85(2):296–305.
- Chang, Haixin and Susan S. Suarez. 2011b. "Two Distinct Ca<sup>2+</sup> Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice<sup>1</sup>." *Biology of Reproduction* 85(2):296–305.
- Chang, M. C. 1951. "Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes." *Nature* 168(4277):697–98.
- Chávez, Julio César, Juan José Ferreira, Alice Butler, José Luis De La Vega Beltrán, Claudia L. Treviño, Alberto Darszon, Lawrence Salkoff, and Celia M. Santi. 2014. "SLO3 K + Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm." *Journal of Biological Chemistry* 289(46):32266–75.
- Chen, L., P. T. Russell, and W. J. Larsen. 1993. "Functional Significance of Cumulus Expansion in the Mouse: Roles for the Preovulatory Synthesis of Hyaluronic Acid within the Cumulus Mass." *Molecular Reproduction and Development* 34(1):87–93.

- Chen, M. S., K. S. Tung, S. A. Coonrod, Y. Takahashi, D. Bigler, A. Chang, Y. Yamashita, P. W. Kincade, J. C. Herr, and J. M. White. 1999. "Role of the Integrin-Associated Protein CD9 in Binding between Sperm ADAM 2 and the Egg Integrin Alpha6beta1: Implications for Murine Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(21):11830–35.
- Cherr, G. N., S. A. Meyers, A. I. Yudin, C. A. VandeVoort, D. G. Myles, P. Primakoff, and J. W. Overstreet. 1996. "The PH-20 Protein in Cynomolgus Macaque Spermatozoa: Identification of Two Different Forms Exhibiting Hyaluronidase Activity." *Developmental Biology* 175(1):142–53.
- Chung, Jean-Ju, Sang-Hee Shim, Robert A. Everley, Steven P. Gygi, Xiaowei Zhuang, and David E. Clapham. 2014. "Structurally Distinct Ca<sup>2+</sup> Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility." *Cell* 157(4):808–22.
- Chung, Jean Ju, Kiyoshi Miki, Doory Kim, Sang Hee Shim, Huanan F. Shi, Jae Yeon Hwang, Xinjiang Cai, Yusuf Iseri, Xiaowei Zhuang, and David E. Clapham. 2017. "Catsper $\zeta$  Regulates the Structural Continuity of Sperm Ca<sup>2+</sup> Signaling Domains and Is Required for Normal Fertility." *ELife* 6.
- Chung, Jean Ju, Betsy Navarro, Grigory Krapivinsky, Luba Krapivinsky, and David E. Clapham. 2011. "A Novel Gene Required for Male Fertility and Functional CATSPER Channel Formation in Spermatozoa." *Nature Communications* 2(1).
- Cohen, D. J., D. A. Ellerman, D. Busso, M. M. Morgenfeld, A. D. Piazza, M. Hayashi, E. T. Young, M. Kasahara, and P. S. Cuasnicu. 2001. "Evidence That Human Epididymal Protein ARP Plays a Role in Gamete Fusion through Complementary Sites on the Surface of the Human Egg." *Biology of Reproduction* 65(4):1000–1005.
- Cohen, D. J., D. A. Ellerman, and P. S. Cuasnicú. 2000. "Mammalian Sperm-Egg Fusion: Evidence That Epididymal Protein DE Plays a Role in Mouse Gamete Fusion." *Biology of Reproduction* 63(2):462–68.
- Cohen, D. J., L. Rochwerger, D. A. Ellerman, M. M. Morgenfeld, D. Busso, and P. S. Cuasnicú. 2000. "Relationship between the Association of Rat Epididymal Protein &quot;DE&quot; with Spermatozoa and the Behavior and Function of the Protein." *Molecular Reproduction and Development* 56(2):180–88.
- Conine, Colin C., Fengyun Sun, Lina Song, Jaime A. Rivera-Pérez, and Oliver J. Rando. 2018. "Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice." *Developmental Cell* 1–11.
- Cooper, T. G. 1998. "Interactions between Epididymal Secretions and Spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 53:119–36.
- Coy, P., F. A. García-Vázquez, P. E. Visconti, and M. Avilés. 2012. "Roles of the Oviduct in Mammalian Fertilization." *Reproduction* 144(6):649–60.
- Crane, Linda H. and Len Martin. 1991. "Postcopulatory Myométrial Activity in the Rat as Seen by Video-Laparoscopy." *Reproduction, Fertility and Development* 3(6):685–98.
- Cuasnicu, P. S., F. Gonzalez Echeverria, A. D. Piazza, M. S. Cameo, and J. A. Blaquier. 1984. "Antibodies against Epididymal Glycoproteins Block Fertilizing Ability in Rat." *Journal of Reproduction and Fertility* 72(2):467–71.

- Cuasnicú, P. S., V. G. Da Ros, M. Weigel Muñoz, and D. J. Cohen. 2016. *Acrosome Reaction as a Preparation for Gamete Fusion*. Vol. 220.
- Cuasnicú, Patricia S., Débora J. Cohen, Diego A. Ellerman, Dolores Busso, Vanina G. Da Ros, and Mauro M. Morgenfeld. 2002. "Changes in Specific Sperm Proteins During Epididymal Maturation." Pp. 389–403 in *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Springer US.
- Cui, Yingbo, Jiaming Xu, Minxia Cheng, Xiangke Liao, and Shaoliang Peng. 2018. "Review of CRISPR/Cas9 SgRNA Design Tools." *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 10(2):455–65.
- Darszon, Alberto, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran, and Claudia L. Treviño. 2011. "Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa." *Physiological Reviews* 91(4):1305–55.
- Demarco, Ignacio A., Felipe Espinosa, Jennifer Edwards, Julian Sosnik, José Luis De la Vega-Beltrán, Joel W. Hockensmith, Gregory S. Kopf, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2003. "Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation." *Journal of Biological Chemistry* 278(9):7001–9.
- Díaz-Pérez, Eneida and Stanley Meizel. 1992. "Importance of Mammalian Sperm Metalloendoprotease Activity during the Acrosome Reaction to Subsequent Sperm-egg Fusion: Inhibitor Studies with Human Sperm and Zona-free Hamster Eggs." *Molecular Reproduction and Development* 31(2):122–30.
- Díaz-Pérez, Eneida, Paul Thomas, and Stanley Meizel. 1988. "Evidence Suggesting a Role for Sperm Metalloendoprotease Activity in Penetration of Zona-free Hamster Eggs by Human Sperm." *Journal of Experimental Zoology* 248(2):213–21.
- Doench, John G., Ella Hartenian, Daniel B. Graham, Zuzana Tothova, Mudra Hegde, Ian Smith, Meagan Sullender, Benjamin L. Ebert, Ramnik J. Xavier, and David E. Root. 2014. "Rational Design of Highly Active SgRNAs for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Inactivation." *Nature Biotechnology* 32(12):1262–67.
- Domagała, A., S. Pulido, M. Kurpisz, and J. C. Herr. 2007. "Application of Proteomic Methods for Identification of Sperm Immunogenic Antigens." *Molecular Human Reproduction* 13(7):437–44.
- Doty, A., W. C. Buhi, S. Benson, K. E. Scoggin, M. Pozor, M. Macpherson, M. Mutz, and M. H. T. Troedsson. 2011. "Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils1." *Biology of Reproduction* 85(1):157–64.
- Du, Yong, Xiaoyan Huang, Jianmin Li, Yanqiu Hu, Zuomin Zhou, and Jiahao Sha. 2006. "Human Testis Specific Protein 1 Expression in Human Spermatogenesis and Involvement in the Pathogenesis of Male Infertility." *Fertility and Sterility* 85(6):1852–54.
- Ducibella, T. 1991. "Mammalian Egg Cortical Granule and the Cortical Reaction." *Ci.Nii.Ac.Jp*.
- Ducibella, Tom. 1996. *The Cortical Reaction and Development of Activation Competence in Mammalian Oocytes*. Vol. 2.
- Ducibella, Tom, Paul Duffy, and Jan Buetow. 1994. *Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse*. Vol. 50.

- Ebensperger, C. and C. Barros. 1984. "Changes at the Hamster Oocyte Surface from the Germinal Vesicle Stage to Ovulation." *Gamete Research* 9(4):387–97.
- Eberspaecher, U., D. Roosterman, J. Krätzschar, B. Haendler, U. F. Habenicht, A. Becker, C. Quensel, T. Petri, W. D. Schleuning, and P. Donner. 1995. "Mouse Androgen-Dependent Epididymal Glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, Biochemical Characterization, and Expression in Recombinant Form." *Molecular Reproduction and Development* 42(2):157–72.
- Eddy, Edward M. and A. O'Brien. 1994. *The Spermatozoon*.
- Edwards, R. G., J. M. Purdy, P. C. Steptoe, and D. E. Walters. 1981. "The Growth of Human Preimplantation Embryos in Vitro." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 141(4):408–16.
- Eisenbach, M. 1999. "Mammalian Sperm Chemotaxis and Its Association with Capacitation." *Developmental Genetics* 25(2):87–94.
- Eisenbach, M. and H. T. Kasper. 1994. "Human Sperm Chemotaxis Is Not Enigmatic Anymore." *Fertility and Sterility* 62(2):233–35.
- Ellerman, Diego A., Verónica S. Brantúa, Silvina Pérez Martínez, Débora J. Cohen, Daniela Conesa, and Patricia S. Cuasnicú. 1998. "Potential Contraceptive Use of Epididymal Proteins: Immunization of Male Rats with Epididymal Protein DE Inhibits Sperm Fusion Ability1." *Biology of Reproduction* 59(5):1029–36.
- Ellerman, Diego A., Débora J. Cohen, Vanina G. Da Ros, Mauro M. Morgenfeld, Dolores Busso, and Patricia S. Cuasnicú. 2006. "Sperm Protein "DE" Mediates Gamete Fusion through an Evolutionarily Conserved Site of the CRISP Family." *Developmental Biology* 297(1):228–37.
- Ellerman, Diego A., Débora J. Cohen, Mariana Weigel Muñoz, Vanina G. Da Ros, Juan I. Ernesto, Ted L. Tollner, and Patricia S. Cuasnicu. 2010. "Immunologic Behavior of Human Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (HCRISP1) in Primates: Prospects for Immunocontraception." *Fertility and Sterility* 93(8):2551–56.
- Ellerman, Diego A., Vanina G. Da Ros, Débora J. Cohen, Dolores Busso, Mauro M. Morgenfeld, and Patricia S. Cuasnicú. 2002. "Expression and Structure-Function Analysis of de, a Sperm Cysteine-Rich Secretory Protein That Mediates Gamete Fusion." *Biology of Reproduction* 67(4):1225–31.
- Eppig, John J. 1979. "FSH Stimulates Hyaluronic Acid Synthesis by Oocyte-Cumulus Cell Complexes from Mouse Preovulatory Follicles [13]." *Nature* 281(5731):483–84.
- Erbach, Gregory T., Joel A. Lawitts, Virginia E. Papaioannou, and John D. Biggers. 1994. "Differential Growth of the Mouse Preimplantation Embryo in Chemically Defined Media1." *Biology of Reproduction* 50(5):1027–33.
- Ernesto, Juan I., Mariana Weigel Muñoz, María A. Battistone, Gustavo Vasen, Pablo Martínez-López, Gerardo Orta, Dulce Figueiras-Fierro, José L. De la Vega-Beltran, Ignacio A. Moreno, Héctor A. Guidobaldi, Laura Giojalas, Alberto Darszon, Débora J. Cohen, and Patricia S. Cuasnicú. 2015. "CRISP1 as a Novel CatSper Regulator That Modulates Sperm Motility and Orientation during Fertilization." *The Journal of Cell Biology* 210(7):1213–24.

- Esposito, G., B. S. Jaiswal, F. Xie, M. A. M. Krajnc-Franken, T. J. A. A. Robben, A. M. Strik, C. Kuil, R. L. A. Philipsen, M. van Duin, M. Conti, and J. A. Gossen. 2004. "Mice Deficient for Soluble Adenylyl Cyclase Are Infertile Because of a Severe Sperm-Motility Defect." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(9):2993–98.
- Evans, G. and D. T. Armstrong. 1984. "Reduction of Sperm Transport in Ewes by Superovulation Treatments." *Journal of Reproduction and Fertility* 70(1):47–53.
- Evans, Jemma, Rebecca D'Sylva, Marianna Volpert, Duangporn Jamsai, Donna Jo Merriner, Guiying Nie, Lois A. Salamonsen, and Moira K. O'Bryan. 2015. "Endometrial CRISP3 Is Regulated Throughout the Mouse Estrous and Human Menstrual Cycle and Facilitates Adhesion and Proliferation of Endometrial Epithelial Cells1." *Biology of Reproduction* 92(4).
- Fabro, Georgina, Roberto A. Rovasio, Silvia Civalero, Anat Frenkel, S. Roy Caplan, Michael Eisenbach, and Laura C. Giojalas. 2002. "Chemotaxis of Capacitated Rabbit Spermatozoa to Follicular Fluid Revealed by a Novel Directionality-Based Assay1." *Biology of Reproduction* 67(5):1565–71.
- Farboud, Behnom and Barbara J. Meyer. 2015. "Dramatic Enhancement of Genome Editing by CRISPR/Cas9 through Improved Guide RNA Design." *Genetics* 199(4):959–71.
- Félix, Romain, David Crottès, Anthony Delalande, Jérémy Fauconnier, Yvon Lebranchu, Jean-Yves Le Guennec, and Florence Velge-Roussel. 2013. "The Orai-1 and STIM-1 Complex Controls Human Dendritic Cell Maturation." *PLoS One* 8(5):e61595.
- Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka, and C. Foresta. 2007. "Male Infertility: Role of Genetic Background." *Reprod Biomed Online* 14(6):734–45.
- Feske, Stefan, Heike Wulff, and Edward Y. Skolnik. 2015. "Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity." *Annual Review of Immunology* 33(1):291–353.
- Florman, Harvey M. and Rafael A. Fissore. 2014. "Fertilization in Mammals." Pp. 149–96 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Fornés, M. W., A. Barbieri, M. A. Sosa, and F. Bertini. 1991. "First Observations on Enzymatic Activity and Protein Content of Vesicles Separated from Rat Epididymal Fluid." *Andrologia* 23(5):347–51.
- Fouquet, Jean Pierre and Marie Louise Kann. 1994. "The Cytoskeleton of Mammalian Spermatozoa." *Biology of the Cell* 81(2):89–93.
- Franchi, N. Anahí, Rosa I. Molina Conrado Avendaño, Andrea D. Tissera, Cristina A. Maldonado, Sergio Coronel, and Oehninger Carlos E. 2008. "β-Microseminoprotein in Human Spermatozoa and Its Potential Role in Male Fertility." *Rep.Bioscientifica.Com*.
- Fraser, L. R. and L. M. Drury. 1975. "The Relationship between Sperm Concentration and Fertilization in Vitro of Mouse Eggs." *Biology of Reproduction* 13(5):513–18.
- Fraser, Lynn R. 2010. "The 'Switching on' of Mammalian Spermatozoa: Molecular Events Involved in Promotion and Regulation of Capacitation." *Molecular Reproduction and Development* 77(3):197–208.
- Fraser, Lynn R., Susan A. Adeoya-Osiguwa, Rhona W. Baxendale, and Rachel Gibbons. 2006. "Regulation of Mammalian Sperm Capacitation by Endogenous Molecules." *Frontiers in Bioscience* 11(2 P.1591-2006):1636–45.

- Fraser, Peter and Wendy Bickmore. 2007. "Nuclear Organization of the Genome and the Potential for Gene Regulation." *Nature* 447(7143):413–17.
- Freeman, Brian. 2003. "The Active Migration of Germ Cells in the Embryos of Mice and Men Is a Myth." *Reproduction (Cambridge, England)* 125(5):635–43.
- Frenette, G. and R. Sullivan. 2001. "Prostasome-like Particles Are Involved in the Transfer of P25b from the Bovine Epididymal Fluid to the Sperm Surface." *Molecular Reproduction and Development* 59(1):115–21.
- Frenette, Gilles, Christine Légaré, Fabrice Saez, and Robert Sullivan. 2005. "Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Epididymis and Semen." *Molecular Human Reproduction* 11(8):575–82.
- Frenette, Gilles, Carl Lessard, and Robert Sullivan. 2002. "Selected Proteins of 'Prostasome-like Particles' from Epididymal Cauda Fluid Are Transferred to Epididymal Caput Spermatozoa in Bull." *Biology of Reproduction* 67(1):308–13.
- Friess, Helmut, Jiayi Ding, Jörg Kleeff, Quan Liao, Pascal O. Berberat, Jürgen Hammer, and Markus W. Büchler. 2001. "Identification of Disease-Specific Genes in Chronic Pancreatitis Using DNA Array Technology." Pp. 769–79 in *Annals of Surgery*. Vol. 234.
- Fujihara, Yoshitaka, Haruhiko Miyata, and Masahito Ikawa. 2018. "Factors Controlling Sperm Migration through the Oviduct Revealed by Gene-Modified Mouse Models." *Experimental Animals* 67(2):91–104.
- Fujihara, Yoshitaka, Taichi Noda, Kiyonori Kobayashi, Asami Oji, Sumire Kobayashi, Takafumi Matsumura, Tamara Larasati, Seiya Oura, Kanako Kojima-Kita, Zhifeng Yu, Martin M. Matzuk, and Masahito Ikawa. 2019. "Identification of Multiple Male Reproductive Tract-Specific Proteins That Regulate Sperm Migration through the Oviduct in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(37):18498–506.
- Furlong, L. I., U. Hellman, A. Krimer, J. G. Tezón, E. H. Charreau, and M. H. Vazquez-Levin. 2000. "Expression of Human Proacrosin in Escherichia Coli and Binding to Zona Pellucida." *Biology of Reproduction* 62(3):606–15.
- Gaddum-Rosse, P. 1985. "Mammalian Gamete Interactions: What Can Be Gained from Observations on Living Eggs?" *The American Journal of Anatomy* 174(3):347–56.
- Gaddum-Rosse, Penelope. 1981. "Some Observations on Sperm Transport through the Uterotubal Junction of the Rat." *American Journal of Anatomy* 160(3):333–41.
- Gakamsky, Anna, Leah Armon, and Michael Eisenbach. 2009. "Behavioral Response of Human Spermatozoa to a Concentration Jump of Chemoattractants or Intracellular Cyclic Nucleotides." *Human Reproduction* 24(5):1152–63.
- Galantino-Homer, H. L., P. E. Visconti, and G. S. Kopf. 1997. "Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation during Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphate-Dependent Pathway." *Biology of Reproduction* 56(3):707–19.
- Garberi, J. C., J. D. Fontana, and J. A. Blaquier. 1982. "Carbohydrate Composition of Specific Rat Epididymal Protein." *International Journal of Andrology* 5(6):619–26.
- Garberi, J. C., A. C. Kohane, M. S. Cameo, and J. A. Blaquier. 1979. "Isolation and Characterization of Specific Rat Epididymal Proteins." *Molecular and Cellular Endocrinology* 13(1):73–82.

- Gasiunas, Giedrius, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2012. "Cas9-CrRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(39):E2579-86.
- Gervasi, M. G. and Pablo E. Visconti. 2017. "Molecular Changes and Signaling Events Occurring in Spermatozoa during Epididymal Maturation." *Andrology* 5(2):204-18.
- Gibbs, Gerard M. and Moira K. O'Bryan. 2007. "Cysteine Rich Secretory Proteins in Reproduction and Venom." *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65:261-67.
- Gibbs, Gerard M., Gerardo Orta, Thulasimala Reddy, Adam J. Koppers, Pablo Martínez-López, José Luis de la Vega-Beltrán, Jennifer C. Y. Lo, Nicholas Veldhuis, Duangporn Jamsai, Peter McIntyre, Alberto Darszon, and Moira K. O'Bryan. 2011. "Cysteine-Rich Secretory Protein 4 Is an Inhibitor of Transient Receptor Potential M8 with a Role in Establishing Sperm Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(17):7034-39.
- Gibbs, Gerard M, Kim Roelants, and Moira K. O'Bryan. 2008. "The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins--Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense." *Endocrine Reviews* 29(7):865-97.
- Gibbs, Gerard M., Kim Roelants, and Moira K. O'Bryan. 2008. "The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins - Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense." *Endocrine Reviews* 29(7):865-97.
- Gibbs, Gerard M., Martin J. Scanlon, James Swarbrick, Suzanne Curtis, Esther Gallant, Angela F. Dulhunty, and Moira K. O'Bryan. 2006. "The Cysteine-Rich Secretory Protein Domain of Tpx-1 Is Related to Ion Channel Toxins and Regulates Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 281(7):4156-63.
- Giese, Alexander, Rony Jude, Heidi Kuiper, Terje Raudsepp, Francois Piumi, Alexandra Schambony, Gérard Guérin, Bhanu P. Chowdhary, Ottmar Distl, Edda Töpfer-Petersen, and Tosso Leeb. 2002. "Molecular Characterization of the Equine Testis-Specific Protein 1 (TPX1) and Acidic Epididymal Glycoprotein 2 (AEG2) Genes Encoding Members of the Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family." *Gene* 299(1-2):101-9.
- Giojalas, L. C. and R. A. Rovasio. 1998. "Mouse Spermatozoa Modify Their Motility Parameters and Chemotactic Response to Factors from the Oocyte Microenvironment." *International Journal of Andrology* 21(4):201-6.
- Gmachl, M., S. Sagan, S. Ketter, and G. Kreil. 1993. "The Human Sperm Protein PH-20 Has Hyaluronidase Activity." *FEBS Letters* 336(3):545-48.
- Godia, Marta, Grace Swanson, and Stephen A. Krawetz. 2018. "A History of Why Fathers' RNA Matters†." *Biology of Reproduction* 99(1):147-59.
- Göndör, Anita and Rolf Ohlsson. 2009. "Chromosome Crosstalk in Three Dimensions." *Nature* 461(7261):212-17.
- Griffiths, Genevieve S., Deni S. Galileo, Kristen Reese, and Patricia A. Martin-Deleon. 2008. "Investigating the Role of Murine Epididymosomes and Uterosomes in GPI-Linked Protein Transfer to Sperm Using SPAM1 as a Model." *Molecular Reproduction and*

- Development* 75(11):1627–36.
- Grupp, Katharina, Sebastian Kohl, Hüseyin Sirma, Ronald Simon, Stefan Steurer, Andreas Becker, Meike Adam, Jakob Izbicki, Guido Sauter, Sarah Minner, Thorsten Schlomm, and Maria Christina Tsourlakis. 2013. “Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Overexpression Is Linked to a Subset of PTEN-Deleted ERG Fusion-Positive Prostate Cancers with Early Biochemical Recurrence.” *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26(5):733–42.
- Guermonprez, Pierre, Jenny Valladeau, Laurence Zitvogel, Clotilde Théry, and Sebastian Amigorena. 2002. “A NTIGEN P RESENTATION AND T C ELL S TIMULATION BY D ENDRITIC C ELLS .” *Annual Review of Immunology* 20(1):621–67.
- Guidobaldi, H. A., M. E. Teves, D. R. Uñates, and L. C. Giojalas. 2012. “Sperm Transport and Retention at the Fertilization Site Is Orchestrated by a Chemical Guidance and Oviduct Movement.” *Reproduction (Cambridge, England)* 143(5):587–96.
- Guo, Min, Maikun Teng, Liwen Niu, Qun Liu, Qingqiu Huang, and Quan Hao. 2005. “Crystal Structure of the Cysteine-Rich Secretory Protein Stecrisp Reveals That the Cysteine-Rich Domain Has a K<sup>+</sup> Channel Inhibitor-like Fold.” *The Journal of Biological Chemistry* 280(13):12405–12.
- Haendler, B., J. Krätzschar, F. Theuring, and W. D. Schleuning. 1993. “Transcripts for Cysteine-Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the Novel Related CRISP-3 Are Expressed under Androgen Control in the Mouse Salivary Gland.” *Endocrinology* 133(1):192–98.
- Haendler, B., I. Toda, D. A. Sullivan, and W. D. Schleuning. 1999. “Expression of Transcripts for Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) in the Murine Lacrimal Gland.” *Journal of Cellular Physiology* 178(3):371–78.
- Ham, K. N., J. V. Hurley, A. Lopata, and G. B. Ryan. 1970. “A Combined Isotopic and Electron Microscopic Study of the Response of the Rat Uterus to Exogenous Oestradiol.” *The Journal of Endocrinology* 46(1):71–81.
- Hamann, H., R. Jude, H. Sieme, U. Mertens, E. Töpfer-Petersen, O. Distl, and T. Leeb. 2007. “A Polymorphism within the Equine CRISP3 Gene Is Associated with Stallion Fertility in Hanoverian Warmblood Horses.” *Animal Genetics* 38(3):259–64.
- Hanada, A. and M. C. Chang. 1972. “Penetration of Zone-Free Eggs by Spermatozoa of Different Species.” *Biology of Reproduction* 6(2):300–309.
- Hardy, D. M., T. T. Huang, W. J. Driscoll, K. K. Tung, and G. C. Wild. 1988. “Purification and Characterization of the Primary Acrosomal Autoantigen of Guinea Pig Epididymal Spermatozoa.” *Biology of Reproduction* 38(2):423–37.
- Harper, Claire V., Christopher L. R. Barratt, and Stephen J. Publicover. 2004. “Stimulation of Human Spermatozoa with Progesterone Gradients to Simulate Approach to the Oocyte. Induction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Oscillations and Cyclical Transitions in Flagellar Beating.” *Journal of Biological Chemistry* 279(44):46315–25.
- Harris, Tanya, Becky Marquez, Susan Suarez, and John Schimenti. 2007. “Sperm Motility Defects and Infertility in Male Mice with a Mutation in Nsun7, a Member of the Sun Domain-Containing Family of Putative RNA Methyltransferases.” *Biology of*

- Reproduction* 77(2):376–82.
- Hayashi, M., S. Fujimoto, H. Takano, T. Ushiki, K. Abe, H. Ishikura, M. C. Yoshida, C. Kirchhoff, T. Ishibashi, and M. Kasahara. 1996. "Characterization of a Human Glycoprotein with a Potential Role in Sperm-Egg Fusion: CDNA Cloning, Immunohistochemical Localization, and Chromosomal Assignment of the Gene (AEGL1)." *Genomics* 32(3):367–74.
- He, Zhi-Yong, Cord Brakebusch, Reinhard Fässler, Jordan A. Kreidberg, Paul Primakoff, and Diana G. Myles. 2003. "None of the Integrins Known to Be Present on the Mouse Egg or to Be ADAM Receptors Are Essential for Sperm-Egg Binding and Fusion." *Developmental Biology* 254(2):226–37.
- Hedger, M. P. 2011. "Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis." *Journal of Andrology* 32(6):625–40.
- Hedger, Mark P. 2014. "The Immunophysiology of Male Reproduction." Pp. 805–92 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Hemler, Martin E. 2005. "Tetraspanin Functions and Associated Microdomains." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(10):801–11.
- Hermo, Louis and Duncan Jacks. 2002. "Nature's Ingenuity: Bypassing the Classical Secretory Route via Apocrine Secretion." *Molecular Reproduction and Development* 63(3):394–410.
- Hernández-González, Enrique O., Julian Sosnik, Jennifer Edwards, Juan José Acevedo, Irene Mendoza-Lujambio, Ignacio López-González, Ignacio Demarco, Eva Wertheimer, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2006. "Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-Associated Hyperpolarization in Mouse Sperm." *Journal of Biological Chemistry* 281(9):5623–33.
- Hess, Kenneth C., Brian H. Jones, Becky Marquez, Yanqiu Chen, Teri S. Ord, Margarita Kamenetsky, Catarina Miyamoto, Jonathan H. Zippin, Gregory S. Kopf, Susan S. Suarez, Lonny R. Levin, Carmen J. Williams, Jochen Buck, and Stuart B. Moss. 2005. "The 'Soluble' Adenylyl Cyclase in Sperm Mediates Multiple Signaling Events Required for Fertilization." *Developmental Cell* 9(2):249–59.
- Hino, Toshiaki, Yuko Muro, Miwa Tamura-Nakano, Masaru Okabe, Hiroyuki Tateno, and Ryuzo Yanagimachi. 2016. "The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating." *Biology of Reproduction* 95(3):50.
- Ho, Katharine, Collin A Wolff, and Susan S. Suarez. 2009. "CatSper-Null Mutant Spermatozoa Are Unable to Ascend beyond the Oviductal Reservoir." *Reproduction, Fertility, and Development* 21(2):345–50.
- Ho, Katharine, Collin A. Wolff, and Susan S. Suarez. 2009. "CatSper-Null Mutant Spermatozoa Are Unable to Ascend beyond the Oviductal Reservoir." *Reproduction, Fertility and Development* 21(2):345–50.
- Holt, William V. and Alireza Fazeli. 2015. "Do Sperm Possess a Molecular Passport? Mechanistic Insights into Sperm Selection in the Female Reproductive Tract." *Molecular Human Reproduction* 21(6):491–501.
- Hoodbhoy, Tanya and Jurrien Dean. 2004. "Insights into the Molecular Basis of Sperm-Egg

- Recognition in Mammals." *Reproduction* 127(4):417–22.
- Horne, A. W., W. C. Duncan, A. E. King, S. Burgess, P. C. Lourenco, P. Cornes, P. Ghazal, A. R. Williams, L. Udby, and H. O. D. Critchley. 2009. "Endometrial Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Is Inhibited by Human Chorionic Gonadotrophin, and Is Increased in the Decidua of Tubal Ectopic Pregnancy." *Molecular Human Reproduction* 15(5):287–94.
- Howes, Liz and Roy Jones. 2002. "Interactions between Zona Pellucida Glycoproteins and Sperm Proacrosin/Acrosin during Fertilization." *Journal of Reproductive Immunology* 53(1–2):181–92.
- Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. 2014. "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering." *Cell* 157(6):1262–78.
- Hsu, Patrick D., David A. Scott, Joshua A. Weinstein, F. Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yinqing Li, Eli J. Fine, Xuebing Wu, Ophir Shalem, Thomas J. Cradick, Luciano A. Marraffini, Gang Bao, and Feng Zhang. 2013. "DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases." *Nature Biotechnology* 31(9):827–32.
- Hunter, Ronald H. F. 1995. "Human Sperm Reservoirs and Fallopian Tube Function: A Role for the Intra-mural Portion?" *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 74(9):677–81.
- Hwang, Jae Yeon, Nadja Mannowetz, Yongdeng Zhang, Robert A. Everley, Steven P. Gygi, Joerg Bewersdorft, Polina V. Lishko, and Jean Ju Chung. 2018. "EFCAB9 Is a PH-Dependent Ca<sup>2+</sup> Sensor That Regulates CatSper Channel Activity and Sperm Motility." *BioRxiv* <http://dx.doi.org/10.1101/459487>.
- Illarregui, Juan M., Diego O. Croci, Germán A. Bianco, Marta A. Toscano, Mariana Salatino, Mónica E. Vermeulen, Jorge R. Geffner, and Gabriel A. Rabinovich. 2009. "Tolerogenic Signals Delivered by Dendritic Cells to T Cells through a Galectin-1-Driven Immunoregulatory Circuit Involving Interleukin 27 and Interleukin 10." *Nature Immunology* 10(9):981–91.
- Inoue, Naokazu, Masahito Ikawa, Ayako Isotani, and Masaru Okabe. 2005. "The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required for Sperm to Fuse with Eggs." *Nature* 434(7030):234–38.
- Inoue, Naokazu, Yuhkoh Satouh, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, and Ryuzo Yanagimachi. 2011. "Acrosome-Reacted Mouse Spermatozoa Recovered from the Perivitelline Space Can Fertilize Other Eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(50):20008–11.
- Isobe, Tetsuya, Hiroyuki Minoura, Keisuke Tanaka, Takashi Shibahara, Naoko Hayashi, and Nagayasu Toyoda. 2002. "The Effect of RANTES on Human Sperm Chemotaxis." *Human Reproduction (Oxford, England)* 17(6):1441–46.
- Jalkanen, Jenni, Ilpo Huhtaniemi, and Matti Poutanen. 2005. "Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (CRISP4): A Member of the Crisp Family Exclusively Expressed in the Epididymis in an Androgen-Dependent Manner." *Biology of Reproduction* 72(5):1268–74.
- Jensen, Kristopher Torp, Lasse Fløe, Trine Skov Petersen, Jinrong Huang, Fengping Xu, Lars Bolund, Yonglun Luo, and Lin Lin. 2017. "Chromatin Accessibility and Guide Sequence

- Secondary Structure Affect CRISPR-Cas9 Gene Editing Efficiency." *FEBS Letters* 591(13):1892–1901.
- Janeway C (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 6th edn (Garl and Science).
- Jiang, Fuguo, Kaihong Zhou, Linlin Ma, Saskia Gressel, and Jennifer A. Doudna. 2015. "A Cas9-Guide RNA Complex Preorganized for Target DNA Recognition." *Science* 348(6242):1477–81.
- Jin, Jingling, Nange Jin, Huili Zheng, Seungil Ro, Dora Tafolla, Kenton M. Sanders, and Wei Yan. 2007. "Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse." *Biology of Reproduction* 77(1):37–44.
- Jin, Mayuko, Eiji Fujiwara, Yasutaka Kakiuchi, Masaru Okabe, Yuhkoh Satouh, Shoji A. Baba, Kazuyoshi Chiba, and Noritaka Hirohashi. 2011. "Most Fertilizing Mouse Spermatozoa Begin Their Acrosome Reaction before Contact with the Zona Pellucida during in Vitro Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(12):4892–96.
- Jing, Xiao-wei, Rong-wei Xing, Qi-zhao Zhou, Qing-feng Yu, Wen-bin Guo, Si-mei Chen, Qing-jun Chu, Chun-qiong Feng, and Xiang-ming Mao. 2011. "[Expressions of Cysteine-Rich Secretory Protein 2 in Asthenospermia]." *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology* 17(3):203–7.
- Johnson, M. H., D. Eager, A. Muggleton-Harris, and H. M. Grave. 1975. "Mosaicism in Organisation Concanavalin A Receptors on Surface Membrane of Mouse Egg." *Nature* 257(5524):321–22.
- Johnson, M. H. and C. A. Ziomek. 1981. "Induction of Polarity in Mouse 8-Cell Blastomeres: Specificity, Geometry, and Stability." *The Journal of Cell Biology* 91(1):303–8.
- Kaji, Keisuke, Shoji Oda, Tomohide Shikano, Tatsuya Ohnuki, Yoshikatsu Uematsu, Junko Sakagami, Norihiro Tada, Shunichi Miyazaki, and Akira Kudo. 2000. "The Gamete Fusion Process Is Defective in Eggs of Cd9-Deficient Mice." *Nature Genetics* 24(3):279–82.
- Kapsenberg, Martien L. 2003. "Dendritic-Cell Control of Pathogen-Driven T-Cell Polarization." *Nature Reviews Immunology* 3(12):984–93.
- Kasahara, M., F. Figueroa, and J. Klein. 1987. "Molecular Cloning of a Testis-Specific Gene from Mouse Chromosome 17." *Transplantation Proceedings* 19(1 Pt 1):815–16.
- Kasahara, Masanori, Jutta Gutknecht, Keith Brew, Nigel Spurr, and Peter N. Goodfellow. 1989. "Cloning and Mapping of a Testis-Specific Gene with Sequence Similarity to a Sperm-Coating Glycoprotein Gene." *Genomics* 5(3):527–34.
- Kaupp, U. Benjamin, Nachiket D. Kashikar, and Ingo Weyand. 2008. "Mechanisms of Sperm Chemotaxis." *Annual Review of Physiology* 70(1):93–117.
- Kawano, Natsuko, Naoya Araki, Kaoru Yoshida, Taku Hibino, Naoko Ohnami, Maako Makino, Seiya Kanai, Hidetoshi Hasuwa, Manabu Yoshida, Kenji Miyado, and Akihiro Umezawa. 2014. "Seminal Vesicle Protein SVS2 Is Required for Sperm Survival in the Uterus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(11):4145–50.
- Kim, Ekyune, Daichi Baba, Masanori Kimura, Misuzu Yamashita, Shin-ichi Kashiwabara, and

- Tadashi Baba. 2005. "Identification of a Hyaluronidase, Hyal5, Involved in Penetration of Mouse Sperm through Cumulus Mass." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(50):18028–33.
- Kim, Kye-Seong, James A. Foster, and George L. Gerton. 2001. "Differential Release of Guinea Pig Sperm Acrosomal Components During Exocytosis1." *Biology of Reproduction* 64(1):148–56.
- Kim, Kye-Seong and George L. Gerton. 2003. "Differential Release of Soluble and Matrix Components: Evidence for Intermediate States of Secretion during Spontaneous Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm." *Developmental Biology* 264(1):141–52.
- Kim, Taewan, Jungsu Oh, Jong-Min Woo, Eunyoung Choi, Sin Hyeog Im, Yung Joon Yoo, Do Han Kim, Hitoshi Nishimura, and Chunghee Cho. 2006. "Expression and Relationship of Male Reproductive ADAMs in Mouse1." *Biology of Reproduction* 74(4):744–50.
- Kirchhoff, Christiane, Geoffrey Hale, and Sir William. 1996. *Cell-to-Cell Transfer of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins during Sperm Maturation*. Vol. 2.
- Kirichok, Yuriy, Betsy Navarro, and David E. Clapham. 2006. "Whole-Cell Patch-Clamp Measurements of Spermatozoa Reveal an Alkaline-Activated Ca<sup>2+</sup> Channel." *Nature* 439(7077):737–40.
- Kleinjan, Dirk A. and Veronica Van Heyningen. 2005. "Long-Range Control of Gene Expression: Emerging Mechanisms and Disruption in Disease." *American Journal of Human Genetics* 76(1):8–32.
- Ko, Wen-Chang, Keisuke Sugahara, Takumi Sakuma, Ching-Yu Yen, Shyun-Yeu Liu, Gwo-An Liaw, and Takahiko Shibahara. 2012. "Copy Number Changes of CRISP3 in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Oncology Letters* 3(1):75–81.
- Kohane, A. C., M. S. Cameo, L. Piñeiro, J. C. Garberi, and J. A. Blaquier. 1980. "Distribution and Site of Production of Specific Proteins in the Rat Epididymis." *Biology of Reproduction* 23(1):181–87.
- Kohane, A. C., F. M. González Echeverría, L. Piñeiro, and J. A. Blaquier. 1980. "Interaction of Proteins of Epididymal Origin with Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 23(4):737–42.
- Kohane, A. C., L. Piñeiro, and J. A. Blaquier. 1983. "Androgen-Controlled Synthesis of Specific Proteins in the Rat Epididymis." *Endocrinology* 112(5):1590–96.
- Kosari, Farhad, Yan W. Asmann, John C. Cheville, and George Vasmatazis. 2002. "Cysteine-Rich Secretory Protein-3: A Potential Biomarker for Prostate Cancer." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 11(11):1419–26.
- Krätzschar, J., B. Haendler, U. Eberspaecher, D. Roosterman, P. Donner, and W. D. Schleuning. 1996. "The Human Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family. Primary Structure and Tissue Distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3." *European Journal of Biochemistry* 236(3):827–36.
- Krutsikh, Anton, Ariel Poliandri, Victoria Cabrera-Sharp, Jean Louis Dacheux, Matti

- Poutanen, and Ilpo Huhtaniemi. 2012. "Epididymal Protein Rnase10 Is Required for Post-Testicular Sperm Maturation and Male Fertility." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(10):4198–4209.
- De La Vega-Beltran, Jose Luis, Claudia Sánchez-Cárdenas, Darío Krapf, Enrique O. Hernandez-González, Eva Wertheimer, Claudia L. Treviño, Pablo E. Visconti, and Alberto Darszon. 2012. "Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction." *Journal of Biological Chemistry* 287(53):44384–93.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680–85.
- Laine, Mikael, Pauliina Porola, Lene Udby, Lars Kjeldsen, Jack B. Cowland, Niels Borregaard, Jarkko Hietanen, Mona Ståhle, Antti Pihakari, and Yrjö T. Konttinen. 2007. "Low Salivary Dehydroepiandrosterone and Androgen-Regulated Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Levels in Sjögren's Syndrome." *Arthritis & Rheumatism* 56(8):2575–84.
- Lea, I. A., R. T. Richardson, E. E. Widgren, and M. G. O'Rand. 1996. "Cloning and Sequencing of cDNAs Encoding the Human Sperm Protein, Sp17." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1307(3):263–66.
- Lefièvre, L., S. J. Conner, A. Salpekar, O. Olufowobi, P. Ashton, B. Pavlovic, W. Lenton, M. Afnan, I. A. Brewis, M. Monk, D. C. Hughes, and C. L. R. Barratt. 2004. "Four Zona Pellucida Glycoproteins Are Expressed in the Human." *Human Reproduction* 19(7):1580–86.
- Légaré, Christine, Bruno Bérubé, Franck Boué, Linda Lefièvre, Carlos R. Morales, Mohamed El-Alfy, and Robert Sullivan. 1999. "Hamster Sperm Antigen P26h Is a Phosphatidylinositol-Anchored Protein." *Molecular Reproduction and Development* 52(2):225–33.
- Liao, Q., J. Kleeff, Y. Xiao, A. Guweidhi, A. Schambony, E. Töpfer-Petersen, A. Zimmermann, M. W. Büchler, and Helmut Friess. 2003. "Preferential Expression of Cystein-Rich Secretory Protein-3 (CRISP-3) in Chronic Pancreatitis." *Histology and Histopathology* 18(2):425–33.
- Lim, Shuly, Michelina Kierzek, Anne E. O'Connor, Christoph Brenker, D. Jo Merriner, Hidenobu Okuda, Marianna Volpert, Avinash Gaikwad, Deborah Bianco, David Potter, Ranganathan Prabhakar, Timo Strünker, and Moira K. O'Bryan. 2019. "CRISP2 Is a Regulator of Multiple Aspects of Sperm Function and Male Fertility." *Endocrinology* 160(4):915–24.
- Lin, Y., K. Mahan, W. F. Lathrop, D. G. Myles, and P. Primakoff. 1994. "A Hyaluronidase Activity of the Sperm Plasma Membrane Protein PH-20 Enables Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg." *The Journal of Cell Biology* 125(5):1157–63.
- Lishko, Polina V, Inna L. Botchkina, and Yuriy Kirichok. 2011. "Progesterone Activates the Principal Ca<sup>2+</sup> Channel of Human Sperm." *Nature* 471(7338):387–91.
- van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieterse. 2006. "Significance of Inducible Defense-Related Proteins in Infected Plants." *Annual Review of Phytopathology* 44(1):135–62.

- Luo, Tao, Qian Xing Zou, Yuan Qiao He, Hua Feng Wang, Tao Wang, Min Liu, Ying Chen, and Bing Wang. 2016. "Matrine Compromises Mouse Sperm Functions by a  $[Ca^{2+}]_i$ -Related Mechanism." *Reproductive Toxicology* 60:69–75.
- Maeda, T., M. Sakashita, Y. Ohba, and Y. Nakanishi. 1998. "Molecular Cloning of the Rat Tpx-1 Responsible for the Interaction between Spermatogenic and Sertoli Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248(1):140–46.
- Maeda, Tomoji, Jun Nishida, and Yoshinobu Nakanishi. 1999. "Expression Pattern, Subcellular Localization and Structure- Function Relationship of Rat Tpx-1, a Spermatogenic Cell Adhesion Molecule Responsible for Association with Sertoli Cells." *Development Growth and Differentiation* 41(6):715–22.
- Magdaleno, Leticia, María Gasset, Julio Varea, Alexandra M. Schambony, Claus Urbanke, Manfred Raida, Edda Töpfer-Petersen, and Juan J. Calvete. 1997. "Biochemical and Conformational Characterisation of HSP-3, a Stallion Seminal Plasma Protein of the Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family." *FEBS Letters* 420(2–3):179–85.
- Mahony, Mary C. and TanYa Gwathmey. 1999. "Protein Tyrosine Phosphorylation during Hyperactivated Motility of Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*) Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 60(5):1239–43.
- Maldera, J., Fornes, M.W., Cuasnicú, P.S. (2006). Participación de los epididimosomas en el mecanismo de asociación de DE al espermatozoide. *Medicina (Buenos Aires)*; 66: 51228
- Maldera, J. A., G. Vasen, J. I. Ernesto, M. Weigel-Muñoz, D. J. Cohen, and P. S. Cuasnicu. 2011. "Evidence for the Involvement of Zinc in the Association of CRISP1 with Rat Sperm during Epididymal Maturation." *Biology of Reproduction* 85(3).
- Maldera, J. A., M. Weigel Muñoz, M. Chirinos, D. Busso, F. G E Raffo, M. A. Battistone, J. A. Blaquier, F. Larrea, and P. S. Cuasnicu. 2014. "Human Fertilization: Epididymal HCRISP1 Mediates Sperm-Zona Pellucida Binding through Its Interaction with ZP3." *Molecular Human Reproduction* 20(4):341–49.
- Maňásková-Postlerová, Pavla, Nina Davidová, Miroslav Sulc, Anatoly Philimonenko, Pavel Hozák, and Věra Jonáková. 2011. "Reproductive Tissue Expression and Sperm Localization of Porcine Beta-Microseminoprotein." *Cell and Tissue Research* 344(2):341–53.
- Markey, Caroline M. and Geoffrey T. Meyer. 1992. *A Quantitative Description of the Epididymis and Its Microvasculature: An Age-Related Study in the Rat*. Vol. 180.
- Martínez-López, Pablo, Claudia L. Treviño, José Luis de la Vega-Beltrán, Gerardo De Blas, Esteban Monroy, Carmen Beltrán, Gerardo Orta, Gerard M. Gibbs, Moira K. O'Bryan, and Alberto Darszon. 2011. "TRPM8 in Mouse Sperm Detects Temperature Changes and May Influence the Acrosome Reaction." *Journal of Cellular Physiology* 226(6):1620–31.
- Martinez, Silvina Perez, Daniela Conesa, and Patricia S. Cuasnicú. 1995. "Potential Contraceptive Use of Epididymal Proteins: Evidence for the Participation of Specific Antibodies against Rat Epididymal Protein DE in Male and Female Fertility Inhibition." *Journal of Reproductive Immunology* 29(1):31–45.
- Mata-Martínez, Esperanza, Omar José, Paulina Torres-Rodríguez, Alejandra Solís-López, Ana A. Sánchez-Tusie, Yoloxochitl Sánchez-Guevara, Marcela B. Treviño, and Claudia L.

- Treviño. 2013. "Measuring Intracellular  $Ca^{2+}$ ; Changes in Human Sperm Using Four Techniques: Conventional Fluorometry, Stopped Flow Fluorometry, Flow Cytometry and Single Cell Imaging." *Journal of Visualized Experiments* (75):e50344.
- Matsudaira, Paul. 1990. "Limited N-Terminal Sequence Analysis." *Methods in Enzymology* 182(C):602–13.
- Mehrvavar, Maryam, Abolfazl Shirazi, Mahboobeh Nazari, and Mehdi Banan. 2019. "Mosaicism in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing." *Developmental Biology* 445(2):156–62.
- Mellado-Sanchez, Gabriela, Hector Vivanco-Cid, Adriana Sumoza-Toledo, Gabriela Mellado-Sánchez, and Héctor Vivanco-Cid. 2014. "Regulation of Murine Dendritic Cell Functions by Calcium Channels Factor de Transferencia View Project Regulation of Murine Dendritic Cell Functions by Calcium Channels."
- Miller, Brent J., Elisabeth Georges-Labouesse, Paul Primakoff, and Diana G. Myles. 2000. "Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin  $A\beta 1$  and Is CD9-Dependent." *Journal of Cell Biology* 149(6):1289–95.
- Miller, Melissa R., Steven A. Mansell, Stuart A. Meyers, and Polina V Lishko. 2015. "Flagellar Ion Channels of Sperm: Similarities and Differences between Species." *Cell Calcium* 58(1):105–13.
- Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe, and E. Mekada. 2000. "Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization." *Science (New York, N.Y.)* 287(5451):321–24.
- Miyado, K., K. Yoshida, K. Yamagata, K. Sakakibara, M. Okabe, X. Wang, K. Miyamoto, H. Akutsu, T. Kondo, Y. Takahashi, T. Ban, C. Ito, K. Toshimori, A. Nakamura, M. Ito, M. Miyado, E. Mekada, and A. Umezawa. 2008. "The Fusing Ability of Sperm Is Bestowed by CD9-Containing Vesicles Released from Eggs in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(35):12921–26.
- Miyata, Haruhiko, Yuhkoh Satouh, Daisuke Mashiko, Masanaga Muto, Kaori Nozawa, Kogiku Shiba, Yoshitaka Fujihara, Ayako Isotani, Kazuo Inaba, and Masahito Ikawa. 2015. "Sperm Calcineurin Inhibition Prevents Mouse Fertility with Implications for Male Contraceptive." *Science (New York, N.Y.)* 350(6259):442–45.
- Mizuki, Nobuyuki and Masanori Kasahara. 1992. "Mouse Submandibular Glands Express an Androgen-Regulated Transcript Encoding an Acidic Epididymal Glycoprotein-like Molecule." *Molecular and Cellular Endocrinology* 89(1–2):25–32.
- Mizuno, Seiya, Tra Thi Huong Dinh, Kanako Kato, Saori Mizuno-Iijima, Yoko Tanimoto, Yoko Daitoku, Yoshikazu Hoshino, Masahito Ikawa, Satoru Takahashi, Fumihiko Sugiyama, and Ken-ichi Yagami. 2014. "Simple Generation of Albino C57BL/6J Mice with G291T Mutation in the Tyrosinase Gene by the CRISPR/Cas9 System." *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 25(7–8):327–34.
- Morrisette, J., J. Krätzschar, B. Haendler, R. el-Hayek, J. Mochca-Morales, B. M. Martin, J. R. Patel, R. L. Moss, W. D. Schleuning, R. Coronado, and et al. 1995. "Primary Structure and Properties of Helothermine, a Peptide Toxin That Blocks Ryanodine Receptors." *Biophysical Journal* 68(6):2280–88.

- Mulnard, J. and R. Huygens. 1978. "Ultrastructural Localization of Non-Specific Alkaline Phosphatase during Cleavage and Blastocyst Formation in the Mouse." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 44:121–31.
- Muñoz-Garay, C., J. L. De la Vega-Beltrán, R. Delgado, P. Labarca, R. Felix, and A. Darszon. 2001. "Inwardly Rectifying K(+) Channels in Spermatogenic Cells: Functional Expression and Implication in Sperm Capacitation." *Developmental Biology* 234(1):261–74.
- Muñoz, Mariana Weigel, Juan I. Ernesto, Carolina Bluguermann, Dolores Busso, María A. Battistone, Débora J. Cohen, and Patricia S. Cuasnicú. 2012. "Evaluation of Testicular Sperm CRISP2 as a Potential Target for Contraception." *Journal of Andrology* 33(6):1360–70.
- Murer, Valérie, Jean François Spetz, Ulrich Hengst, Ludger Maria Altrogge, Ariane De Agostini, and Denis Monard. 2001. "Male Fertility Defects in Mice Lacking the Serine Protease Inhibitor Protease Nexin-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(6):3029–33.
- Muro, Yuko, Hidetoshi Hasuwa, Ayako Isotani, Haruhiko Miyata, Kazuo Yamagata, Masahito Ikawa, Ryuzo Yanagimachi, and Masaru Okabe. 2016. "Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization." *Biology of Reproduction* 94(4):80.
- Myles, D. G. and P. Primakoff. 1997. "Why Did the Sperm Cross the Cumulus? To Get to the Oocyte. Functions of the Sperm Surface Proteins PH-20 and Fertilin in Arriving at, and Fusing with, the Egg." *Biology of Reproduction* 56(2):320–27.
- Nakamura, Brooke N., Thomas J. Fielder, Yvonne D. Hoang, Jinhwan Lim, Lisa A. McConnachie, Terrance J. Kavanagh, and Ulrike Luderer. 2011. "Lack of Maternal Glutamate Cysteine Ligase Modifier Subunit (Gclm) Decreases Oocyte Glutathione Concentrations and Disrupts Preimplantation Development in Mice." *Endocrinology* 152(7):2806–15.
- Narlikar, Leelavati and Ivan Ovcharenko. 2009. "Identifying Regulatory Elements in Eukaryotic Genomes." *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8(4):215–30.
- Nassar, Ahmed, Mary Mahony, Mahmood Morshedi, M. H. Lin, Chartchai Srisombut, and Sergio Oehninger. 1999. "Modulation of Sperm Tail Protein Tyrosine Phosphorylation by Pentoxifylline and Its Correlation with Hyperactivated Motility." *Fertility and Sterility* 71(5):919–23.
- Navarrete, Felipe A., Francisco A. García-Vázquez, Antonio Alvau, Jessica Escoffier, Dario Krapf, Claudia Sánchez-Cárdenas, Ana M. Salicioni, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2015. "Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways." *Journal of Cellular Physiology* 230(8):1758–69.
- Navarro, Betsy, Yuriy Kirichok, and David E. Clapham. 2007. *KSper, a PH-Sensitive K Current That Controls Sperm Membrane Potential*.
- Nimlamool, Wutigri, Barry S. Bean, and Linda J. Lowe-Krentz. 2013. "Human Sperm CRISP2 Is Released from the Acrosome during the Acrosome Reaction and Re-Associates at the Equatorial Segment." *Molecular Reproduction and Development* 80(6):488–502.
- Nishimura, Hitoshi, Chunghee Cho, Daniel R. Branciforte, Diana G. Myles, and Paul Primakoff.

2001. "Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin  $\beta$ ." *Developmental Biology* 233(1):204–13.
- Nishimura, Hitoshi, Ekyune Kim, Tomoko Nakanishi, and Tadashi Baba. 2004. "Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface." *The Journal of Biological Chemistry* 279(33):34957–62.
- Nolan, Michael A., Leeyung Wu, Hyun J. Bang, Scott A. Jelinsky, Kenneth P. Roberts, Terry T. Turner, Gregory S. Kopf, and Daniel S. Johnston. 2006. "Identification of Rat Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) as the Ortholog to Human CRISP1 and Mouse Crisp4." *Biology of Reproduction* 74(5):984–91.
- Novak, S., T. A. Smith, F. Paradis, L. Burwash, M. K. Dyck, G. R. Foxcroft, and W. T. Dixon. 2010. "Biomarkers of in Vivo Fertility in Sperm and Seminal Plasma of Fertile Stallions." *Theriogenology* 74(6):956–67.
- O'Bryan, M. K., K. L. Loveland, D. Herszfeld, J. R. McFarlane, M. T. Hearn, and D. M. de Kretser. 1998. "Identification of a Rat Testis-Specific Gene Encoding a Potential Rat Outer Dense Fibre Protein." *Molecular Reproduction and Development* 50(3):313–22.
- O'Bryan, Moira K., Kimberly Sebire, Andreas Meinhardt, Kimberly Edgar, Hong Hooi Keah, Milton T. W. Hearn, and David M. De Kretser. 2001. "Tpx-1 Is a Component of the Outer Dense Fibers and Acrosome of Rat Spermatozoa." *Molecular Reproduction and Development* 58(1):116–25.
- O'Rand, M. G., J. E. Welch, and S. J. Fisher. 1986. "Sperm Membrane and Zona Pellucida Interactions during Fertilization." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 205:131–44.
- Okabe, M. 2013. "The Cell Biology of Mammalian Fertilization." *Development* 140(22):4471–79.
- Okabe, Masaru. 2015. "Mechanisms of Fertilization Elucidated by Gene-Manipulated Animals." *Asian Journal of Andrology* 17(4):646.
- Okada, Yuki and Kosuke Yamaguchi. 2017. "Epigenetic Modifications and Reprogramming in Paternal Pronucleus: Sperm, Preimplantation Embryo, and Beyond." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 74(11):1957–67.
- Okunade, Gbolahan W., Marian L. Miller, Gail J. Pyne, Roy L. Sutliff, Kyle T. O'Connor, Jonathan C. Neumann, Anastasia Andringa, Daniel A. Miller, Vikram Prasad, Thomas Doetschman, Richard J. Paul, and Gary E. Shull. 2004. "Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4." *Journal of Biological Chemistry* 279(32):33742–50.
- Olesen, C. 2001. "Identification of Human Candidate Genes for Male Infertility by Digital Differential Display." *Molecular Human Reproduction* 7(1):11–20.
- Oliveira, R. G., L. Tomasi, R. A. Rovasio, and L. C. Giojalas. 1999. "Increased Velocity and Induction of Chemotactic Response in Mouse Spermatozoa by Follicular and Oviductal Fluids." *Journal of Reproduction and Fertility* 115(1):23–27.
- Oliver, Daniel, Shuiqiao Yuan, Hayden McSwiggin, and Wei Yan. 2015. "Pervasive Genotypic Mosaicism in Founder Mice Derived from Genome Editing through Pronuclear

- Injection." *PLoS ONE* 10(6).
- OMS. (2010). *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (5th ed.). Geneva, Switzerland: World Health Organization Press.
- Orgebin-Crist, M. C. 1968. "Maturation of Spermatozoa in the Rabbit Epididymis: Delayed Fertilization in Does Inseminated with Epididymal Spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* 16(1):29–33.
- Orgebin-Crist, M. C. and N. Jahad. 1977. "Delayed Cleavage of Rabbit Ova after Fertilization by Young Epididymal Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 16(3):358–62.
- Orgebin-Crist, Marie-Claire, Eloise B. Brantley, J. R. Hart, and J. R. Hart MATURATION. 1967. *MATURATION OF SPERMATOZOA IN THE RABBIT EPIDIDYMIS : FERTILIZING ABILITY AND EMBRYONIC MORTALITY IN DOES INSEMINATED WITH EPIDIDYMAL SPERMATOZOA OF SPERMATO-ZOA IN THE RABBIT EPIDIDYMIS : FERTILIZING ABILITY AND EMBRYONIC MORTALITY IN DOES INSEMINATED WITH EPIDIDYMAL SPERMATOZOA. Annales de Biologie Animale. Vol. 7.*
- Paoloni-Giacobino, A., I. Kern, Y. Rumpler, R. Djelati, M. A. Morris, and S. P. Dahoun. 2000. "Familial t(6;21)(P21.1;P13) Translocation Associated with Male-Only Sterility." *Clinical Genetics* 58(4):324–28.
- Pathak, Bhakti R., Ananya A. Breed, Snehal Apte, Kshitish Acharya, and Smita D. Mahale. 2016. "Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Plays a Role in Prostate Cancer Cell Invasion and Affects Expression of PSA and ANXA1." *Molecular and Cellular Biochemistry* 411(1–2):11–21.
- Peitz, Betsy and Patricia Olds-Clarke. 1986. "Effects of Seminal Vesicle Removal on Fertility and Uterine Sperm Motility in the House Mouse1." *Biology of Reproduction* 35(3):608–17.
- Peterson, Ron L., Tatiana V Tkatchenko, Nathanael D. Pruett, Christopher S. Potter, Donna F. Jacobs, and Alexander Awgulewitsch. 2005. "Epididymal Cysteine-Rich Secretory Protein 1 Encoding Gene Is Expressed in Murine Hair Follicles and Downregulated in Mice Overexpressing Hoxc13." *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings* 10(3):238–42.
- Pfisterer, P., H. König, J. Hess, G. Lipowsky, B. Haendler, W. D. Schleuning, and T. Wirth. 1996. "CRISP-3, a Protein with Homology to Plant Defense Proteins, Is Expressed in Mouse B Cells under the Control of Oct2." *Molecular and Cellular Biology* 16(11):6160–68.
- Philpott, Caroline C., Maurice J. Ringuette, and Jurrien Dean. 1987. "Oocyte-Specific Expression and Developmental Regulation of ZP3, the Sperm Receptor of the Mouse Zona Pellucida." *Developmental Biology* 121(2):568–75.
- Pommer, Angela C., Josep Rutllant, and Stuart A. Meyers. 2003. "Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions." *Biology of Reproduction* 68(4):1208–14.
- Primakoff, Paul, Hilary Hyatt, and Diana G. Myles. 1985. "A Role for the Migrating Sperm Surface Antigen PH-20 in Guinea Pig Sperm Binding to the Egg Zona Peilucida." *Journal of Cell Biology* 101(6):2239–44.

- Prins, Gail S. and Mark Lindgren. 2014. *Accessory Sex Glands in the Male*. Vol. 1.
- Puga Molina, Lis C., Guillermina M. Luque, Paula A. Balestrini, Clara I. Marín-Briggiler, Ana Romarowski, and Mariano G. Buffone. 2018. "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6:72.
- Qi, Huayu, Magdalene M. Moran, Betsy Navarro, Jayhong A. Chong, Grigory Krapivinsky, Luba Krapivinsky, Yuriy Kirichok, I. Scott Ramsey, Timothy A. Quill, and David E. Clapham. 2007. "All Four CatSper Ion Channel Proteins Are Required for Male Fertility and Sperm Cell Hyperactivated Motility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(4):1219–23.
- Quill, Timothy a, Sarah a Sugden, Kristen L. Rossi, Lynda K. Doolittle, Robert E. Hammer, and David L. Garbers. 2003. "Hyperactivated Sperm Motility Driven by CatSper2 Is Required for Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):14869–74.
- Ramathal, Cyril, Renee A. Reijo Pera, and Shawn L. Chavez. 2014. "Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification." Pp. 233–65 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Ran, FA, PD Hsu, J. Wright, V. Agarwala, DA Scott-Nature Protocols, and Undefined 2013. 2013. "Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature.Com*.
- Rankin, T. L., M. O'Brien, E. Lee, K. Wigglesworth, J. Eppig, and J. Dean. 2001. "Defective Zona Pellucida in Zp2-Null Mice Disrupt Folliculogenesis, Fertility and Development." *Development* 128(7):1119–26.
- Rankin, Tracy, Mary Familiar, Eric Lee, Ann Ginsberg, Nancy Dwyer, Joan Blanchette-Mackie, John Drago, Helner Westphal, and Jurrien Dean. 1996. "Mice Homozygous for an Insertional Mutation in the Zp3 Gene Lack a Zona Pellucida and Are Infertile." *Development* 122(9):2903–10.
- Rankin, Tracy L., Jenell S. Coleman, Olga Epifano, Tanya Hoodbhoy, Scott G. Turner, Philip E. Castle, Eric Lee, Robert Gore-Langton, and Jurrien Dean. 2003. "Fertility and Taxon-Specific Sperm Binding Persist after Replacement of Mouse Sperm Receptors with Human Homologs." *Developmental Cell* 5(1):33–43.
- Rankin, Tracy, Prue Talbot, Eric Lee, and Jurrien Dean. 1999. "Abnormal Zona Pellucida in Mice Lacking ZP1 Result in Early Embryonic Loss." *Development* 126(17):3847–55.
- Ravaux, Benjamin, Nabil Garroum, Eric Perez, Hervé Willaime, and Christine Gourier. 2016. "A Specific Flagellum Beating Mode for Inducing Fusion in Mammalian Fertilization and Kinetics of Sperm Internalization." *Scientific Reports* 6(1):31886.
- Reddy, Thulasimala, Gerard M Gibbs, D. Jo Merriner, Jeffrey B. Kerr, and Moira K. O'Bryan. 2008. "Cysteine-Rich Secretory Proteins Are Not Exclusively Expressed in the Male Reproductive Tract." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237(11):3313–23.
- Reddy, Thulasimala, Gerard M. Gibbs, D. Jo Merriner, Jeffrey B. Kerr, and Moira K. O'Bryan. 2008. "Cysteine-Rich Secretory Proteins Are Not Exclusively Expressed in the Male Reproductive Tract." *Developmental Dynamics* 237(11):3313–23.
- Reid, Andrew T., Kate Redgrove, R. John Aitken, and Brett Nixon. 2011. "Cellular Mechanisms

- Regulating Sperm-Zona Pellucida Interaction." *Asian Journal of Andrology* 13(1):88–96.
- Ren, D. and J. Xia. 2010. "Calcium Signaling through CatSper Channels in Mammalian Fertilization." *Physiology (Bethesda)* 25(3):165–75.
- Ren, Dejian, Betsy Navarro, Gloria Perez, Alexander C. Jackson, Shyuefang Hsu, Qing Shi, Jonathan L. Tilly, and David E. Clapham. 2001. "A Sperm Ion Channel Required for Sperm Motility and Male Fertility." *Nature* 413(6856):603–9.
- Roan, Nadia R., Nathallie Sandi-Monroy, Nargis Kohgadai, Shariq M. Usmani, Katherine G. Hamil, Jason Neidleman, Mauricio Montano, Ludger Ständker, Annika Röcker, Marielle Cavrois, Jared Rosen, Kara Marson, James F. Smith, Christopher D. Pilcher, Friedrich Gagsteiger, Olena Sakk, Michael O’Rand, Polina V. Lishko, Frank Kirchhoff, Jan Münch, and Warner C. Greene. 2017. "Semen Amyloids Participate in Spermatozoa Selection and Clearance." *ELife* 6:1–22.
- Robaire, Bernard and Barry T. Hinton. 2014. *The Epididymis*. Vol. 1. Fourth Edi. Elsevier.
- Roberts, Kenneth P., Joseph A. Wamstad, Kathy M. Ensrud, and David W. Hamilton. 2003. "Inhibition of Capacitation-Associated Tyrosine Phosphorylation Signaling in Rat Sperm by Epididymal Protein Crisp-1." *Biology of Reproduction* 69(2):572–81.
- Roblero, L. S., A. Guadarrama, M. E. Ortiz, E. Fernandez, and F. Zegers-Hochschild. 1990. "High Potassium Concentration and the Cumulus Corona Oocyte Complex Stimulate the Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa." *Fertility and Sterility* 54(2):328–32.
- Rochwerger, L. and P. S. Cuasnicu. 1992. "Redistribution of a Rat Sperm Epididymal Glycoprotein after in Vitro and in Vivo Capacitation." *Molecular Reproduction and Development* 31(1):34–41.
- Rochwerger, Leonora, Débora J. Cohen, and Patricia S. Cuasnicú. 1992. "Mammalian Sperm-Egg Fusion: The Rat Egg Has Complementary Sites for a Sperm Protein That Mediates Gamete Fusion." *Developmental Biology* 153(1):83–90.
- Roller, R. J., R. A. Kinloch, B. Y. Hiraoka, S. S. Li, and P. M. Wassarman. 1989. "Gene Expression during Mammalian Oogenesis and Early Embryogenesis: Quantification of Three Messenger RNAs Abundant in Fully Grown Mouse Oocytes." *Development* 106(2).
- Da Ros, Vanina G., Julieta A. Maldera, William D. Willis, Débora J. Cohen, Eugenia H. Goulding, Diego M. Gelman, Marcelo Rubinstein, Edward M. Eddy, and Patricia S. Cuasnicu. 2008. "Impaired Sperm Fertilizing Ability in Mice Lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1)." *Developmental Biology* 320(1):12–18.
- Da Ros, Vanina G., Mariana Weigel Muñoz, Maria A. Battistone, Nicolás G. Brukman, Guillermo Carvajal, Ludmila Curci, Matías D. Gómez-Ellas, D. Bora J. Cohen, and Patricia S. Cuasnicu. 2015. "From the Epididymis to the Egg: Participation of CRISP Proteins in Mammalian Fertilization." *Asian Journal of Andrology* 17(5):711–15.
- Ruknudin, A. and I. A. Silver. 1990. "Ca<sup>2+</sup> Uptake during Capacitation of Mouse Spermatozoa and the Effect of an Anion Transport Inhibitor on Ca<sup>2+</sup> Uptake." *Molecular Reproduction and Development* 26(1):63–68.
- Sakkas, Denny, Mythili Ramalingam, Nicolas Garrido, and Christopher L. R. Barratt. 2015. "Sperm Selection in Natural Conception: What Can We Learn from Mother Nature to Improve Assisted Reproduction Outcomes?" *Human Reproduction Update* 21(6):711–

26.

- Saling, P. M. and B. T. Storey. 1979. "Mouse Gamete Interactions during Fertilization in Vitro. Chlortetracycline as a Fluorescent Probe for the Mouse Sperm Acrosome Reaction." *The Journal of Cell Biology* 83(3):544–55.
- Salter, Russell D. and Simon C. Watkins. 2009. "Dendritic Cell Altered States: What Role for Calcium?" *Immunological Reviews* 231(1):278–88.
- Santi, Celia M., Pablo Martínez-López, José Luis de la Vega-Beltrán, Alice Butler, Arturo Alisio, Alberto Darszon, and Lawrence Salkoff. 2010. "The SLO3 Sperm-Specific Potassium Channel Plays a Vital Role in Male Fertility." *FEBS Letters* 584(5):1041–46.
- Satouh, Yuhkoh, Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, and Masaru Okabe. 2012. "Visualization of the Moment of Mouse Sperm-Egg Fusion and Dynamic Localization of IZUMO1." *Journal of Cell Science* 125(Pt 21):4985–90.
- Schambony, A., M. Gentzel, H. Wolfes, M. Raida, U. Neumann, and E. Töpfer-Petersen. 1998. "Equine CRISP-3: Primary Structure and Expression in the Male Genital Tract." *Biochimica et Biophysica Acta* 1387(1–2):206–16.
- Schroer, Sarah C., Ashley I. Yudin, Diana G. Myles, and James W. Overstreet. 2000. "Acrosomal Status and Motility of Guinea Pig Spermatozoa during in Vitro Penetration of the Cumulus Oophorus." *Zygote* 8(2):107–17.
- Schuh, Kai, Elizabeth J. Cartwright, Eriks Jankevics, Karin Bundschu, Jürgen Liebermann, Judith C. Williams, Angel L. Armesilla, Michael Emerson, Delvac Oceandy, Klaus Peter Knobloch, and Ludwig Neyses. 2004. "Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility." *Journal of Biological Chemistry* 279(27):28220–26.
- Schwidetzky, U., B. Haendler, and W. D. Schleuning. 1995. "Isolation and Characterization of the Androgen-Dependent Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein-3 (CRISP-3) Gene." *The Biochemical Journal* 309 ( Pt 3):831–36.
- Scott, L. 2000. "The Morphology of Human Pronuclear Embryos Is Positively Related to Blastocyst Development and Implantation." *Human Reproduction* 15(11):2394–2403.
- Seli, Emre, David K. Gardner, William B. Schoolcraft, Odette Moffatt, and Denny Sakkas. 2004. "Extent of Nuclear DNA Damage in Ejaculated Spermatozoa Impacts on Blastocyst Development after in Vitro Fertilization." *Fertility and Sterility* 82(2):378–83.
- Shalgi, Ruth and David M. Phillips. 1980. "Mechanics of in Vitro Fertilization in the Hamster." *Biology of Reproduction* 23(2):433–44.
- Shamsadin, R., I. M. Adham, K. Nayernia, U. A. Heinlein, H. Oberwinkler, and W. Engel. 1999. "Male Mice Deficient for Germ-Cell Cytostatin Are Infertile." *Biology of Reproduction* 61(6):1445–51.
- Shaver, Evelyn L. and D. H. Carr. n.d. *CHROMOSOME ABNORMALITIES IN RABBIT BLASTOCYSTS FOLLOWING DELAYED FERTILIZATION*.
- Sheng, Jie, Nick K. Olrichs, Willie J. Geerts, Xueyi Li, Ashfaq Ur Rehman, Barend M. Gadella, Dora V. Kaloyanova, and J. Bernd Helms. 2019. "Zinc Binding Regulates Amyloid-like Aggregation of GAPR-1." *Bioscience Reports* 39(2).

- Shumilina, Ekaterina, Stephan M. Huber, and Florian Lang. 2011. "Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Regulation of Dendritic Cell Functions." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300(6).
- Smith, James F., Olga Syritsyna, Marc Fellous, Catherine Serres, Nadja Mannowetz, Yuriy Kirichok, and Polina V Lishko. 2013. "Disruption of the Principal, Progesterone-Activated Sperm Ca<sup>2+</sup> Channel in a CatSper2-Deficient Infertile Patient." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(17):6823–28.
- Van Soom, Ann, S. Tanghe, I. De Pauw, D. Maes, and A. de Kruif. 2002. "Function of the Cumulus Oophorus before and during Mammalian Fertilization." *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 37(3):144–51.
- Sosnik, Julian, Patricia V Miranda, Nikolay A. Spiridonov, Sook-Young Yoon, Rafael A. Fissore, Gibbes R. Johnson, and Pablo E. Visconti. 2009. "Tssk6 Is Required for Izumo Relocalization and Gamete Fusion in the Mouse." *Journal of Cell Science* 122(Pt 15):2741–49.
- Spehr, Marc, Gunter Gisselmann, Alexandra Poplawski, Jeffrey A. Riffell, Christian H. Wetzel, Richard K. Zimmer, and Hanns Hatt. 2003. "Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis." *Science (New York, N.Y.)* 299(5615):2054–58.
- La Spina, Florenza A., Lis C. Puga Molina, Ana Romarowski, Alejandra M. Vitale, Tomas L. Falzone, Dario Krapf, Noritaka Hirohashi, and Mariano G. Buffone. 2016. "Mouse Sperm Begin to Undergo Acrosomal Exocytosis in the Upper Isthmus of the Oviduct." *Developmental Biology* 411(2):172–82.
- Steinman, Ralph M. 1991. "The Dendritic Cell System and Its Role in Immunogenicity." *Annual Review of Immunology* 9(1):271–96.
- Strünker, Timo, Normann Goodwin, Christoph Brenker, Nachiket D. Kashikar, Ingo Weyand, Reinhard Seifert, and U. Benjamin Kaupp. 2011. "The CatSper Channel Mediates Progesterone-Induced Ca<sup>2+</sup> Influx in Human Sperm." *Nature* 471(7338):382–86.
- Suarez, S. S. 1996. "Hyperactivated Motility in Sperm." *Journal of Andrology* 17(4):331–35.
- Suarez, S. S. and X. Dai. 1992. "Hyperactivation Enhances Mouse Sperm Capacity for Penetrating Viscoelastic Media." *Biology of Reproduction* 46(4):686–91.
- Suarez, S. S. and A. A. Pacey. 2006. "Sperm Transport in the Female Reproductive Tract." *Human Reproduction Update* 12(1):23–37.
- Suarez, Susan S. 2014. "Gamete and Zygote Transport." Pp. 197–232 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Suarez, Susan S. 2016. "Mammalian Sperm Interactions with the Female Reproductive Tract." *Cell and Tissue Research* 363(1):185–94.
- Sullivan, Robert, Gilles Frenette, and Julie Girouard. 2007. "Epididymosomes Are Involved in the Acquisition of New Sperm Proteins during Epididymal Transit." *Asian Journal of Andrology* 9(4):483–91.
- Sunagar, Kartik, Warren E. Johnson, Stephen J. O'Brien, Vítor Vasconcelos, and Agostinho Antunes. 2012. "Evolution of CRISPs Associated with Toxicoferan-Reptilian Venom and Mammalian Reproduction." *Molecular Biology and Evolution* 29(7):1807–22.

- Sundberg, John P., Alexander Awgulewitsch, Nathan D. Pruett, Christopher S. Potter, Kathleen A. Silva, Timothy M. Stearns, Beth A. Sundberg, Mariana Weigel Muñoz, Patricia S. Cuasnicu, Lloyd E. King, and Robert H. Rice. 2014. "Crisp1 and Alopecia Areata in C3H/HeJ Mice." *Experimental and Molecular Pathology* 97(3):525–28.
- Sutherland, A. E., T. P. Speed, and P. G. Calarco. 1990. "Inner Cell Allocation in the Mouse Morula: The Role of Oriented Division during Fourth Cleavage." *Developmental Biology* 137(1):13–25.
- Suzuki, Nobuhiro, Yasuo Yamazaki, R. Lane Brown, Zui Fujimoto, Takashi Morita, and Hiroshi Mizuno. 2008. "Structures of Pseudechetoxin and Pseudecin, Two Snake-Venom Cysteine-Rich Secretory Proteins That Target Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels: Implications for Movement of the C-Terminal Cysteine-Rich Domain." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 64(Pt 10):1034–42.
- Tachibana, Isao and Martin E. Hemler. 1999. "Role of Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Proteins CD9 and CD81 in Muscle Cell Fusion and Myotube Maintenance." *Journal of Cell Biology* 146(4):893–904.
- Takano, Hiroko, R. Yanagimachi, and Umberto A. Urch. 1993. "Evidence That Acrosin Activity Is Important for the Development of Fusibility of Mammalian Spermatozoa with the Oolemma: Inhibitor Studies Using the Golden Hamster." *Zygote* 1(1):79–91.
- Talbot, P. 1985. "Sperm Penetration through Oocyte Investments in Mammals." *American Journal of Anatomy* 174(3):331–46.
- Talbot, P. and Pramila Dandekar. 2003. "Perivitelline Space: Does It Play a Role in Blocking Polyspermy in Mammals?" *Microscopy Research and Technique* 61(4):349–57.
- Tamba, Shigero, Rieko Yodoi, Eri Segi-Nishida, Atsushi Ichikawa, Shuh Narumiya, and Yukihiko Sugimoto. 2008. "Timely Interaction between Prostaglandin and Chemokine Signaling Is a Prerequisite for Successful Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14539–44.
- Tateno, H., D. Krapf, T. Hino, C. Sanchez-Cardenas, A. Darszon, R. Yanagimachi, and P. E. Visconti. 2013. "Ca<sup>2+</sup> Ionophore A23187 Can Make Mouse Spermatozoa Capable of Fertilizing in Vitro without Activation of CAMP-Dependent Phosphorylation Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(46):18543–48.
- Teves, María Eugenia, Flavia Barbano, Héctor Alejandro Guidobaldi, Raúl Sanchez, Werner Miska, and Laura Cecilia Giojalas. 2006. "Progesterone at the Picomolar Range Is a Chemoattractant for Mammalian Spermatozoa." *Fertility and Sterility* 86(3):745–49.
- Tomes, Claudia Nora. 2015. "The Proteins of Exocytosis: Lessons from the Sperm Model." *The Biochemical Journal* 465(3):359–70.
- Toshimori, Kiyotaka and Edward M. Eddy. 2014. *The Spermatozoon*. Vol. 1. Fourth Edi. Elsevier.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9):4350–54.
- Truett, Gary E., P. Heeger, R. L. Mynatt, A. A. Truett, J. A. Walker, and M. L. Warman. 2000.

- "Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic Dna with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT)." *BioTechniques* 29(1):52–54.
- Turunen, H. T., P. Sipila, A. Krutskikh, J. Toivanen, H. Mankonen, V. Hamalainen, I. Bjorkgren, I. Huhtaniemi, and M. Poutanen. 2012. "Loss of Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) Leads to Deficiency in Sperm-Zona Pellucida Interaction in Mice." *Biology of Reproduction* 86(1):1–8.
- Udby, L. 2005. "Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract." *Journal of Andrology* 26(3):333–42.
- Udby, Lene, Jero Calafat, Ole E. Sørensen, Niels Borregaard, and Lars Kjeldsen. 2002. "Identification of Human Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3)." 3.
- Udby, Lene, Jack B. Cowland, Anders H. Johnsen, Ole E. Sørensen, Niels Borregaard, and Lars Kjeldsen. 2002. "An ELISA for SGP28/CRISP-3, a Cysteine-Rich Secretory Protein in Human Neutrophils, Plasma, and Exocrine Secretions." *Journal of Immunological Methods* 263(1–2):43–55.
- Udby, Lene, Ole E. Sørensen, Jesper Pass, Anders H. Johnsen, Niels Behrendt, Niels Borregaard, and Lars Kjeldsen. 2004. "Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Is a Ligand of Alpha1B-Glycoprotein in Human Plasma." *Biochemistry* 43(40):12877–86.
- Urner, F., G. Leppens-Luisier, and D. Sakkas. 2001. "Protein Tyrosine Phosphorylation in Sperm during Gamete Interaction in the Mouse: The Influence of Glucose." *Biology of Reproduction* 64(5):1350–57.
- Urner, Françoise and Denny Sakkas. 2003. "Protein Phosphorylation in Mammalian Spermatozoa." *Reproduction* 125(1):17–26.
- Usuga, Alexandra, Benjamín A. Rojano, and Giovanni Restrepo. 2018. "Association of the Cysteine-Rich Secretory Protein-3 (CRISP-3) and Some of Its Polymorphisms with the Quality of Cryopreserved Stallion Semen." *Reproduction, Fertility and Development* 30(3):563–69.
- Uusi-Mäkelä, Meri I. E., Harlan R. Barker, Carina A. Bäuerlein, Tomi Häkkinen, Matti Nykter, and Mika Rämetsä. 2018. "Chromatin Accessibility Is Associated with CRISPR-Cas9 Efficiency in the Zebrafish (*Danio Rerio*)." *PLoS ONE* 13(4).
- Valansi, Clari, David Moi, Evgenia Leikina, Elena Matveev, Martín Graña, Leonid V Chernomordik, Héctor Romero, Pablo S. Aguilar, and Benjamin Podbilewicz. 2017. "Arabidopsis HAP2/GCS1 Is a Gamete Fusion Protein Homologous to Somatic and Viral Fusogens." *The Journal of Cell Biology* 216(3):571–81.
- Valli, Hanna, Bart T. Phillips, Kyle E. Orwig, Kathrin Gassei, and Makoto C. Nagano. 2014. "Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis." Pp. 595–635 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Valsecchi, Federica, Csaba Konrad, Marilena D'Aurelio, Lavoisier S. Ramos-Espiritu, Anna Stepanova, Suzanne R. Burstein, Alexander Galkin, Jordi Magranè, Anatoly Starkov, Jochen Buck, Lonny R. Levin, and Giovanni Manfredi. 2017. "Distinct Intracellular SAC-CAMP Domains Regulate ER Ca<sup>2+</sup> Signaling and OXPHOS Function." *Journal of Cell Science* 130(21):3713–27.
- Vasen, Gustavo, Maria Agustina Battistone, Diego O. Croci, Nicolás G. Brukman, Mariana

- Weigel Muñoz, Juan C. Stupirski, Gabriel A. Rabinovich, and Patricia S. Cuasnicú. 2015. "The Galectin-1-Glycan Axis Controls Sperm Fertilizing Capacity by Regulating Sperm Motility and Membrane Hyperpolarization." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29(10):4189–4200.
- Vicens, Alberto and Claudia L. Treviño. 2018. "Positive Selection in the Evolution of Mammalian CRISPs." *Journal of Molecular Evolution* 86(9):635–45.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995. "Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation." *Development (Cambridge, England)* 121(4):1129–37.
- Visconti, P E, G. D. Moore, J. L. Bailey, P. Leclerc, S. A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995. "Capacitation of Mouse Spermatozoa. II. Protein Tyrosine Phosphorylation and Capacitation Are Regulated by a CAMP-Dependent Pathway." *Development (Cambridge, England)* 121(4):1139–50.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, J. L. Bailey, P. Leclerc, S. A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995. "Capacitation of Mouse Spermatozoa. II. Protein Tyrosine Phosphorylation and Capacitation Are Regulated by a CAMP-Dependent Pathway." *Development* 121(4):1139–50.
- Visconti, P. E., J. Stewart-Savage, a Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G. S. Kopf, and J. G. Tezón. 1999. "Roles of Bicarbonate, CAMP, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm." *Biology of Reproduction* 61(1):76–84.
- Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight, and A. B. Diekman. 2002. "Novel Signaling Pathways Involved in Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity." *Journal of Reproductive Immunology* 53(1–2):133–50.
- Visconti, Pablo E. 2009. "Understanding the Molecular Basis of Sperm Capacitation through Kinase Design." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(3):667–68.
- Visconti, Pablo E., Dario Krapf, José Luis de la Vega-Beltrán, Juan José Acevedo, and Alberto Darszon. 2011. "Ion Channels, Phosphorylation and Mammalian Sperm Capacitation." *Asian Journal of Andrology* 13(3):395–405.
- Vogel, R. and H. Spielmann. 1992. "Genotoxic and Embryotoxic Effects of Gonadotropin-Hyperstimulated Ovulation of Murine Oocytes, Preimplantation Embryos, and Term Fetuses." *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 6(4):329–33.
- Wang, Dan, Jie Hu, I. Alexandru Bobulescu, Timothy a Quill, Paul McLeroy, Orson W. Moe, and David L. Garbers. 2007. "A Sperm-Specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (SNHE) Is Critical for Expression and in Vivo Bicarbonate Regulation of the Soluble Adenylyl Cyclase (SAC)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(22):9325–30.
- Wang, Haoyi, Hui Yang, Chikdu S. Shivalila, Meelad M. Dawlaty, Albert W. Cheng, Feng Zhang, and Rudolf Jaenisch. 2013. "One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering." *Cell* 153(4):910–18.

- Wassarman, P. M., J. D. Bleil, H. M. Florman, J. M. Greve, R. J. Roller, G. S. Salzmann, and F. G. Samuels. 1985. "The Mouse Egg's Receptor for Sperm: What Is It and How Does It Work?" *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 50:11–19.
- Wassarman, Paul M. 1988a. "Fertilization in Mammals." *Scientific American* 259(6):78–84.
- Wassarman, Paul M. 1988b. "Zona Pellucida Glycoproteins." *Annual Review of Biochemistry* 57(1):415–42.
- Wassarman, Paul M. and Eveline S. Litscher. 2001. *Towards the Molecular Basis of Sperm and Egg Interaction during Mammalian Fertilization*. Vol. 168.
- Weigel Muñoz, Mariana, A. María Battistone, Guillermo Carvajal, Julieta A. Maldera, Ludmila Curci, Pablo Torres, Daniel Lombardo, Omar P. Pignataro, Vanina G. Da Ros, and Patricia S. Cuasnicu. 2018. "Influence of the Genetic Background on the Reproductive Phenotype of Mice Lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1)." *Biology of Reproduction*.
- Wertheimer, Eva V., Ana M. Salicioni, Weimin Liu, Claudia L. Trevino, Julio Chavez, Enrique O. Hernández-González, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2008. "Chloride Is Essential for Capacitation and for the Capacitation-Associated Increase in Tyrosine Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 283(51):35539–50.
- Wright, Gavin J. and Enrica Bianchi. 2016. "The Challenges Involved in Elucidating the Molecular Basis of Sperm-Egg Recognition in Mammals and Approaches to Overcome Them." *Cell and Tissue Research* 363(1):227–35.
- Xia, Jingsheng and Dejian Ren. 2009. "The BSA-Induced Ca<sup>2+</sup> Influx during Sperm Capacitation Is CATSPER Channel-Dependent." *Reproductive Biology and Endocrinology* 7.
- Xu, Han, Tengfei Xiao, Chen Hao Chen, Wei Li, Clifford A. Meyer, Qiu Wu, Di Wu, Le Cong, Feng Zhang, Jun S. Liu, Myles Brown, and X. Shirley Liu. 2015. "Sequence Determinants of Improved CRISPR SgRNA Design." *Genome Research* 25(8):1147–57.
- Yamaguchi, Ryo, Yuko Muro, Ayako Isotani, Keizo Tokuhiko, Kazuhiro Takumi, Ibrahim Adham, Masahito Ikawa, and Masaru Okabe. 2009. "Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse1." *Biology of Reproduction* 81(1):142–46.
- Yamaguchi, Ryo, Kazuo Yamagata, Masahito Ikawa, Stuart B. Moss, and Masaru Okabe. 2006. "Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice." *Biology of Reproduction* 75(5):760–66.
- Yamazaki, Yasuo, R. Lane Brown, and Takashi Morita. 2002. "Purification and Cloning of Toxins from Elapid Venoms That Target Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels." *Biochemistry* 41(38):11331–37.
- Yanagimachi, R. 1970. "The Movement of Golden Hamster Spermatozoa before and after Capacitation." *Journal of Reproduction and Fertility* 23(1):193–96.
- Yanagimachi, R. 1994. "Mammalian Fertilization." Pp. 189–317 in *The Physiology of Reproduction*, edited by E. Knobil and J.D. Neill.
- Yanagimachi, R. and Amitabha Bhattacharyya. 1988. "Acrosome-reacted Guinea Pig Spermatozoa Become Fusion Competent in the Presence of Extracellular Potassium Ions." *Journal of Experimental Zoology* 248(3):354–60.

- Ye, Hui, Tianwei Yu, Stephane Temam, Barry L. Ziober, Jianguang Wang, Joel L. Schwartz, Li Mao, David T. Wong, and Xiaofeng Zhou. 2008. "Transcriptomic Dissection of Tongue Squamous Cell Carcinoma." *BMC Genomics* 9:69.
- Yeung, Ching-Hei, Sylvie Breton, Iwan Setiawan, Yaoxian Xu, Florian Lang, and Trevor G. Cooper. 2004. "Increased Luminal PH in the Epididymis of Infertile C-Ros Knockout Mice and the Expression of Sodium-Hydrogen Exchangers and Vacuolar Proton Pump H<sup>+</sup>-ATPase." *Molecular Reproduction and Development* 68(2):159–68.
- Yoshida, M. and K. Yoshida. 2011. "Sperm Chemotaxis and Regulation of Flagellar Movement by Ca<sup>2+</sup>." *Molecular Human Reproduction* 17(8):457–65.
- Young, Samantha A. M., R. John Aitken, and Masahito Ikawa. 2015. "Advantages of Using the CRISPR/Cas9 System of Genome Editing to Investigate Male Reproductive Mechanisms Using Mouse Models." Pp. 623–27 in *Asian Journal of Andrology*. Vol. 17. Medknow Publications.
- Yudin, A. I., G. N. Cherr, and D. F. Katz. 1988. "Structure of the Cumulus Matrix and Zona Pellucida in the Golden Hamster: A New View of Sperm Interaction with Oocyte-Associated Extracellular Matrices." *Cell and Tissue Research* 251(3):555–64.
- Yudin, Ashley I., Catherine A. Vandevoort, Ming Wen Li, and James W. Overstreet. 1999. "PH-20 but Not Acrosin Is Involved in Sperm Penetration of the Macaque Zona Pellucida." *Molecular Reproduction and Development* 53(3):350–62.
- Yuen, Garmen, Fehad J. Khan, Shaojian Gao, Jayne M. Stommel, Eric Batchelor, Xiaolin Wu, and Ji Luo. 2017. "CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout Is Insensitive to Target Copy Number but Is Dependent on Guide RNA Potency and Cas9/SgRNA Threshold Expression Level." *Nucleic Acids Research* 45(20):12039–53.
- Zeng, Yang, Edward N. Clark, and Harvey M. Florman. 1995. "Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion." *Developmental Biology* 171(2):554–63.
- Zeng, Yang, Jon A. Oberdorf, and Harvey M. Florman. 1996. "PH Regulation in Mouse Sperm: Identification of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Dependent and Arylamino benzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation." *Developmental Biology* 173(2):510–20.
- Zhang, L., S. Jiang, P. J. Wozniak, X. Yang, and R. A. Godke. 1995. "Cumulus Cell Function during Bovine Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryo Development in Vitro." *Molecular Reproduction and Development* 40(3):338–44.
- ZHOU, Chong, Woojin KANG, and Tadashi BABA. 2012. "Functional Characterization of Double-Knockout Mouse Sperm Lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in Fertilization." *Journal of Reproduction and Development* 58(3):330–37.
- Zhou, Jiankui, Jianying Wang, Bin Shen, Li Chen, Yang Su, Jing Yang, Wensheng Zhang, Xuemei Tian, and Xingxu Huang. 2014. "Dual SgRNAs Facilitate CRISPR/Cas9-Mediated Mouse Genome Targeting." *The FEBS Journal* 281(7):1717–25.
- Zhou, Jun-Hao, Qi-Zhao Zhou, Xiao-Ming Lyu, Ting Zhu, Zi-Jian Chen, Ming-Kun Chen, Hui Xia, Chun-Yan Wang, Tao Qi, Xin Li, and Cun-Dong Liu. 2015. "The Expression of Cysteine-Rich Secretory Protein 2 (CRISP2) and Its Specific Regulator MiR-27b in the Spermatozoa

- of Patients with Asthenozoospermia1.” *Biology of Reproduction* 92(1).
- Zhu, Xiaoxiao, Yajie Xu, Shanshan Yu, Lu Lu, Mingqin Ding, Jing Cheng, Guoxu Song, Xing Gao, Liangming Yao, Dongdong Fan, Shu Meng, Xuewen Zhang, Shengdi Hu, and Yong Tian. 2014. “An Efficient Genotyping Method for Genome-Modified Animals and Human Cells Generated with CRISPR/Cas9 System.” *Scientific Reports* 4:6420.
- Zhuo, Lisheng and Koji Kimata. 2001. *Cumulus Oophorus Extracellular Matrix: Its Construction and Regulation*. Vol. 26.
- Zippin, Jonathan H., Yanqiu Chen, Patrick Nahirney, Margarita Kamenetsky, Mark S. Wuttke, Donald A. Fischman, Lonny R. Levin, and Jochen Buck. 2003. “Compartmentalization of Bicarbonate-Sensitive Adenylyl Cyclase in Distinct Signaling Microdomains.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(1):82–84.
- Zudova, Dagmar, Andrew J. Wyrobek, Jack Bishop, and Francesco Marchetti. 2004. “Impaired Fertility in T-Stock Female Mice after Superovulation.” *Reproduction (Cambridge, England)* 128(5):573–81.