



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

# **Contribución de las proteínas CRISP epididimarias a la fertilización y el desarrollo embrionario temprano**

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

**Lic. Valeria Sulzyk**

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

**Directora Adjunta:** Dra. Mariana Weigel Muñoz

**Consejera de estudios:** Dra. Vanina Andrea Fontana

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

Buenos Aires, 30 de junio de 2025

## **Contribución de las proteínas CRISP epididimarias a la fertilización y el desarrollo embrionario temprano**

Las proteínas de la familia *Cysteine-Rich Secretory Proteins* (CRISP1-4), con expresión mayoritaria en el tracto reproductor masculino de mamíferos, regulan canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , son claros mediadores del proceso de fertilización y resultan relevantes para la fertilidad de un individuo. En base a ello, en esta Tesis Doctoral nos propusimos explorar el posible empleo de las CRISP para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad e investigar los mecanismos moleculares por los cuales las CRISP epididimarias son relevantes para la fertilidad a través de su contribución a la fertilización y posterior desarrollo embrionario.

Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio en roedores y primates mostrando que la inmunización con la proteína CRISP1 induce la producción de anticuerpos específicos capaces de unirse a los espermatozoides, así como de inhibir la fertilidad sin producir efectos deletéreos, como primer objetivo nos propusimos identificar proteínas epididimarias CRISP en perros como posibles blancos anticonceptivos para el control de la creciente población canina callejera. Los resultados obtenidos revelaron la existencia de una proteína CRISP canina de expresión exclusivamente epididimaria, presente en los espermatozoides tanto epididimarios como eyaculados la cual no sólo permanece en los mismos luego de la capacitación, sino que se relocaliza al segmento ecuatorial, región involucrada en la fusión de gametas en todas especies estudiadas. Estas observaciones, junto al hecho de que la exposición de espermatozoides caninos a un anticuerpo capaz de reconocer a la proteína canina inhibiera significativamente la capacidad de los espermatozoides de penetrar el cúmulus de células que rodea al ovocito, apoya la participación de la proteína CRISP canina identificada en el proceso de fertilización y su futuro empleo como blanco para el desarrollo de un método anticonceptivo canino no hormonal.

Dada la subfertilidad observada en las colonias de ratones doble KO para CRISP1 y CRISP4 (DKO 1/4) y para CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3) debidas a defectos exclusivos de fertilización y desarrollo embrionario, respectivamente, así como la infertilidad de las colonias carentes de más de dos proteínas simultáneamente, como segundo objetivo de esta Tesis nos propusimos generar y caracterizar una nueva colonia triple KO carente de CRISP1, CRISP3 y CRISP4 con el fin de analizar la relevancia de los diferentes miembros de la familia CRISP para la fertilidad. Los resultados indicaron que mientras la nueva colonia TKO mostró una mayor bajada en la fertilidad respecto a las colonias DKO 1/4 y 1/3, no alcanzó la infertilidad

observada en la colonia TKO 1/2/3 previamente estudiada. El análisis del fenotipo reproductivo reveló la ausencia de defectos en la fertilización *in vivo*, a diferencia de lo observado en el modelo DKO 1/4, detectándose, en cambio, una bajada significativa en el desarrollo embrionario, tal como la observada para los animales DKO 1/3. A pesar de que todos los parámetros espermáticos estudiados resultaron normales, los espermatozoides TKO fueron prácticamente incapaces de fertilizar ovocitos *in vitro*, en concordancia con lo observado en todos los modelos carentes de CRISP4. En conjunto, esta caracterización permitió confirmar que la infertilidad no dependería exclusivamente de la cantidad sino de la combinación de proteínas deletadas, contribuyendo a una mayor comprensión de los mecanismos de redundancia y compensación funcional entre los miembros de la familia CRISP.

Como último objetivo de esta Tesis, nos propusimos investigar los mecanismos moleculares por los cuales las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP3 contribuyen al desarrollo embrionario temprano que afecta la fertilidad de todas las colonias carentes de estas proteínas. Los resultados obtenidos utilizando la colonia DKO 1/3, que solo exhibe defectos de desarrollo embrionario, indicaron que dichos defectos ya son acarreados por los espermatozoides epididimarios y no son debido a un retraso en la fertilización. Un hallazgo interesante fue que los ovocitos fertilizados *in vitro* por los espermatozoides mutantes mostraron un arresto en el reinicio de la meiosis no causado por alteración en las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  durante la activación ovocitaria sino por niveles elevados de fragmentación del ADN espermático adquiridos durante el tránsito por el epidídimo. Nuestras observaciones también mostraron que la exposición de espermatozoides control a fluido epididimario de animales mutantes o a fluido control suplementado con  $Ca^{2+}$  incrementó significativamente la fragmentación del ADN y que los espermatozoides mutantes tanto frescos como capacitados exhibían niveles significativamente mayores de  $Ca^{2+}$  intracelular. En conjunto, estas observaciones nos permiten concluir que una desregulación en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  durante la maduración epididimaria sería la responsable del daño en la integridad del ADN espermático que conduce al retraso en el reinicio de la meiosis y los consecuentes defectos en el desarrollo embrionario temprano, apoyando la relevancia de la maduración epididimaria más allá de la conocida adquisición de capacidad fertilizante.

Consideramos que los resultados obtenidos en esta Tesis utilizando como modelo a la familia de proteínas CRISP contribuirán a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de fertilización y embriogénesis como así también al

desarrollo de nuevos y mejores métodos tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la fertilidad.

**Palabras clave: Fertilidad, fertilización, espermatozoide, ovocito, epidídimo, CRISP, anticoncepción, desarrollo embrionario, calcio, fragmentación del ADN.**

## **Contribution of Epididymal CRISP Proteins to Fertilization and Early Embryo Development**

Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP1–4), predominantly expressed in the male reproductive tract in mammals, regulate  $\text{Ca}^{2+}$  channels and act as key mediators of the fertilization process, playing critical roles in male fertility. Based on this, the aim of this PhD Thesis was to explore the potential use of CRISP proteins for the development of fertility regulation methods, and to investigate the molecular mechanisms by which epididymal CRISP proteins contribute to fertility through their involvement in fertilization and subsequent embryo development.

Based on previous results from our laboratory in rodents and primates showing that immunization with epididymal CRISP1 protein induces the production of specific antibodies capable of binding to sperm and inhibiting fertility without causing side effects, our first aim was to identify epididymal CRISP proteins in dogs as potential contraceptive targets for controlling the growing population of stray dogs. The results revealed the existence of a canine CRISP protein exclusively expressed in the epididymis and present in both epididymal and ejaculated sperm. Notably, this protein not only remains associated with sperm after capacitation but also relocates to the equatorial segment, a region involved in gamete fusion across all studied species. These observations, together with the finding that exposure of canine sperm to an antibody recognizing the canine CRISP protein significantly inhibited their ability to penetrate the cumulus cell layer surrounding the oocyte, support a role for this protein in fertilization and its potential use as a target for the development of a non-hormonal contraceptive method for dogs.

Given the subfertility observed in double KO mouse colonies lacking CRISP1 and CRISP4 (DKO 1/4) or CRISP1 and CRISP3 (DKO 1/3), associated with fertilization and embryo development defects, respectively, as well as the infertility reported in colonies lacking more than two CRISP proteins simultaneously, the second aim of this Thesis was to generate and characterize a novel triple KO (TKO) mouse line deficient in CRISP1, CRISP3 and CRISP4 in order to assess the relevance of different CRISP family members to fertility. The results indicated that, while the newly generated TKO line exhibited a more pronounced fertility decrease compared to DKO 1/4 and 1/3 models, it did not reach the infertility observed in the TKO 1/2/3

model previously studied. Reproductive phenotype analysis revealed no *in vivo* fertilization defects, in contrast to what was observed in the DKO 1/4 model and a significant reduction in embryo development similar to that seen in DKO 1/3 animals. Despite normal values in all sperm parameters analyzed, TKO sperm were almost unable to fertilize oocytes *in vitro*, consistent with what has been observed in all models lacking CRISP4. Altogether, these results confirmed that infertility does not depend only on the number of deleted CRISP proteins, but rather on the specific combination of the members deleted, contributing to a deeper understanding of the redundancy and functional compensation mechanisms operating within the CRISP protein family.

As the last aim of this Thesis, we investigated the molecular mechanisms through which the epididymal proteins CRISP1 and CRISP3 contribute to early embryo development, a process compromised in all mouse colonies lacking these two proteins. Results obtained using the DKO 1/3 model, which exhibits defects only at the level of embryo development, indicated that these defects are already present in epididymal sperm and are not due to delayed fertilization. An interesting finding was that oocytes fertilized *in vitro* by mutant sperm showed an arrest in meiotic resumption that was not caused by alterations in  $Ca^{2+}$  oscillations during oocyte activation, but rather by elevated levels of sperm DNA fragmentation acquired during the epididymal transit. Our observations also showed that exposing control sperm to epididymal fluid from mutant animals or to control fluid supplemented with  $Ca^{2+}$ , significantly increased sperm DNA fragmentation, and that both fresh and capacitated mutant sperm exhibited significantly higher intracellular  $Ca^{2+}$  levels. Altogether, these findings indicate that a dysregulation of  $Ca^{2+}$  homeostasis during epididymal maturation may compromise the integrity of sperm DNA, resulting in delayed meiotic resumption and subsequent defects in early embryo development highlighting the importance of epididymal maturation beyond its established role in the acquisition of sperm fertilizing ability.

We believe that the results obtained in this thesis using the CRISP protein family as a model will contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms involved in fertilization and embryogenesis, as well as to the development of methods for both fertility regulation and diagnosis, and treatment of infertility.

**Keywords: Fertility, fertilization, spermatozoon, oocyte, epididymis, CRISP proteins, contraception, embryo development, calcium signalling, DNA fragmentation.**

## Agradecimientos

Llegar hasta acá fue un viaje largo. Y por largo me refiero a seis años, que para las nuevas generaciones es prácticamente una era geológica. En este tiempo aprendí muchas cosas: a investigar, a existir en un laboratorio, a gestionar insumos, a planificar experimentos, a convivir con personas que sienten parecido y con otras que no tanto. Pero, sobre todo, aprendí a frustrarme, o mejor dicho, a convivir con la frustración y dejar de pelearme con ella. A entender que forma parte del camino, como una compañera molesta pero constante. Podría romantizar la ciencia y decir que fallar hace que los aciertos valgan más, pero no siempre es así. A veces fallar es simplemente fallar. Y aun así seguimos. Hasta que un día, sin cambiar absolutamente nada, funciona el ensayo de fertilización *in vitro*. Y lo más raro es que ya va a no dejar de funcionar.

Durante estos años también crecí. Cambié de década. Superamos una pandemia que lo atravesó todo. No quiero dejar de nombrársela a los posibles lectores del futuro muy muy lejano, porque a veces siento que la negamos y hacemos como que nada pasó, como si nos diera vergüenza. Cuando volvimos al laboratorio fue empezar de nuevo, literalmente desde cero. En este proceso, los compañeros de laboratorio se volvieron amigos del alma, personas que me vieron reír, llorar, y me ayudaron a tomar decisiones fundamentales de la vida.

Le quiero agradecer de corazón a mi directora Paty, quien me dio un lugar en su laboratorio cuando pensé que la ciencia argentina me había dado la espalda. Le agradezco no sólo por acompañarme y guiarme en mi doctorado, sino también por su cariño y preocupación por lo humano. Por elegirme como compañera de viajes y enseñarme de arte y también de cultura. Por jamás bajar los brazos ante ningún *deadline* o situación adversa de la vida.

Le agradezco también a mi co-directora Mariana, por su guía paciente, sus preguntas que me hicieron pensar mucho más allá de lo obvio y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Gracias por su particular forma de hacer que todo parezca positivo, incluso cuando los experimentos que no dan o las hipótesis se refutan. Gracias por los consejos de vida y por acompañarme en este camino hasta el final.

Quiero agradecerle a mis compañeros y compañeras de laboratorio, a los que están y a los que estuvieron. Gracias por compartir los días (y las noches), las frustraciones, los favores, las enseñanzas, las risas espontáneas y las locuras. Sobre todo, gracias por aguantar mis caras, mi humor y por entender que jamás fue personal. Gracias porque muchos quedan como amigos de la vida.

Gracias a Lucas por todas las charlas, sus enseñanzas, su parcimonia. También por su paciencia con la estadística y, en particular, su ayuda con las famosas oscilaciones de calcio.

Gracias a Abi por alegrar los día y por su incondicionalidad. Estuvo disponible para cualquier ayuda que siempre necesité.

A Jae que siempre tiene la palabra justa, la fuerza de empuje de una yunta de bueyes y una claridad para ver las cosas y encontrar soluciones que jamás antes había visto.

A Sol que me acompañó particularmente en mis primeros años y con quien compartí los tiempos de pandemia en la mesada, que me inició en la bioquímica de proteínas y me enseñó muchas de las cosas que sé hoy.

A Mili que, aunque ya no esté en el laboratorio, fue partícipe necesaria de mi formación y por antagonismo crecimos las dos.

En particular a Ludmila, con quien hoy no hablo y tampoco hablé mucho cuando la conocí porque se encontraba en el punto justo donde me estoy yo ahora, intentando cerrar una etapa, a las corridas y con caras. Ella fue el puntapié inicial para esta Tesis y el pilar fundamental para el nacimiento del proyecto de investigación que hoy mereció una publicación.

A Nico Brukman y Mati, con quienes compartí poco o nada de mesada, pero siempre fueron fuentes de consulta a la distancia, dispuestos a colaborar, a pensar y que me ayudaron con sus ideas a avanzar en mi proyecto.

A las personas nuevas que se incorporaron este último tiempo les digo: se vienen tiempos difíciles, el camino es arduo, pero no aprende quien no lucha y no sale adelante quien

no camina. Espero poder ser para ustedes guía, aunque sea a la distancia, como fueron los chicos de la generación anterior para mí.

A Vani y a Deb que como investigadoras tomaron el papel de compañeras, me recibieron y ayudaron en todas las elucubraciones y problemas experimentales casi tanto como si fueran otras directoras mías. A todo el laboratorio en su conjunto, gracias por las horas y horas de chismes.

Le quiero agradecer también a mis amigos Fede, Feli, Ailu, Viole, Sofi, Flor, Marian, Luca, Juan, Lauti, Momo y Gabi. A quienes conocí en la Universidad de Buenos Aires, me abrazaron y me ayudaron a atravesar la carrera. Me enseñaron a estudiar y hacer resúmenes, a entender las cosas con otra lógica y a que me importen cosas que antes no. Sin ellos yo no sería ni tan bióloga ni tan humana como lo soy hoy. Son un grupo de nerds que les gusta hablar de resultados casi tanto como de planificar vacaciones. Gracias.

A mis amigas de la vida Andi, Lu y Maca. Gracias por entender cada vez que desaparecí por estudiar o trabajar, por apoyarme incondicionalmente en cada cosa, por ser como un grupo de autoayuda y por felicitarme por logros que quizá nunca supe explicarles bien qué fueron.

Particularmente quiero agradecerle a mi familia. A mis viejos por el esfuerzo enorme que hicieron para que las circunstancias se dieran para que yo hoy esté acá. A mi vieja por incitarme a estudiar y ser curiosa, por ser ejemplo de esfuerzo y superación, por responder todas mis preguntas de por qué y por haberme obligado a aprender inglés. Particularmente, hoy por ser ejemplo de valentía y enseñarme la importancia de seguir los sueños sin importar qué. A mi viejo porque es la única persona que sé que realmente se sacaría una extremidad si yo la necesitara, de manera completamente literal. También por acompañarme y escucharme, entender mis distancias y mis locuras. A mi hermana por ser quien lleva la capitanía de la familia, por obligarme a interactuar y por estar siempre cerca, aunque esté tan lejos.

A Manu. Gracias por tu profundo amor y tu paciencia. Por tu escucha, tu ternura y por acompañarme incluso en mis momentos de mayor ansiedad. Por tener un proyecto de vida juntos. Con vos pensar encarar una nueva remodelación hasta parece algo divertido. Gracias

por reírte de mis chistes bobos. Gracias por ayudarme todos los días a ser mejor persona. Pero sobre todas las cosas, gracias por compartirme a la perrita, apoyo emocional completamente indispensable estos últimos años.

A Vanina Fontana, mi consejera de estudios, siempre predispuesta a ayudar, y al Comité de Seguimiento, integrado por los Dres. Pablo Cética y Rodolfo Rey, por sus valiosos aportes. En particular a Pablo, por la sentida charla que tuvimos una tarde sobre la incertidumbre del futuro y darme su apoyo en mis ideas voladas de cambiar.

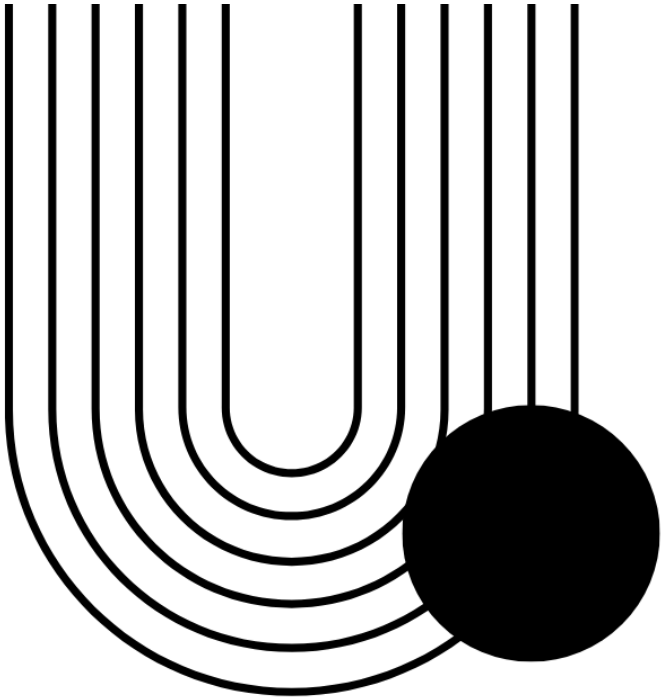
A las personas del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur y de la Facultad de Veterinaria de la UBA por su indispensable colaboración para la realización de los experimentos con muestras caninas.

No quiero olvidarme de nadie. Voy a agradecer a cada persona que me sostuvo cuando me tambaleaba, que celebró mis logros como propios, que me escuchó, que me esperó, que me hizo reír. A quienes no nombro, pero sí recuerdo. Gracias por haber estado.

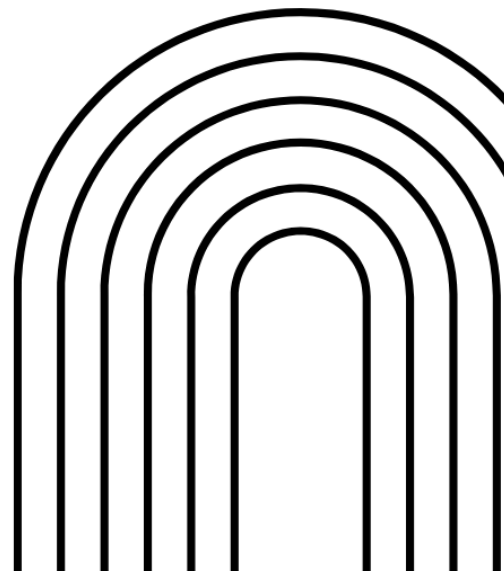
Le quiero agradecer particularmente a la Universidad de Buenos Aires por la excelencia, la exigencia y por permitirme hacer mi doctorado. Al IByME por la hermosa red de investigación que brinda, el espacio para pensar y crecer y las puertas que me ha abierto. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA) por brindar el apoyo económico para la realización de esta Tesis. Y nombrando a estas tres instituciones, quiero agradecer sobre todo al pueblo de la República Argentina. Esta Tesis es de y gracias a todos ustedes, quienes bancan un sistema de enseñanza superior y formación científica de excelencia, que es esencial para el crecimiento de un país. Deseo fuertemente que la época vigente de desprestigio a la ciencia, a los científicos y a las instituciones que los albergan sea pasajera y que la ciencia argentina no deje nunca de formar profesionales envidiados y deseados por el mundo entero por el entusiasmo y la pasión que tenemos por nuestro trabajo.

## Índice

<b>Introducción</b> .....	11
<i>El tracto reproductor femenino</i> .....	12
<i>Ovocito: la gameta femenina</i> .....	14
<i>El tracto reproductor masculino</i> .....	18
<i>Espermatozoide: la gameta masculina</i> .....	22
Maduración epididimaria .....	26
Eyaculación y transporte .....	29
Capacitación espermática .....	32
<i>Producción de cAMP, activación de PKA</i> <i>y fosforilación de proteínas en tirosina</i> .....	34
<i>Incremento del calcio intracelular</i> .....	35
<i>Hiperpolarización</i> .....	39
<i>Reacción acrosomal</i> .....	40
<i>Hiperactivación</i> .....	42
Fertilización .....	45
<i>Penetración del cumulus oophorus</i> .....	46
<i>Interacción espermatozoide-Zona Pelúcida</i> .....	47
<i>Fusión del espermatozoide con el ovocito</i> .....	49
<i>Activación del ovocito y desarrollo preimplantatorio</i> .....	55
<i>Las proteínas CRISP y su rol en la reproducción</i> .....	58
Proteína CRISP1.....	62
Proteína CRISP2.....	70
Proteína CRISP3.....	73
Proteína CRISP4.....	75
Estudio del rol de las CRISP mediante el uso de múltiples KO .....	78
<i>Colonia doble KO para CRISP1 y CRISP4 (DKO 1/4)</i> .....	79
<i>Colonia doble KO para CRISP2 y CRISP4 (DKO 2/4)</i> .....	81
<i>Colonia doble KO para CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3)</i> .....	82
<i>Colonias carentes de más de 2 proteínas CRISP</i> .....	84
<b>Objetivos</b> .....	89
<b>Materiales y métodos</b> .....	92
<b>Resultados</b> .....	113
<i>Capítulo I</i> .....	114
<i>Capítulo II</i> .....	133
<i>Capítulo III</i> .....	148
<b>Discusión</b> .....	165
<i>Capítulo I</i> .....	166
<i>Capítulo II</i> .....	176
<i>Capítulo III</i> .....	186
<b>Conclusión</b> .....	194
<b>Abreviaturas</b> .....	198
<b>Referencias</b> .....	201



# Introducción

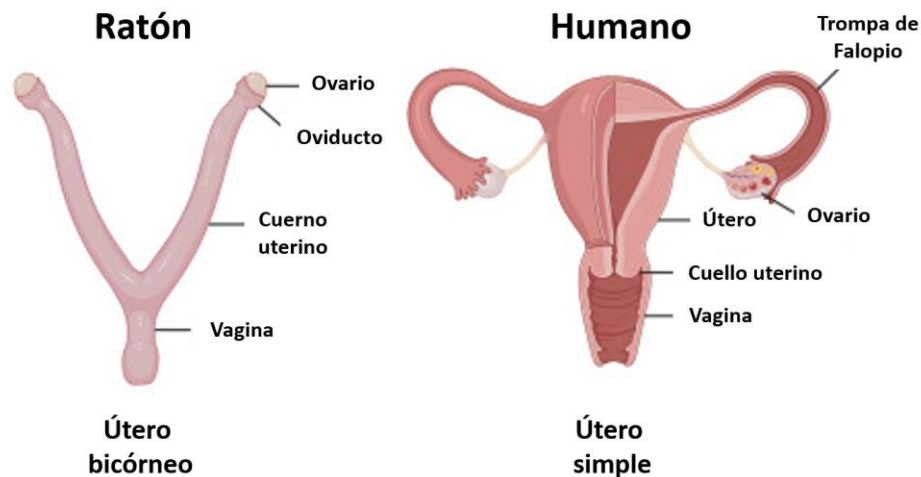


La fertilización en mamíferos es un proceso mediante el cual el espermatozoide y el ovocito se fusionan para dar origen a un nuevo individuo con una composición genética única, distinta a la de sus progenitores. Estas células altamente complejas, denominadas gametas, deben encontrarse en el momento y lugar adecuados dentro del tracto reproductor femenino para que la fertilización sea exitosa, en un proceso que involucra una secuencia ordenada y precisa de eventos que aún no ha sido completamente caracterizada. Por ello, el estudio de los mecanismos que lo regulan resulta fundamental, ya que permite profundizar en el conocimiento de la biología reproductiva y favorece el desarrollo de nuevas estrategias tanto para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad como para la regulación de la fertilidad (Florman & Fissore, 2015; Yanagimachi, 2022).

El proceso de gametogénesis (*formación de gametas*) comienza durante la embriogénesis con la formación de células germinales primordiales en la pared posterior del intestino primitivo (saco vitelino definitivo). Posteriormente, estas células migran hacia la cresta genital (lugar donde se desarrollará la gónada) diferenciándose en oogonias (en la hembra) o espermatogonias (en el macho). A continuación, se describen los tractos reproductivos y los procesos de gametogénesis tanto de hembras como de machos y las características principales de las gametas maduras. Posteriormente, se detallan las diferentes etapas involucradas en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

### **El tracto reproductor femenino**

El tracto reproductor femenino está conformado por los ovarios, los oviductos o trompas de falopio, el útero, el cérvix y la vagina. Los ovarios, ubicados a ambos lados de la cavidad pélvica y próximos a su pared posterior, presentan una estructura compuesta por una corteza externa, donde se localizan los ovocitos en desarrollo, y una médula central rica en tejido conjuntivo y vasos sanguíneos (Austin & Short, 1972; Jones *et al.*, 2018). En roedores, los ovarios están conectados al útero a través de los oviductos, mientras que en humanos esta conexión se da mediante las trompas de Falopio (**Figura 1**).



**Figura 1. Morfología del tracto reproductor femenino y variaciones en mamíferos.** Diagrama del tracto reproductor femenino en humano (A) y ratón (B) (modificado de Machado et al., 2022).

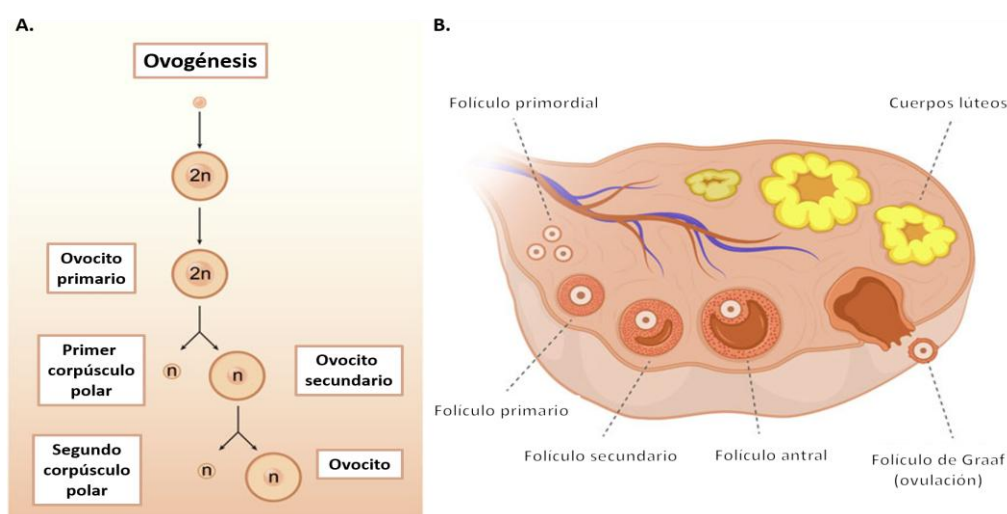
La fertilización ocurre en la región del oviducto más cercana al ovario, denominada *ampulla*, mientras que la zona media del oviducto, denominada *isthmus*, actúa como un reservorio temporal de espermatozoides previo a la fertilización (Hunter 1995; Suarez & Pacey 2006). Finalmente, el segmento inferior del oviducto se comunica con el útero a través de la unión útero-tubárica (UTJ por sus siglas en inglés *uterotubal junction*). La UTJ presenta una estructura variable entre especies, aunque en la mayoría de los mamíferos es una región estrecha que representa un desafío para el transporte de los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino (Fujihara *et al.*, 2018; Suarez, 2014). El útero, ubicado entre los oviductos y la vagina, se extiende a lo largo de la cavidad abdominal dorsal. A diferencia de los ovarios y los oviductos, que son estructuras pares, el útero es una única cavidad en primates, mientras que en la mayoría de los mamíferos es bicórneo (Machado *et al.*, 2022). En ratones, aunque los cuernos uterinos parecen fusionados, permanecen separados por un tabique central y desembocan en la vagina a través de sus respectivos conductos cervicales.

Desde el punto de vista histológico, el útero está compuesto por tres capas diferenciadas: la serosa externa, el miometrio o capa muscular media, y el endometrio interno, encargado de albergar y nutrir al embrión en desarrollo (Ham *et al.*, 1970). Además

de su función en la gestación, se ha observado que las contracciones musculares inducidas por la estimulación nerviosa durante el apareo favorecen el desplazamiento de los espermatozoides hacia las partes superiores del oviducto en los minutos posteriores a la cópula.

### Ovocito: la gameta femenina

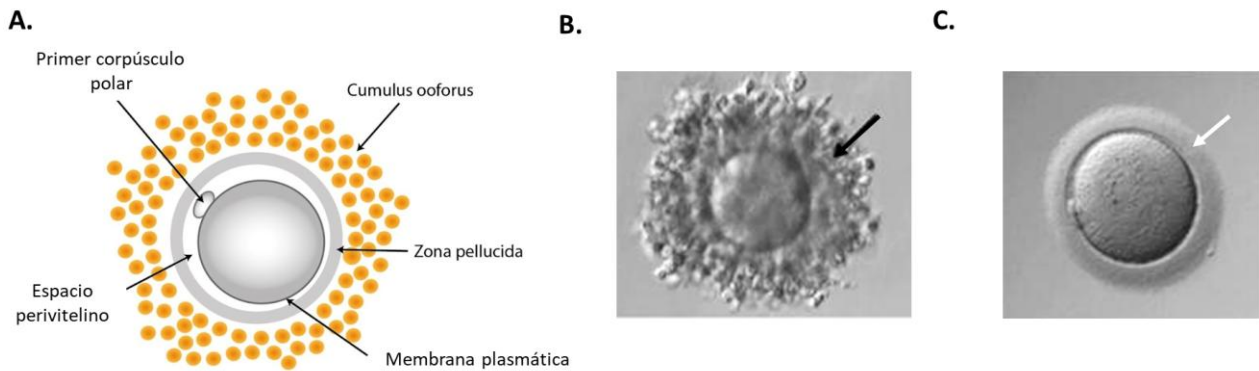
Los ovocitos se originan a partir de un número limitado de células pluripotenciales de origen extragonadal, las cuales migran hacia la gónada primitiva en las primeras etapas de la embriogénesis (Austin & Short, 1972; Freeman, 2003). Con la diferenciación del ovario, estas células germinales primordiales comienzan su desarrollo, dando lugar a los ovocitos en la vida adulta (Jones *et al.*, 2018; Wassarman, 1988a). La ovogénesis se inicia con la proliferación mitótica de estas células, denominadas ovogonias, que, posteriormente, durante el desarrollo embrionario, comienzan la síntesis de ADN en preparación para la meiosis (**Figura 2.A**). En esta etapa, pierden su pluripotencialidad y se transforman en ovocitos primarios. Al nacer, la hembra ya posee un número finito de ovocitos, los cuales permanecen detenidos en Profase I de la meiosis hasta la pubertad, cuando retoman su crecimiento en conjunto con células somáticas dentro de unas estructuras denominadas folículos.



**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 (modificado de Yao *et al.*, 2023).

Durante la fase periovulatoria, la acción hormonal estimula la reanudación de la meiosis en un ovocito, que sufre una primera división meiótica. Debido a una distribución asimétrica del citoplasma, se generan dos células: el ovocito, que retiene la mayor parte del citoplasma y tiene el potencial de originar un embrión, y el corpúsculo polar (CP), que contiene una mínima cantidad de citoplasma y está destinado a la apoptosis. En cada ciclo menstrual o estral, dependiendo de la especie, un número determinado de ovocitos alcanza la ovulación (**Figura 2.B**). En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son liberados en Metafase II (MII) junto con el primer corpúsculo polar, dentro de folículos preovulatorios o de Graaf, a excepción de contadas especies como los caninos, en la cual los ovocitos son ovulados en Profase I (inmaduros) y la reanudación de la primera etapa de la meiosis ocurre entre 48 y 72 horas luego de la ovulación (Chastant-Maillard *et al.*, 2011). La meiosis II sólo se completa tras la entrada del espermatozoide en el ovocito, lo que desencadena la expulsión del segundo CP. En caso de no producirse la fertilización, el ovocito secundario degenera sin completar la meiosis. Así, la meiosis en las hembras comienza durante la etapa fetal, se mantiene en pausa hasta la madurez y sólo finaliza con la fertilización.

En los mamíferos euterios, el ovocito ovulado es una célula esférica cuyo diámetro varía entre 70 y 120  $\mu\text{m}$  según la especie. Se encuentra rodeado por una matriz extracelular denominada zona pelúcida (ZP) y, más externamente, por varias capas de células de la granulosa y una matriz extracelular que, en conjunto, forman el denominado *cumulus-oophorus*. La estructura conformada por el ovocito, la ZP, las células del cúmulus y su matriz extracelular recibe el nombre de complejo cúmulus-ovocito (COC). Entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito se encuentra el espacio perivitelino, compuesto por una matriz extracelular sintetizada, principalmente, por el ovocito, junto con moléculas y fluido provenientes de las células circundantes (Talbot & Dandekar, 2003) (**Figura 3**).



**Figura 3. La gameta femenina.** **A.** Esquema representando un complejo cúmulo-ovocito (COC) y sus componentes. **B.** Micrografía de un COC humano. La flecha negra señala el cúmulo ooforus. **C.** Micrografía de un ovocito humano que ha sido denudado de las células del cúmulo. La flecha blanca señala la ZP. **B.** y **C.** fueron modificados de Maggiulli et al., (2012).

El ovocito está compuesto por la membrana plasmática (u oolema) que rodea al citoplasma (u ooplasma). Una característica distintiva del oolema es la presencia de microvellosidades en toda su superficie, a excepción de una pequeña área que recubre el huso meiótico donde rara vez ocurre la fusión con el espermatozoide (Ducibella, 1991; Matsudaira, 1990; O'Rand *et al.*, 1986; Shalgi & Phillips, 1980). Al igual que en otras células, dentro del ooplasma se localizan organelas esenciales como las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, que son cruciales para los procesos metabólicos del ovocito. En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la capa de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas por una membrana (Ducibella, 1991). Estos gránulos se desarrollan durante el crecimiento del ovocito, y su aparición está asociada con la expansión del aparato de Golgi (Ducibella *et al.*, 1994). La liberación de los gránulos corticales tras la fertilización juega un papel fundamental en el desarrollo de un embrión viable, ya que garantiza la entrada de un solo espermatozoide al ovocito (Yanagimachi, 1994).

La ZP es una matriz glicoproteica cuya composición está formada por componentes sintetizados por el propio ovocito (Wassarman, 1988b), que se depositan alrededor de éste durante su crecimiento (Philpott *et al.*, 1987; Roller *et al.*, 1989). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares siguen en contacto con el ovocito a través de uniones estrechas tipo

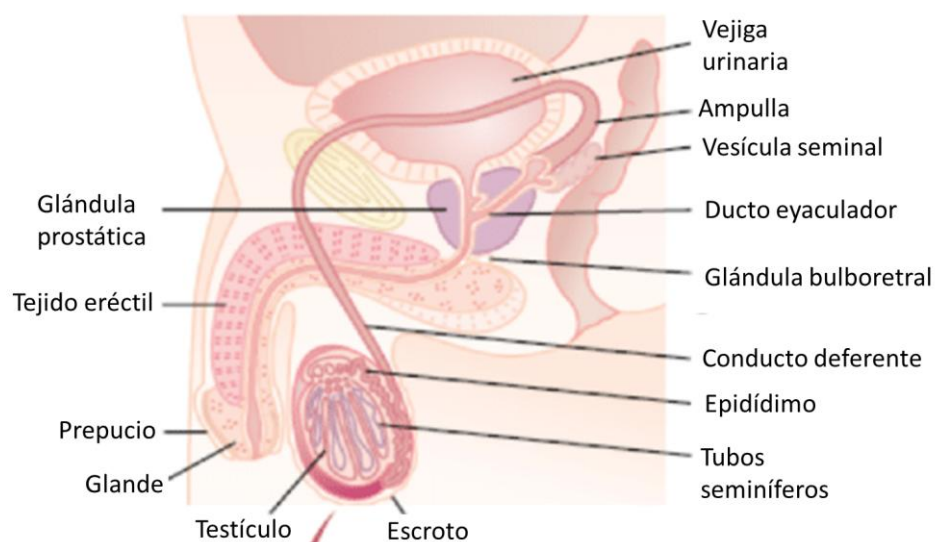
gap entre el oolema y las extensiones de las células del cúmulus, lo que es importante para mantener las funciones nutricionales y regulatorias que las células foliculares ejercen sobre el ovocito (Austin & Short, 1972; Florman & Fissore, 2015). La ZP está compuesta principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias, dependiendo de la especie (Lefièvre *et al.*, 2004; Wassarman, 1988b). Los estudios realizados por los Dres. Paul Wassarman y Jurrien Dean, utilizando el ratón como modelo, han permitido profundizar en la bioquímica, la estructura y la función de la ZP, determinando que tres proteínas altamente glicosiladas, ZP1, ZP2 y ZP3, conforman la ZP, siendo ZP2 y ZP3 las más abundantes y esenciales para la fertilidad (Hoodbhoy & Dean, 2004; Rankin *et al.*, 2001; Wassarman, 1988b; Wassarman & Litscher, 2001).

Como se mencionó previamente, en la mayoría de los mamíferos, el *cúmulus oophorus* rodea la ZP y está compuesto por un conjunto de células de la granulosa conocidas como células del cúmulus, inmersas en una matriz extracelular. Dentro del folículo ovárico, estas células están interconectadas mediante uniones tipo GAP. Tras el pico de gonadotrofinas previo a la ovulación, las células del cúmulus incrementan la producción de matriz extracelular, lo que provoca un aumento del volumen de los COC entre 20 y 40 veces su tamaño original. Este fenómeno es denominado “expansión del cúmulus” (Zhuo & Kimata, 2001). Inicialmente, se consideraba que el ácido hialurónico era el principal componente de la matriz del cúmulus (Eppig, 1979). Sin embargo, estudios posteriores identificaron otros elementos, especialmente glicosaminoglicanos y proteínas producidos por las células de la granulosa, que también desempeñan un papel clave en la estructura de esta matriz (Zhuo & Kimata, 2001). Además de estos componentes, hay factores extrafoliculares de origen plasmático que podrían influir en la composición y estabilidad de la matriz del cúmulus. Se ha comprobado que los ovocitos euterios pueden ser fertilizados tanto *in vitro* como *in vivo* aún en ausencia de las células del cúmulus (Bedford, 2004; Yanagimachi, 1994). Esto sugiere que su presencia no es estrictamente necesaria para la interacción entre gametas. No obstante, diversas investigaciones han resaltado los efectos positivos del cúmulus en el proceso de fertilización (Chen *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994). Se ha propuesto que ciertos factores solubles presentes en el cúmulus podrían estimular la motilidad de los espermatozoides y facilitar la fertilización (Roblero *et al.*, 1990; Schroer *et al.*, 2000). Adicionalmente, se ha planteado que el cúmulus cumple otras funciones tales como proteger al ovocito del

envejecimiento y endurecimiento (*hardening*) de la ZP, aumentar el volumen de los ovocitos y las posibilidades de que los espermatozoides los encuentren dentro de la *ampulla* (Bedford & Kim, 1993), guiar a los espermatozoides hacia el ovocito a través de un proceso de quimiotaxis (Ernesto *et al.*, 2015 ; Kaupp *et al.*, 2008; Yoshida & Yoshida, 2011), fijar al ovocito y facilitar la penetración de la ZP (Yudin *et al.*, 1988), prolongar la viabilidad de los espermatozoides, seleccionar aquellos con mayor capacidad fertilizante (Roblero *et al.*, 1990; Tanghe *et al.*, 2002) y contribuir al desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 1995). En consecuencia, aunque no es indispensable para la interacción entre gametas, la presencia del cúmulus favorece significativamente el éxito de la fertilización (Florman & Ducibella, 2006).

### El tracto reproductor masculino

El tracto reproductor masculino está conformado principalmente por los testículos, epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias, uretra y pene (**Figura 4**).



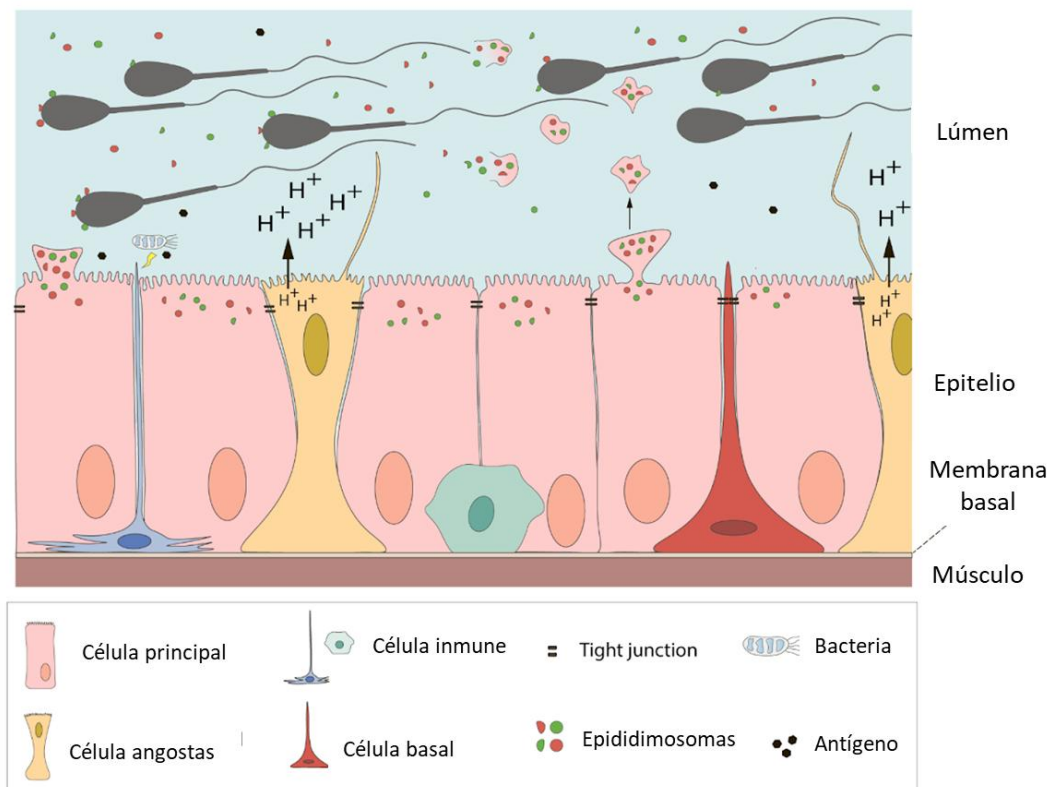
**Figura 4. Tracto reproductor masculino.** Esquema mostrando diferentes órganos que conforman el sistema reproductor masculino.

Los testículos son órganos pares compuestos por varios lóbulos que contienen túbulos seminíferos, los cuales están separados por tejido intersticial. Dentro de estos túbulos se

encuentra la línea germinal, responsable de la formación de los espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis (que se detallará más adelante) (Austin & Short, 1972). Además, los túbulos contienen células de Sertoli, cuya función es proporcionar y mantener un microambiente adecuado para el desarrollo de los espermatozoides. Estas células poseen una morfología particular, ya que se apoyan en la membrana basal y se extienden hasta el lumen del epitelio seminífero, rodeando a las células germinales. Las células de Sertoli están unidas por complejas uniones estrechas, formando una barrera que restringe el paso de moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos, entre las células adyacentes. Esta propiedad define la barrera hemato-testicular, la cual aísla a las células haploides del sistema inmunológico. Este aislamiento es crucial porque los espermatozoides diferenciados aparecen en el tracto masculino sólo tras la madurez sexual, cuando el sistema inmune ya ha alcanzado su pleno desarrollo y ha establecido sus mecanismos de inmunotolerancia. Es por eso que, a diferencia de la mayoría de los tejidos y órganos, los espermatozoides son particularmente vulnerables a la respuesta inmunológica. Sin embargo, la idea tradicional de que la barrera hemato-testicular es la única responsable del privilegio inmunológico no concuerda completamente con los conceptos actuales sobre tolerancia inmunológica y la organización histológica del tracto reproductor. Estudios más recientes han enfatizado el papel regulador de células inmunológicas como macrófagos, linfocitos y células dendríticas, así como la acción de diversos factores inmunosupresores, entre ellos citoquinas inmunorreguladoras, esteroides androgénicos y otros agentes antiinflamatorios. Se ha comprobado que la función reproductiva normal depende en gran medida del equilibrio de este microambiente inmunológico (Fomichova *et al.*, 2024; Hedger, 2014).

Una vez completada su formación en los testículos, los espermatozoides son transportados a través de los conductos eferentes hasta el epidídimo. Este órgano, compuesto por un único conducto de gran longitud y múltiples circunvoluciones, recubre el borde posterior del testículo y desempeña un papel fundamental en la maduración, transporte, protección y almacenamiento de los espermatozoides. Al igual que los testículos, el epidídimo posee una barrera funcional denominada barrera hemato-epididimaria. Sin embargo, ésta es menos restrictiva que la barrera testicular, ya que es más común encontrar leucocitos luminales e inmunoglobulinas en el lumen epididimario en comparación con los túbulos seminíferos. Además, el epidídimo alberga diversas células inmunitarias intraepiteliales,

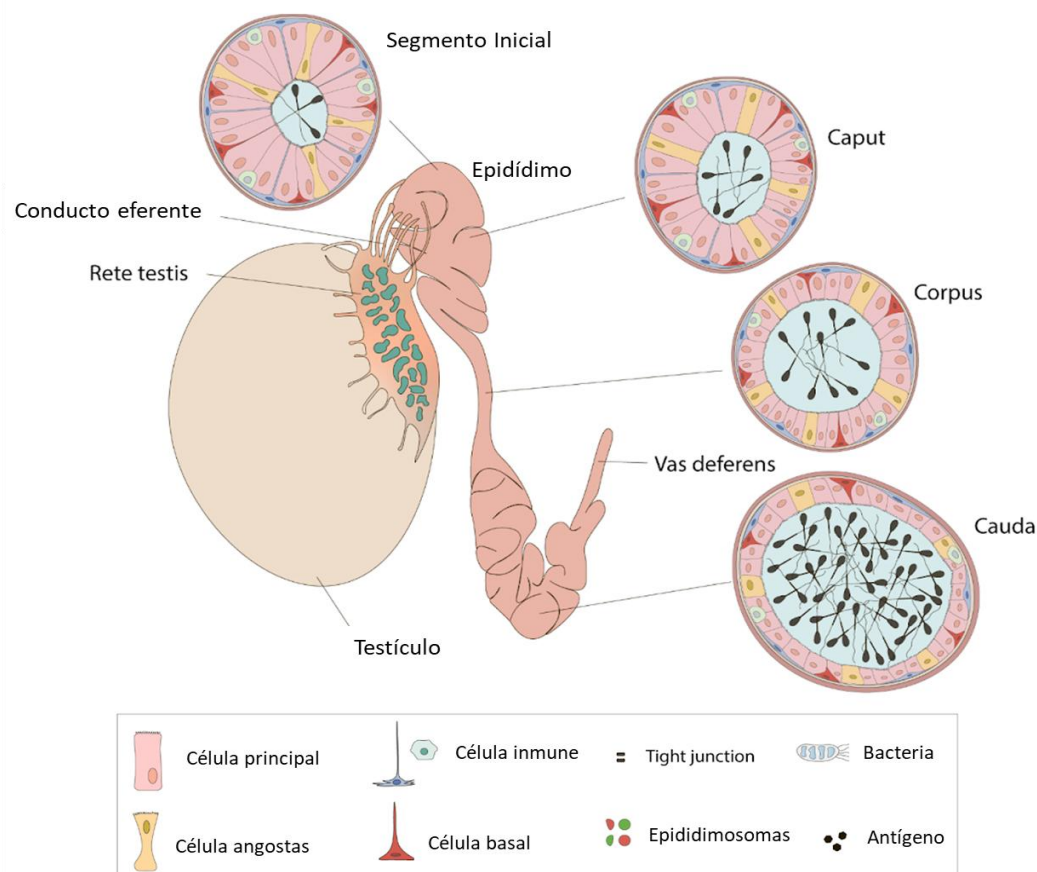
incluidas células dendríticas y macrófagos, que contribuyen a un ambiente inmunotolerante particular (**Figura 5**).



**Figura 5. Representación de las interacciones entre los espermatozoides y el epitelio epididimario.** El epitelio del epidídimo está compuesto por diversos tipos celulares, cada uno con funciones específicas que contribuyen a la formación de una barrera física y a la creación de un ambiente inmunotolerante. Este entorno protege a los espermatozoides del sistema inmunológico y de posibles patógenos o infecciones, además de proporcionar un microambiente óptimo para su maduración mediante la regulación de la composición del fluido luminal, manteniendo el pH luminal y liberando vesículas que transfieren ARN y proteínas (epididimosomas). Modificado de Weigel Muñoz *et al.*, (2024).

Aunque no existen límites anatómicos precisos, el epidídimo suele dividirse en cuatro regiones principales: el segmento inicial (SI), la cabeza o *caput*, el cuerpo o *corpus* y la cola o *cauda*. Aunque todas estas regiones están compuestas por los mismos tipos celulares, presentan diferencias en la proporción de cada tipo celular como así también en su morfología general (**Figura 6**). Conforme el conducto avanza hacia la región del *cauda*, el epitelio se torna más delgado y el diámetro del túbulo aumenta, permitiendo el almacenamiento de millones

de espermatozoides hasta su eyaculación (Markey & Meyer, 1992). El lumen de esta región presenta características fisicoquímicas particulares que lo distinguen del resto del epidídimo: una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  marcadamente reducida, lo cual contribuye a mantener a los espermatozoides en un estado quiescente (Weissgerber *et al.*, 2012), un pH ligeramente ácido (Newcombe *et al.*, 2000), una composición iónica específica con niveles bajos de sodio y cloruro, y una relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  invertida en comparación con otros compartimientos extracelulares (Shum *et al.*, 2022). Además, contiene proteínas específicas y componentes antioxidantes que protegen a los espermatozoides del daño oxidativo durante su almacenamiento prolongado (O'Flaherty, 2019).



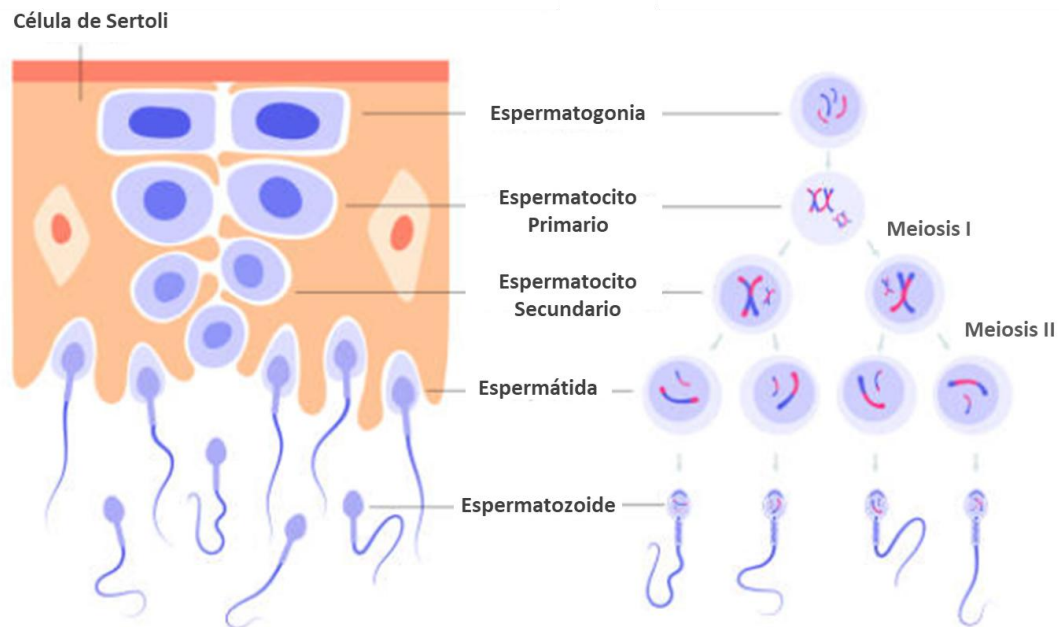
**Figura 6. Esquema mostrando secciones de las diferentes regiones del epidídimo.** Luego de la espermatogénesis, los espermatozoides son recolectados desde el testículo a través de la *rete testis* y entran al epidídimo mediante los conductos eferentes. Anatómicamente, el epidídimo se divide en cuatro secciones: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*. A medida que el lumen del túbulo epididimario se ensancha, el epitelio se vuelve más delgado en las secciones más distales del órgano. Los espermatozoides se almacenan en el *cauda* y, durante

la eyaculación son transportados a través del conducto deferente (*vas deferens*). Modificado de Weigel Muñoz *et al.*, (2024).

Finalmente, durante la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbo-uretrales) y son transportados a través de los conductos deferentes (o *vas deferens*) hasta la uretra (Eddy & O'Brien, 1994), donde serán finalmente depositados en el tracto reproductor femenino.

### **Espermatozoide: la gameta masculina**

Como se mencionó previamente, la producción de espermatozoides ocurre en los testículos mediante un proceso conocido como espermatogénesis (Austin & Short, 1972). Al igual que en la hembra, este proceso se inicia con la formación de células germinales primordiales (espermatogonias) durante la vida embrionaria y requiere de la meiosis para la generación de gametas haploides (**Figura 7**). Sin embargo, a diferencia de la ovogénesis en la que todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario, en los machos la espermatogénesis comienza después de la pubertad y continúa a lo largo de toda la vida adulta. A partir de ese momento, una parte de las células germinales se mantiene en proliferación por mitosis, mientras que otra se diferencia en espermatocitos primarios. Estos ingresan a la meiosis, dando lugar a los espermatocitos secundarios, los cuales experimentan una breve interfase antes de completar la segunda división meiótica, originando así las espermatidas. Estas células esféricas sufren una serie de modificaciones estructurales en un proceso conocido como espermiogénesis, que incluye la pérdida de citoplasma, la condensación del núcleo y la formación de estructuras especializadas como la cola y el acrosoma, esenciales para la función del espermatozoide. Debido a la eliminación casi total del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria celular necesaria para la síntesis de proteínas, el metabolismo de lípidos y el transporte vesicular. Finalmente, los espermatozoides son liberados en el lumen de los túbulos seminíferos a través de un proceso denominado espermiación (Valli *et al.*, 2014).

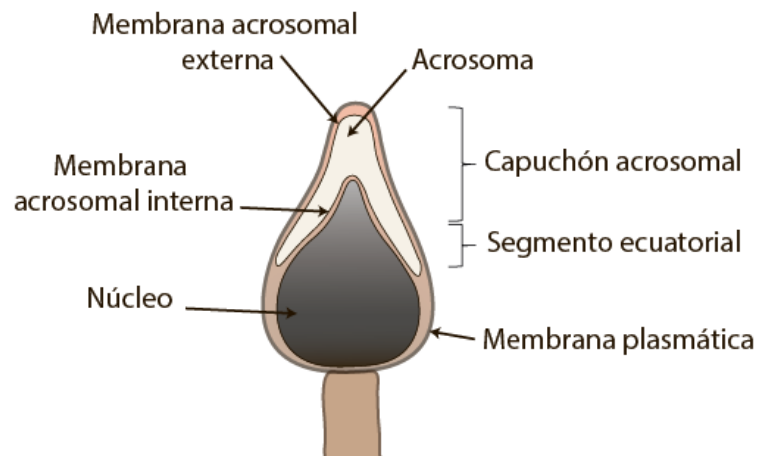


**Figura 7. Proceso de espermatogénesis.** A la izquierda, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis masculina y, a la derecha, se esquematizan los diferentes estadios celulares presentes durante la espermatogénesis en un corte transversal de un túbulo seminífero.

El espermatozoide es una célula altamente especializada cuya función principal es desplazarse a través del tracto reproductor femenino hasta alcanzar el sitio de fertilización y fusionarse al ovocito. Aunque existen variaciones en la forma y tamaño de los espermatozoides entre distintas especies de mamíferos, todos comparten una estructura general similar. Morfológicamente, el espermatozoide se compone de dos partes principales: la cabeza y la cola o flagelo (Darszon *et al.*, 2011; Eddy & O'Brien, 1994).

En la cabeza del espermatozoide se encuentran dos estructuras esenciales: el núcleo, caracterizado por una cromatina altamente compactada, y el acrosoma, una organela clave para la fertilización (Eddy & O'Brien, 1994) (**Figura 8**). El tamaño del núcleo es considerablemente menor en comparación con otras células, lo que se debe a que el ADN está asociado con protaminas, unas proteínas básicas de bajo peso molecular que permiten un empaquetamiento más compacto de la cromatina en comparación con las histonas de las células somáticas. Además, la envoltura nuclear del espermatozoide es atípica, ya que sus

membranas se encuentran muy próximas entre sí y presentan una baja cantidad de poros nucleares.



**Figura 8. Morfología de la cabeza del espermatozoide.** Estructura interna de una cabeza de un espermatozoide genérico.

El acrosoma, por su parte, es una estructura membranosa que recubre la parte anterior del núcleo y tiene su origen en el aparato de Golgi. Su tamaño y forma varían entre especies y suelen estar relacionadas con la morfología de la cabeza del espermatozoide. A pesar de tener una membrana continua, se distinguen dos regiones: la membrana acrosomal interna, que está en contacto con la envoltura nuclear externa, y la membrana acrosomal externa, situada bajo la membrana plasmática. Además, el acrosoma presenta dos regiones funcionalmente diferenciadas: el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial. En cuanto a su composición, el acrosoma alberga diversas moléculas con actividad enzimática que facilitan la penetración del espermatozoide a través de las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. No obstante, estudios de microscopía y análisis diferenciales de proteínas sugieren que esta organela no solo actúa como un depósito de enzimas solubles, sino que su estructura funcional está organizada mediante una matriz intra-acrosomal (Foster & Gerton, 2016; Kim & Gerton, 2003; Yanagimachi & Bhattacharyya, 1988).

Las dos enzimas acrosomales mejor estudiadas son la acrosina, una serín-proteasa, y la hialuronidasa, ambas expresadas específicamente en las células espermatogénicas (Díaz-Pérez *et al.*, 1988; Díaz-Pérez & Meizel, 1992; Takano, 1993). Aunque el acrosoma comparte

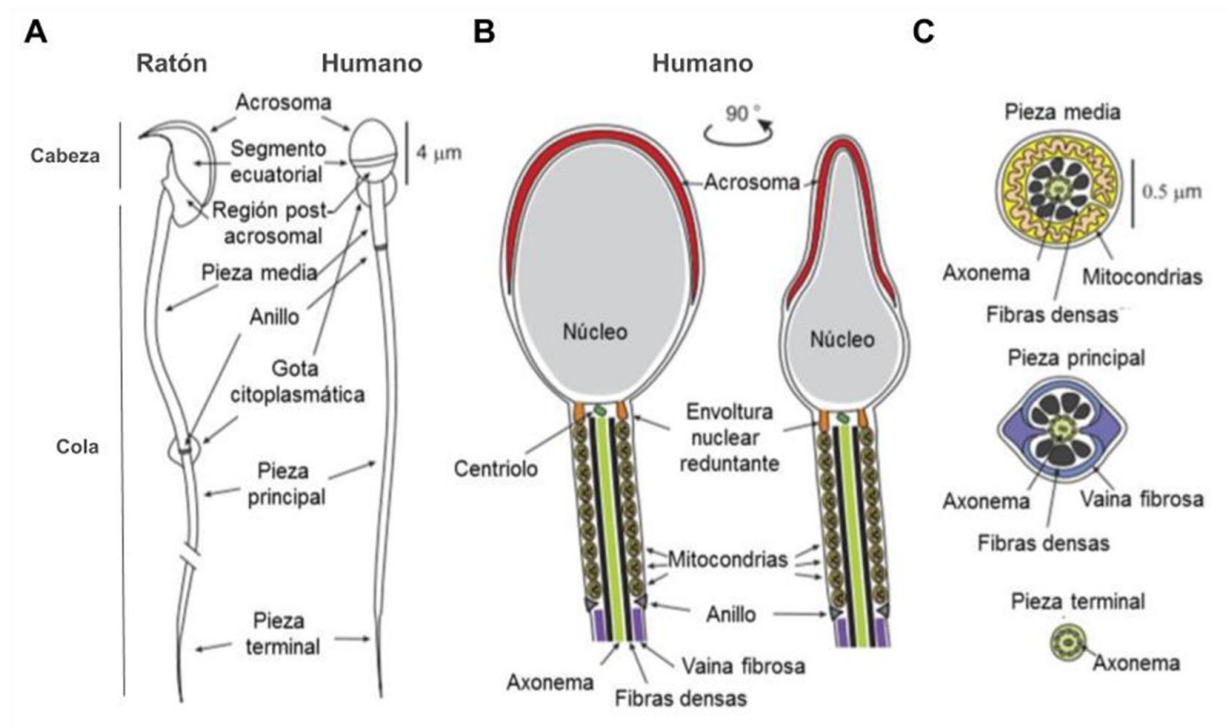
características con los lisosomas debido a su contenido enzimático, también se asemeja a una vesícula secretora, ya que libera sus componentes mediante exocitosis en respuesta a señales internas durante la capacitación, un proceso indispensable que sufre el espermatozoide gracias a los estímulos externos durante la interacción con el tracto reproductor femenino.

En la cabeza del espermatozoide también se encuentran estructuras del citoesqueleto organizadas en dos regiones: el citoesqueleto sub-acrosomal o *perforatorium*, ubicado entre el acrosoma y el núcleo, y compuesto principalmente por material denso, y el citoesqueleto post-acrosomal, que se sitúa entre el núcleo y la membrana plasmática en la región posterior de la cabeza del espermatozoide (Oko & Sutovsky, 2009). En la mayoría de los mamíferos, incluyendo el ser humano y varias especies domésticas como el perro, el toro y el caballo, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada, con el núcleo y el acrosoma como estructuras simétricas y aplanadas en el eje longitudinal de la célula. Sin embargo, en ciertas especies, como el hámster y el cobayo, el acrosoma presenta una protrusión perpendicular a este plano. En la mayoría de los roedores, la cabeza del espermatozoide tiene una forma de hoz, con el acrosoma ocupando la parte convexa del núcleo (**Figura 9.A**).

La cola o flagelo del espermatozoide en mamíferos se divide en cuatro segmentos: el cuello o pieza conectora, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Eddy & O'Brien, 1994; Darszon *et al.*, 2011) (**Figura 9.A**). Su estructura principal es el axonema, compuesto por un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de nueve pares de microtúbulos, siguiendo el patrón característico "9+2". Alrededor del axonema, desde la pieza conectora hasta la pieza principal, se disponen nueve fibras densas formadas por proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras mediante múltiples puentes disulfuro sugiere que contribuyen a la elasticidad y flexibilidad necesarias para el movimiento flagelar del espermatozoide.

En la pieza media de la cola se encuentra la vaina mitocondrial, una estructura compuesta por mitocondrias dispuestas de extremo a extremo en forma helicoidal, cuya función sería proporcionar energía para la motilidad espermática (**Figura 9.B**). A medida que se avanza hacia la pieza principal, la vaina mitocondrial es reemplazada por la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales conectadas por estructuras transversales. La disposición compacta y la organización de las fibras en la vaina fibrosa desempeñan un papel

crucial en la regulación del patrón de batido de la cola. Finalmente, la pieza terminal está compuesta únicamente por el axonema, sin otros elementos estructurales adicionales (Darszon et al. 2011; Toshimori & Eddy 2014) (**Figura 9.C**).

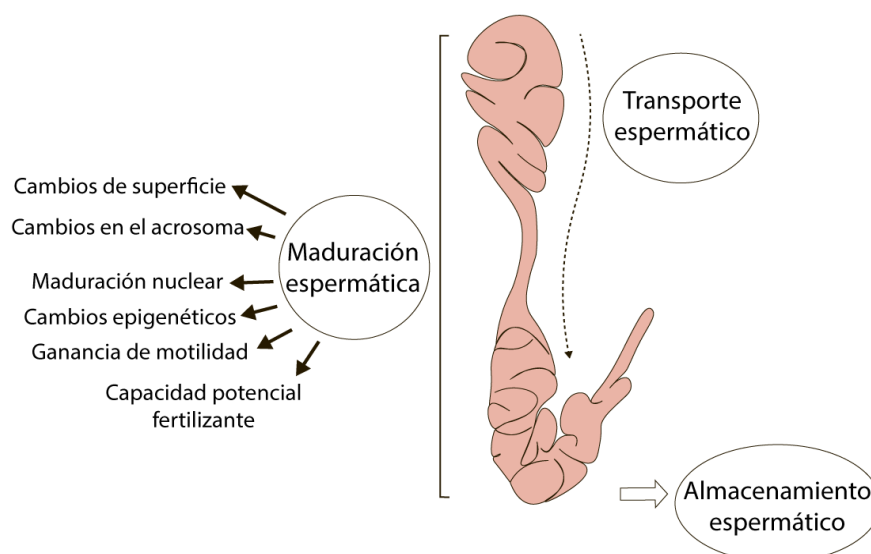


**Figura 9. Estructuras del espermatozoide.** **A.** Esquema de un espermatozoide de ratón y otro de humano en el que se muestran las diferentes estructuras de la cabeza y la cola. **B.** Esquemas de corte sagital de espermatozoides espatulado y con forma de gancho donde se muestra disposición de vaina mitocondrial. **C.** Cortes transversales del flagelo en las diferentes secciones (modificado de Darszon *et al.*, 2011).

### Maduración epididimaria

A pesar de ser células altamente diferenciadas, los espermatozoides recién liberados del testículo aún no poseen la capacidad de desplazarse de manera progresiva ni de interactuar con el ovocito. Para alcanzar la competencia funcional, llegar a la *ampulla*, y ser capaces de fertilizar, deben experimentar diversas modificaciones post-testiculares a lo largo de su tránsito por el epidídimo, proceso denominado maduración epididimaria, y por el tracto reproductor femenino, proceso denominado capacitación (Yanagimachi, 1994).

El proceso de maduración espermática es dependiente de andrógenos (Robaire & Hinton, 2015) y consiste en una serie de modificaciones bioquímicas y funcionales. Es llevado a cabo gracias al microambiente altamente especializado y específico de cada segmento epididimario (Weigel Muñoz *et al.*, 2024) (**Figura 10**). Recientemente, se describió que la dependencia androgénica es mediada por la SUMOilación del receptor de andrógenos en células epiteliales epididimarias, dado que en un modelo murino carente de dicho mecanismo, la espermatogénesis ocurre correctamente pero los espermatozoides fallan en adquirir su capacidad fertilizante (Zhang *et al.*, 2019). Las modificaciones que sufren los espermatozoides incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales como la eliminación de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, además de adaptaciones metabólicas como el aumento en el consumo de oxígeno. Es importante destacar que la mayoría de estos cambios ocurren a nivel de la membrana plasmática. A nivel molecular y bioquímico, se observan alteraciones en la carga superficial, en la capacidad de unión de lectinas, en la composición lipídica y en los carbohidratos y proteínas de la superficie celular (Toshimori & Eddy 2014). Estos cambios resultan de la incorporación de nuevos componentes a la membrana plasmática, así como de la migración, modificación o liberación de moléculas preexistentes en la superficie de la gameta las cuales contribuyen a estabilizar la membrana del espermatozoide.



**Figura 10. Maduración epididimaria.** Resumen esquemático de las diferentes procesos que sufre el espermatozoide desde su tránsito por el *caput* y *corpus* epididimario hasta su almacenamiento en el *cauda*.

Diversas estrategias experimentales han permitido estudiar la síntesis y secreción de proteínas epididimarias, así como su incorporación a distintos dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Cuasnicu *et al.*, 2002). Se ha identificado que la mayoría de las proteínas adquiridas durante la maduración son proteínas de superficie que se asocian a la membrana plasmática del espermatozoide mediante interacciones electrostáticas (Cooper, 1998). No obstante, algunas proteínas incorporadas en esta etapa se comportan como proteínas integrales de membrana (Kirchhoff & Hale, 1996; Legare *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2000b). Varias de estas proteínas de superficie están ancladas a la membrana mediante enlaces GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Frenette & Sullivan, 2001; Legare *et al.*, 1999; Zhang & Martin-Deleon, 2003). Sin embargo, según la vía clásica de secreción proteica, una proteína anclada por GPI debe atravesar el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y las vesículas secretoras antes de alcanzar la superficie celular. De acuerdo con este mecanismo, los espermatozoides no podrían adquirir proteínas ancladas a GPI durante su tránsito por el epidídimo, lo que sugiere la existencia de una vía alternativa de incorporación de estas proteínas epididimarias.

En este contexto, Yanagimachi y colaboradores (1985), mediante microscopía electrónica en cortes de epidídimo de hámster identificaron, por primera vez, la presencia de vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides. Años después, el grupo de investigación del Dr. Robert Sullivan demostró que estas vesículas desempeñan un papel clave en la transferencia de proteínas epididimarias a la superficie del espermatozoide durante la maduración (Frenette *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2007). Estas vesículas, denominadas epididimosomas, han sido descritas en el epidídimo de distintas especies de mamíferos, incluyendo la rata (Fornes *et al.*, 1991), el toro (Frenette & Sullivan, 2001), el ratón (Griffiths *et al.*, 2008) y el humano (Frenette *et al.*, 2005). Se ha identificado que los epididimosomas son secretados de forma apocrina, es decir, contenidas dentro de vesículas más grandes que son liberadas por la porción apical de las células, y de manera segmentada a lo largo de las diferentes regiones del epidídimo en un proceso mediado por señales de andrógenos y la vía Wnt, generándose una heterogeneidad regional tanto en el contenido como en la función los mismos (Cheng *et al.*, 2018) (**Figura 5**). Una vez liberadas al lumen epididimario, las vesículas se desintegran liberando su contenido, lo que incluye a los epididimosomas (Aumüller *et al.*, 1997; Hermo & Jacks, 2002) que se unirán a los

espermatozoides. Mientras que algunas de las proteínas que acarrear participan en la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicú *et al.*, 2002) otras, que reciben el nombre de “factores decapacitantes”, estabilizan la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia prematura del proceso de capacitación (Fraser 2010; Fraser *et al.*, 2006).

Además de proteínas y lípidos, los epididimosomas transportan ARN pequeños no codificantes (sncARN), incluyendo miARN, piARNs, tsARN y circARN, los cuales son incorporados al espermatozoide durante la maduración. Estos sncARN participan en la regulación de la motilidad, viabilidad y respuesta al estrés oxidativo del espermatozoide (Naveed & Bao, 2025; Trigg & Conine, 2024). Algunas de estas moléculas, como los tsARN mitocondriales, son luego transferidas al ovocito en el momento de la fertilización, regulando eventos tempranos de la expresión génica embrionaria (Liu *et al.*, 2024). Estudios recientes revelaron que alteraciones en el contenido de sncARN epididimarios están asociadas a condiciones ambientales como la dieta paterna, lo que podría tener consecuencias epigenéticas en la descendencia (Tomar *et al.*, 2024), llevando a proponer que el perfil de sncARN, incluyendo circARN adquiridos en el epidídimo, podría emplearse como biomarcador no invasivo para evaluar la calidad espermática y detectar disfunciones del tracto reproductor masculino (Metha & Singh, 2024).

### Eyaculación

Tras su tránsito por el epidídimo, los espermatozoides son almacenados en la región del *cauda* hasta que, en respuesta a estímulos sensoriales, se produce la eyaculación. El eyaculado está compuesto por una fracción celular que corresponde a los espermatozoides, y una fracción líquida conocida como plasma seminal, la cual resulta de la combinación del fluido epididimario con las secreciones provenientes de las glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales). La función primordial del plasma seminal es facilitar el transporte, nutrir y proteger a los espermatozoides. Su composición incluye proteínas, citoquinas, prostaglandinas, fructosa, ácido cítrico, poliaminas, distintos iones como calcio y zinc, además de enzimas como proteasas y fosfatasas ácidas. Sin embargo, aún

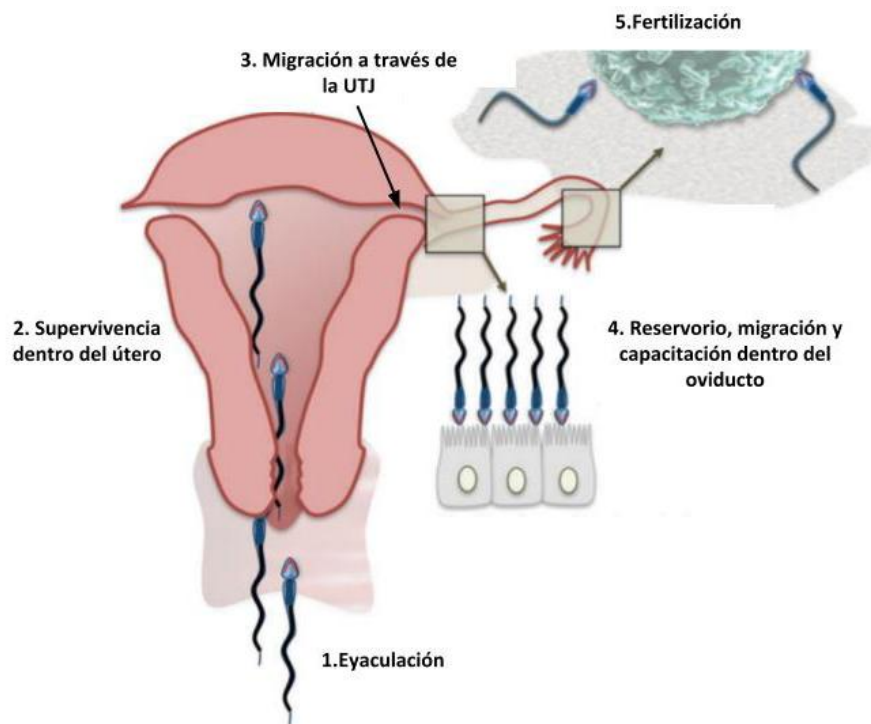
no se ha logrado esclarecer completamente el papel fisiológico de muchas de estas sustancias ni su impacto en la fertilidad.

Se ha demostrado que los espermatozoides que no han estado en contacto con el plasma seminal pueden fertilizar un ovocito tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, estudios en ratones a los que se les extirparon las vesículas seminales o que presentan deficiencias en ciertos componentes del plasma seminal han evidenciado problemas de fertilidad (Kawano *et al.*, 2014; Peitz & Olds-Clarke, 1986). Esto sugiere que, aunque el plasma seminal no es estrictamente necesario para la fertilización, sus componentes favorecen la supervivencia y el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino, optimizando su llegada al sitio de fertilización (Prins & Lindgren, 2014).

En la mayoría de las especies (humanos, bovinos, caninos, felinos, caprinos, entre otros), el semen se deposita en la vagina. Sin embargo, en algunos casos, la deposición ocurre en el cérvix, como en los porcinos, o directamente en el útero, como sucede en equinos y ciertos roedores (Coy *et al.*, 2012). En humanos, tras la eyaculación, algunos componentes del plasma seminal tales como el fibrinógeno y la semenogelina, inducen la formación de un coágulo que retiene a los espermatozoides y los protege del ambiente ácido vaginal. Pasados unos minutos, la acción de la fibrinolisis licúa este coágulo, permitiendo la liberación de los espermatozoides. En otras especies, como los ratones, el coágulo es más denso y forma un tapón vaginal que es esencial para la fertilidad (Murer *et al.*, 2001; Kawano *et al.*, 2014). En ratas, se ha comprobado que la ligadura de las glándulas responsables de la coagulación impide tanto la formación del tapón como el transporte espermático hacia el útero (Suarez & Pacey, 2006).

Una vez en el tracto reproductor femenino, el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito podría parecer aleatorio. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que el sistema reproductor femenino implementa sofisticados mecanismos de selección para garantizar que solo los espermatozoides de mayor calidad alcancen el sitio de fertilización (Suarez, 2016; Mahé *et al.*, 2021). Independientemente del sitio de deposición del semen, en todas las especies los espermatozoides deben atravesar el útero y alcanzar el oviducto. En este proceso, el paso a través de la UTJ representa una barrera que filtra la mayoría de los espermatozoides (Coy *et al.*, 2012) (**Figura 11**). Se cree que esta estructura actúa como un filtro debido a su

estrecha morfología y la presencia de moco denso, lo que dificulta el paso tanto de patógenos como de espermatozoides con anomalías morfológicas o alteraciones en su motilidad. En diversas especies se ha observado que los espermatozoides con un movimiento progresivo y lineal tienen mayores probabilidades de superar esta barrera en comparación con aquellos con patrones de motilidad no lineales (Gaddum-Rosse, 1981).



**Figura 11. 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. Almacenamiento, migración y capacitación de los espermatozoides dentro del oviducto. 5. Encuentro con los ovocitos en la *ampulla* y fertilización de los mismos (modificado de Aitken & Nixon 2013).

Además del papel de la motilidad espermática, la actividad contráctil del útero también favorece el transporte de los espermatozoides hacia el oviducto (Suarez & Pacey, 2006). Se ha demostrado que la presencia de semen estimula estas contracciones ya que se han observado significativamente menores contracciones en ratas apareadas con machos vasectomizados, sugiriendo que tanto los espermatozoides como los componentes del plasma seminal desempeñan un papel en este proceso (Peitz & Olds-Clarke, 1986). En ratones, la

extirpación de las vesículas seminales reduce la actividad contráctil uterina y disminuye las tasas de preñez (Crane & Martin, 1991). No obstante, ni la motilidad espermática ni las contracciones uterinas por sí solas garantizan el paso exitoso de los espermatozoides al oviducto. Se ha reportado que ciertos ratones con deficiencia en proteínas como ACE, miembros de la familia ADAM, Calr3, Clgn, Tpst2 y PDILT son incapaces de cruzar la UTJ, a pesar de presentar una morfología y motilidad aparentemente normales (Fujihara *et al.*, 2019; Okabe *et al.*, 2015). Esto indica que, además de los criterios físicos de selección, los espermatozoides deben poseer marcas bioquímicas específicas en su superficie para lograr fertilizar (Holt & Fazeli, 2015; Sakkas *et al.*, 2015; Suarez, 2016).

Otro aspecto crucial para la fertilización es la viabilidad de las gametas. En muchas especies, los espermatozoides pueden permanecer en el oviducto a la espera del ovocito durante días o incluso un año (Suarez & Pacey, 2006). Se ha propuesto que la interacción entre los espermatozoides y el epitelio oviductal prolonga su vida útil al estabilizar la membrana plasmática y retrasar la capacitación, posiblemente por inhibición de la entrada de calcio a la célula espermática (Suarez, 2014). En cuanto a la gameta femenina, la mayoría de los ovocitos mantienen su capacidad de ser fertilizados por un período de aproximadamente 24 horas tras la ovulación tal como ha sido descrito para especies como la vaca, la oveja, el cerdo y el humano. No obstante, en otras especies como el conejo, la rata, el hámster y el ratón, este período no supera las 12 horas (Austin & Short, 1972). Si la fertilización ocurre después de este tiempo, el desarrollo embrionario suele ser anómalo y de corta duración (Austin, 1982; Takahashi *et al.*, 2013). Por ello, el transporte eficiente del ovocito hacia el sitio de fertilización es fundamental para evitar embarazos ectópicos y asegurar el éxito reproductivo (Suarez & Pacey, 2006).

### Capacitación espermática

Tras la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos aún no poseen la capacidad de reconocer ni fertilizar al ovocito. Esto se debe a que la capacidad fertilizante que adquieren durante la maduración epididimaria es solo de carácter potencial (Yanagimachi, 1994). En su recorrido por el tracto femenino, los espermatozoides experimentan una serie de cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos, conocidos como capacitación, que les permitirá

expresar su capacidad fertilizante (Chang, 1951; Austin, 1952). Estos cambios incluyen la eliminación de colesterol en la membrana plasmática, la pérdida de factores decapacitantes, la redistribución de antígenos en la superficie, la entrada de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), así como un aumento del pH intracelular, hiperpolarización de la membrana y fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr). Los mecanismos moleculares responsables de estos cambios aún no están completamente esclarecidos pero se sabe que son fundamentales para el proceso de capacitación (Visconti *et al.*, 2011). Dado que el espermatozoide carece de capacidad de transcripción y traducción, los cambios en los mensajeros intracelulares como AMP cíclico (AMPC) y  $\text{Ca}^{2+}$ , los flujos iónicos y las modificaciones postraduccionales como la fosforilación de proteínas, parecen ser los mecanismos regulatorios que modulan la funcionalidad del espermatozoide (Visconti *et al.*, 1995a; 1995b). Mientras algunos de estos cambios se producen inmediatamente después de que el espermatozoide entra en contacto con el tracto femenino, otros se desarrollan después de un tiempo de permanencia en el mismo (Battistone *et al.*, 2013).

A pesar de que la capacitación espermática normalmente ocurre en el tracto femenino, también puede inducirse *in vitro* incubando los espermatozoides en un medio definido. Este medio debe simular las condiciones del fluido oviductal, proporcionando fuentes de energía y carbono como piruvato y glucosa, un aceptor de colesterol como la albúmina, así como iones tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Visconti *et al.*, 2002). La identificación de las condiciones óptimas para la capacitación *in vitro* ha sido clave en el desarrollo de técnicas de fertilización asistida. La relevancia de estos procedimientos impulsa la necesidad de comprender a fondo los mecanismos moleculares subyacentes a la capacitación para mejorar y garantizar el éxito en las técnicas de fertilización *in vitro*. En este contexto, un estudio reciente de nuestro laboratorio comparó de manera sistemática distintos medios de capacitación ampliamente utilizados en ratón, revelando que la composición del medio puede afectar diferentes aspectos funcionales del espermatozoide, resaltando la importancia de considerar el entorno experimental como una variable crítica en la interpretación de los procesos de capacitación espermática *in vitro* (González *et al.*, 2024).

Durante la capacitación, los espermatozoides experimentan una serie de modificaciones en su superficie que les permiten sufrir un evento exocítico denominado

reacción acrosomal (RA) en la cabeza, y desarrollar un patrón de motilidad vigorosa, conocido como hiperactivación (HA) en la cola. Aunque las funciones de la cabeza y la cola del espermatozoide son distintas, el flagelo también actuaría como una cilia sensorial, capaz de detectar cambios en el entorno extracelular y transmitir esta información a la cabeza a través de mensajeros secundarios, influyendo en la ocurrencia de la RA (Buffone *et al.*, 2012). A continuación, se detallan los principales mecanismos moleculares que ocurren durante la capacitación y sus consecuencias funcionales.

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

Los espermatozoides invierten una parte considerable de su energía en la regulación del flujo y el gradiente intracelular de iones a través de bombas y transportadores de membrana, lo que influye en el potencial eléctrico celular y en las concentraciones de segundos mensajeros intracelulares (Miller *et al.*, 2015; Visconti *et al.*, 2011). Aunque el rol preciso de estas moléculas aún se encuentra en investigación, diversas evidencias sugieren que tanto el  $\text{HCO}_3^-$  como el  $\text{Ca}^{2+}$  desempeñan un papel fundamental en la regulación de la capacitación espermática, modulando distintas vías de señalización intracelular (Delgado-Bermúdez *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2024).

Estudios en distintas especies han demostrado que la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  durante la capacitación es un requisito clave para la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC), lo que provoca un incremento en los niveles de AMPc y, como consecuencia, la activación de la proteína quinasa A (PKA). A través de este mecanismo, PKA fosforila diversas proteínas en residuos de serina y treonina, desencadenando una cascada de señalización que culmina con un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina dentro de los espermatozoides (Visconti, 2009). Tanto en humanos como en roedores, se ha observado que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA están regulados por la acción de las tirosina quinasas de la familia Src (SFK, Src kinase family), las cuales inhiben a las fosfatasas de serina/treonina (Battistone *et al.*, 2013). La fosforilación de estos sustratos en respuesta al aumento de AMPc y la activación de SFKs ocurre rápidamente (Battistone *et al.*, 2013) y resulta clave en distintos aspectos de la capacitación espermática, incluyendo el incremento del pH intracelular (Wang

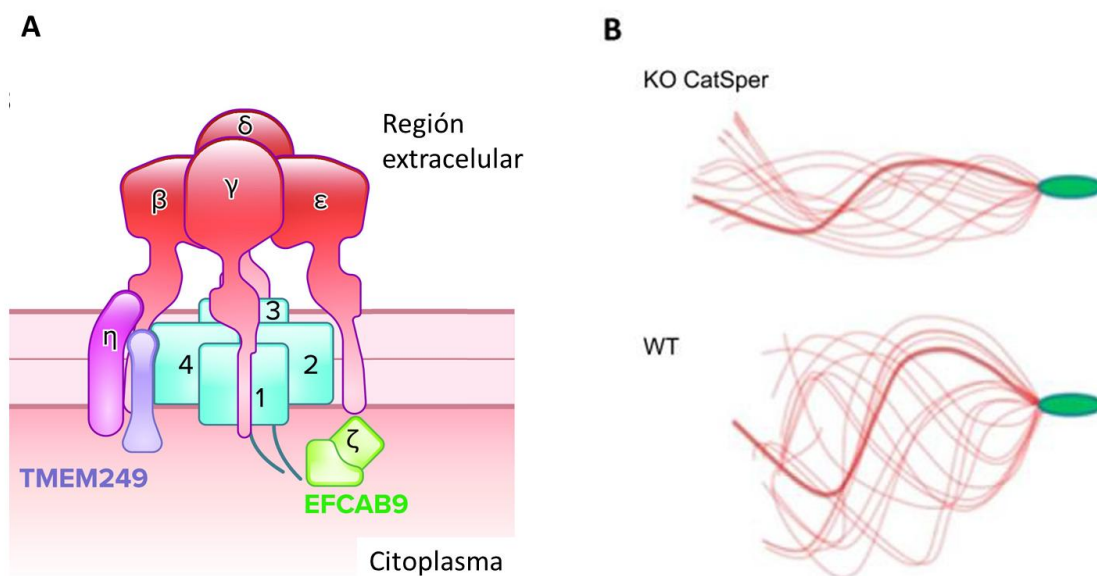
et al., 2007; Zeng *et al.*, 1996), el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tateno *et al.*, 2013), la hiperpolarización (Demarco *et al.*, 2003) y la activación de la vía de fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr) (Visconti *et al.*, 1995a; 1995b). Esta vía se ha sido asociada con el desarrollo de la hiperactivación del espermatozoide (Mahony & Gwathmey, 1999; Nassar *et al.*, 1999; Visconti, 2009) así como también con la reacción acrosomal (Asquith *et al.*, 2004; Urner et al., 2001). Además, se ha observado que los espermatozoides de ratón que alcanzan el oolema mantienen la fosforilación en el flagelo (Urner & Sakkas, 2003). No obstante, si bien la vía de pTyr parece desempeñar un rol regulador en la mayoría de los eventos dependientes de la capacitación, influyendo directamente en el proceso de fertilización (Battistone *et al.*, 2014; Galantino-Homer *et al.*, 1997; Pommer *et al.*, 2003; Visconti *et al.*, 1999), estudios más recientes han demostrado que esta fosforilación no es estrictamente esencial para que ocurra la fecundación (Alvau *et al.*, 2016). Aun así, se la continúa considerando un marcador relevante del estado de capacitación espermática y sigue utilizándose rutinariamente para su evaluación.

#### *Incremento intracelular de calcio*

Durante la capacitación espermática, se produce un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ruknudin & Silver, 1990; Baldi *et al.*, 1991), el cual resulta del equilibrio entre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  provenientes del medio extracelular y aquellos liberados desde los reservorios intracelulares (Darszon *et al.*, 2011). El principal canal responsable del ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  es CatSper (Cation Channel of Sperm), cuya función es esencial para la fertilidad, como se ha demostrado tanto en modelos de ratones KO como en pacientes con mutaciones en el gen correspondiente (Hildebrand *et al.*, 2010; Hwang & Chung, 2023; Ren *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2013). Aunque la activación de CatSper es clave para el desarrollo de la HA (**Figura 12**) (Ren *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2003), este proceso también requiere la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares (Alasmari *et al.*, 2013; Chang & Suarez, 2011).

CatSper es un canal altamente complejo compuesto por cuatro subunidades principales (CatSper  $\alpha$  1-4) y ocho subunidades auxiliares ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , EFCAB9 y TMEM249) (**Figura 12**), y se localiza en la pieza principal del flagelo espermático (Chung *et al.*, 2011; 2014;

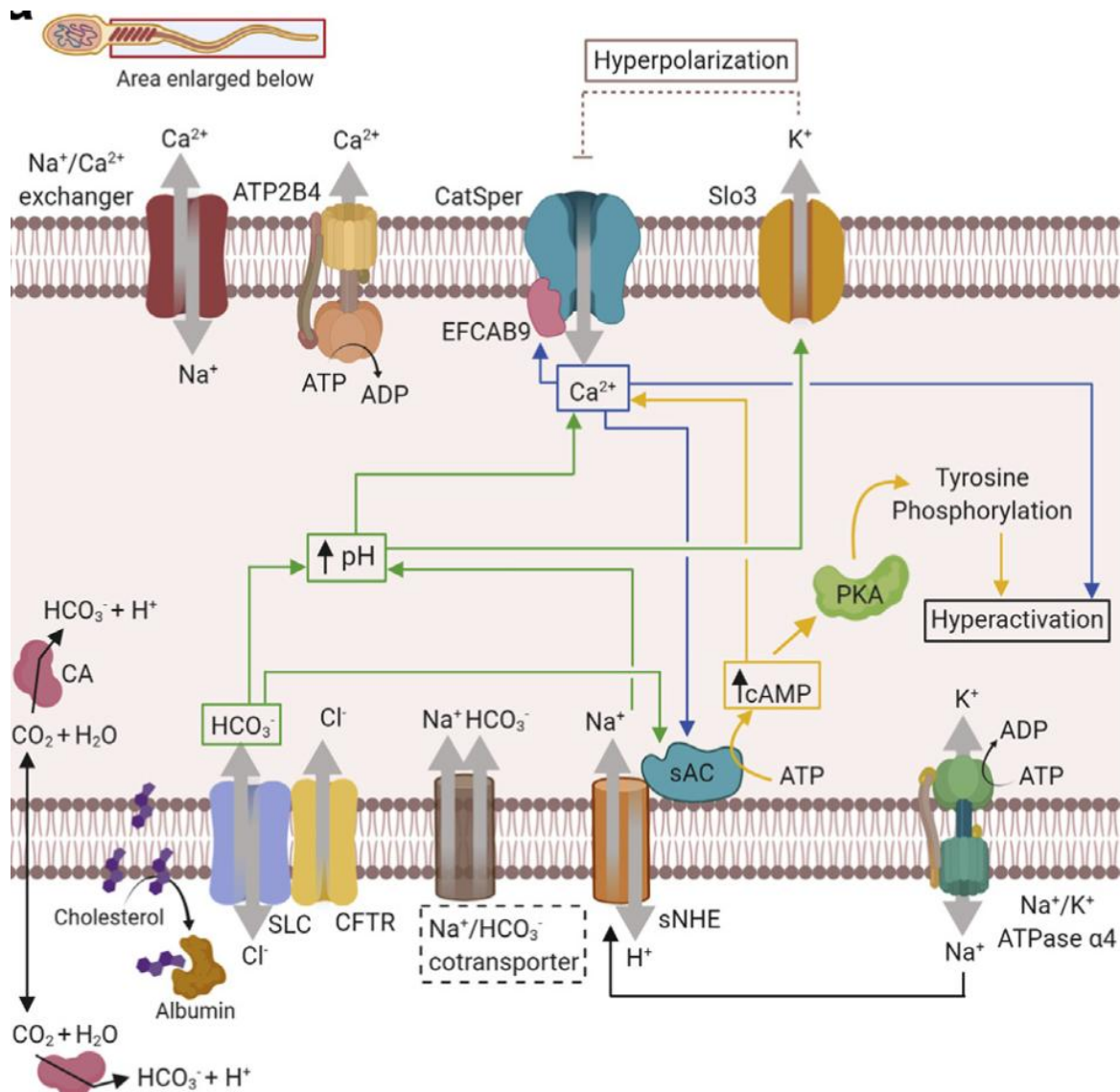
2017; Huang *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2007; Ren & Xia, 2010; Wang *et al.*, 2009). El primer miembro identificado de este canal, CatSper1, posee un extenso dominio N-terminal en el citoplasma con alta concentración de residuos de histidina, lo que sugiere su papel como sensor de pH (Lishko & Kirichok, 2011; Ren *et al.*, 2001). En este contexto, se ha determinado que la alcalinización citoplasmática inducida por Hv1 o sNHE en espermatozoides humanos y murinos, respectivamente, es un potente activador de CatSper ya que estas proteínas se encuentran en la misma región del flagelo (Lishko & Kirichok *et al.*, 2011). Los estudios electrofisiológicos han indicado que CatSper presenta una leve sensibilidad al voltaje, activándose preferentemente en condiciones de despolarización, con una mayor dependencia en humanos que en ratones (Kirichok *et al.*, 2006; Lishko & Kirichok *et al.*, 2011). Además, su regulación se ve influenciada por la unión de ligandos como la albúmina y la proteína CRISP1 en ratón (Xia & Ren, 2009; Ernesto *et al.*, 2015).



**Figura 12. Incremento intracelular de calcio dependiente del canal CatSper.** **A.** Esquema la estructura principal del canal CatSper compuesta por cuatro subunidades formadoras del poro ( $\alpha$  1-4) (en celeste), cinco subunidades auxiliares con un paso transmembrana ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ) (en rojo), 2 subunidades auxiliares citosólicas ( $\zeta$  y EFCAB9) (en verde), y 2 subunidades con más de un paso transmembrana TMEM249 (púrpura) y CATSPER $\eta$  (violeta). Modificado de Hwang *et al.*, 2023. **B.** Esquema representando el batido flagelar de un espermatozoide KO para CatSper, el cual no desarrolla HA tal como lo hace un espermatozoide control capacitado.

Por otra parte, la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide ocurre principalmente a través de PMCA4 (bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa isoforma 4) que en el flagelo del espermatozoide epididimario presenta dos variantes de splicing, 4a y 4b (Patel *et al.*, 2013). Los animales KO para esta proteína presentan espermatozoides epididimarios inmóviles con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, demostrando la importancia de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  para la fertilidad de los machos (Okunade *et al.*, 2004, Schuh *et al.*, 2004).

En los últimos años, se han logrado avances significativos en la identificación de múltiples complejos macromoleculares de membrana que regulan el intercambio de iones y permiten la capacitación espermática en mamíferos (**Figura 13**). Al respecto nos parece importante destacar que aún es necesario determinar la localización relativa de los principales sistemas de transporte iónico flagelar y caracterizar detalladamente su función en condiciones fisiológicas para comprender la intrincada regulación que existe en las diferentes cascadas de señalización durante la capacitación (Vyklícka & Lishko 2020).



**Figura 13. Vías de señalización en el flagelo del espermatozoide murino.** CatSper, activado por pH, se abre y permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Este canal es regulado adicionalmente por el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de su subunidad citoplasmática EFCAB9. Los mecanismos de eliminación del calcio intracelular en los espermatozoides de ratón están mediados principalmente por una ATPasa (ATP2B4) y por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La alcalinización intracelular puede ser inducida por la acción de los intercambiadores NHE. La capacitación espermática se desencadena por un aumento del  $\text{HCO}_3^-$  intracelular, que ingresa a la célula por dos vías diferentes. Primero, el  $\text{CO}_2$  puede difundirse a través de la membrana y luego ser convertido en  $\text{HCO}_3^-$  por la acción de la anhidrasa carbónica (CA). Segundo, el  $\text{HCO}_3^-$  extracelular puede ingresar a la célula mediante un cotransportador SLC de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  que interactúa con el canal CFTR permeable a  $\text{Cl}^-$ . El gradiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, el potencial de membrana, se mantienen gracias a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa  $\alpha 4$ . Este gradiente podría ser aprovechado para activar el intercambiador sNHE, promoviendo el ingreso de  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{H}^+$ , contribuyendo así a la alcalinización intracelular. El potasio

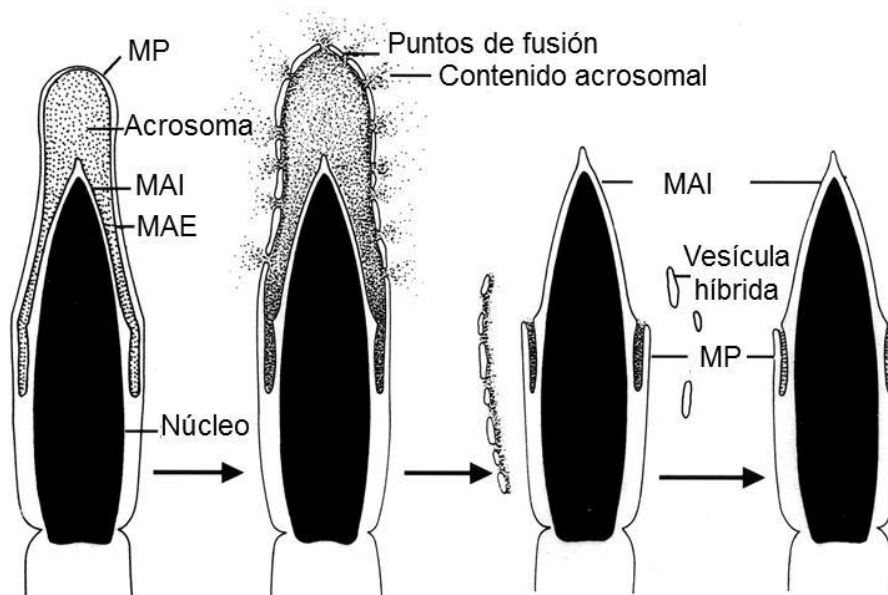
entra a la célula a través de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa  $\alpha 4$  y puede salir a través del canal Slo3, que en el ratón es activado por la alcalinización intracelular. La salida de K<sup>+</sup> provoca una hiperpolarización que inhibe aún más a CatSper. El HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el Ca<sup>2+</sup> intracelular pueden activar sAC, que produce AMPc, lo que lleva a la activación de la PKA y de quinasas de tirosina, provocando una amplia fosforilación de residuos de tirosina que culmina en la capacitación espermática y la hiperactivación. La capacitación también está asociada con la remoción de colesterol de la membrana plasmática por acción de la albúmina. Las líneas continuas representan activación, las líneas punteadas representan inhibición. (Vyklicka & Lishko 2020).

### *Hiperpolarización*

El potencial de membrana celular depende de la permeabilidad de la membrana a los iones presentes en el medio, principalmente los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, y el anión HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, así como de la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Los cambios en la permeabilidad al Cl<sup>-</sup> no tienen un efecto evidente sobre las variaciones del potencial. En este sentido, se ha observado que el potencial de membrana del espermatozoide en reposo es más despolarizado que en otros tipos celulares (Zeng *et al.*, 1995; Hernández-González *et al.*, 2006), probablemente debido a su mayor permeabilidad al Na<sup>+</sup>, atribuida a la presencia de canales de Na<sup>+</sup> ENaC que permanecen abiertos en reposo (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2006). Durante la capacitación, se produce una hiperpolarización de la membrana (Zeng *et al.*, 1995; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012) debida al aumento de la concentración intracelular de cargas negativas en comparación con el medio extracelular. Aunque la regulación del potencial de membrana del espermatozoide durante la capacitación no está completamente clara, se ha propuesto que la hiperpolarización se debe a un aumento de la permeabilidad al K<sup>+</sup> y que la salida de K<sup>+</sup> a través de canales rectificadores contribuye a la hiperpolarización de la membrana durante la capacitación (Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Acevedo *et al.*, 2006). Los estudios con ratones KO para el canal de K<sup>+</sup> Slo3 han mostrado que este canal es esencial para la hiperpolarización (Santi *et al.*, 2010) y regula la actividad de CatSper (Chávez *et al.*, 2014). Aunque el papel de la hiperpolarización en la HA no está completamente definido, la dependencia de voltaje de canales clave en la capacitación, como CatSper o Hv1 sugiere que desempeña un papel importante en este proceso. Además, se ha informado que la hiperpolarización es esencial para la ocurrencia de la RA (De La Vega-Beltran *et al.*, 2012).

### Reacción acrosomal

La RA es un proceso exocítico que permite la liberación controlada del contenido del acrosoma del espermatozoide y tiene dos efectos clave para la fertilización: la exposición de moléculas dentro del acrosoma que facilitan la interacción y penetración de las envolturas del ovocito, y la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial. Este proceso implica la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, lo que genera vesículas mixtas y provoca la pérdida del capuchón acrosomal (**Figura 14**). Como resultado, el contenido acrosomal se libera, exponiendo la membrana acrosomal interna, la cuál es más fuerte y permite la penetración de la ZP.



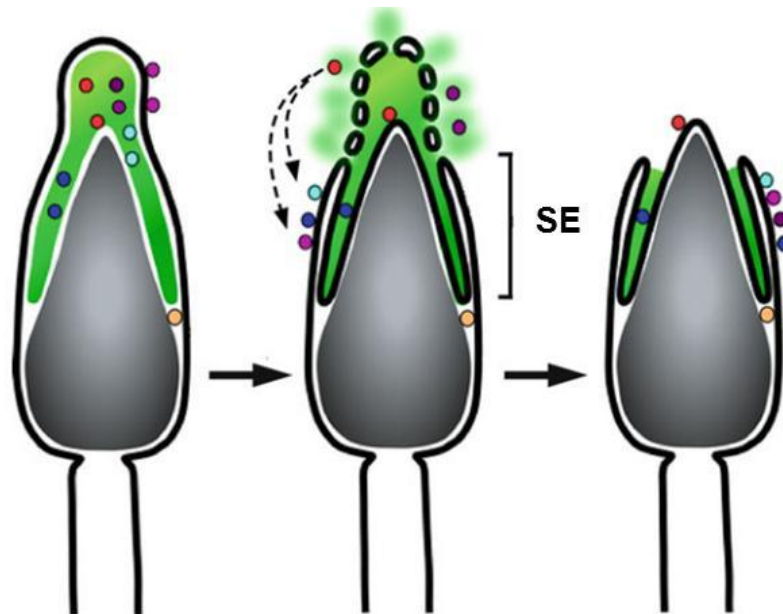
**Figura 14. Progresión de la RA.** Se muestra un diagrama representando las etapas de la RA en la cabeza del espermatozoide de ratón. El de la izquierda representa un espermatozoide intacto y el resto, espermatozoides en diferentes estados de la RA. MP: membrana plasmática, MAI: membrana acrosomal interna, MAE: membrana acrosomal externa (Modificado de Yanagimachi, 1994).

A nivel molecular, la RA se inicia cuando receptores en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado reconocen ligandos como ZP3 y progesterona, lo que activa una cascada de señales que incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y otros mensajeros secundarios como

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

En el modelo clásico, se pensaba que las enzimas del acrosoma eran las encargadas de digerir la matriz extracelular y permitir la penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994). Posteriormente, 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), idea apoyada por tres grupos, independientemente, que observaron que la gran mayoría de los espermatozoides de ratón que llegan al sitio de fertilización *in vivo* ya no poseen acrosoma (Hino *et al.*, 2016; La Spina *et al.*, 2016; Muro *et al.*, 2016).

Además de permitir la penetración de la ZP, la RA es crucial para la fusión de las gametas ya que, aunque los espermatozoides con acrosomas intactos pueden adherirse al oolema, no tienen la capacidad de fusionarse con la membrana del ovocito (Yanagimachi, 1994). Se ha demostrado que enzimas acrosomales como la acrosina y las metaloproteasas, liberadas durante la RA, modifican la membrana del segmento ecuatorial, lo que le otorga la capacidad de fusionarse (Diaz-Perez *et al.*, 1988; Diaz-Perez & Meizel, 1992; Takano *et al.*, 1993). Aunque los detalles de este proceso aún no se comprenden completamente, se sugiere que los mecanismos involucrados en la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial incluyen la acción de proteínas que alteran el citoesqueleto y las moléculas de la membrana plasmática, así como una reorganización tanto de las proteínas acrosomales como de la membrana plasmática (**Figura 15**) (Cuasnicú *et al.*, 2016).



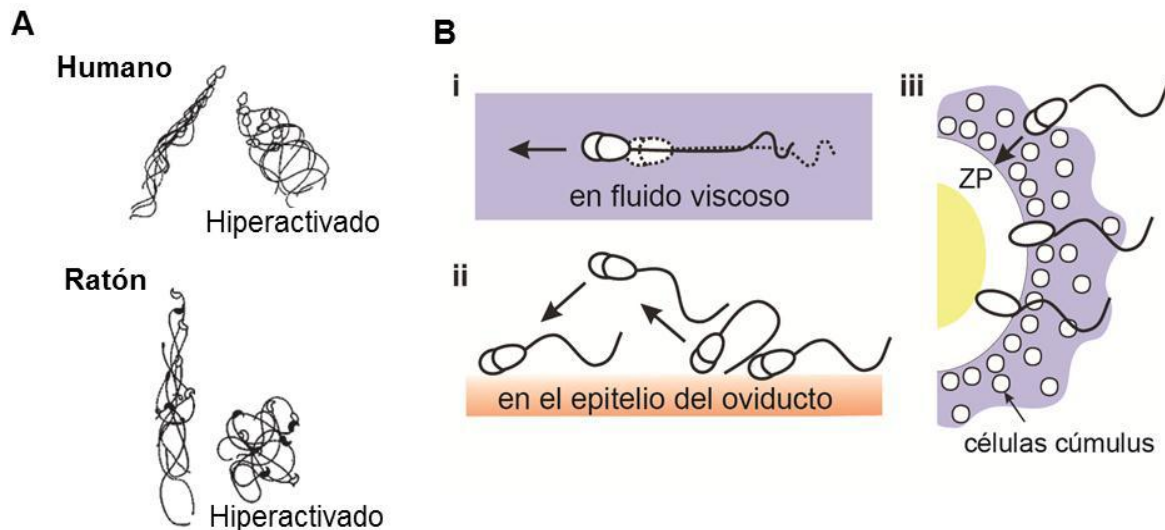
**Figura 15. Adquisición de la fusogenicidad del segmento ecuatorial durante la RA.** Diagrama que representa diferentes proteínas del espermatozoide que estarían involucradas en la adquisición de la fusogenicidad del segmento ecuatorial por alterar el citoesqueleto (como TSSK6, en naranja); o por modificar proteínas presentes en el segmento ecuatorial (SE) (como acrosina en rojo o SPESP1 en azul oscuro) o por relocalizarse en el SE y participar en la fusión de gametas (como IZUMO1 en celeste, o CRISP1 en rosa, o CRISP2 en magenta) (Cuasnicú *et al.*, 2016).

### *Hiperactivación*

La HA es un patrón de motilidad descrito por primera vez en el hámster (Yanagimachi, 1970), caracterizado por un movimiento flagelar intenso, que se observa tanto *in vivo*, en el sitio de fertilización, como *in vitro*, en todas las especies investigadas (Yanagimachi, 1994). Este movimiento hiperactivado se distingue por un aumento en la velocidad, una reducción en la linealidad y un incremento en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, junto con movimientos del flagelo que recuerdan a latigazos en medios de baja viscosidad (Suarez & Dai, 1992; Suarez, 1996).

Se han propuesto diversos posibles roles para este tipo de motilidad. En primer lugar, el espermatozoide hiperactivado es más eficiente para penetrar sustancias viscoelásticas (Suarez, 1996), lo que le permite atravesar el entorno viscoso del fluido oviductal y, luego, durante la interacción con el ovocito, penetrar a través de la matriz extracelular del cumulus

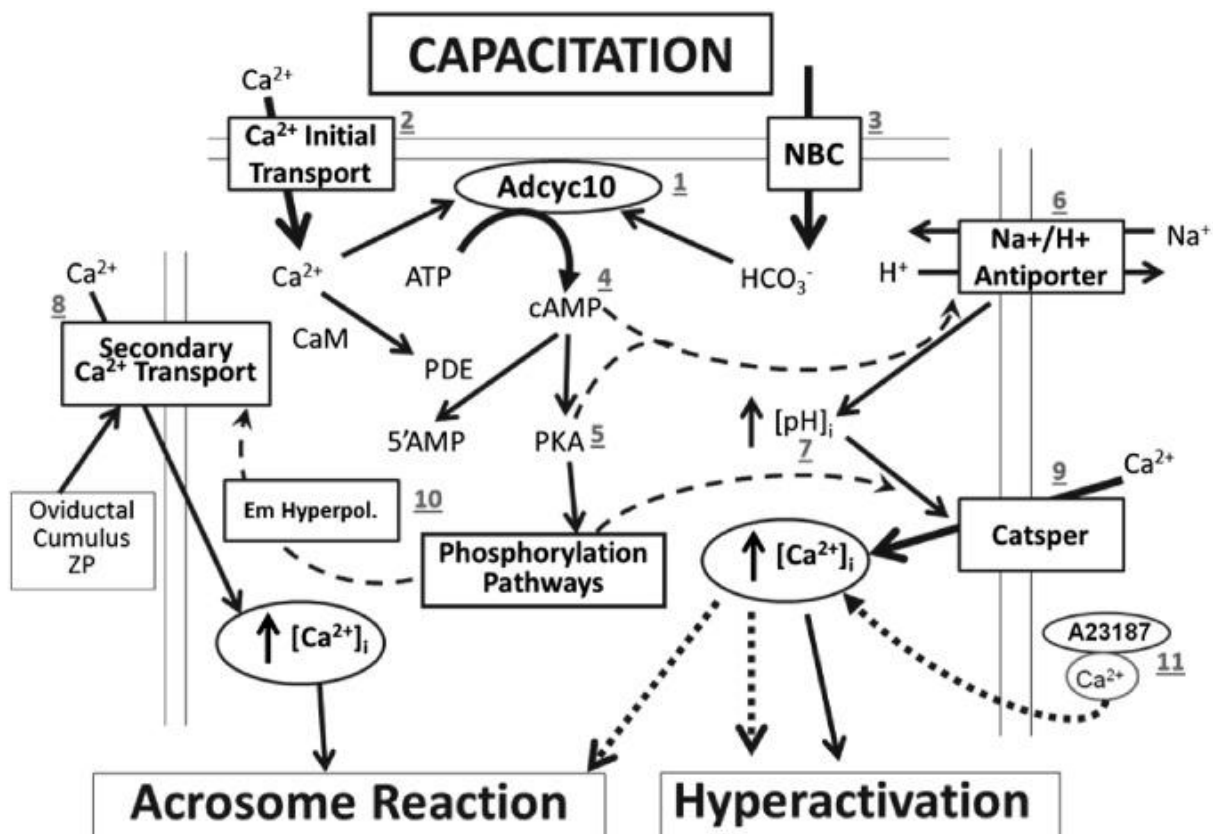
oophorus y de la ZP. En segundo lugar, la HA podría facilitar el ascenso de los espermatozoides desde el *isthmus* hacia el sitio de fertilización (*ampulla*), ayudándoles a disociarse de la adhesión temporal que establecen con el epitelio oviductal (Yanagimachi, 1994; Suarez, 1996; Ho *et al.*, 2009). Además, al tener una mayor amplitud de movimiento, la HA aumentaría la probabilidad de que los espermatozoides se encuentren con el ovocito en la *ampulla* (Yanagimachi, 1994)(Figura 16).



**Figura 16. Hiperactivación de espermatozoides humanos y murinos.** **A.** Se representan los patrones de movimiento de un espermatozoide humano (arriba) o de ratón (abajo) progresivo o hiperactivado en un medio de baja viscosidad (modificado de Yanagimachi, 1994). **B.** La HA sería relevante para i. avanzar en un medio viscoso como el tracto reproductor femenino, ii. liberarse del epitelio del oviducto y avanzar hacia la *ampulla* (sitio de fertilización), y iii. penetrar el cúmulus y la ZP (modificado de Darszon *et al.*, 2011).

Aunque se plantea que la HA podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino durante la fertilización, aún no existe consenso sobre cuáles son estos factores específicos. Además, las vías de señalización que controlan la HA no han sido completamente descritas, aunque se sabe que la alcalinización de los espermatozoides, el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$  juegan un papel crucial en la activación de este proceso (Figura 17) (Tateno *et al.*, 2013). Asimismo, se han identificado varias enzimas y canales que podrían participar en la HA a juzgar por el hecho de que los ratones mutantes para el canal CatSper y la enzima

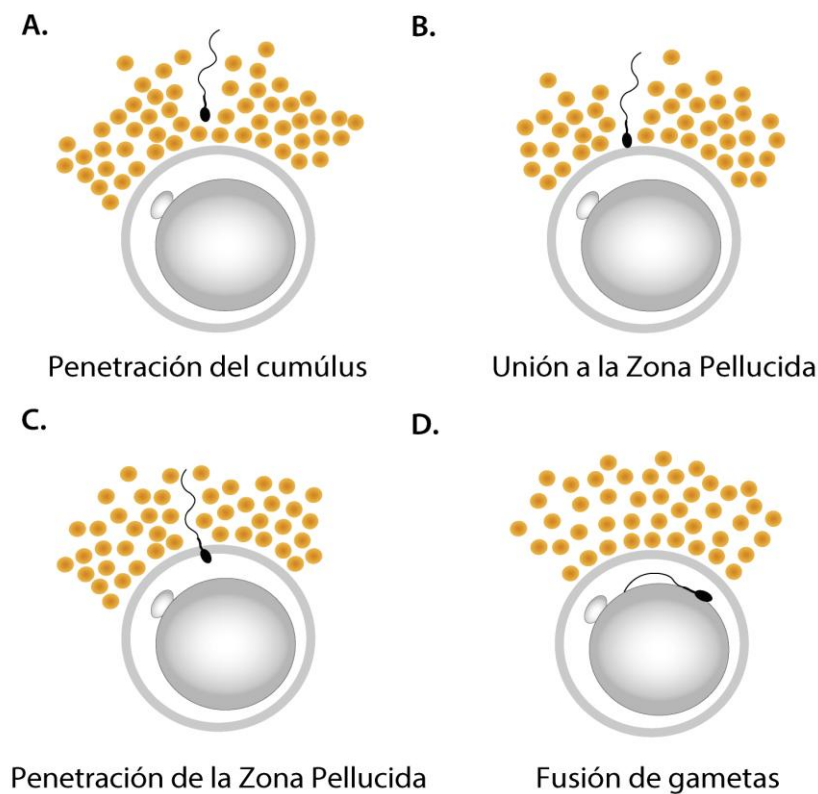
glicerol-3-fosfato deshidrogenasa no son capaces de inducir la HA (Ho *et al.*, 2009; Buffone *et al.*, 2012).



**Figura 17. Modelo funcional de la secuencia de eventos que ocurren durante la capacitación.** Las líneas continuas representan eventos conocidos, líneas punteadas para eventos probables. Cuando se colocan espermatozoides recién extraídos en un medio que favorece la capacitación, la adenilil ciclasa atípica Adcy10 (1) se estimula rápidamente por la acción combinada del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{HCO}_3^-$ , que ingresan a los espermatozoides a través de un transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  inicial aún no identificado (2) y un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (3), respectivamente. El aumento del cAMP (4) activa la PKA (5) y el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (6), lo que provoca un aumento en el  $[\text{pH}]_i$  (7), que a su vez estimula el canal CatSper (9). Se plantea la hipótesis de que un transportador secundario de  $\text{Ca}^{2+}$  (8) es estimulado por factores del oviducto, cúmulo o zona pelúcida, transporta  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular hacia la cabeza espermática para inducir la reacción acrosomal. El  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al flagelo espermático a través del CatSper activado induce la hiperactivación. Alternativamente, las vías de fosforilación podrían regular los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática espermática (Em Hyperpol) (10). El ionóforo A23187 (11) eleva directamente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides e induce tanto la reacción acrosomal como la hiperactivación, omitiendo todos los transportadores iónicos y las vías de cAMP/PKA en los espermatozoides (flechas punteadas gruesas) (Tateno *et al.*, 2013).

Fertilización

Una vez que el espermatozoide alcanza al ovocito, se inicia el proceso de fertilización que, en mamíferos, ocurre en la *ampulla* del oviducto. El espermatozoide capacitado debe atravesar la ZP y el *cumulus oophorus* que rodean al ovocito para llegar a la membrana plasmática y fusionarse con ella. Este proceso implica interacciones entre células y matrices (espermatozoide-cumulus oophorus y espermatozoide-ZP), así como interacciones célula-célula (fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito) (**Figura 18**), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culmina con la formación de un nuevo individuo. A continuación describiremos cada una de las etapas.



**Figura 18. Distintas etapas del proceso de fertilización.** Esquema mostrando un ovocito rodeado de la ZP y una porción de la matriz de las células del cúmulus siendo donde **A.** un espermatozoide penetra el cúmulus, luego **B.** se une a la ZP, **C.** penetra la ZP y, por último, **D.** se une al oolema y fusiona sus membrana.

### *Penetración del cumulus oophorus*

Como se mencionara previamente, la matriz de las células del cúmulus está compuesta principalmente por ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos, los cuales le otorgan propiedades viscoelásticas distintivas, y que los espermatozoides deben ser capaces de penetrar para alcanzar y fertilizar al ovocito. Aún persisten debates sobre los mecanismos celulares y moleculares implicados en la penetración del cúmulus. Algunas investigaciones han sugerido que los espermatozoides poseen hialuronidasas en su superficie, y que estas enzimas facilitarían su paso a través del cúmulus (Talbot, 1985; Florman & Fissore, 2015). En este contexto, se ha identificado que SPAM1 (sperm adhesion molecule 1, anteriormente conocida como PH-20), de origen testicular, exhibe actividad hialuronidasa en diversas especies (Primakoff *et al.*, 1985; Gmachl *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994; Cherr *et al.*, 1996). Sin embargo, la importancia de esta proteína en la penetración del cúmulus ha sido cuestionada, ya que los ratones KO para SPAM1 mantienen su fertilidad, aunque con un ligero retraso en la dispersión del cúmulus en comparación con los controles (Baba *et al.*, 2002). En ese estudio, se identificó otra proteína con actividad hialuronidasa, denominada HYAL5, localizada en las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides epididimarios de ratón. Posteriormente, se propuso que HYAL5 podría compensar la ausencia de SPAM1 en los ratones KO, lo que sugiere una redundancia funcional entre ambas proteínas (Kim *et al.*, 2001). Asimismo, estudios en ratones doble KO para SPAM1 y las serinproteasas TESP5 o acrosina han indicado que estas proteínas actúan en conjunto con SPAM1 en la penetración del cúmulus (Zhou *et al.*, 2012). En este sentido, se vio que ratas KO para acrosina mostraron un retraso significativo en la dispersión del cúmulus, lo cual sugiere que esta enzima cumpliría un rol relevante en la penetración de esta envoltura en ratas (Isotani *et al.*, 2017), respaldando un modelo cooperativo entre hialuronidasas y proteasas acrosomales, cuya contribución puede variar entre especies.

Si bien se ha demostrado que los espermatozoides pueden alcanzar el sitio de fertilización ya reaccionados en murinos, el hecho de que las enzimas liberadas durante la reacción acrosomal sean capaces de permanecer unidas a la superficie del espermatozoide reaccionado, como es el caso de PH-20 o la acrosina (Overstreet *et al.*, 1995; Green & Hockaday 1978), ha llevado a plantear que estas enzimas seguirían participando activamente tanto en la penetración del cúmulus como en la interacción con la zona pelúcida. Otra

teoría propone que la HA también podría desempeñar un papel clave en la penetración del cúmulus, al facilitar el desplazamiento espermático a través de la matriz extracelular hasta alcanzar el ovocito, lo que sugiere que no sólo la acción enzimática, sino también la fuerza mecánica generada por el movimiento flagelar vigoroso son necesarias para atravesar las envolturas ovocitarias (Puga Molina et al., 2018). Este modelo se ve respaldado por los ensayos de fertilización *in vitro* realizados con ratones KO para CatSper, los cuales al no ser capaces de hiperactivar no logran penetrar el cúmulus ni la zona pelúcida (Ren *et al.*, 2001).

### *Interacción espermatozoide-Zona Pelúcida*

Después de atravesar el *cumulus oophorus*, el espermatozoide entra en contacto con la ZP, estableciendo una interacción mediada por moléculas presentes tanto en su superficie como en la matriz extracelular del ovocito.

Existen debates en torno al proceso de unión del espermatozoide a la ZP. Inicialmente, estudios en ratones llevaron al desarrollo de un modelo de adhesión en dos fases (Wassarman, 1988a): primero, una interacción primaria entre el espermatozoide intacto y la ZP a través de los carbohidratos de ZP3, lo que induciría la RA, y, posteriormente, una unión secundaria del espermatozoide ya reaccionado mediante la interacción con ZP2. Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado por investigaciones que sugieren un mecanismo alternativo en el cual la adhesión del espermatozoide ocurre con una estructura supramolecular conformada por ZP2 y ZP3 en lugar de una única glicoproteína (Hoodbhoy & Dean, 2004; Rankin *et al.*, 2003). Estudios posteriores han demostrado que la integridad de ZP2 es un factor clave en la penetración del espermatozoide ya que una ZP2 intacta facilita su paso a través de la ZP, mientras que una versión clivada de esta proteína impide la penetración (Avella et al., 2014; Avella *et al.*, 2013). Además, como se ha señalado anteriormente, las investigaciones en ratón sugieren que la RA ocurre en el oviducto, mucho antes del contacto del espermatozoide con la ZP, por lo que el espermatozoide arribaría al sitio de fertilización ya reaccionado.

En cuanto a las proteínas espermáticas implicadas en la unión a la ZP, se han propuesto diversas moléculas, entre ellas SPAM1 (Myles & Primakoff, 1997; Yudin *et al.*, 1999) y

proacrosina/acrosina (Furlong et al., 2000; Lea *et al.*, 1996). Aunque estudios en modelos KO han sugerido que la acrosina no es esencial para la fertilización, dado que los machos deficientes en esta enzima siguen siendo fértiles (Baba *et al.*, 1994), investigaciones posteriores han respaldado la hipótesis de que la interacción entre proacrosina/acrosina y ZP2 desempeña un papel relevante en la adhesión del espermatozoide reaccionado a la ZP. Esto sugiere la posible existencia de otras proteasas capaces de compensar la función de acrosina en los animales KO (Howes & Jones, 2002).

Otra de las proteínas involucradas en la adhesión del espermatozoide a la ZP es ADAM3, miembro de la familia ADAM, compuesta por aproximadamente 40 proteínas (Kim *et al.*, 2001). Aunque inicialmente se sugirió que ADAM3 participaba en la fusión espermatozoide-ovocito, estudios en modelos KO mostraron que los ratones machos sin esta proteína conservaban una capacidad de fusión normal pero eran infértiles debido a una deficiencia en la unión con la ZP (Nishimura *et al.*, 2004; Shamsadin *et al.*, 1999) y a fallas en la migración espermática hacia el oviducto (Yamaguchi *et al.*, 2006). Investigaciones adicionales han indicado que el complejo ADAM1a/ADAM2 sería fundamental para la correcta localización de ADAM3 en la superficie espermática y que ADAM3 desempeñaría un papel clave en la unión del espermatozoide a la ZP (Kim *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que los espermatozoides de ratones KO para estas proteínas pueden fertilizar ovocitos rodeados de cúmulus cuando se los introduce directamente en la *ampulla*, evitando la migración a través de la UTJ. Esto sugiere que la adhesión a la ZP podría no ser un requisito indispensable para la interacción espermatozoide-ovocito en condiciones *in vivo* (Okabe, 2013). Un fenotipo similar ha sido observado en ratones KO para la proteína epididimaria RNasa 10 (Krutskikh *et al.*, 2012).

Una vez establecida la unión del espermatozoide a la ZP, sigue la fase de penetración de esta matriz, para la cual históricamente se han propuesto dos mecanismos principales (Yanagimachi, 1994). La primera hipótesis, conocida como “enzimática”, plantea que la penetración de la ZP depende de la acción de enzimas acrosomales. Según este modelo, al día de hoy casi discontinuado, la mayoría de estas enzimas serían liberadas en la superficie de la ZP durante la RA, lo que provocaría la hidrólisis parcial de la matriz y facilitaría la progresión del espermatozoide. Se cree que, además, otras de las enzimas permanecerían unidas a la

membrana acrosomal interna y degradarían las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se adhirió, permitiendo su avance a través de la ZP, siendo esta teoría más compatible con las observaciones de la ocurrencia de la RA en el oviducto.

La segunda hipótesis, denominada “mecánica”, postula que la exposición del perforatorium, una estructura rígida del espermatozoide en conjunto con la fuerza generada por la HA, facilitaría la penetración de la ZP. Esta teoría ha sido respaldada por diversas características estructurales y funcionales de la cabeza espermática en mamíferos euterios tales, como la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil afilado del perforatorium y la resistencia de la membrana acrosomal interna (Bedford, 2004).

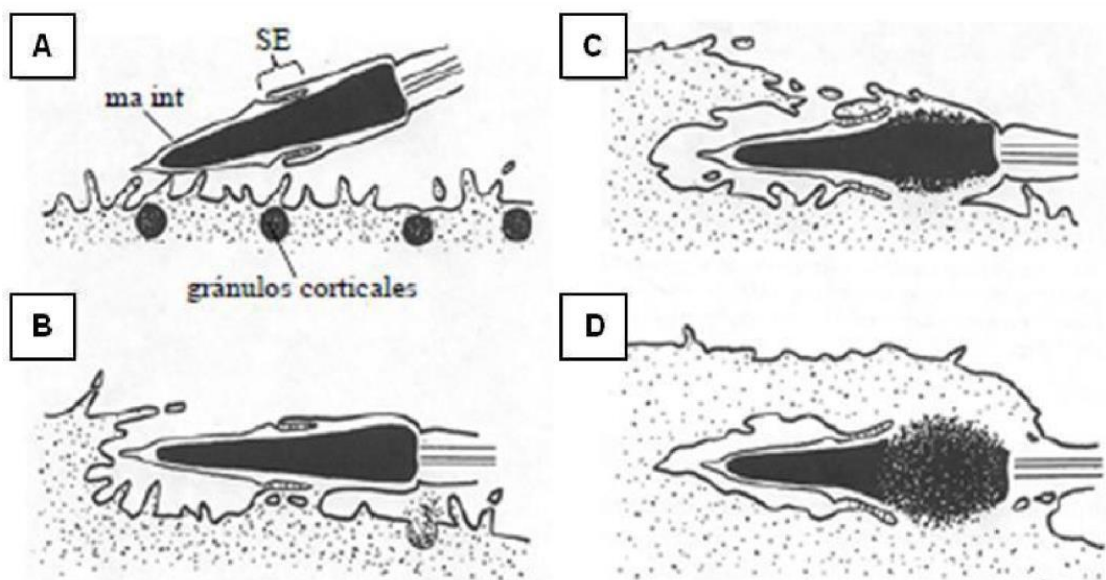
La penetración de la ZP representa la fase más especie-específica dentro del proceso de fertilización ya que un espermatozoide solo puede atravesar la ZP de un ovocito de su misma especie. Aunque existen excepciones en mamíferos híbridos como el cruce entre león y tigre o entre asno y caballo, en general, la reproducción interespecífica está limitada por factores anatómicos, comportamentales y barreras celulares como la ZP (Hanada & Chang, 1972). En estudios con modelos quiméricos en los que las proteínas ZP2 y ZP3 de ratón fueron sustituidas por sus homólogas humanas, se observó que los ovocitos seguían siendo fertilizados por espermatozoides de ratón, pero no por espermatozoides humanos, sugiriendo que la especificidad de especie no dependería únicamente de la secuencia peptídica de estas proteínas, sino de los oligosacáridos asociados a ellas (Rankin *et al.*, 2003). Además, cada vez hay mayor consenso en que la unión a la ZP y la especie-especificidad no dependen de una única proteína sino de múltiples moléculas que actúan en conjunto. Esta idea es respaldada por la identificación de grupos de proteínas localizadas en la cabeza del espermatozoide, específicamente en la región donde ocurre la interacción con la ZP (Reid *et al.*, 2011).

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

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la ZP, cruza rápidamente al espacio perivitelino, un microambiente que contiene vesículas membranosas secretadas por el ovocito. Estas vesículas podrían interactuar con el espermatozoide y favorecer su capacidad

fusogénica (Miyado *et al.*, 2008). A continuación, ocurre la fusión entre las membranas plasmáticas de ambas gametas, un evento clave que marca la fertilización del ovocito.

El proceso de fusión espermatozoide-ovocito consta de dos fases principales: primero, la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito, seguida por la fusión propiamente dicha. Luego de un breve intervalo, cuya duración varía según la especie, se establece la fusión entre la membrana del segmento ecuatorial del espermatozoide y las microvellosidades del oolema, lo que se acompaña de una marcada reducción o cese en el movimiento flagelar (Gaddum-Rosse, 1985). Si bien se consideraba que la motilidad espermática no era un requisito para la fusión, estudios recientes han sugerido que cierto tipo de movimiento sutil podría ser necesario para estimular la unión de las membranas (Ravaux *et al.*, 2016). Finalmente, el espermatozoide es incorporado progresivamente al citoplasma del ovocito: la parte posterior de la cabeza y la cola ingresan a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es internalizada de manera similar a la fagocitosis (Shalgi & Phillips, 1980) (**Figura 19**).



**Figura 19. 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 los primeros puntos entre las gametas. **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 (modificado de Yanagimachi 1994).

Los dominios de membrana implicados en la fusión están restringidos en ambas gametas, ya que no toda la membrana plasmática presenta propiedades fusogénicas. En roedores, el ovocito está recubierto por microvellosidades en casi toda su superficie, con excepción del área que rodea al huso meiótico, a través de la cual la fusión raramente ocurre (Ebensperger & Barros, 1984; Johnson *et al.*, 1975). En cuanto al espermatozoide, se ha establecido que la membrana plasmática del segmento ecuatorial es la primera en fusionarse con el ovocito (Arts *et al.*, 1993; Yanagimachi & Bhattacharyya, 1988). Es por eso que la RA es un paso indispensable en este proceso, ya que solo después de completarse, se expone el SE y adquiere su capacidad fusogénica. Como consecuencia, los espermatozoides que aún no han reaccionado no pueden fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).

En cuanto a la especificidad de especie en la fusión de gametas, la misma es menos estricta en comparación con la penetración de la ZP. Existen casos en los que la fusión entre gametas de distintas especies es posible, aunque solo entre especies determinadas y no siempre en ambas direcciones. Es así que los ovocitos de rata pueden fusionarse con espermatozoides de ratón, pero los ovocitos de ratón no permiten la fusión con espermatozoides de rata (Yanagimachi, 1994). Asimismo, al remover la ZP del ovocito de hámster, este puede ser penetrado por espermatozoides de varias especies, incluido el humano (OMS, 2010).

Aunque la fusión de gametas es un evento crucial en la fertilización, aún se dispone de poca información sobre los mecanismos moleculares que la regulan. Al igual que en la unión a la ZP, este proceso depende de la interacción entre moléculas complementarias situadas en los dominios fusogénicos específicos de las membranas del espermatozoide y el ovocito. En relación con los componentes de la membrana ovocitaria, las integrinas fueron inicialmente consideradas mediadores clave de la fusión debido a su capacidad para interactuar con proteínas espermáticas involucradas en este proceso. En particular, la integrina  $\alpha 6\beta 1$ , una de las más abundantes en la superficie del ovocito, se propuso como responsable de la adhesión espermatozoide-ovocito (Almeida *et al.*, 1995; Bigler *et al.*, 2000). No obstante, estudios en modelos KO demostraron que la ausencia de esta integrina no afectaba la fertilidad, lo que puso en duda su papel en la fusión de gametas (Miller *et al.*, 2000). Investigaciones posteriores, que incluyeron ensayos de fusión *in vitro* con anticuerpos bloqueantes y

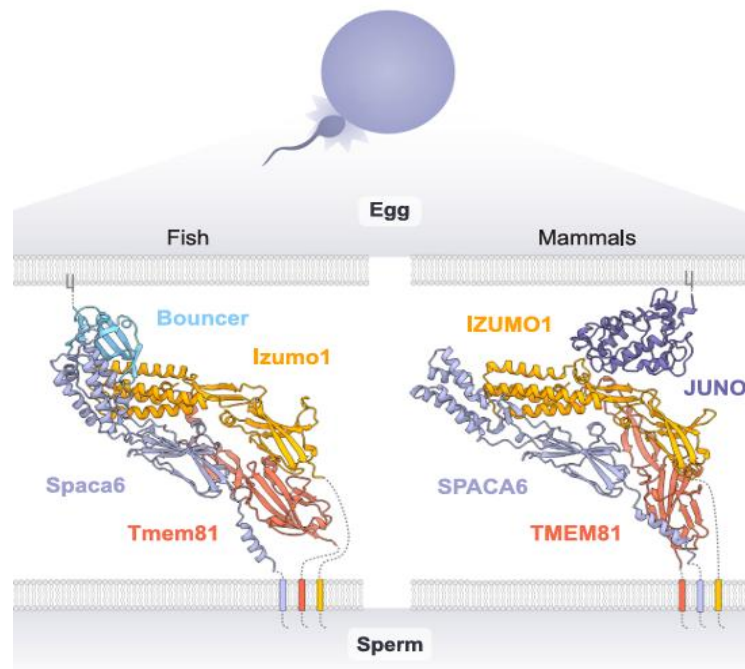
combinaciones de mutantes para diversas integrinas, revelaron que ninguna de las integrinas identificadas en la membrana del ovocito ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 5$ ) era indispensable para la fertilización (He *et al.*, 2003).

Por otro lado, la interacción entre la integrina  $\alpha 6\beta 1$  y la tetraspanina CD9 en la membrana del ovocito de ratón (Chen *et al.*, 1999), junto con la participación de CD9 en la fusión de membranas en otros sistemas celulares (Tachibana & Hemler, 1999), sugirió que esta tetraspanina podría desempeñar un papel en la fusión de gametas. Esta hipótesis se confirmó mediante estudios en ratones KO para CD9, los cuales mostraron infertilidad en hembras debido a que sus ovocitos, a pesar de unirse a los espermatozoides, no podían fusionarse con ellos (Kaji *et al.*, 2000; Miyado *et al.*, 2000). Así, CD9 fue la primera molécula del ovocito identificada como esencial para la fusión de gametas y la fertilidad femenina.

Por su parte, una de las moléculas espermáticas identificadas hasta el momento como completamente esencial para la fusión con el ovocito es IZUMO1, perteneciente a la familia de inmunoglobulinas IgSF, que se expresa específicamente en los testículos y se localiza en el acrosoma del espermatozoide (Inoue *et al.*, 2005). La importancia de IZUMO1 en la fertilización fue confirmada mediante estudios en ratones KO en los cuales los machos mutantes resultaron estériles debido a la incapacidad de sus espermatozoides para fusionarse con el ovocito (Inoue *et al.*, 2005). Investigaciones en ratones KO para TSSK6 (testis-specific serine kinase 6) revelaron que IZUMO se redistribuye al SE y que la fusión de gametas se ve afectada cuando IZUMO1 no se redistribuye correctamente (Sosnik *et al.*, 2009). Posteriormente, se identificó a la proteína ovocitaria a la que se unía IZUMO1, JUNO, una proteína receptora de folato unida al oolema por GPI (Bianchi *et al.*, 2014). Se observó que anticuerpos contra JUNO bloqueaban la fertilización en ovocitos de ratón sin ZP, y que hembras KO para esta proteína eran infértiles debido a defectos en la interacción con la membrana del espermatozoide. Además, tras la fertilización, se observó que JUNO es liberada rápidamente del ovocito en vesículas, contribuyendo al mecanismo de bloqueo de la polispermia (Bianchi *et al.*, 2014). Curiosamente, en ovocitos activados partenogénicamente mediante compuestos farmacológicos como  $Sr^{2+}$ , esta liberación de JUNO no se produce.

La interacción entre IZUMO y JUNO está conservada en diversas especies de mamíferos, incluyendo humanos y cerdos, y se caracteriza por ser de baja afinidad en los primeros pasos de la fusión. No obstante, este contacto inicial facilita la formación de un complejo molecular más estable mediante la participación de la tetraspanina CD9, que refuerza la interacción entre IZUMO1 y JUNO (Chalbi *et al.*, 2014). CD9, previamente propuesta como organizadora de microdominios involucrados en la fusión de membranas (Hemler, 2005). Un dato adicional que refuerza la importancia de IZUMO1 en la fusión es que la versión humana de esta proteína puede interactuar con JUNO en ovocitos de hámster, lo que explicaría la capacidad de estos ovocitos para fusionarse con espermatozoides humanos (Bianchi & Wright, 2015). El hecho de que se viera que luego de completarse la fusión IZUMO1 desaparece de la membrana plasmática (Satouh *et al.*, 2012) abrió el interrogante sobre su mecanismo de acción.

Se ha propuesto que IZUMO1 actuaría en cooperación con otras proteínas espermáticas como SPACA6, TMEM95, FIMP, DCST1/2 y SOF1, las cuales formarían parte de un complejo multiproteico esencial para la fusión (Deneke & Pauli, 2021). En este sentido, estudios más recientes han demostrado que IZUMO1 forma parte de un complejo trimérico conservado en vertebrados junto a SPACA6 y TMEM81, tres proteínas espermáticas cuya interacción sería esencial para la fertilidad masculina en ratones y peces (Deneke *et al.*, 2024). Este complejo espermático actuaría como puente entre la membrana del espermatozoide y la del ovocito al interactuar con receptores específicos, como JUNO en mamíferos o Bouncer en peces (**Figura 20**). La formación del complejo no solo estabilizaría a sus componentes, sino que también organizaría espacialmente las moléculas espermáticas de modo tal que facilita su reconocimiento y unión con los receptores ovocitarios, constituyendo así una plataforma funcional indispensable para el proceso de fusión de gametas (Deneke *et al.*, 2024).



**Figura 20. Moléculas involucradas en la fusión de gametas.** Imágenes de animación generadas mediante *alfa-fold* mostrando el trímero conservado en espermatozoides de vertebrados que formarían IZUMO1, TMEM81 y SPACA6, interactuando con su receptor en el ovocito, JUNO en mamíferos y BOUNCER en peces (Deneke *et al.*, 2024).

Si bien se han identificado proteínas esenciales para la fusión de gametas, hasta el momento ninguna ha demostrado ser suficiente para inducir la fusión de membranas por sí sola (Wright & Bianchi, 2016). Recientemente, se descubrió que la proteína HAP2 en plantas actúa como un fusógeno sexual formando parte de la superfamilia de proteínas conservadas a lo largo de la evolución denominada Fusexinas (fusion proteins essential for sexual reproduction & exoplasmic merger of plasma membranes) (Valansi *et al.*, 2017), sugiriendo que el fusógeno aún no identificado en mamíferos podría pertenecer a esta familia. Recientemente se ha demostrado que IZUMO1 no solo participaría en la adhesión espermatozoide-ovocito, sino que también poseería actividad fusogénica unilateral, evidenciado por su expresión en células somáticas no fusionantes, las cuales adquirieron la capacidad de fusionarse únicamente mediante la presencia de IZUMO1, incluso en ausencia de JUNO, comportamiento similar al de fusógenos virales como el de la gripe o el VSV-G (Brukman *et al.*, 2023).

Más allá del papel central del par IZUMO1-JUNO, otras proteínas espermáticas han sido relacionadas con el proceso de fusión (Gonzalez *et al.*, 2021), incluyendo las proteínas CRISP, que serán abordadas más adelante en esta introducción.

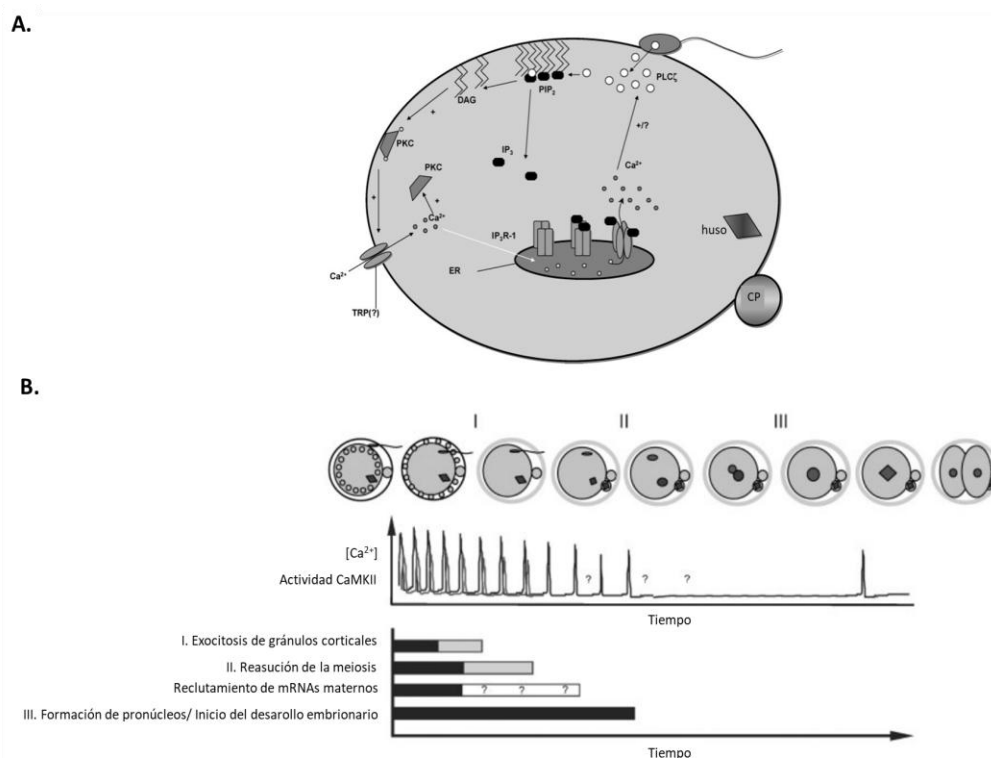
### *Activación del ovocito y desarrollo embrionario temprano*

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito experimenta una serie de cambios morfológicos y bioquímicos llamados activación que son críticos para el posterior éxito del desarrollo embrionario temprano. Esta fase inicial ocurre bajo un estado de silencio transcripcional y abarca la migración y fusión de los pronúcleos materno y paterno, la reprogramación genética y epigenética, la activación del genoma embrionario y sucesivas divisiones mitóticas que conducen a la formación de una mórula compacta, precursor del blastocisto (Ramathal *et al.*, 2015).

Entre los eventos que suceden inmediatamente luego de la fertilización, uno de los principales son las oscilaciones intracelulares  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas modificaciones en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen una señalización prolongada y repetitiva que ha demostrado ser tanto necesaria como suficiente para inducir la activación del ovocito y permitir su transición hacia el desarrollo embrionario temprano (Malcuit *et al.*, 2006; Schultz & Kopf, 1995). Molecularmente, se sabe que el espermatozoide introduce en el ovocito una proteína soluble (PLC $\zeta$ ) que desencadena la producción de moléculas señalizadoras (IP3 y DAG). El IP3 libera  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios del ovocito, mientras que el DAG actúa en la membrana plasmática, ayudando a activar la proteína quinasa C (PKC). Esta activación puede favorecer la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, manteniendo las oscilaciones. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de entrada de calcio, se sabe que participan canales TRP y mecanismos dependientes de los reservorios internos (**Figura 21.A**).

Una vez desencadenadas, estas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan una serie de respuestas celulares clave (**Figura 21.B**). Los primeros picos de  $\text{Ca}^{2+}$  son fundamentales para desencadenar la exocitosis del contenido de los gránulos corticales (Cran *et al.*, 1988), lo cual, como ya fuera mencionado, establece un bloqueo contra la polispermia. Otra consecuencia fundamental es la degradación de la ciclina B, necesaria para el reinicio del ciclo celular. Este

proceso es mediado por la activación de la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII), que conduce a la activación del complejo promotor de la anafase, encargado de dirigir la ciclina B hacia su degradación (Hyslop *et al.*, 2004). De esta forma se induce la salida del arresto meiótico en Metafase II (MII) del ovocito, permitiendo el reinicio de la meiosis, lo que lleva a la expulsión del segundo corpúsculo polar y la formación del pronúcleo femenino. Luego de la acumulación de suficientes oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 21.B**), ocurre la migración de los pronúcleos hacia el centro del ovocito, donde sus envolturas nucleares se desintegran, permitiendo la fusión de los cromosomas parentales en un proceso conocido como singamia, que da inicio a la primera división mitótica, marcando el comienzo del desarrollo embrionario.

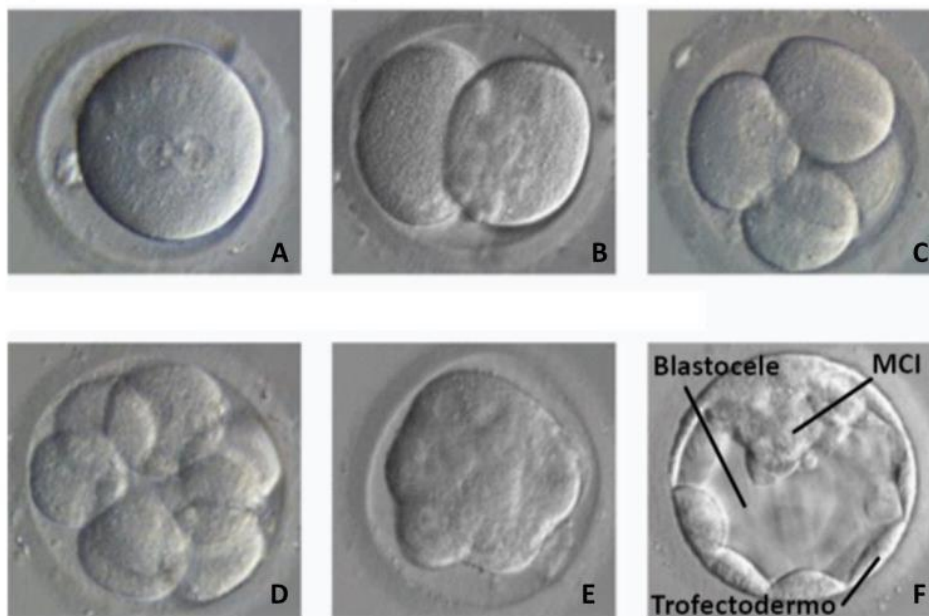


**Figura 21. Activación ovocitaria y desarrollo embrionario. A.** Mecanismos propuestos de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fertilización en mamíferos. Tras la fusión de las gametas, el espermatozoide libera PLC $\zeta$  en el citoplasma del ovocito, la cual es capaz de hidrolizar PIP2 en dos moléculas señalizadoras: IP3 y DAG. El IP3 está implicado en la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  al unirse y activar su receptor, el IP3R-1, localizado en el retículo endoplasmático (RE), que es el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, mientras que el DAG podría desempeñar un papel integral en eventos de señalización en la membrana plasmática. El DAG, junto con los aumentos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  puede, además, dirigir y activar la PKC en la membrana plasmática, la cual podría regular el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  para recargar los depósitos intracelulares,

haciendo posible la persistencia de las oscilaciones. **B.** En el ratón, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se sincronizan con el ciclo celular y cesan poco antes de la formación de los pronúcleos. Los eventos de activación del ovocito presentan distintos requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ : los primeros picos son responsables de la exocitosis de los gránulos corticales y del bloqueo a la polispermia (I), mientras que se requieren oscilaciones adicionales para inducir el reinicio de la meiosis, incluida la extrusión del segundo cuerpo polar y el inicio del reclutamiento de ARNm maternos (II). Una estimulación adicional sería necesaria para promover la formación de pronúcleos y el inicio de la mitosis embrionaria (III). El requerimiento relativo de  $\text{Ca}^{2+}$  para completar cada evento de activación del ovocito se representa mediante barras horizontales (las áreas oscuras dentro de la barra indican el número de elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarias para iniciar cada evento; las áreas sombreadas indican el número requerido para completarlos; modificado de Ducibella *et al.*, 2002). Cada aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  induce un incremento concomitante en la actividad de CaMKII, que se considera una de las moléculas responsables de traducir el estímulo de  $\text{Ca}^{2+}$  en eventos de activación del ovocito. (Modificado de Malcuit *et al.*, 2006)

Se ha demostrado, además, que el patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  regula el reclutamiento y traducción de ARNm maternos almacenados en el citoplasma del ovocito, proceso considerado crucial para la activación del genoma embrionario. La traducción de estos ARNm parece depender del número y frecuencia de los pulsos de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo una relación directa entre la señalización y la síntesis proteica temprana (Ducibella *et al.*, 2002; Schultz & Kopf, 1995).

A medida que el embrión progresa en su desarrollo preimplantatorio, las sucesivas divisiones mitóticas conducen a la compactación, que ocurre en la fase de 8 células en ratón y de 16 células en humanos (Mulnard & Huygens, 1978). Este evento es la primera pérdida de simetría radial en el desarrollo embrionario. Luego de la compactación y polarización, el destino de las células hijas queda determinado por la orientación del plano de clivaje (Johnson & Ziomek, 1981; Sutherland *et al.*, 1990). A partir de divisiones simétricas y asimétricas, se generan dos poblaciones celulares diferenciadas: las células internas formarán el macizo celular interno (MCI), mientras que las células externas darán origen al trofotodermo (**Figura 22**). Finalmente, como preparación para la implantación en el útero, el blastocisto eclosiona de la ZP, lo que permite su crecimiento y desarrollo, así como la interacción del trofotodermo con el epitelio uterino para facilitar su adhesión.



**Figura 22. 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

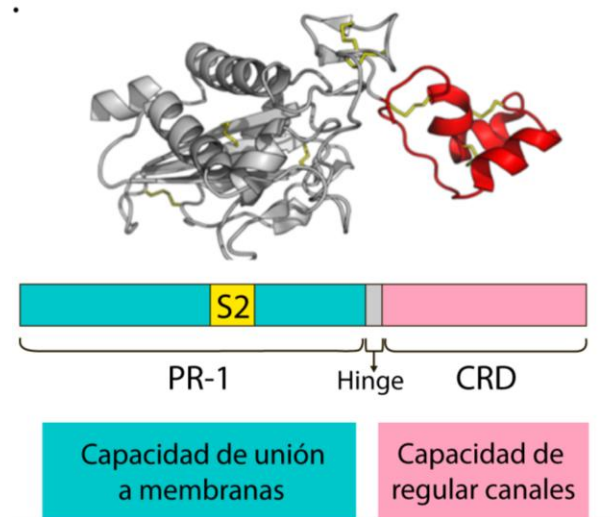
A lo largo de los años, nuestro laboratorio ha contribuido a la caracterización de una familia de proteínas denominada CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins) destacada por su participación en diferentes etapas del proceso reproductivo.

Nuestros estudios, junto con los realizados por otros grupos, han demostrado que las proteínas CRISP están involucradas en la maduración epididimaria, la interacción de gametas e, incluso, en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Gonzalez *et al.*, 2021). Comprender su función no solo permitirá avanzar en el conocimiento de la fisiología reproductiva sino también ofrecerá nuevas perspectivas para el abordaje de la infertilidad y el desarrollo de métodos anticonceptivos. Dado que las proteínas CRISP constituyen el eje central de esta Tesis doctoral, en esta última sección de la introducción se presentará en detalle a esta importante familia de proteínas.

Las proteínas de la familia CRISP, junto con las pertenecientes a las familias AG5 (Antigen 5) y PR-1 (Pathogenesis-Related Protein 1), conforman la superfamilia CAP (CRISP, AG5, PR-1). Los miembros de esta superfamilia comparten el dominio PR-1 y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose desde procariotas hasta eucariotas, incluidos hongos, plantas y diversos grupos de animales como insectos, reptiles y mamíferos (Abraham & Chandler 2017; Gibbs *et al.*, 2008). Se ha propuesto que estas proteínas desempeñan funciones en la reproducción, la defensa contra patógenos y la toxicidad (Gibbs *et al.*, 2008).

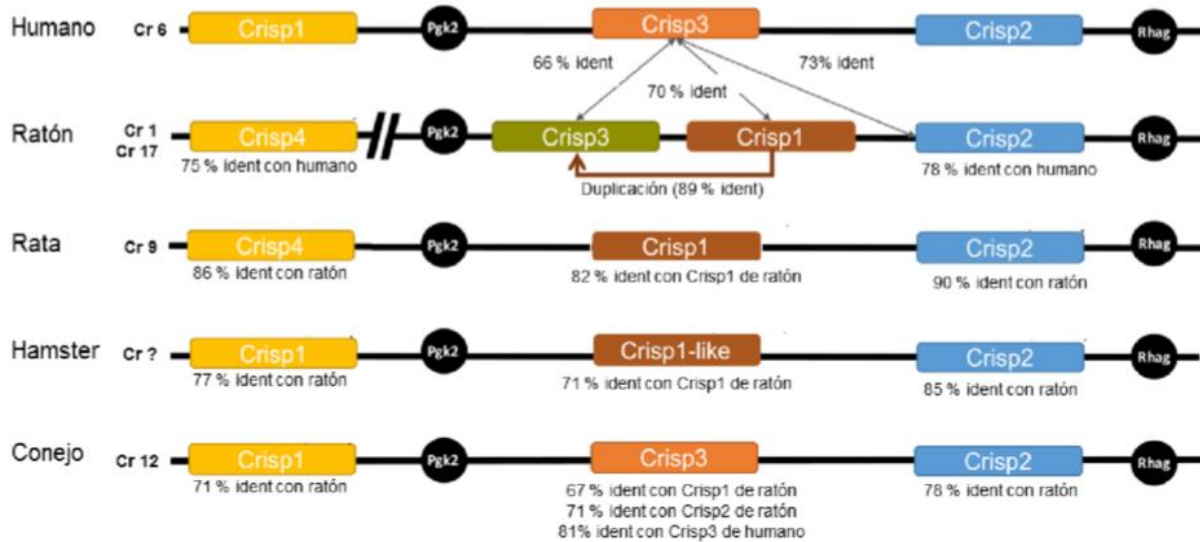
Las CRISP se caracterizan por contener 16 residuos de cisteína conservados, de los cuales 10 se localizan en el dominio C-terminal de la molécula (Gibbs *et al.*, 2008). Estudios de cristalografía han revelado que todos los miembros de esta familia presentan una estructura general compuesta por dos dominios bien definidos: un dominio C-terminal conocido como CRD (Cysteine Rich Domain), de aproximadamente 6 kDa, y un dominio N-terminal denominado Pathogenesis Related 1 (PR-1) o CAP, con un tamaño aproximado de 21 kDa (**Figura 23**) (Gibbs *et al.*, 2006; Gibbs *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2005).

El CRD está conformado por dos regiones: Hinge (o bisagra) e ICR (Ion Channel Regulator). Hasta el momento, las evidencias sugieren que estos dos dominios desempeñan funciones biológicas independientes. Mientras que se ha demostrado que el dominio CRD, a través de su región ICR, tiene la capacidad de modular canales iónicos (Ernesto *et al.*, 2015; Gibbs *et al.*, 2006, 2011; Guo *et al.*, 2005), el dominio N-terminal parece estar implicado en la interacción entre membranas (Ellerman *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 1999). Además, el dominio CRD está conectado al PR-1 mediante la región Hinge, sin que haya otro punto de contacto directo entre PR-1 e ICR (Gibbs *et al.*, 2008) (**Figura 23**).



**Figura 23. Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas de la familia CRISP y su relación con las funciones propuestas.**

La familia CRISP se originó a partir de la incorporación de las regiones Hinge e ICR al dominio PR-1 ancestral y está presente en algunos invertebrados, como los insectos, así como en todas las clases de vertebrados (Abraham & Chandler 2017). En los mamíferos, las especies estudiadas hasta ahora poseen entre tres y cuatro genes que codifican proteínas CRISP. Estos genes presentan un alto grado de conservación entre sí en comparación con sus homólogos en reptiles (Sunagar *et al.*, 2012). Aunque las relaciones evolutivas entre las CRISP de mamíferos siguen siendo objeto de debate, un estudio de nuestro grupo en colaboración con el Dr. Eduardo Roldán ha permitido esclarecer parte de la historia evolutiva de esta familia (Arévalo *et al.*, 2020) (**Figura 24**). Este trabajo reveló que, si bien la mayoría de los mamíferos poseen tres genes CRISP, el ratón es una de las pocas especies que presenta cuatro, y sugiere la ocurrencia de un evento de duplicación del gen de *Crisp1* específico en el linaje de *Mus*. Además, se observaron diferentes presiones selectivas actuando sobre los distintos genes, con signos de selección positiva en algunos casos, lo que apunta a una evolución adaptativa posiblemente impulsada por selección sexual.



**Figura 24. 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.*, 2020).

En mamíferos, las proteínas CRISP se expresan, principalmente, en el tracto reproductor masculino. Específicamente, CRISP1 es sintetizada mayormente en el epidídimo, CRISP2 tiene un origen testicular, CRISP3 está presente tanto en órganos reproductivos como no reproductivos, y CRISP4 es expresada exclusivamente en el epidídimo (Gibbs *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2021). Las evidencias disponibles sugieren que las proteínas CRISP acompañan a los espermatozoides a lo largo de su recorrido, desde su producción en el testículo hasta su participación en la fertilización. Su presencia se mantiene durante la maduración espermática en el epidídimo, su interacción con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias en la eyaculación, su capacitación en el tracto reproductor femenino y su llegada al ovocito, desempeñando un papel clave en distintas etapas del proceso de fertilización.

A continuación, se describen en detalle las características y funciones de cada una de estas proteínas.

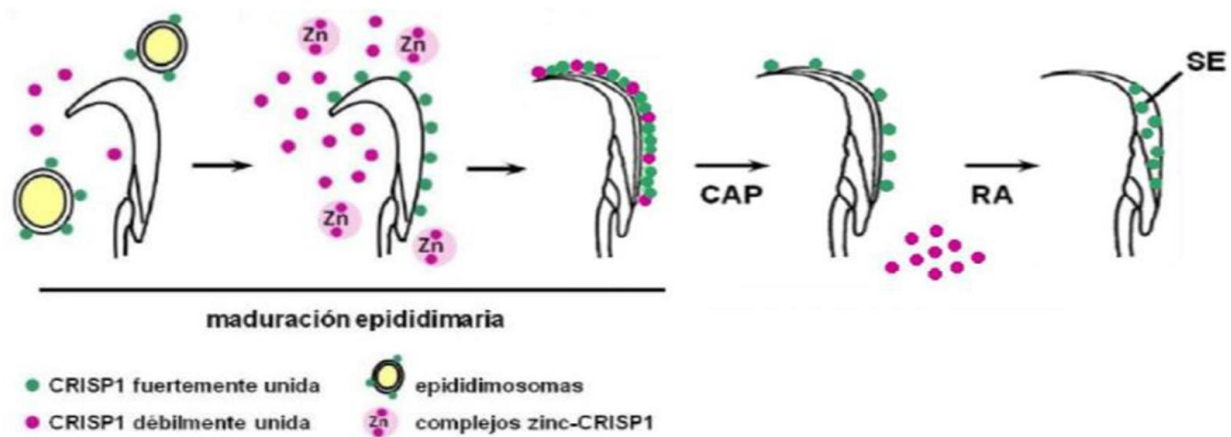
### Proteína CRISP1

La proteína CRISP1 fue el primer miembro de esta familia en ser identificado, caracterizado y purificado, trabajo realizado por nuestro grupo de investigación utilizando la rata como modelo experimental (Cameo & Blaquier 1976; Garberi *et al.*, 1979; Garberi *et al.*, 1982). Estudios posteriores reportaron la expresión de CRISP1 en tejidos de secreción exocrina tales como las glándulas salivales y lacrimales (Eberspaecher *et al.*, 1995; Haendler *et al.*, 1993, 1997), así como en órganos clave del sistema inmunológico, incluyendo el bazo y el timo (Gibbs *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

En la rata, CRISP1 es una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo y su síntesis es regulada de manera andrógeno-dependiente (Kohane *et al.*, 1983) asociándose a la superficie de los espermatozoides a medida que los mismos atraviesan el epidídimo (Kohane *et al.*, 1980). Evidencias de nuestro grupo revelaron la existencia de dos poblaciones de CRISP1 con diferente afinidad de unión a los espermatozoides: una mayoritaria con una interacción débil, y otra minoritaria con una unión de alta afinidad (Cohen *et al.*, 2000a). Mientras la población de CRISP1 fuertemente unida sería transferida desde los epididimosomas a los espermatozoides en el *caput* epididimario (Maldera *et al.*, 2006), la proteína soluble presente en el lumen epididimario se unirá débilmente a los espermatozoides a medida que los mismos avanzan por el epidídimo, mediante un mecanismo dependiente de la formación de complejos con zinc (Maldera *et al.*, 2011). Como resultado, el espermatozoide maduro presenta ambas poblaciones de CRISP1 en su superficie (**Figura 25**).

Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado que, durante la incubación de espermatozoides en condiciones que favorecen la capacitación, se libera una cantidad considerable de CRISP1 (Cohen *et al.*, 2000a; Kohane *et al.*, 1980). Este hallazgo sugiere que la proteína podría desempeñar un papel en la regulación de la capacitación, actuando como un factor decapacitante (**Figura 25**). En este sentido, un estudio de Roberts y colaboradores (Roberts *et al.*, 2003) reveló que la presencia de CRISP1 durante la capacitación de espermatozoides de rata inhibía tanto la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como la RA inducida por progesterona.

Aunque una fracción de CRISP1 es liberada en el transcurso de la capacitación, estudios de microscopía electrónica han mostrado que una porción de la proteína permanece asociada a los espermatozoides tras la RA (Cameo *et al.*, 1986). Investigaciones posteriores indicaron que, luego de la capacitación, tanto *in vitro* como *in vivo*, CRISP1 se redistribuye desde la región dorsal de la cabeza del espermatozoide hacia el segmento ecuatorial (Rochwerger & Cuasnicu 1992).



**Figura 25. 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 (modificada de Weigel Muñoz *et al.*, 2019).

Dado que solo aquellas proteínas que permanecen en el espermatozoide después de la capacitación y/o RA pueden intervenir en la interacción con el ovocito, se llevaron a cabo diversos estudios en el laboratorio para evaluar el posible rol de CRISP1 en la fertilización. Se observó que la incubación de espermatozoides de rata con un anticuerpo anti-CRISP1 antes de la inseminación intrauterina reducía significativamente la tasa de fertilización de los ovocitos (Cuasnicu *et al.*, 1984), lo que representó la primera evidencia de su participación en el proceso de fertilización. Estudios posteriores demostraron que la adición de CRISP1 purificada durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP disminuía el porcentaje de ovocitos penetrados. Sin embargo, la presencia de la proteína no afectó la unión

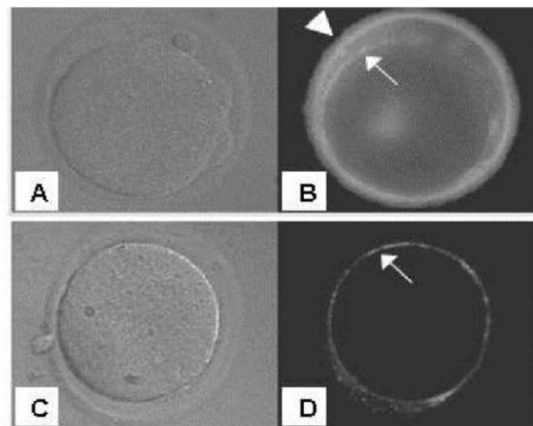
inicial de los espermatozoides al oolema, sugiriendo que CRISP1 intervendría en una etapa posterior a la adhesión de las gametas, específicamente en la fusión de membranas (Rochwerger & Cuasnicu, 1992). Estos resultados indicaron la posible existencia de sitios de unión para CRISP1 en la membrana del ovocito a juzgar por ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), detectando la unión de CRISP1 a toda la superficie del ovocito, exceptuando la zona que recubre el huso meiótico. Estudios adicionales con CRISP1 nativa deglicosilada, proteína recombinante expresada en un sistema procariótico y fragmentos recombinantes permitieron establecer que los carbohidratos no serían esenciales para su función en la fusión (Ellerman *et al.*, 2002). Además, se identificó que la región comprendida entre los aminoácidos 114 y 159 del dominio PR-1 conservaba la actividad biológica de la proteína completa.

Un hallazgo relevante fue que esta secuencia de 45 aminoácidos incluía los dos motivos característicos de la familia CRISP, denominados Signature 1 y Signature 2. Ensayos con péptidos sintéticos correspondientes a estas regiones (denominados P1 y P2) demostraron que sólo P2 se unía a la superficie del ovocito e interfería con la fusión de gametas, mientras que P1 no mostraba dicho efecto. En conjunto, estos datos revelaron que CRISP1 se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos altamente conservada dentro de la familia CRISP, correspondiente al Signature 2 (S2) (Ellerman *et al.*, 2006).

La proteína CRISP1 en ratón no solo muestra una alta similitud con su homóloga en rata (Haendler *et al.* 1993; Mizuki & Kasahara 1992) sino que, de acuerdo a estudios realizados en nuestro laboratorio, la misma se encuentra presente en la superficie del espermatozoide y también participa en la fusión espermatozoide-ovocito (Cohen *et al.*, 2000b; Da Ros *et al.*, 2008). Además, mediante ensayos de IFI, se han detectado sitios complementarios para CRISP1 en la región fusogénica del ovocito murino, un hallazgo similar al reportado por nuestro grupo en rata (Cohen *et al.*, 2000b).

Más allá de su papel en la fusión de gametas, investigaciones posteriores en las que se evaluó el efecto de la presencia tanto de anticuerpos específicos contra CRISP1 como de CRISP1 exógena durante la fertilización, revelaron que CRISP1 también interviene en la interacción inicial entre el espermatozoide y la ZP. Asimismo, experimentos de IFI demostraron que, mientras la CRISP1 nativa tenía la capacidad de unirse tanto al oolema

como a la ZP (**Figura 26**), la versión recombinante de la proteína solo se unía al oolema, sugiriendo que sería la estructura conformacional de CRISP1, más que su glicosilación, un factor clave para su unión a la ZP (Busso *et al.*, 2007). En conjunto, estas observaciones apoyan la hipótesis de que CRISP1 desempeña un papel dual en la interacción entre gametas, actuando tanto en la unión del espermatozoide a la ZP como en el proceso de fusión con el ovocito, a través de sitios complementarios en la gameta femenina.



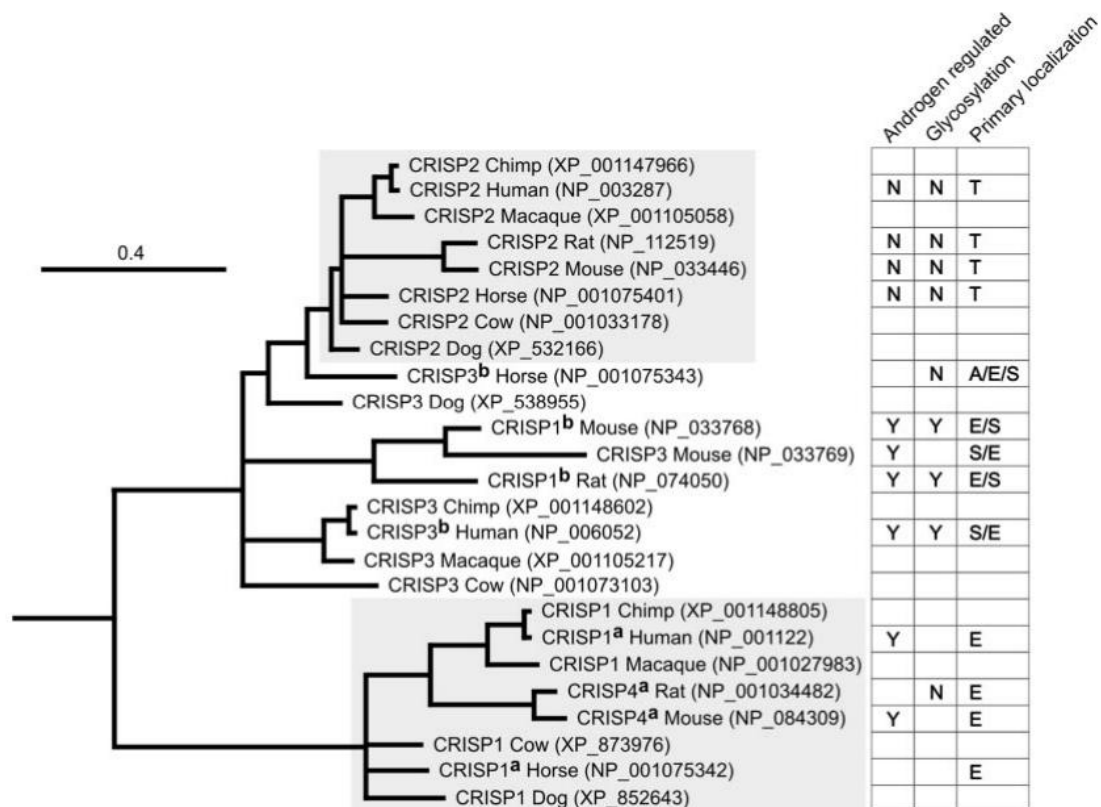
**Figura 26. Localización de los sitios complementarios a CRISP1 en el ovocito.** Microfotografías de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP1 nativa (A y B) y de CRISP1 recombinante (C y D) tanto en la ZP (punta de flecha) como en el oolema (flecha) (Busso *et al.*, 2007). **A.** y **C.** imágenes de DIC y **B.** y **D.** imágenes de fluorescencia.

Por otra parte, se ha identificado en humanos una proteína denominada ARP o hCRISP1 (Hayashi *et al.*, 1996; Krätzschar *et al.*, 1996), la cual presenta un alto grado de homología con CRISP1 de roedores. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio demostraron que hCRISP1 se encuentra en la superficie del espermatozoide humano y cumple un papel en la unión a la ZP así como en la fusión de gametas (Cohen *et al.*, 2001; Maldera *et al.*, 2014). Si bien esta proteína fue denominada hCRISP1 por su homología (aprox 40%) con la proteína CRISP1 epididimaria de rata y ratón, estudios posteriores a la identificación de la proteína epididimaria CRISP4 (**Figura 24**) revelaron que hCRISP1 exhibía una mayor homología de secuencia tina con CRISP4 de roedores (aprox 60%). Dado que los humanos presentan sólo tres proteínas CRISP (hCRISP1, hCRISP2 y hCRISP3), se ha propuesto que hCRISP1, cuya

expresión en el epidídimo es elevada, desempeñaría una función equivalente a la combinación de las proteínas epididimarias de ratón CRISP1 y CRISP4 (Jalkanen *et al.*, 2005).

Más allá de su implicancia en la fertilización, CRISP1 ha demostrado ser relevante para la fertilidad de un individuo, a juzgar por estudios en los que la inmunización de ratas macho y hembra con CRISP1 nativa indujo la producción de anticuerpos específicos contra la proteína en más de un 90% de los animales y provocó una reducción significativa en la fertilidad de ambos sexos (Cuasnicu *et al.*, 1990; Perez Martinez *et al.*, 1995). Investigaciones posteriores revelaron que este efecto se debía a un mecanismo específico en el que los anticuerpos ingresan al tracto reproductivo, se asocian a los espermatozoides e inhiben su capacidad fertilizante sin generar efectos patológicos (Ellerman *et al.*, 1998). Estos hallazgos no solo destacan la importancia de CRISP1 en la fertilidad sino que también sugieren su potencial uso en el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad. En este contexto, nuestro laboratorio evaluó la respuesta inmune en primates no humanos (*Macaca fascicularis*) tras la inmunización con hCRISP1 recombinante, observándose la generación de una respuesta específica en ambos sexos. Los sueros inmunes reconocieron la proteína nativa en extractos proteicos de espermatozoides mediante *Western Blot* (WB) y también en espermatozoides frescos mediante IFI. Además, ensayos de ELISA e IFI revelaron que los anticuerpos anti-hCRISP1 estaban presentes en el plasma seminal y unidos a los espermatozoides eyaculados de los animales inmunizados, sin observarse alteraciones en el número, morfología o motilidad de espermatozoide, indicando que la inmunización con hCRISP1 no generaría efectos adversos sobre la espermatogénesis a nivel testicular ni sobre la maduración epididimaria (Ellerman *et al.*, 2010). El hecho de que CRISP1 se asocie a la superficie del espermatozoide siendo accesible a un ataque inmunológico (o farmacológico), que participe en etapas específicas de la fertilización y que, sea inmunogénica tanto en su forma nativa como recombinante la convierte en un blanco ideal para el desarrollo de estrategias de inmuno-anticoncepción masculina. Más aún, dado que CRISP1 es de origen epididimario y no participa ni en la espermatogénesis ni esteroidogénesis a nivel testicular, su bloqueo interferiría específicamente con la adquisición de capacidad fertilizante de los espermatozoides durante la maduración epididimaria representando una estrategia atractiva y segura de anticoncepción masculina como así también femenina. Si bien en los últimos años la comunidad científica ha reconocido que la idea de una vacuna anticonceptiva para

humanos difícilmente llegue al mercado por la dificultad de revertir la respuesta inmune gatillada, resulta de sumo interés la posibilidad de utilizar esta estrategia para el desarrollo de un método anticonceptivo para empleo en otras especies cuyo crecimiento poblacional requiera ser controlado tal como es el caso de los animales domésticos (ej: perros y gatos). En base a ello, y teniendo en cuenta que los genomas de estas especies predicen la presencia de proteínas homólogas a CRISP1 (**Figura 27**) (Gibbs *et al.*, 2008), las cuales aún no han sido identificadas, el Capítulo I de esta Tesis está enfocado en identificar y caracterizar las proteínas CRISP epididimarias caninas como blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para perros.



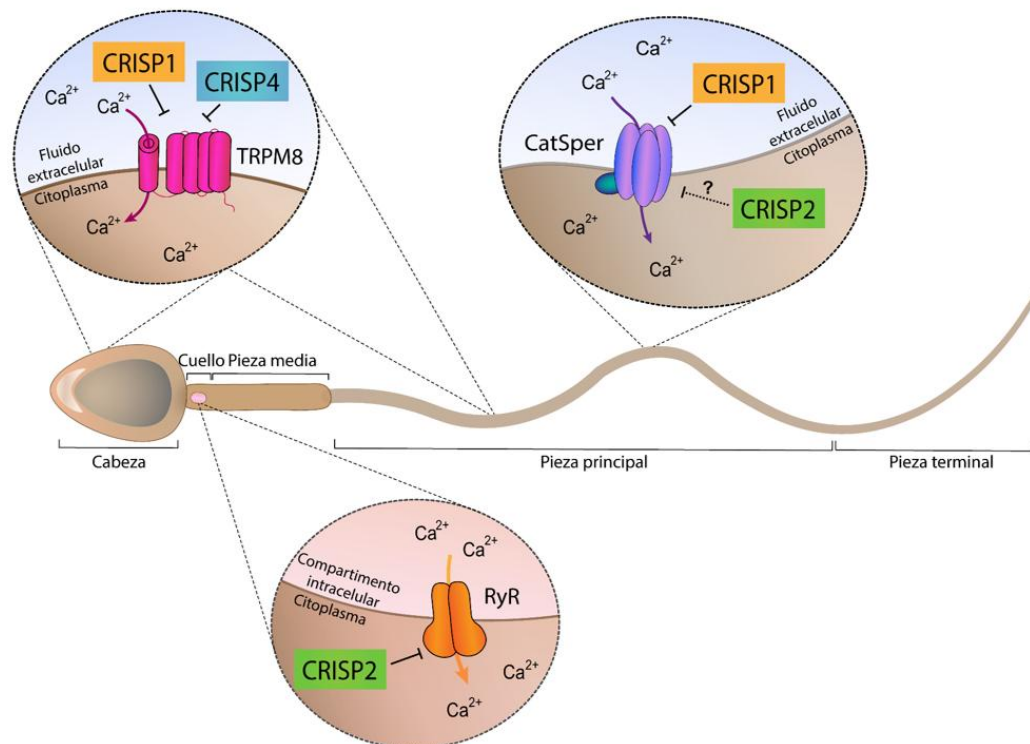
**Figura 27. Filogenia de CRISP en mamíferos.** Árbol filogenético mostrando la divergencia evolutiva entre los miembros de la familia CRISP en humano, macaco, chimpancé, perro, caballo, vaca, rata y ratón, junto con un resumen de la regulación de la expresión génica mediada por andrógenos, modificaciones postraduccionales de las proteínas y los principales sitios de localización. Los superíndices “a” y “b” en CRISP1, CRISP3 y CRISP4 de caballo, humano, ratón y rata indican similitud filogenética y discrepancias en la nomenclatura. E: epidídimo; S: conducto salival; T: testículo; A: *ampulla* del conducto deferente; N: no; Y: sí. (Gibbs *et al.*, 2008).

Hace ya varios años, para profundizar en la importancia de CRISP1 en la fertilidad, generamos una línea de ratones KO para esta proteína mediante recombinación homóloga. Como resultado, se estableció una colonia de ratones deficientes en CRISP1 con un fondo genético mixto (129/SvEvxC57B/6), constituyendo los primeros animales KO desarrollados para una proteína de la familia CRISP. El análisis de estos animales mostró que su viabilidad, crecimiento y fertilidad no presentaban diferencias respecto a los controles. Sin embargo, se observaron diferencias en diversos parámetros espermáticos tales, como una notable reducción en los niveles de pTyr (Da Ros et al., 2008), de HA, de motilidad y RA inducida dependiendo del fondo genético de la colonia mutante (Weigel Muñoz *et al.*, 2018).

Los espermatozoides de los ratones simples KO para CRISP1 fueron capaces de fertilizar ovocitos rodeados de cúmulus con una eficiencia comparable a la de los controles en ensayos *in vitro*. Sin embargo, al denudar al ovocito de las células del cúmulus, la tasa de fertilización se redujo significativamente para los espermatozoides KO, sin acumulación en el espacio perivitelino, lo que refuerza la idea de que CRISP1 juega un papel en la interacción espermatozoide-ZP. Asimismo, los ensayos de fertilización *in vitro* con ovocitos sin ZP mostraron una disminución marcada en la capacidad fusogénica de los espermatozoides mutantes (Da Ros *et al.*, 2008; Weigel Muñoz *et al.*, 2018).

Registros electrofisiológicos realizados en espermatozoides de ratón han proporcionado evidencia clara de que CRISP1 tiene la capacidad de modular la actividad de los canales de calcio TRPM8 y CatSper (**Figura 28**) (Ernesto *et al.*, 2015). Estos hallazgos establecen a CRISP1 como el primer inhibidor fisiológico identificado para CatSper, el principal canal de Ca<sup>2+</sup> en los espermatozoides. Además, mediciones de microscopía en tiempo real utilizando una sonda específica para Ca<sup>2+</sup> revelaron que la exposición de los espermatozoides a CRISP1 se asocia con una reducción en los niveles intracelulares de este ion (Ernesto *et al.*, 2015). Este efecto es coherente con estudios previos que han demostrado que las CRISP presentes en los venenos de reptiles pueden regular distintos canales iónicos (Gibbs *et al.*, 2008). En conjunto, estos resultados sugieren que mientras la fracción de CRISP1 fuertemente unida al espermatozoide desempeñaría un papel clave en la interacción con el ovocito a través de su dominio PR-1, la porción de CRISP1 débilmente asociada, que se libera durante la

capacitación, actuaría como un factor decapacitante al modular los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  TRPM8 y CatSper, probablemente mediante su dominio CRD.



**Figura 28. Capacidad reguladora de canales iónicos de las proteínas CRISP.** Se ha encontrado que las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP4 (ubicadas en la membrana plasmática de la cabeza y la cola del espermatozoide) regulan el canal TRPM8, presente en ambas regiones, y se ha propuesto su participación en la regulación de la reacción acrosomal. Además, se ha identificado que la CRISP1 epididimaria tiene la capacidad de regular CatSper, localizado en la pieza principal de la cola y fundamental para el desarrollo de la HA. Por otro lado, la CRISP2 testicular (presente en la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide) ha demostrado regular los receptores de Ryanodina (RyR), conocidos por su localización en el cuello del espermatozoide y su función en el control de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Más allá de su función en el tracto reproductor masculino, se ha detectado la presencia de CRISP1 en distintos órganos del sistema reproductor femenino, incluyendo el útero, el oviducto y el ovario (Ernesto *et al.*, 2015; Gibbs *et al.*, 2008). Estudios realizados en nuestro laboratorio también indican que CRISP1 se expresa en las células del cúmulo que rodea al ovocito y jugaría un papel en la fertilización, a juzgar por la menor capacidad de los espermatozoides para fertilizar los COC provenientes de hembras KO para CRISP1 (Ernesto *et al.*, 2015). En este sentido, de manera similar a lo descrito para la proteína homóloga en

anfibios, "allurina" (Burnett *et al.*, 2012), se ha propuesto que CRISP1 actuaría como un quimioatrayente de espermatozoides en mamíferos. Por otro lado, la incubación de espermatozoides en presencia de CRISP1 ha demostrado reducir los niveles de hiperactivación, lo cual podría explicarse por la capacidad de esta proteína de inhibir CatSper (Ernesto *et al.*, 2015). Estas evidencias nos llevaron a postular que CRISP1 presente en el cúmulus inhibiría la hiperactividad espermática, aumentando la orientación de los espermatozoides durante la penetración de cumulus (Ernesto *et al.*, 2015).

Finalmente, estudios en roedores han identificado la expresión de CRISP1 en tejidos de secreción exocrina como las glándulas salivales y lacrimales (Eberspaecher *et al.*, 1995; Haendler *et al.*, 1993, 1997), así como en órganos y células clave del sistema inmunológico, incluyendo células dendríticas, el bazo y el timo (Tesis doctoral Curci, 2019; Gibbs *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

### Proteína CRISP2

En 1987, se identificó una secuencia en el cromosoma 17 del ratón con expresión específica en el testículo (Kasahara *et al.*, 1987). Posteriormente, se determinó que su producto proteico presentaba una alta similitud con la proteína CRISP1 de rata (Kasahara *et al.*, 1989). El análisis de la secuencia codificante reveló la existencia de una proteína secretora con un dominio C-terminal rico en residuos de cisteína a la que se denominó Testicular Protein 1 (Tpx-1). Debido a su similitud estructural con CRISP1, años más tarde se propuso renombrarla como CRISP2 (Haendler *et al.*, 1993). Desde entonces, se ha identificado esta proteína en diversas especies, destacando un alto grado de conservación en su secuencia aminoacídica (Giese *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 1988; Kasahara *et al.*, 1989; O'Bryan *et al.*, 1998). Además, a diferencia de otros miembros de la familia CRISP, se ha demostrado que CRISP2 es la única cuya expresión se da predominantemente en el testículo, no está glicosilada y no se encuentra regulada por andrógenos (Gibbs *et al.*, 2008).

CRISP2 está presente en la superficie de células espermatógenicas dentro del testículo (Maeda *et al.*, 1998) y en el interior de los espermatozoides de diversas especies, incluyendo cobayo (Hardy *et al.*, 1988; O'Bryan *et al.*, 2001), ratón (Busso *et al.*, 2007) y humano (Busso

*et al.*, 2005; Masai *et al.*, 2025). Específicamente, se ha encontrado en el acrosoma, en la pieza conectora del cuello, en las fibras densas externas de la cola (Gibbs *et al.*, 2008; O'Bryan *et al.*, 1998; 2001), y en la gota citoplasmática y en el segmento ecuatorial en espermatozoides humanos eyaculados (Masai *et al.*, 2025). Estudios sobre su función han demostrado que el dominio N-terminal participa en la adhesión entre células germinales y células de Sertoli (Maeda *et al.*, 1999), mientras que la región C-terminal tiene la capacidad de regular el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales RyR (**Figura 28**) (Gibbs *et al.*, 2006). Dado que tanto los canales RyR (Harper *et al.*, 2004) como CRISP2 se localizan en el cuello del espermatozoide, y que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde reservorios intracelulares en esta región participa en la HA (Chang & Suarez, 2011), es probable que CRISP2 module dicha motilidad regulando los canales RyR y, por ende, los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Resultados recientes mostraron que, en condiciones nativas no reductoras, CRISP2 forma oligómeros tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide, aunque con distintos pesos moleculares y propiedades bioquímicas (Zhang *et al.*, 2021). Aunque se ha observado una leve expresión de CRISP2 en el ovario (Reddy *et al.*, 2008), aún se desconoce la relevancia de esta observación.

Nuestro grupo ha llevado a cabo diversos estudios para evaluar el papel de CRISP2 en la interacción entre gametas. Mediante ensayos de extracción proteica e inmunofluorescencia se determinó que, en ratones y humanos, CRISP2 es una proteína acrosomal que, a diferencia de lo que sucede con CRISP1, es liberada durante la RA y, luego, vuelve a asociarse al espermatozoide específicamente a la superficie del segmento ecuatorial (Busso *et al.*, 2005; Busso *et al.*, 2007a; Muñoz *et al.*, 2012; Nimlamool *et al.*, 2013). Su localización en esta región es consistente con su participación en el proceso de fusión de gametas y su interacción con sitios complementarios en el ovocito (Busso *et al.*, 2005; Busso *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2012). Curiosamente, estudios de competencia indican que CRISP2 se une a los mismos sitios complementarios del ovocito que CRISP1 (Busso *et al.*, 2007), sugiriendo que ambas proteínas podrían cooperar durante la fusión de gametas. Si bien esta cooperación podría deberse a una acción sinérgica de cada proteína individual, no se puede descartar la posibilidad de que estas dos proteínas formen un complejo (es decir, dímeros y/o oligómeros) para cumplir dicha función, consistente con las propiedades oligoméricas descritas para miembros de la familia CRISP (Zhang *et al.*, 2021).

Para profundizar el estudio del rol de CRISP2 en la fertilización, se desarrolló un modelo de ratón KO para en colaboración con el grupo del Dr. Okabe de la Universidad de Osaka, Japón (Brukman *et al.*, 2016). Mediante el uso de este modelo, encontramos que los espermatozoides carentes de CRISP2 mostraban deficiencias en la fusión con el ovocito así como dificultades para atravesar la ZP, relacionadas con alteraciones en el desarrollo de la HA durante la capacitación. Un estudio posterior utilizando este modelo KO reveló que los espermatozoides presentaban anomalías en la motilidad debido a una mayor rigidez en la pieza media (Lim *et al.*, 2019). Análisis más detallados de nuestro grupo indicaron que la ausencia de CRISP2 generaba cambios en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , lo que podría explicar los defectos en la capacitación (Brukman *et al.*, 2016). Si bien los animales KO para CRISP2 eran fértiles bajo condiciones normales de apareo, se detectó una reducción significativa en la fertilización de ovocitos *in vivo* y en la fertilidad bajo condiciones más demandantes tales como el apareo de machos KO con hembras superovuladas o la vasectomía unilateral de los machos mutantes, (Brukman *et al.*, 2016), indicando la relevancia de de CRISP2 para la fertilidad.

En contraste con la inhibición significativa de la fertilidad observada en animales inmunizados con CRISP1 (Ellerman *et al.*, 1998; 2010), la inmunización de ratas macho y hembra con CRISP2 recombinante generó anticuerpos específicos en ambos sexos sin afectar la fertilidad de los animales (Weigel Muñoz *et al.*, 2012). Sin embargo, numerosas evidencias indican que la expresión aberrante de CRISP2 está asociada a problemas de fertilidad en hombres con parámetros espermáticos alterados (Du *et al.*, 2006; Gholami *et al.*, 2020; Jing *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 en pacientes con infertilidad inmunológica y anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal (Domagała *et al.*, 2007) y que reordenamientos cromosómicos en la región del gen de CRISP2 están asociados con infertilidad en varios individuos (Olesen 2001; Paoloni-Giacobino *et al.*, 2000). Finalmente, en un estudio en el cual separaron espermatozoides humanos según su calidad mediante un gradiente de densidad, observaron que tanto en pacientes normozoospermicos como astenozoospermicos (semen con espermatozoides con poca motilidad), fracción con baja calidad espermática correlacionó con una disminución en CRISP2, CATSPER1 y PATE1 (Manfrevola *et al.*, 2021). Estos estudios, sumados a la correlación

positiva entre los niveles de expresión de CRISP2 y la fertilidad encontrados en cerdos (Gao *et al.*, 2021), indican que CRISP2 podría servir como biomarcador de fertilidad espermática.

### Proteína CRISP3

El tercer miembro de la familia CRISP fue identificado inicialmente en la glándula salival del ratón, encontrándose, además, que el promotor del gen contenía dos elementos de respuesta a andrógenos (Schwidetzky *et al.*, 1995). Posteriormente, se detectó la expresión del ARNm de CRISP3 en células linfoides pre-B en ratón (Pfisterer *et al.*, 1996), además de encontrarse en órganos tanto reproductivos tales como próstata y útero, como en tejidos no reproductivos, incluyendo el timo y el bazo (Evans *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2008). Más adelante, se identificó una glicoproteína de aproximadamente 28 kDa, con homología con CRISP2, en la matriz de los gránulos de los neutrófilos humanos (Udby *et al.*, 2002). Paralelamente, se caracterizó la expresión de los ARNm de CRISP1, CRISP2 y CRISP3 en tejidos humanos, encontrándose que CRISP3 se expresaba, predominantemente, en glándula salival, páncreas y próstata, con niveles más bajos en epidídimo, ovario, timo y colon (Krätzschmar *et al.*, 1996). Aunque estudios recientes indican que la CRISP3 humana es más similar a CRISP1 de ratón (**Figura 24**), su expresión en múltiples órganos, incluidos aquellos relacionados con el sistema inmunológico, sugiere que ambas proteínas podrían cumplir funciones homólogas.

En equinos, CRISP3, inicialmente denominada HSP-3, es una proteína abundante en el plasma seminal (aproximadamente 1 mg/ml), producida mayormente en la *ampulla* del conducto deferente y en las vesículas seminales (Magdaleno *et al.*, 1997; Schambony *et al.*, 1998). Esta proteína no presenta glicosilación y se localiza en la región post-acrosomal y en la pieza media de los espermatozoides (Magdaleno *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la proteína CRISP3 del plasma seminal cumple un rol protector al impedir que los espermatozoides vivos se unan y sean destruidos por neutrófilos polimorfonucleares uterinos, sin ejercer este efecto sobre espermatozoides muertos ni bacterias (Doty *et al.*, 2024). La importancia de CRISP3 para el éxito reproductivo en equinos ha sido demostrada mediante un estudio que mostró que polimorfismos en el gen de *Crisp3* se asocian con variaciones en la fertilidad de los caballos (Ferlin *et al.*, 2007). De forma similar, un estudio reciente en cerdos demostró que concentraciones elevadas de CRISP3 en el plasma seminal se correlacionan

positivamente con la fertilidad masculina, la tasa de parto en hembras y el tamaño de camada. Además, CRISP3 recombinante redujo significativamente la expresión de interleuquinas proinflamatorias tras estimulación con LPS en células RAW264.7, evidenciando una función inmunomoduladora que protege a los espermatozoides durante su tránsito por el tracto femenino (Bu *et al.*, 2024). En felinos, CRISP3 también ha sido propuesta como un marcador de fertilidad, dado que se vio que su presencia en el pellet de espermatozoides se asociaba positivamente con el volumen de semen, la concentración y, el número total de espermatozoides, y la integridad de la membrana espermática (Wittayarat *et al.*, 2024)

En humanos, CRISP3 se encuentra en altas concentraciones en la saliva y el plasma seminal, y en niveles menores en el plasma sanguíneo y el sudor, así como también a lo largo del tracto reproductor masculino, con una expresión particularmente alta en el *cauda* epididimario (Udby *et al.*, 2002). Sin embargo, al comparar los niveles de CRISP3 en el plasma seminal de hombres vasectomizados y no vasectomizados, no se detectaron diferencias significativas, lo que sugiere que la principal fuente de esta proteína en el plasma seminal proviene de órganos situados más allá del epidídimo (Udby, 2005).

Existen dos formas maduras de CRISP3 en humanos, una N-glicosilada con un peso molecular aparente entre 29 y 31 kDa, y otra no glicosilada de entre 27 y 29 kDa (Udby *et al.*, 2002) y, estudios de nuestro grupo han demostrado que las mismas se unen a los espermatozoides con diferentes afinidades (Da Ros *et al.*, 2015). Mientras que la forma glicosilada se une débilmente y se libera durante la capacitación, la forma no glicosilada se une firmemente y permanece en los espermatozoides incluso después de la RA (Da Ros *et al.*, 2015), de manera similar a las dos poblaciones descritas para hCRISP1. Recientemente, se observó una correlación positiva entre la isoforma glicosilada de hCRISP3 y la morfología normal de los espermatozoides en individuos infértiles con teratozoospermia (Gholami *et al.*, 2021; 2024), sugiriendo que la proteína CRISP3 podría desempeñar un papel significativo en la fertilidad masculina. A pesar de que las evidencias sugieren un posible papel de hCRISP3 en la fertilización (Gholami *et al.*, 2021), la incubación de espermatozoides humanos con un anticuerpo anti-CRISP3 no logró inhibir la fusión de gametas evaluada mediante el test de Hámster (Da Ros *et al.*, 2015).

Tanto en el plasma sanguíneo como en el plasma seminal, CRISP3 forma complejos con proteínas como  $\alpha 1\beta$ -glicoproteína y  $\beta$ -microseminoproteína (MSP), respectivamente (Udby 2005; Udby *et al.*, 2004). Aunque aún no se comprende la relevancia de estas interacciones, se ha observado que MSP se une específicamente con alta afinidad al dominio PR-1 de CRISP3 (Gibbs *et al.*, 2008). Si bien el papel de CRISP3 en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida aún no ha sido investigado, se ha planteado la hipótesis de que MSP, proteína que interactúa con CRISP3, podría estar involucrada en esta etapa del proceso de fertilización (Franchi *et al.*, 2008; Maňásková-Postlerová *et al.*, 2011).

En cuanto al ratón, las investigaciones sobre CRISP3 son aún limitadas y se restringen a su presencia en algunos órganos del aparato reproductor masculino y femenino, como la próstata y el útero (Evans *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2008). Recientemente, hemos generado un modelo de ratón KO para esta proteína (Tesis doctoral Ludmila Curci, 2019). Sin embargo, al analizar la expresión del resto de los miembros de la familia CRISP, observamos que, en todos los casos, la ausencia de CRISP3 se asociaba también con la pérdida de expresión de CRISP1, a pesar de que el gen *Crisp1* permanecía intacto. Es decir, obtuvimos animales que, fenotípicamente, carecían tanto de CRISP1 como de CRISP3 en el epidídimo y los espermatozoides (Tesis doctoral Ludmila Curci, 2019). Por otro lado, si bien un estudio reciente reportó que los machos KO para CRISP3 eran fértiles, no se proporcionaron detalles adicionales sobre su fenotipo reproductivo ni sobre la expresión de las demás proteínas de la familia (Volpert *et al.*, 2020). En este sentido, el fenotipo observado en los ratones doble KO para *Crisp1* y *Crisp3* (detallado más adelante) no respalda un papel esencial de CRISP3 en la fertilización, aunque sí sugiere una posible participación en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Curci *et al.*, 2020).

### Proteína CRISP4

CRISP4 es el último miembro identificado dentro de la familia CRISP (Jalkanen *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006). Esta proteína se expresa específicamente en el epidídimo de manera andrógeno-dependiente y se asocia a los espermatozoides a medida que estos maduran en dicho órgano (Jalkanen *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006). No obstante, a diferencia de las otras CRISP, el gen que codifica CRISP4 en ratón se encuentra ubicado en el cromosoma 1, separado

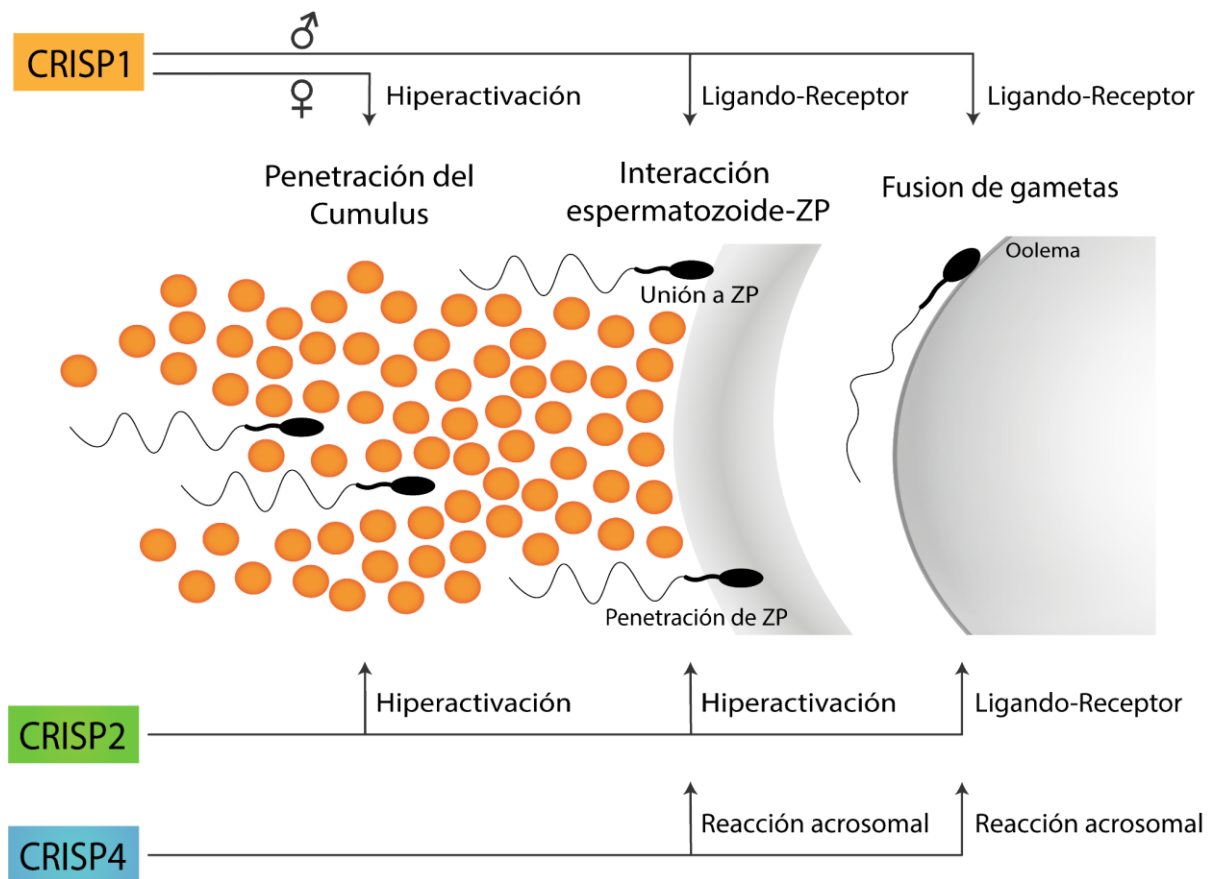
del grupo de genes que codifican CRISP1, CRISP2 y CRISP3 en el cromosoma 17. Debido a esta localización independiente, CRISP4 segrega de forma distinta a CRISP1, CRISP2 y CRISP3, las cuales, estar a menos de 200 kb de distancia entre sí, presentan una recombinación homóloga prácticamente nula y se heredan casi como una sola unidad genética. Este aspecto es particularmente relevante en esta Tesis ya que se han empleado modelos de ratón con delección simultánea de *Crisp1* y *Crisp3* y se los ha apareado con animales KO para la proteína CRISP4, tomando provecho de su ubicación genómica característica.

Estudios realizados por dos grupos de investigación que generaron ratones KO para CRISP4 de manera independiente (Gibbs *et al.*, 2011; Turunen *et al.*, 2012) proporcionaron las primeras evidencias de su implicancia en la fertilización. En dichos estudios, los espermatozoides KO mostraron una disminución significativa en su capacidad de adherirse a la ZP y de experimentar la RA en respuesta a progesterona (Gibbs *et al.*, 2011; Turunen *et al.*, 2012). Luego, estudios de nuestro laboratorio en los que analizamos más en profundidad el fenotipo reproductivo de un nuevo modelo simple KO para CRISP4 (Carvajal *et al.*, 2018) revelaron que, si bien los animales eran fértiles en condiciones ideales de laboratorio, los espermatozoides mutantes presentaron serios defectos de fertilización *in vitro*, independientemente de la presencia o ausencia de las envolturas del ovocito. En particular, se observó una severa deficiencia en la capacidad fusogénica de los espermatozoides, evidenciada por los niveles prácticamente nulos de fertilización de ovocitos sin envolturas. Estos resultados sugieren que CRISP4 cumpliría un rol crítico en la fusión espermatozoide-ovocito. La alta homología de secuencia de la región S2, compartida con CRISP1 y CRISP2, apoya además, su posible participación en interacciones tipo ligando-receptor con el ovocito. Resultados obtenidos en un modelo murino de obesidad inducida por una dieta rica en grasas, mostraron una vinculación entre la disminución de la expresión de CRISP4 y una menor capacidad fertilizante de los espermatozoides la cual pudo ser revertida mediante la adición de CRISP4 recombinante (Borges *et al.*, 2017), apoyando la relevancia de esta proteína para la fertilización.

Al igual que CRISP1, CRISP4 también es capaz de modular la actividad de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo TRPM8 (Gibbs *et al.*, 2011). Estudios funcionales han sugerido que esta capacidad de regulación está determinada por la región C-terminal de la proteína, de manera similar a

lo descrito para otras CRISP (**Figura 29**). Además, se ha observado que la adición de CRISP4 recombinante a espermatozoides WT puede contrarrestar el efecto inhibitorio del mentol, activador de TRPM8, sobre la RA inducida por progesterona (Gibbs *et al.*, 2011). Estos hallazgos sugieren que la modulación de TRPM8 sería uno de los principales mecanismos a través de los cuales CRISP4 regula la RA. Recientemente, se propuso que la localización de las CRISPs en balsas lipídicas (*lipid rafts*), microdominios enriquecidos en colesterol dentro de la membrana plasmática, podría influir en su capacidad de interactuar con otros componentes de membrana tales como la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  PMCA4b (Miya *et al.*, 2023). En este contexto, se observó que tanto CRISP4 de rata (rCRISP4) como hCRISP1 y hCRISP3 pueden interactuar con PMCA4b a través de su dominio N-terminal (Miya *et al.*, 2023). Sin embargo, mientras que hCRISP1 y rCRISP4 retrasan la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por PMCA4b, hCRISP3 no ejerce este efecto. Este hallazgo coincide con análisis *in silico* mostrando que hCRISP1 y rCRISP4 tienen mayor afinidad de unión al colesterol que hCRISP3. Dado que el colesterol es clave para la organización de las balsas lipídicas, se propuso que las diferencias en la afinidad por este lípido afectarían la redistribución de las CRISPs en la membrana espermática durante la capacitación, modulando así su acceso y su capacidad de interacción con PMCA4b (Miya *et al.*, 2023).

En conjunto, la información recopilada en esta sección resalta la participación de las proteínas CRISP en múltiples etapas de la fertilización, con una evidente superposición funcional entre ellas. Esta redundancia y cooperación entre CRISP homólogas sugiere que la acción combinada de estas proteínas es clave para garantizar el éxito del proceso de fertilización y, en consecuencia, la fertilidad del individuo (**Figura 29**).



**Figura 29. Participación de las proteínas CRISP en diferentes etapas del proceso de fertilización.** La proteína CRISP1 de origen epididimario participa tanto en la unión del espermatozoide a la ZP como en la fusión de gametas a través de interacciones ligando-receptor. Por otro lado, se ha propuesto que la CRISP1 presente en el cúmulo desempeña un papel en la penetración de esta estructura, orientando al espermatozoide mediante su capacidad para modular la HA espermática. CRISP2 de origen testicular ha sido relacionada con la penetración tanto del cúmulo como de la ZP debido a su capacidad para regular la HA, además de participar en la fusión de gametas mediante interacciones ligando-receptor. Finalmente, se ha reportado que la CRISP4 desempeña un papel en la interacción espermatozoide-ZP, así como en la fusión de gametas, en concordancia con su capacidad para regular la reacción acrosomal. Hasta el momento, no se dispone de información sobre el papel funcional de la CRISP3 en la interacción entre gametas (Gonzalez *et al.*, 2021).

#### Estudio del rol de las proteínas CRISP mediante el uso de animales múltiples KO

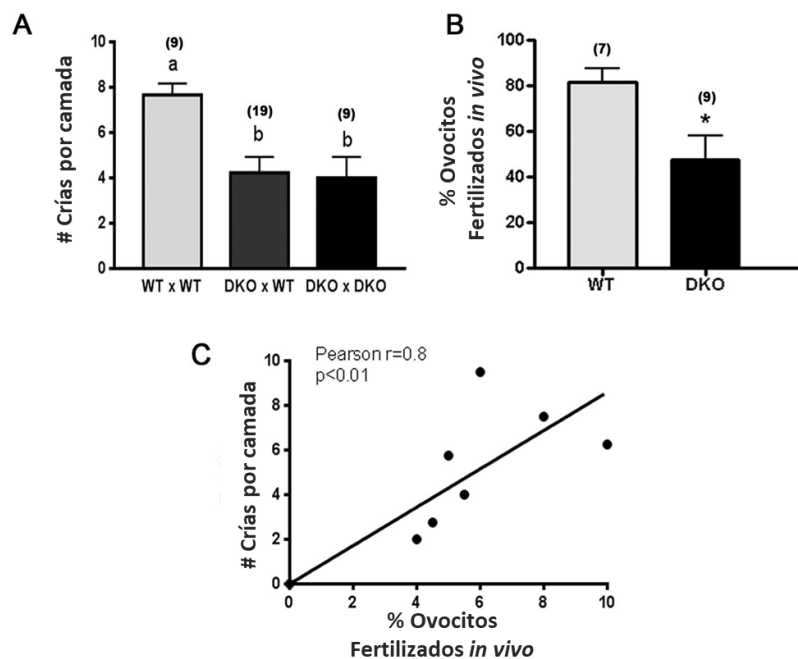
El hecho de que las proteínas CRISP compartan un alto nivel de homología, y que los animales KO para cada una de las proteínas CRISP hayan resultado fértiles a pesar de la participación crítica de las CRISP en diferentes etapas del proceso de fertilización, nos llevaron

a pensar que estas proteínas podrían estar cumpliendo roles funcionales redundantes en pos de garantizar el éxito reproductivo del individuo. De esa manera, ante la ausencia de una de las proteínas, las restantes podrían compensar su función. Para estudiar esta hipótesis, durante los últimos años, nuestro laboratorio se dedicó a generar y caracterizar diferentes modelos de animales KO carentes de dos (dobles) o más (múltiples) proteínas CRISP los cuáles se detallan a continuación:

#### *Colonia doble KO para CRISP1 y CRISP4 (DKO 1/4)*

Como ya fuera mencionado, tanto CRISP1 como CRISP4 se expresan en altas concentraciones en el epidídimo (Eberspaecher *et al.*, 1995; Krätzschar *et al.*, 1996), se unen a los espermatozoides durante su tránsito epididimario y participan en la interacción espermatozoide-ZP y en la fusión de gametas (Da Ros *et al.*, 2008; Carvajal *et al.*, 2018), apoyando la idea de que podrían compensarse entre sí para asegurar el éxito reproductivo. Esto motivó la generación de una colonia de animales KO carentes de las dos proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP4 (DKO 1/4) (Carvajal *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018) por apareo entre las colonias individuales. Mientras que el grupo de Hu no encontró diferencias en fertilidad entre mutantes y controles DKO 1/4, concluyendo que las CRISP epididimarias no serían necesarias para la fertilidad masculina, observaciones de nuestro laboratorio mostraron que la colonia DKO 1/4 presentó una clara alteración en la fertilidad (**Figura 30.A**) (Carvajal *et al.*, 2018). Más específicamente, nuestro estudio evidenció una correlación positiva entre la cantidad de animales nacidos y el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*, apoyando la idea de que el defecto principal de fertilidad en estos mutantes se debería a fallas en la fertilización *in vivo* (**Figura 30.B, C**) (Carvajal *et al.*, 2018). Esta hipótesis se vio reforzada por estudios *in vitro* en los cuales los espermatozoides DKO 1/4 fueron incapaces de fertilizar ovocitos con o sin envolturas, consistente con los roles conocidos de CRISP1 y CRISP4 en la interacción con la ZP y la fusión de gametas (Cohen *et al.*, 2000b; Busso *et al.*, 2007a; Carvajal *et al.*, 2018). La fertilidad comprometida del animal DKO 1/4 reveló, por primera vez, la importancia de las proteínas CRISP para la fertilidad y confirmó la existencia de mecanismos compensatorios entre los miembros de esta familia, revelando a

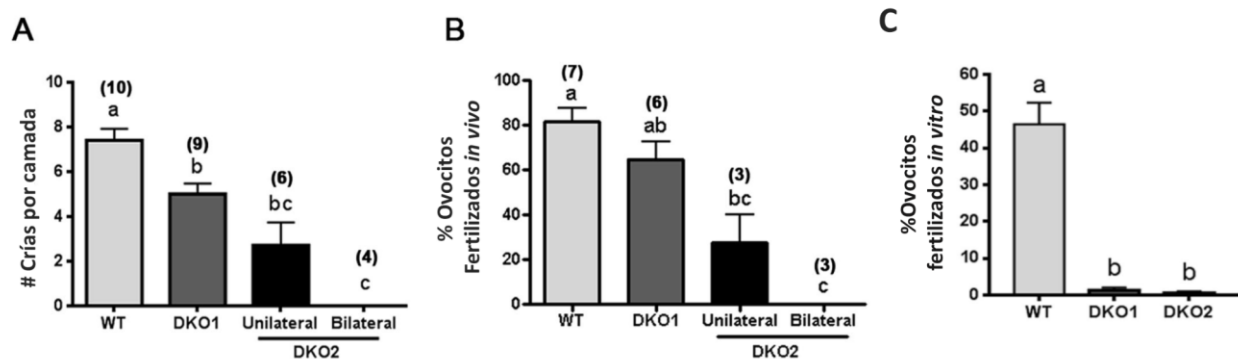
su vez que la ausencia simultánea de las dos proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP4 no podría ser compensada por los restantes miembros de la familia (CRISP2 y CRISP3).



**Figura 30. Efecto de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP4 sobre la fertilidad masculina y la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides.** **A.** Machos adultos WT o DKO 1/4 fueron cruzados con hembras control y se analizó el número de crías nacidas. **B.** Machos WT y DKO 1/4 fueron apareados con hembras en estro natural y se evaluó al día siguiente el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*. **C.** Correlación entre el número de crías nacidas (**A**) y el número de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla* (**B**) correspondientes a hembras apareadas con los mismos machos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM; el número de machos analizados (n) se indica entre paréntesis. Traducido de Carvajal *et al.*, 2018.

Al analizar más en profundidad los machos DKO 1/4, encontramos que los defectos de fertilización podrían deberse a una falla de los espermatozoides mutantes durante la capacitación a juzgar por las alteraciones observadas en parámetros espermáticos tales como pTyr, RA inducida por progesterona e HA (Carvajal *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018). Mientras la ausencia de CRISP4 contribuyó significativamente a la disminución en pTyr asociada a la capacitación, la falta de CRISP1 resultó en una disminución de la motilidad progresiva y la RA inducida por progesterona (Hu *et al.*, 2018). Interesantemente, nuestro grupo observó que una subpoblación de los machos DKO presentaba un agrandamiento testicular y epididimario

acompañado por infiltrado inmunológico y signos de epididimo-orquitis, con reducción significativa en la viabilidad espermática y acumulación de macrófagos en el lumen epididimario (Carvajal *et al.*, 2018). Los defectos en fertilidad y fertilización observados en nuestros estudios no pudieron atribuirse solo a la bajada en la viabilidad espermática observada en los machos con epididimo-orquitis ya que, los espermatozoides de animales mutantes que no presentaban el fenotipo inflamatorio mostraron una marcada reducción en la tasa de fertilización, indicando que los defectos provenían de la falta específica de CRISP1 y CRISP4 en el espermatozoide (**Figura 31**), probablemente debido un proceso de maduración epididimaria deficiente.



**Figura 31. Fertilidad y capacidad fertilizante in vivo de los espermatozoides en cada grupo DKO.** Los machos mostrando órganos normales (DKO1) o con signos de epididimo-orquitis (DKO2) uni o bilateral fueron analizados en cuanto a **A.** Crías nacidas por camada (fertilidad), **B.** Fertilización *in vivo* recuperando los ovocitos después del apareo y **C.** Fertilización *in vitro* co-incubando a los espermatozoides con COC control. Los datos se expresan como media ± SEM, n>4 en todos los casos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. Modificado de Carvajal *et al.*, 2018.

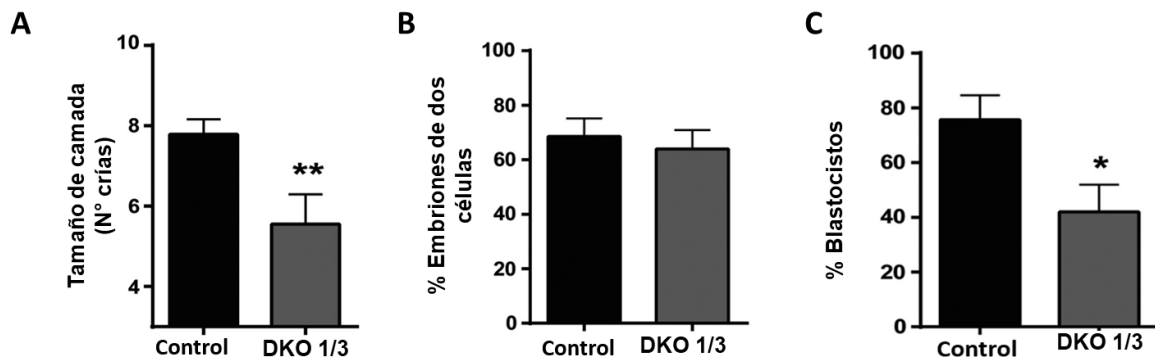
#### *Colonia doble KO para CRISP2 y CRISP4 (DKO 2/4)*

El hecho de que *Crisp2* y *Crisp4* se encuentren en distintos cromosomas, sumado a la disponibilidad de colonias KO simples para *CRISP2* y *CRISP4*, permitió a nuestro laboratorio generar ratones DKO 2/4 mediante cruzamiento (Curci *et al.*, 2020). El análisis de fertilidad reveló que, a pesar de la participación de ambas proteínas en etapas clave del proceso de fertilización, los machos carentes de ambas proteínas eran fértiles bajo condiciones normales de laboratorio (Curci *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando los machos DKO 2/4 se aparearon en

condiciones más exigentes, como por ejemplo con hembras superovuladas, se observó una clara disminución en las tasas de fertilización *in vivo* en comparación con los controles (Curci *et al.*, 2020). En línea con esta observación, y con los roles reportados para CRISP2 y CRISP4 en distintas etapas de la fertilización, los espermatozoides DKO 2/4 mostraron severos defectos de fertilización *in vitro*, probablemente debido a la combinación de los defectos asociados a la capacitación observados en los modelos KO progenitores (es decir, pTyr alterada, RA inducida por progesterona, desarrollo de HA y deficiencia en la interacción de gametas). A diferencia de lo que ocurre en el DKO 1/4, es muy probable que la fertilidad normal de esta colonia se deba que la ausencia de CRISP4 epididimaria esté siendo parcial o totalmente compensada por la presencia de CRISP1, el otro miembro epididimario de la familia CRISP murina.

#### *Colonia doble KO para CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3)*

Gracias al empleo de la novedosa técnica uso de CRISPR/Cas9, fuimos capaces de generar la colonia carente de las proteínas CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3) a pesar de estar cercanas en el cromosoma (Curci *et al.*, 2020). El análisis de la fertilidad de esta colonia mostró que los machos mutantes eran subfértiles (**Figura 32.A**), indicando que la ausencia de CRISP1 en combinación ya sea con CRISP4 o CRISP3 revela el papel importante de las proteínas CRISP para una fertilidad. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los animales DKO 1/4, se detectaron niveles normales de fertilización *in vivo* (**Figura 32.B**) (Curci *et al.*, 2020), sugiriendo, por primera vez, la participación de las proteínas CRISP en etapas posteriores a la fertilización. La continuación de estos estudios mostró que la subfertilidad observada podría estar asociada, al menos en parte, con una falla de los ovocitos fertilizados por espermatozoides DKO 1/3 en alcanzar el estadio de blastocisto (**Figura 31.C**), revelando la participación de las proteínas CRISP1 y CRISP3 en el desarrollo embrionario temprano y respaldando el impacto de factores paternos en este proceso.

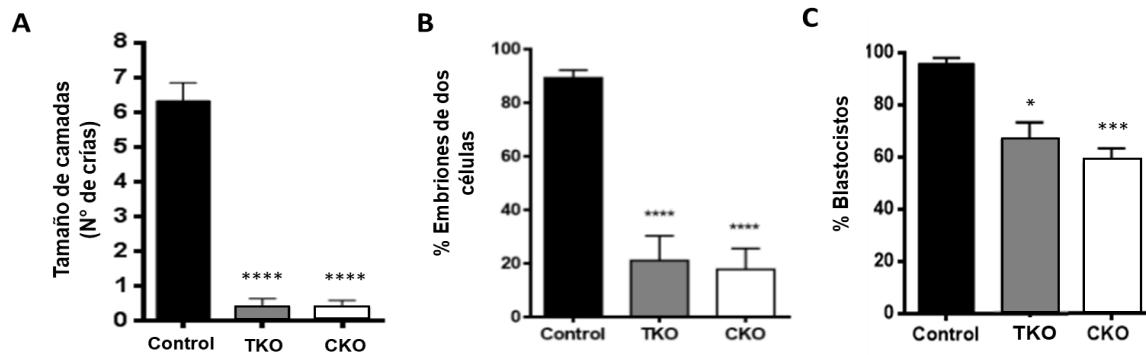


**Figura 32. Efecto de la ausencia simultánea de CRISP1 y CRISP3 sobre la fertilidad masculina y la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides.** **A.** Machos adultos control o DKO 1/3 fueron cruzados con hembras control, analizándose el número de crías nacidas. **B.** Machos control y DKO 1/3 fueron apareados con hembras superovuladas, evaluándose, al día siguiente, el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*. **C.** Tasa de embriones de dos células obtenidas en **B** que fueron capaces de alcanzar el estadio de blastocisto luego de haber sido incubados durante 3 días *in vitro*. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM;  $n > 4$  en todos los casos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p > 0,01$ . Modificado de Curci *et al.*, 2020.

El análisis de la motilidad de los eyaculados dentro del útero de hembras control mostró que mientras los espermatozoides control se movían libremente en el fluido uterino, los DKO 1/3 se encontraban en su mayoría inmóviles y formando agregados (Curci *et al.*, 2020). Si bien estos defectos podrían ser responsables de una fertilización tardía y defectos en el desarrollo embrionario en esta colonia, no se puede descartar la posibilidad de que las deficiencias en el desarrollo embrionario se deban a alteraciones en la maduración epididimaria y/o en la capacitación espermática, procesos que es sabido afectan el desarrollo embrionario (Orgebin-Crist *et al.*, 1968; Conine *et al.*, 2018; Navarrete *et al.*, 2019). En conjunto, la comparación de las tres colonias DKO generadas en nuestro laboratorio nos permite concluir que solo se puede obtener subfertilidad al deleccionar más de una proteína CRISP y que el fenotipo de subfertilidad puede ser debido a defectos en la fertilización o en el desarrollo embrionario, dependiendo del par de proteínas deleccionadas. Dado que aún resta esclarecer los mecanismos subyacentes a los defectos en el desarrollo ante la ausencia de CRISP1 y CRISP3, los mismos serán abordados en profundidad en el Capítulo III de esta Tesis.

*Colonias carentes de más de 2 proteínas CRISP*

La fertilidad normal observada en los distintos modelos KO simples como así también la subfertilidad de los animales DKO confirmó nuestra hipótesis de la existencia de mecanismos de compensación funcional por parte de los restantes miembros de la familia CRISP y nos condujo a la generación de modelos múltiples KO carentes de más de dos proteínas CRISP simultáneamente mediante el empleo de la técnica de CRISPR/Cas9 (Curci et al, 2020). Aprovechando el alto nivel de homología entre los genes *Crisp1* y *Crisp3*, diseñamos ARN guías (sgARN) contra el exón 2 de cada uno, los cuales fueron microinyectados en cigotos provenientes de la colonia simple KO para CRISP2/CRISP4, logrando generar la primera colonia triple KO para las proteínas CRISP carente de CRISP1, CRISP2 y CRISP3 (TKO 1/2/3) y la colonia cuádruple KO (CKO) carente de los cuatro miembros de la familia. El análisis de la fertilidad de estos machos mostró, por primera vez, que la falta de más de dos proteínas CRISP llevaba prácticamente a la infertilidad con un promedio de menos de una cría nacida y una alta proporción de machos estériles (**Figura 33.A**) (Curci et al., 2020). Al analizar la causa subyacente a este fenotipo, encontramos que la severa bajada en fertilidad en los machos TKO y CKO se acompañaba de tasas de fertilización *in vivo* significativamente más bajas (**Figura 33.B**), consistente con la ausencia de CRISP1 y CRISP4, así como también de defectos en desarrollo embrionario de los pocos embriones generados (**Figura 33.C**) (Curci et al., 2020), similar a lo observado en los animales carentes de CRISP1 y CRISP3.



**Figura 33. Efecto de la delección múltiple de miembros de la familia CRISP sobre la fertilidad masculina y la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides.** **A.** Machos adultos carentes de CRISP1, CRISP2 y CRISP3 (TKO 1/2/3), carentes de las cuatro proteínas (CKO) o control fueron cruzados con hembras control, analizándose el número de crías nacidas. **B.** Machos adultos TKO 1/2/3, CKO o control fueron apareados con hembras superovuladas, evaluándose, al día siguiente, el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*. **C.** Tasa de embriones de dos células obtenidas en **B** que fueron capaces de alcanzar el estadio de blastocisto luego de haber sido incubados durante 3 días *in vitro*. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM;  $n < 4$  en todos los casos. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p > 0.001$ ; \*\*\*\* $p > 0.0001$ . Modificado de Curci *et al.*, 2020.

Al estudiar la motilidad de los espermatozoides múltiples KO en el fluido uterino, encontramos que los espermatozoides TKO 1/2/3 y CKO eyaculados también se encontraban en su mayoría inmóviles y atrapados en agregados, tal como se describió previamente para la colonia DKO 1/3. Además de los defectos de motilidad a nivel uterino, estudios de migración espermática revelaron que los espermatozoides TKO 1/2/3 y CKO lograban llegar al *Isthmus* inferior pero mostraban claros defectos para llegar a la *ampulla* (Curci *et al.*, 2020), no pudiéndose descartar que estos defectos de transporte también están presentes en la colonia DKO 1/3. Sin embargo, la drástica disminución en la tasa de fertilización *in vivo* observada en los TKO 1/2/3 y CKO pero no así en los DKO 1/3, apoyaría la idea de que los defectos en la migración oviductal de las colonias múltiples KO estarían principalmente asociados a la rigidez de la pieza media de los espermatozoides carentes de CRISP2 (Lim *et al.*, 2019; Curci *et al.*, 2020).

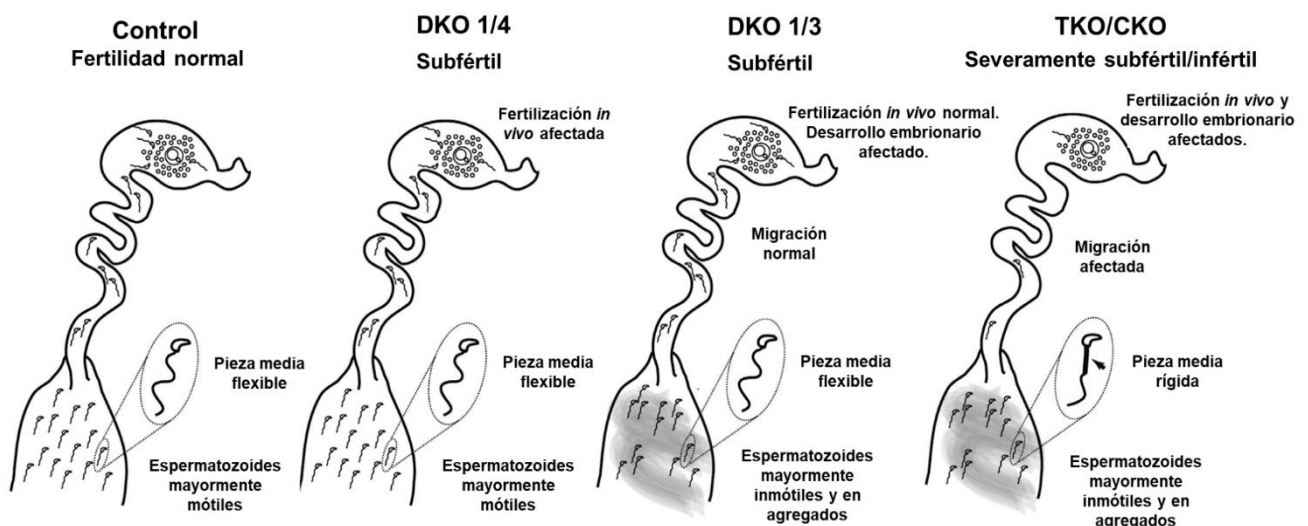
Además de estas observaciones *in vivo*, estudios de fertilización *in vitro* mostraron que los espermatozoides TKO 1/2/3 y CKO presentaban deficiencias severas en su capacidad para

fertilizar tanto COC como ovocitos solo rodeados de ZP sin observarse acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, indicando que la falla de fertilización se debería, principalmente, a defectos del espermatozoide para penetrar las envolturas del ovocito, consistente con los niveles significativamente bajos de HA y de RA observados. El hallazgo de que los espermatozoides CKO pero no así los TKO 1/2/3 hayan sido incapaces de fertilizar ovocitos sin ZP, suma evidencias en contra de la participación de CRISP3 en la fusión de gametas y revela un papel clave de CRISP4 en este evento. Esto se ve respaldado por las bajas tasas de fusión observadas en todos los modelos KO que carecen de *Crisp4* (por ejemplo, CRISP4 KO, CRISP 1/4, CRISP 2/4 y CKO) (Carvajal *et al.*, 2018). Aunque los mecanismos por los cuales CRISP4 participa en la fusión aún están bajo investigación, podrían estar relacionados con su interacción con sitios complementarios en el ovocito, como se ha observado para CRISP1 (Rochwerger *et al.*, 1992; Da Ros *et al.*, 2008) y CRISP2 (Busso *et al.*, 2007), y/o con la participación de CRISP4 en la RA (Gibbs *et al.*, 2011; Turunen *et al.*, 2012; Carvajal *et al.*, 2018), evento esencial para la fusión de gametas (Yanagimachi, 1994). Apoyando esta idea, recientes evidencias de nuestro grupo utilizando CRISP4 recombinante han mostrado la capacidad de esta proteína de unirse a la superficie del ovocito e inhibir la fertilización de ovocitos sin ZP (González *et al.*, *en preparación*). Sin embargo, el hecho de que los machos CKO no mostraran un fenotipo de fertilidad más severo que los TKO 1/2/3 respalda la idea de que la falla de fertilización *in vivo* se debería, principalmente, a defectos previos a la fusión tales como la migración dentro del oviducto y la penetración de las envolturas del ovocito.

Por último, y en concordancia con la capacidad de las proteínas CRISP para regular canales de  $Ca^{2+}$  y la importancia de este catión en la función espermática, los espermatozoides CKO no mostraron el aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  característico que ocurre durante la capacitación, apoyando la idea de que los espermatozoides múltiples KO presentan una disrupción de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  que probablemente refleje ya el balance final de las contribuciones individuales de cada CRISP a esta regulación.

En conjunto, el análisis de los distintos fenotipos observados en los modelos KO simples, dobles y múltiples mostró que mientras la subfertilidad de los machos DKO 1/4 se debería a defectos en la fertilización *in vivo*, la subfertilidad observada en los machos DKO 1/3 estaría asociada tanto a la presencia de espermatozoides inmóviles en útero como a fallas en

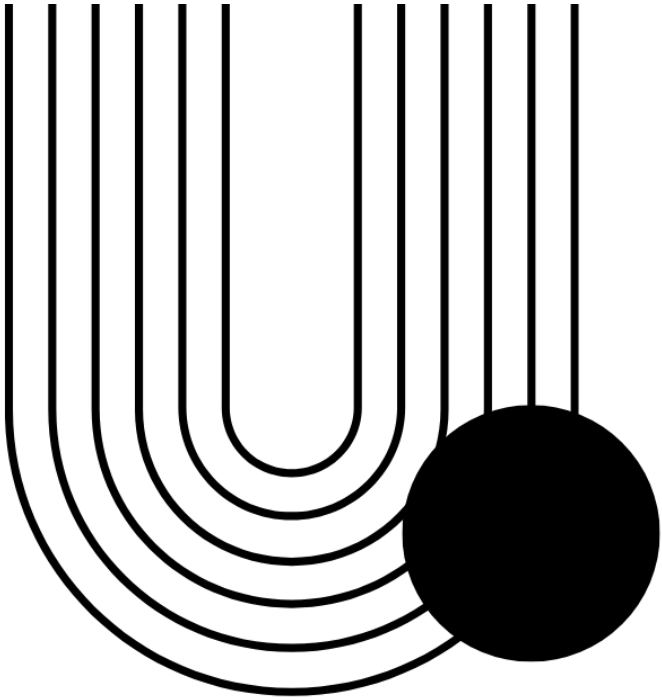
el desarrollo embrionario. Como era de esperarse, estos defectos también se observaron en los machos infértiles TKO 1/2/3 y CKO ya que ambos modelos carecen de CRISP1 y CRISP3, y en el caso del CKO también de CRISP4. Sin embargo, además de estas deficiencias, los TKO 1/2/3 y CKO presentan espermatozoides con rigidez en la pieza media debido a la ausencia adicional de CRISP2, lo cual afecta el desarrollo de la HA y, por lo tanto, la migración oviductal y la interacción con el ovocito, procesos que requieren este tipo de motilidad vigorosa tanto para desprenderse del epitelio del *isthmus* como para penetrarlas envolturas que rodean al ovocito (Yanagimachi, 1994) (**Figura 34**).



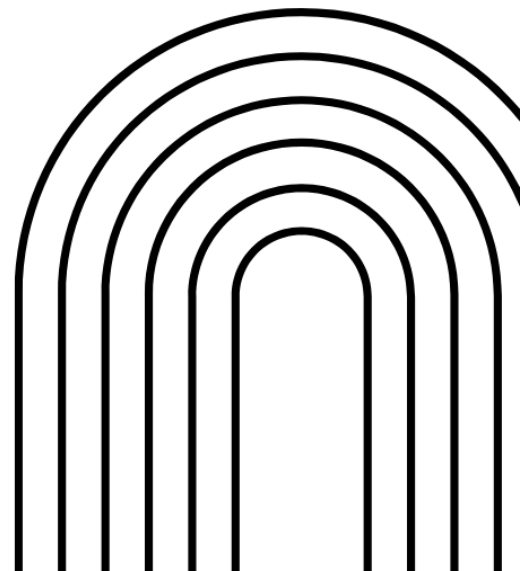
**Figura 34. Posibles causas de la fertilidad reducida en machos KO para las CRISP.** Diagrama que resume nuestras observaciones en animales control, DKO 1/4, DKO 1/3, TKO 1/2/3 y CKO. Los machos DKO 1/4 mostraron una subfertilidad leve en comparación con los controles debido a defectos de fertilización en la *ampulla*, mientras que los DKO 1/3 mostraron una subfertilidad similar a la de los DKO 1/4 debida a defectos en la motilidad uterina y el desarrollo embrionario temprano. Por su parte, los animales TKO 1/2/3 y CKO resultaron prácticamente infértiles en comparación con los controles, exhibiendo la inmotilidad de los espermatozoides dentro del útero y los defectos en el desarrollo embrionario observados en los machos DKO 1/3, como así también la rigidez en la pieza media que lleva a los defectos tanto en la migración oviductal como en la fertilización de los ovocitos en la *ampulla*.

El hallazgo de que los ratones que carecen de tres proteínas CRISP presentan fenotipos más severos que aquellos con deleciones simples o dobles respalda la idea de que las mutaciones combinadas en los distintos miembros de la familia CRISP provocan la disrupción

de múltiples vías independientes. Sin embargo, aún resta esclarecer si la delección de cualquier combinación de tres proteínas de esta familia es suficiente para inducir el fenotipo de infertilidad observado, o si dicho resultado es específico de la ausencia simultánea de ciertas proteínas CRISP. Resultados similares se observaron en los KO de los miembros de la familia de proteínas  $\beta$ -defensinas los cuales eran fértiles al carecer de un solo gen, subfértiles al carecer de dos o tres genes (Zhang *et al.*, 2018) y completamente infértiles al eliminar la expresión de toda la familia (Zhou *et al.*, 2013). Es por ello que, durante el Capítulo II de esta Tesis, nos hemos dedicado a generar y caracterizar una nueva colonia triple KO con el fin de continuar nuestros estudios sobre la relevancia de las CRISP para la fertilidad y la redundancia funcional entre los miembros de esta importante familia.



# Objetivos



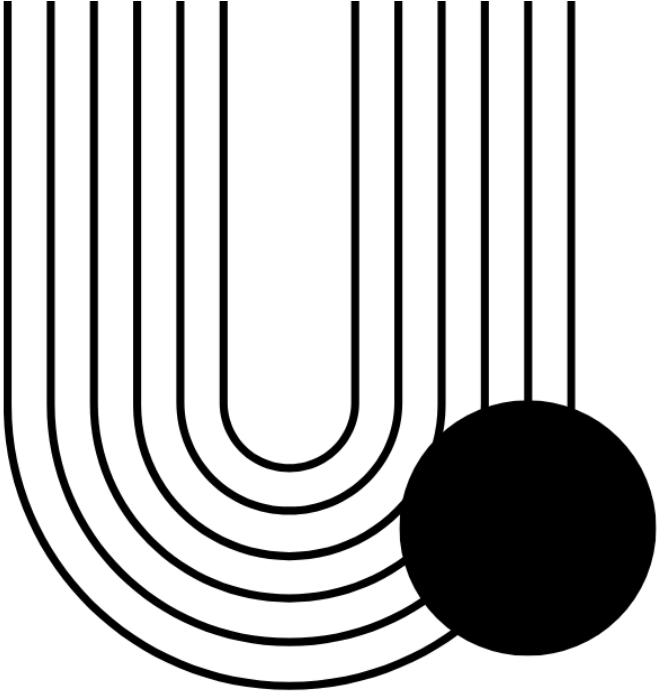
Tal como se describiera anteriormente, las evidencias de nuestro laboratorio indican que las proteínas CRISP participan en diferentes etapas del proceso de fertilización y a través de diferentes mecanismos. Es así que una serie de estudios bioquímicos, moleculares y genéticos mostraron que las proteínas CRISP participan en la etapa de penetración del cúmulus y de la ZP a través de su rol en la ocurrencia de la RA y desarrollo de la hiperactividad como así también en la unión a la ZP y fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios en el ovocito. Más aún, nuestros resultados mostraron que las proteínas CRISP resultan relevantes no solo para la fertilización sino también para la fertilidad de un individuo, a juzgar por la subfertilidad e infertilidad encontradas para los animales carentes de dos o más proteínas CRISP, respectivamente. Estas observaciones junto a nuestros resultados de inmunización con proteínas CRISP en roedores y en primates y el alto grado de conservación evolutiva y funcional de las CRISP en las diferentes especies estudiadas, nos llevaron a plantear la posibilidad de desarrollar un método de regulación de la fertilidad para caninos cuyo crecimiento desmedido en nuestro país genera altos riesgos para la salud pública. En base a ello, **como primer objetivo de esta tesis Doctoral, nos planteamos identificar y caracterizar proteínas CRISP epididimarias caninas como blancos para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para perros (Capítulo I).**

A pesar de los importantes roles que se han encontrado para las proteínas CRISP en diferentes etapas del proceso de fertilización, los animales KO para cada proteína CRISP en forma individual resultaron fértiles, indicando la existencia de redundancia funcional y compensación entre miembros homólogos de la familia CRISP. En base a ello, generamos ratones carentes de más de una proteína CRISP simultáneamente. El primer modelo doble KO (DKO) generado fue el de ratones carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP4 (DKO 1/4), los cuales presentaron problemas de fertilidad causados por defectos específicos en la capacidad fertilizante de los espermatozoides adquirida durante la maduración epididimaria. Posteriormente, generamos animales DKO para las proteínas CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3), los cuáles, para nuestra sorpresa, exhibieron una fertilización *in vivo* normal pero resultaron subfértiles debido a defectos específicos en el desarrollo embrionario temprano, mostrando, por primera vez, la relevancia de las CRISP en procesos posteriores a la fertilización. Estos resultados junto a la infertilidad observada en animales triples KO carentes de CRISP1, CRISP2 y CRISP3 y cuádruples KO carentes de todas las proteínas CRISP, nos llevaron a plantear si la

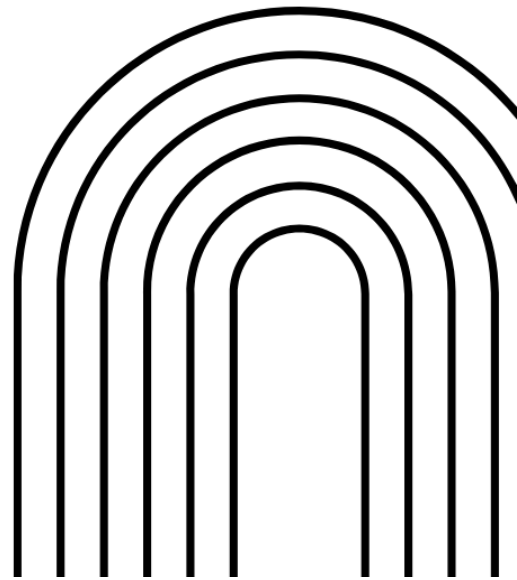
infertilidad observada en los animales múltiples KO era consecuencia de delecionar más de dos miembros de la familia, o si la misma dependía de cuáles eran las proteínas CRISP que se encontraban ausentes. En base a ello, **el segundo objetivo de esta tesis consistió en la generación y caracterización de un nuevo modelo de animal triple KO (TKO 1/3/4) carente tanto de las proteínas CRISP1 y CRISP4 críticas para la fertilización como de las proteínas CRISP1 y CRISP3, críticas para el desarrollo embrionario temprano (Capítulo II).**

Como fuera mencionado anteriormente, nuestros resultados en animales DKO 1/3 revelaron el rol crítico de las proteínas CRISP1 y CRISP3 en el desarrollo embrionario temprano. Teniendo en cuenta que ambas proteínas son expresadas en el epidídimo, estos resultados apoyan la idea de una contribución del epidídimo más allá de la conocida adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante la maduración. En base a ello, y con el fin de investigar el rol de las proteínas CRISP en eventos posteriores a la fertilización, **el tercer objetivo de esta tesis consistió en estudiar los mecanismos moleculares por los cuales las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP3 contribuyen al desarrollo embrionario temprano (Capítulo III).**

Consideramos que los objetivos descritos contribuirán a una mayor comprensión del comportamiento de los miembros de una importante y conservada familia de proteínas como las CRISP, y permitirán no sólo esclarecer el rol de las mismas en los procesos de fertilización y embriogénesis sino analizar su potencial empleo para el desarrollo de métodos tanto anticonceptivos como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina.



# 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 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Para la mayoría de los experimentos se emplearon tanto machos como hembras adultas de entre 2 y 5 meses de edad, excepto en ensayos específicos con hembras superovuladas, en los que se trabajó principalmente con animales prepúberes de 25 a 40 días. La línea DKO para CRISP1 y CRISP3, generada en un fondo genético homogéneo C57BL/6N y la línea DKO para CRISP1 y CRISP4 con un fondo genético mixto C57BL/6N y DBA/2J (B6D2) ya se encontraban disponibles en el laboratorio al momento de comenzar la Tesis. La colonia de ratones triples KO (TKO) para las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 fue generada en el laboratorio para la realización de esta Tesis mediante apareo de las colonias existentes DKO 1/3 y KO para CRISP4 (fondo genético mixto C57BL/6N y DBA/2J (B6D2)). Cabe aclarar que algunos animales de la colonia DKO 1/3 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.

En el caso de los estudios con perros, las muestras de tejido y espermatozoides epididimarios fueron obtenidas de castraciones quirúrgicas realizadas en el Instituto Luis Pasteur, mientras que las muestras frescas de semen fueron obtenidas de 5 Beagles machos de entre 2 y 5 años de edad, con un peso de entre 12 y 25 kg, alojados en perreras en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, con acceso a alimento con concentrados comerciales 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.

### **Obtención de ARN de muestras de tejido canino**

Para la extracción de ARN total se utilizaron muestras de las distintas regiones del epidídimo (caput, corpus y cauda), así como también de testículo, obtenidas en castraciones quirúrgicas. Cada fragmento de tejido fue homogeneizado en 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, EEUU) utilizando un homogeneizador mecánico, seguida por una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol, se agitó enérgicamente durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las muestras fueron luego centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y la fase acuosa superior, que contiene el ARN, fue cuidadosamente transferida a un nuevo tubo libre de RNAsas y precipitada con un volumen igual de isopropanol. Luego de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet de ARN obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 7.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Tras retirar completamente el etanol, el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 20µL de agua libre de RNAsas. Para eliminar la posible contaminación con ADN genómico, el ARN fue tratado con DNasa I (1 U por µg de ARN; Invitrogen, EEUU), incubando durante 30 minutos a 37 °C, seguido de inactivación mediante tratamiento térmico. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 10 minutos para favorecer la completa disolución del ARN. La concentración y pureza del ARN fueron evaluadas mediante espectrofotometría (260/280) nm.

### **Determinación de presencia de ARNm de *Crisp* en muestras caninas**

Para estudiar si en el tejido canino obtenido mediante castración había presencia de mensajeros de proteínas CRISP, se realizó una RT-PCR de las muestras de ARN total extraído de tejidos (ver sección anterior). La retrotranscripción se realizó utilizando 12 µl de la solución con ARN total, y 2,5 µM de oligo dT (oligonucleótido 2-desoxitimidina; Biodynamics). La mezcla fue calentada a 70°C por 5 min e inmediatamente colocada en hielo. A continuación, se agregaron los dNTP (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) a una concentración final de 0,3 mM cada uno, 25 UI de inhibidor de RNAsas (rRNasin; Promega, EEUU) y 100 UI de

retrotranscriptasa M-MLV (Promega, EEUU), en 1X de buffer (Promega, EEUU). La mezcla se incubó por 1h a 37°C para permitir la retrotranscripción del ARN y posteriormente se calentó por 5 min a 95°C para desactivar la enzima. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de PCR convencional utilizando 1 µl de ADNc, 0,25 µM de cada *primer* degenerados contra los motivos *Signature 1* y *Signature 2*, 0,3 µM de dNTPs (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 2,5 UI de enzima GoTaq (Promega, EEUU) y 1x de Buffer (Promega, EEUU), con volúmen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de: 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C. Finalmente, se llevó a cabo una amplificación final de 10 min a 95°C. El resultado de la PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 2% m/v y tinción con bromuro de etidio 0,02 mg/ml.

*Primers:*

Fwd: 5' - TGCAGTCCTTCAAGCAATGG -3'

Rvs WT: 5' - GTTGAAGTACTGACTGTGGGCTG -3'

### **Obtención de extractos proteicos y Western Blot**

Las muestras provenientes de órganos provenientes de castraciones caninas fueron homogeneizados en buffer de lisis Power (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 *Western Blot* (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). En el caso de las suspensiones de espermatozoides obtenidos por eyaculación, los mismos fueron contados en cámara de Neubauer y 3-4x10<sup>6</sup> células 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 por 5 minutos y centrifugadas a 5000 rpm 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.

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en los distintos Western Blot realizados: anti h-CRISP3 (1:50; Cell-Science, HP9033), anti DE(rCrisp1) (1:50; hecho en conejo); monoclonal anti-Flag M2 (1:1000; Sigma-Aldrich, EEUU, F1804), anti- $\beta$ -tubulina (1:300, Sigma-Aldrich, EEUU, T0198) y anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -pY, 1:4000, clone 4G10, Sigma-Aldrich, EEUU, 05-321). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1:2000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, PI-1000-1), anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1:4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, PI-2000-1).

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

Para la obtención de espermatozoides epididimarios, los caudas del epididimo provenientes de castraciones fueron colocados en tubos de 1,5 ml con PBS BSA 4mg/ml en campana de bioseguridad posteriormente a la realización de 3 cortes en el tejido para permitir la salida de los espermatozoides (proceso de swim-out).

En los casos en que se usaron espermatozoides eyaculados, las muestras fueron obtenidas por estimulación manual. Luego, el semen fue centrifugado a  $100 \times g$  durante 1 minuto en una centrífuga clínica para remover los desechos celulares. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en abundante medio CCM (medio de capacitación canino modificado suplementado 2 mg/ml de BSA; Nagashima *et al.*, 2015) o en medio FD (suplementado con 3mg/ml de BSA; Fraser y Drury, 1975; González *et al.*, 2024) según fuera el caso. Luego fueron lavados mediante una centrifugación a 400 g durante 5 minutos para aislar los espermatozoides, los cuales fueron resuspendidos en el medio correspondiente y cuantificados en una cámara de Neubauer en una dilución 1/20. La capacitación se realizó en 500  $\mu$ l de medio a una concentración de  $7.5 \times 10^6$  esp/ml a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire durante 4 horas. En los casos en que se haya estudiado el efecto de anticuerpos en los espermatozoides, anti h-CRISP3 (1:50; Cell-Science, HP9033) o IgG normal de conejo (1:50; Sigma-Aldrich, EEUU, 12-370) fueron agregados desde el comienzo de la capacitación.

### **Evaluación de la RA de espermatozoides caninos**

Para evaluar la RA, los espermatozoides fueron recuperados y fijados en Paraformaldehído (PFA) 4 % m/v en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, lavados 2 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 G-250 (Bio Rad) 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 RA se realizó por exposición de los espermatozoides de perros a a 10 $\mu$ M Progesterona (Sigma-Aldrich, EEUU) o 2 $\mu$ M de ionóforo de calcio (A23187, Sigma-Aldrich, EEUU) durante la última hora de capacitación

### **Evaluación de la motilidad de espermatozoides caninos**

Para este fin, se colocaron 15  $\mu$ l de suspensiones de espermatozoides frescos en portaobjetos precalentados a 37°C (22 x 22 mm, para crear una cámara de 30  $\mu$ m de profundidad) y se registró el movimiento de los espermatozoides mediante videomicroscopía mediante un microscopio óptico (400x). El porcentaje de espermatozoides móviles se calculó analizando un mínimo de 200 células distribuidas en al menos diez campos de microscopio diferentes.

### **Evaluación de la motilidad de espermatozoides caninos por sistema computarizado**

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 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 10 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), frecuencia de batido de la cabeza (beat cross frequency, BCF, Hz), y la oscilación de las trayectorias (WOB:VAP/VCL%). Los espermatozoides fueron considerados móviles 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).

### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de espermatozoides caninos**

Espermatozoides caninos capacitados y expuestos o no a incubación con anticuerpos fueron fijados con paraformaldehído (PFA) 2% m/v en PBS por 10 min, lavados y extendidos sobre portaobjetos precubiertos con poli-lisina. El bloqueo se realizó exponiendo a los espermatozoides a 0,4 % m/v de BSA en PBS (PBS-BSA 4mg/ml) por 30 min a temperatura ambiente. Luego, los espermatozoides fueron incubados con un anticuerpo anti-hCRISP3 (1:50 en PBS-BSA 4mg/ml; Cell-Science, HP9033) o IgG normal de conejo (1:50 en PBS-BSA 4mg/ml; Sigma-Aldrich, EEUU, 12-370) por 18 horas a 4°C. Finalmente, los espermatozoides fueron lavados, incubados con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a FITC (1/100 en PBS; Sigma-Aldrich, EEUU, F-0382) por 2 horas a temperatura ambiente, lavados y examinados bajo un microscopio confocal (Olympus IX83 motorizado con módulo Confocal por Disk Spinning Unit (DSU) (600X, AN 1.42).

### **Expresión de cCRISP recombinante en bacterias**

Para la expresión de proteínas recombinantes, el plásmido correspondiente (pET-16b-cCRISP, Gene Script) fue eluido del papel comercial utilizando agua hexadestilada y

cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop). Se transformaron células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  para amplificación del plásmido, y se verificó la presencia del constructo por corrida en gel de agarosa al 1,25 %. Posteriormente, se realizó una minipreparación para obtener ADN plasmídico en cantidad suficiente y se utilizaron células competentes *E. coli* Origami2 para transformación. La selección de las colonias se realizó en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Laboratorios FABRA SA) y tetraciclina (12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich, EEUU).

Al día siguiente, se repicaron colonias individuales en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 10 mL de medio LB suplementado con los antibióticos, y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante toda la noche. Luego, se inocularon 400 mL de medio LB suplementado con los antibióticos estéril en erlenmeyers de 1 L con una dilución 1:50 del cultivo previo y se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) de aproximadamente 0.6. Se tomaron 3 mL de muestra antes de la inducción, se centrifugaron (10 min, 6000 rpm, 4 °C) y se conservaron para análisis por SDS-PAGE. La expresión de la proteína fue inducida con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido; Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración final de 0,5 y los cultivos fueron incubados a 18 °C y 250 rpm, durante la noche. Finalmente, se tomaron 3 mL de muestra post-inducción, se midió la  $\text{OD}_{600}$  final y se centrifugaron las muestras para análisis por SDS-PAGE. El resto del cultivo fue centrifugado (10 min, 6000 rpm, 4 °C), y los pellets bacterianos fueron congelados a -20 °C.

### **Seguimiento de la inducción y purificación proteica por SDS-PAGE**

Previo a la purificación de las proteínas recombinantes, se verificó la expresión por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 %. Para ello, se resuspendieron los pellets reservados a -20°C en cada paso de la expresión en 500  $\mu\text{L}$  de Buffer A (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.6) y se sonicaron (20 ciclos de 30 s ON / 30 s OFF, 4 °C). Los productos fueron diluidos en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% v/v glicerol, 2% m/v SDS y azul de bromofenol) y hervidos durante 5 minutos previo a ser sembrados en el gel de poliacrilamida. Al finalizar la electroforesis, el gel fue incubado en solución de tinción de proteínas totales (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250,

40 % metanol y 10 % ácido acético glacial en agua destilada) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, el gel fue sometido a un lavado inicial breve con agua y luego fueron decolorados mediante incubación en una solución (40 % Metanol y 10 % ácido acético en agua destilada), renovando la solución hasta que el fondo del gel quedó suficientemente claro para permitir una visualización adecuada de las bandas proteicas. En paralelo, se realizó un revelado por WB para confirmar la expresión de la proteína específica con anti-Flag M2 (1:1000; Sigma-Aldrich, EEUU, F1804) como anticuerpo primario y anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1:4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, PI-2000-1) como anticuerpo secundario como lo previamente mencionado.

### **Purificación de cuerpos de inclusión**

Para la purificación de las proteínas recombinantes presentes en cuerpos de inclusión, los pellets bacterianos se descongelaron en frío y se resuspendieron en Buffer A (30 mL por pellet) complementado con el inhibidor de proteasas PMSF (1 mg/ml, preparado fresco en isopropanol). La suspensión fue sonicada (20 ciclos de 30 s ON / 30 s OFF a 4 °C) y luego fue centrifugada (30 min, 15000g, 4 °C). Al pellet se realizaron dos lavados sucesivos con buffer A suplementado con 1 % Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU) y un tercer lavado con Buffer A sin detergente, repitiendo la centrifugación entre cada lavado (30 min, 15000g, 4 °C). En cada paso se conservaron alícuotas de 100 µL del sobrenadante para control por SDS-PAGE. Finalmente, el pellet obtenido del tercer lavado fue congelado a -20 °C.

### **Lavado de cuerpos de inclusión y purificación por cromatografía de afinidad**

Previo a la purificación por cromatografía debieron solubilizarse y purificar los cuerpos de inclusión (CI). Para ello, los pellets fueron resuspendidos con agitación continua con 30 mL Buffer A suplementado con 2 % N-Lauroilsarcosina (Sigma-Aldrich, EEUU) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas (20 min, 12000 rpm, 4 °C) y el sobrenadante fue recolectado. Se realizó una renaturalización parcial por dilución lenta (*drip dilution*) utilizando una bomba peristáltica, llevando el sobrenadante a un volumen final

de 100 mL de Buffer A a un flujo de 0,6 mL/min a 4 °C. Posteriormente, el material fue filtrado con filtro de jeringa de 0,45 µm.

La purificación por cromatografía de afinidad se realizó utilizando columnas de níquel (Ni-NTA, Biorad mini prepacked). Las columnas se equilibraron previamente con 5 volúmenes de Buffer A. Las muestras fueron sembradas a un flujo de 1 mL/min. Posteriormente, se realizaron dos lavados secuenciales: uno con 25 mL de buffer A y otro con Buffer A conteniendo 100 mM imidazol (lavado 2). La elución de la proteína se llevó a cabo con 16 mL de Buffer B (Buffer A con 250 mM imidazol) recolectando fracciones de 1 mL. Se evaluó la presencia de proteína en las fracciones mediante ensayo de Bradford cualitativo (10 µL por fracción) y SDS-PAGE.

### **Ensayo heterólogo de penetración de matiz de células del cúmulus**

Los COC de ratón fueron inseminados con espermatozoides caninos (concentración final en la gota de co-incubación de gametas:  $0.3 \times 10^5$  células/ml), previamente teñidos con Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich, EEUU) (1 µg/ml concentración final) y las gametas co-incubadas durante 15 min en una estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> 5 % v/v. Finalmente, los COC fueron fijados con PFA 2 % m/v, lavados con PBS, montados con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y observados bajo microscopio de epifluorescencia (x200), determinándose el número total de espermatozoides dentro del cúmulus (Ernesto *et al.*, 2015).

### **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 50 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, 50 µl de una solución de neutralización (40 mM de Tris-HCl, pH=5). Las muestras fueron guardadas a 4°C hasta su utilización.

*PCR*: 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 (Invitrogen, EEUU), 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 DKO para CRISP1 y CRISP4:*

### ***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.

### ***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

*Colonia DKO CRISP1 y CRISP3:*

### ***Crisp1***

Fwd: 5'-TTGTGTTTCTCTGAACCCAATG-3'

Rvs: 5'-GTCATAACCCTCGTAGCTG-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 CRISP1/CRISP3/CRISP4:*

***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.

***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 en ratones**

Para los ensayos de fertilidad se colocaron en una jaula el macho 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 determinó el número de crías por camada.

### **Estimulación hormonal de hembras**

Para la estimulación de la ovulación, las hembras adultas tratadas con una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina coriónica equina (PMSG, Syntex) en cualquier estadio del ciclo seguida, a las 48-72 hs, por una inyección de 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Syntex).

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

Cada macho a ser evaluado fue colocado en apareo por una noche con una hembra control prepúber estimulada hormonalmente. A 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 horas 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/cigotos incubados. En los casos donde se evaluó el desarrollo embrionario, los embriones 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 que alcanzan el estadio de blastocisto.

### **Ensayos de fertilización *in vivo* a tiempos cortos**

Cada macho a ser evaluado fue colocado en apareo a las 6.30 am con una hembra prepúber superovulada y el apareo fue monitoreado cada 15 minutos. Una vez confirmado el éxito del apareo por presencia de tapón vaginal, se separó a la hembra hasta su sacrificio por dislocación cervical 4 horas después. Los ovocitos/cigotos fueron recuperados del oviducto

(por punción) en medio KSOM (Erbach *et al.*, 1994) y fijados con PFA 2% y teñidos con Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich, EEUU-Aldrich, EEUU) para establecer el estado de fertilización mediante microscopía de epifluorescencia o bien incubados *in vitro* en una estufa con gaseado automático como en el ensayo de fertilización *in vivo*, anteriormente mencionado, para analizar el desarrollo embrionario utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60) (Nikon). En el caso de tinción de ADN, 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). Los embriones que alcanzaron el estadio de dos células *in vitro* continuaron su incubación durante 3 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 que alcanzan el estadio de blastocisto.

### **Obtención y capacitación de espermatozoides de 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 medio de capacitación FD (Fraser y Drury, 1975; González *et al.*, 2024) 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 (protocolo de “swim-out”).

La capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio FD, 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 1-10 x 10<sup>6</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.

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

Para los ensayos de migración espermática, machos conteniendo EGFP bajo el promotor de Acrosina disponibles en el laboratorio fueron cruzados con hembras de la

colonia DKO 1/3 y se seleccionaron crías heterocigotas para los genes *Crisp1* y *Crisp3* por PCR, como lo previamente mencionado, que además tuvieran la presencia el transgén EGFP, exponiendo a las crías a luz UV en oscuridad. Con las crías heterocigotas EGFP positivas se realizaron apareos para obtener machos DKO 1/3 o controles, los cuáles fueron apareados con hembras prepúberes control GFP negativas superovuladas de forma tal de poder observar los espermatozoides intactos (conteniendo a EGFP) 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 de capacitación FD (Fraser y Drury, 1975; González *et al.*, 2024), 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.

### **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  $\mu$ l 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.

### 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 adultas estimuladas hormonalmente mediante punción de la ampulla en el medio FD. 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 ovocitos 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 FD por 3 horas 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 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 (ovocito fertilizado) luego de una incubación de una noche, 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. En los casos donde se evaluó el desarrollo embrionario, los embriones 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 que alcanzan el estadio de blastocisto.

### Inseminación intrauterina

Para los ensayos de inseminación intrauterina, se superovularon hembras prepúberes y, una vez transcurridas 8 horas 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 exponiendo ambos cuernos uterinos. Con una jeringa 27G se tomaron 50  $\mu$ l de una suspensión de espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario de machos control o mutantes ( $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml). Los espermatozoides mutantes fueron introducidos en uno de los cuernos uterinos seguido inmediatamente del ligado del mismo. El cuerno contralateral se utilizó como control inyectando espermatozoides control. Luego de aproximadamente 15 hs, se recuperaron los ovocitos de la ampulla, los cuales fueron teñidos con 10  $\mu$ g/ml de Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich, EEUU-Aldrich, EEUU) y montados en portaobjetos. El porcentaje de fertilización se evaluó por la formación de embriones de dos células (ovocito fertilizado) luego de una incubación de una noche, utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60) (Nikon). El porcentaje de fertilización se calculó como el número de embriones de dos células sobre el total de ovocitos recuperados. Luego, los embriones obtenidos continuaron su incubación durante 3 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 que alcanzan el estadio de blastocisto.

### **Evaluación de la RA de espermatozoides murinos**

El protocolo de fijación, tinción y evaluación de la RA de los espermatozoides murinos fue idéntico al previamente descrito para espermatozoides caninos.

La inducción de la RA se realizó por exposición de los espermatozoides de ratón a 15  $\mu$ M Progesterona (Sigma-Aldrich, EEUU-Aldrich, EEUU) o 10  $\mu$ M de ionóforo de calcio (A23187, Sigma-Aldrich, EEUU-Aldrich, EEUU) los últimos 15 minutos de la capacitación.

### **Oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> en ovocitos**

Los ovocitos sin zona pelúcida fueron incubados con 1  $\mu$ M de Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 0.02% (p/v) de ácido plurónico (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y 15  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, EEUU-Aldrich, EEUU) en medio FD durante 25 minutos a temperatura ambiente. Luego, los ovocitos fueron lavados exhaustivamente con medio fresco, montados en 100  $\mu$ l de medio cubierto con aceite de

parafina y analizados en un microscopio Olympus IX83 Spinning Disk (Olympus Corp., Tokio, Japón) (x100), equipado con una cámara ambiental que mantenía una temperatura de 37.5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se tomaron imágenes cada 20 segundos. La fluorescencia representativa del Ca<sup>2+</sup> basal se registró durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron espermatozoides capacitados *in vitro* y se capturaron imágenes durante al menos 1 hora y media. En todos los casos, la fertilización se determinó por la presencia de al menos una cabeza de espermatozoide descondensada dentro del ooplasma. Los ovocitos polispermicos fueron excluidos del análisis. La intensidad de fluorescencia intracelular se determinó en un único plano ecuatorial de cada ovocito mediante la medición de la intensidad de fluorescencia con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) y se normalizó con respecto a la fluorescencia basal.

### **Test de dispersión de cromatina espermática (SCD)**

La integridad del ADN espermático se evaluó según lo descrito previamente (Fernández *et al.*, 2003). En resumen, alícuotas de 200 µl de espermatozoides obtenidos por swim-out en medio FD se mezclaron con agarosa acuosa de bajo punto de fusión al 1% (para obtener una concentración final de agarosa del 0.7%) a 37°C. Cuando se usaron muestras de caput, se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm para concentrar las células antes de la adición de agarosa. Luego, alícuotas de 50 µl de la mezcla fueron colocadas sobre un cubreobjetos, que posteriormente se colocó sobre un portaobjetos precargado con agarosa estándar al 0.65% y se dejó solidificar a 4°C durante 10 minutos.

Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se sumergieron inmediatamente en posición horizontal en una cuba con solución de desnaturalización ácida recién preparada (0.08 N HCl) durante 14 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, las proteínas fueron eliminadas mediante el cambio a una solución de neutralización y lisis 1 (0.4 M Tris, 0.8 M β-mercaptoetanol, 1% SDS y 50 mM EDTA, pH 7.5) durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguida de una incubación en una solución de neutralización y lisis 2 (0.4 M Tris, 2 M NaCl y 1% SDS, pH 7.5) durante otros 15 minutos a temperatura ambiente.

Las portaobjetos se lavaron exhaustivamente en *buffer* TBE (0.09 M Tris-borato y 0.002 M EDTA, pH 7.5) durante 12 minutos, se deshidrataron en baños secuenciales de etanol al 70%, 90% y 100% (2 minutos cada uno) y se dejaron secar al aire. Las células se tiñeron con Hoechst (10 µg/ml) en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y la superficie del halo se analizó mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Olympus IX83 Spinning Disk (Olympus Corp., Tokio, Japón) (x600, AN 1.42). Se tomaron imágenes de al menos 200 cabezas de espermatozoides y el área del halo se analizó con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

El ADN espermático se consideró fragmentado cuando no se observó halo o cuando el área del halo fue menor al doble del área correspondiente a espermatozoides no dispersados.

### **Intercambio de fluidos**

Después de 10 minutos de swim-out en medio FD sin BSA, los espermatozoides fueron centrifugados durante 2 minutos a 1500 rpm y los sobrenadantes recuperados, que contenían fluido diluido del cauda epididimario, se almacenaron a 37°C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire.

Luego, los espermatozoides fueron lavados dos veces con 1 ml de medio FD sin BSA, seguido de una centrifugación de 2 minutos a 1500 rpm. Después de la segunda centrifugación, los fluidos diluidos del cauda epididimario fueron reconstituidos (agregados nuevamente a los espermatozoides del mismo genotipo) o mezclados con espermatozoides de otro genotipo, y posteriormente incubados a 37°C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 1 hora.

En los casos en los que se añadió Ca<sup>2+</sup>, después de la reconstitución del fluido, se utilizó una solución stock de CaCl<sub>2</sub> 100X para alcanzar una concentración final de 10 mM, seguido de una incubación a 37°C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Al final de las incubaciones, se llevó a cabo el protocolo de SCD.

### Medición de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los niveles de ROS en el citoplasma de los espermatozoides se midieron mediante microscopía confocal. En resumen, después de 10 minutos de swim-out, los espermatozoides se incubaron en condiciones no capacitantes ( $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml sin adición de BSA) con Hoechst 33342 (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y CellROX<sup>®</sup> Green (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) (25  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos. Luego, las muestras fueron fijadas con PFA al 4% durante 10 minutos y posteriormente neutralizadas 2 veces con acetato de amonio seguido de una centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos cada una.

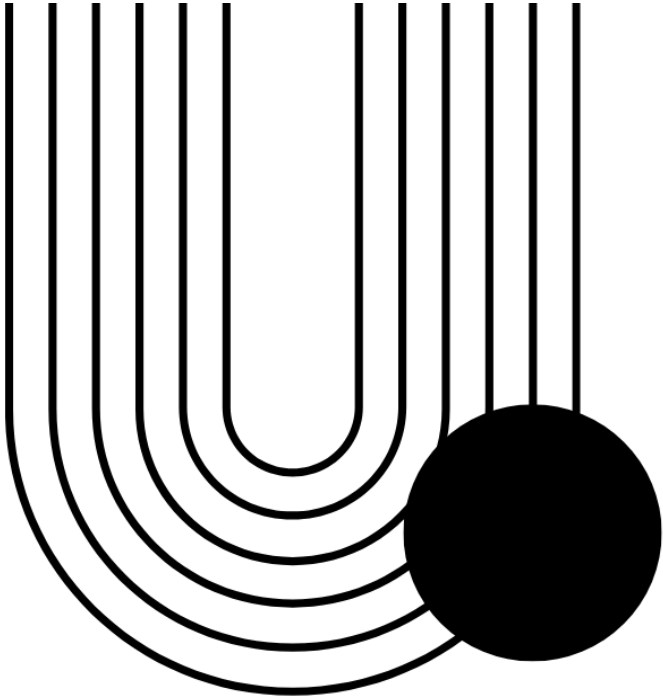
Las muestras se colocaron sobre un portaobjetos, se montaron con glicerol y se analizaron en un microscopio Olympus IX83 Spinning Disk (Olympus Corp., Tokio, Japón) (x600, AN 1.42). Se tomaron imágenes de al menos 200 cabezas de espermatozoides por cada condición y la intensidad de fluorescencia se calculó utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

### Medición de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

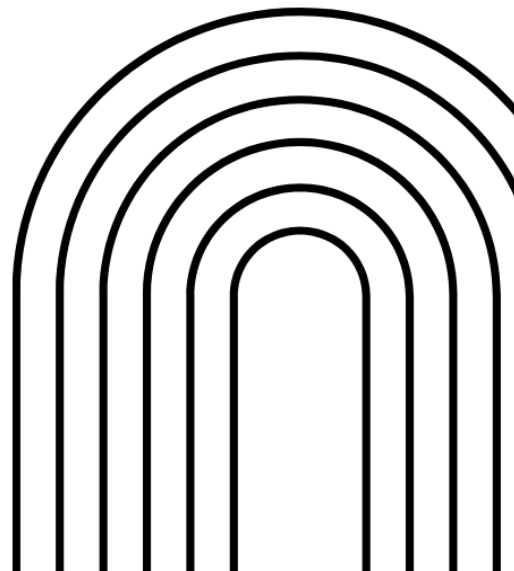
Los espermatozoides fueron incubados durante 90 minutos en medio FD sin colorante en condiciones capacitantes o no capacitantes (sin bicarbonato y sin BSA) conteniendo 1  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 0.02% (p/v) de ácido plurónico (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 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 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (Santa Cruz, USA), y la fluorescencia evaluada inmediatamente por citometría de flujo utilizando un equipo BD FACSCanto<sup>™</sup> 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).

## Análisis estadístico

En todos los casos los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes y 'n' indica el número de animales analizados en cada grupo para todos los experimentos, exceptuando el caso de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos y la penetración del cúmulus, donde 'n' representa el número de ovocitos analizados. Los cálculos se realizaron utilizando el software Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los resultados de experimentos con dos grupos experimentales fueron evaluados por la prueba t-Student no pareada. Las comparaciones entre tres o más grupos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías (según el caso) seguido del test de Fisher LSD a para el análisis de la motilidad y RA comparando los dos medios capacitantes para espermatozoides caninos, en el análisis de la fertilidad, la tasa de embriones de dos células y de blastocistos discriminando por grupos para la colonia TKO 1/3/4 y la progresión del desarrollo embrionario discriminado por día para los DKO 1/3. Por otro lado, el test de Holm–Sidak fue utilizado para los experimentos de RA, motilidad, penetración del cúmulus, comparación de pesos de órganos, análisis de reanudación de la meiosis y concentración  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular espermático. En aquellos casos en los que los datos no cumplieran con los supuestos de distribución normal y homocedasticidad necesarios para aplicar ANOVA de dos vías (fragmentación del ADN, niveles de ROS y fragmentación luego de la incubación con fluidos), se utilizó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis seguido de la prueba de Dunn. Finalmente, los análisis de contingencia para el análisis de la distribución de genotipos en las crías TKO 1/3/4 se realizaron mediante el test  $\text{Chi}^2$ . En todos los casos, se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de  $p < 0,05$ .



# Resultados



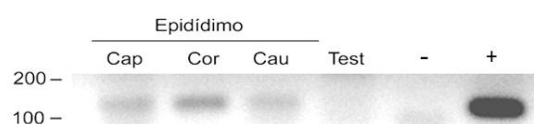
## Capítulo I

### Identificación y caracterización de las proteínas CRISP epididimarias caninas como blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva

Tal como se mencionara en la introducción, las proteínas CRISP han sido propuestas como blancos anticonceptivos por su capacidad de generar anticuerpos específicos que se unen a los espermatozoides (Ellerman *et al.*, 1998; Ellerman *et al.*, 2010) y afectan la fertilidad en hembras y machos sin producir efectos colaterales (Perez Martinez *et al.*, 1995). La alta conservación evolutiva de las proteínas CRISP y su papel fundamental en la fertilización en diversas especies han abierto la posibilidad de emplearlas en el control poblacional de animales domésticos de ambos sexos. Es por eso, que el primer objetivo de esta Tesis consistió en la identificación y caracterización de proteínas CRISP epididimarias caninas como potencial blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva.

El primer paso hacia este objetivo fue analizar la expresión de proteínas CRISP epididimarias en perros. Para ello, el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (perteneciente al Ministerio de Salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires) nos proveyó epidídimos de perros que habían sido sometidos a castración en dicha institución. Por otra parte, se recuperaron también los testículos de dichos animales para descartar que la proteína detectada en tejido epididimario no fuera, además, sintetizada a nivel testicular. Cabe mencionar que, previo al procesamiento de los órganos recuperados, se llevaron a cabo los análisis requeridos por parte de la institución para determinar que el tejido a manipular no proviniera de un animal portador de brucelosis. Con el fin de analizar la presencia de posibles mensajeros de CRISP caninas (cCRISP) de origen epididimario, se realizó la extracción de ARN de las diferentes regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) como así también de testículo de cada animal seguido de un análisis RT-PCR, utilizando *primers* degenerados contra los dos motivos conservados en todas las proteínas CRISP, *Signature 1* y *Signature 2*. Dado que la distancia entre dichos motivos también se encuentra conservada, se estimó que las bandas esperadas debían ser de aproximadamente 120 pb. Los resultados mostraron la presencia de una única banda del tamaño esperado en las tres regiones del epidídimo, pero no así en

testículo (**Figura I.1.A**), sugiriendo la presencia de un transcripto de la familia CRISP de expresión específicamente epididimaria. La secuenciación de dicha banda mostró un porcentaje de alrededor del 80 % de identidad con varias proteínas CRISP descritas de otras especies (**Figura I.1.B-C**). Más aún, la comparación de esta secuencia mediante BLAST Assembled Genomes contra el genoma canino (*CanFam3.1 reference, NCBI Annotation Release 103*), arrojó un alto porcentaje de identidad con un gen (*Crisp2*, Gene ID: 474932) y su transcripto predicho (LOC481834) (93 % de identidad y un *E-value* de  $2e-19$ ) (**Figura I.1.C**). En este sentido, el hecho de que en el genoma canino anotado (*NCBI Annotation Release 104*) esté predicho otro gen homólogo a CRISP (*Crisp1*, Gene ID: 100855553), sugiere la expresión de más de una proteína CRISP canina a nivel epididimario.

**A****B**

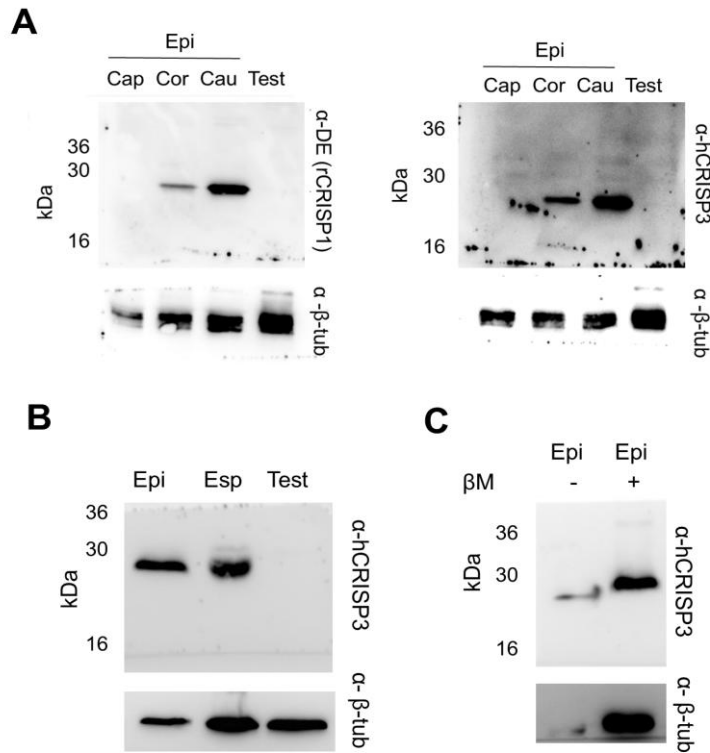
5' -ATAGTAGTATTTTACTCTCTTGATTGGGACAATAGGCAATTCACACCCAACATGATAAGAAGAGTACC-3'

**C**

Especie	Gen	Identidad (%)	E-value	Locus
Bovino	<i>Crisp2</i>	86	1.00E-12	NM_001038089
Humano	<i>Crisp2</i>	85	1.00E-12	NM_003296
Equino	<i>Crisp2</i>	85	1.00E-12	NM_001081932
Porcino	<i>Crisp2</i>	82	3.00E-10	NM_001128437
Bovino	<i>Crisp1</i>	82	5.00E-10	NM_001206259
Porcino	<i>Crisp3</i>	82	1.00E-08	XM_003128432
Humano	<i>Crisp3</i>	80	6.00E-09	NM_006061
Equino	<i>Crisp3</i>	80	6.00E-09	NM_001081874
Rata	<i>Crisp2</i>	79	3.00E-07	NM_001011710
Ratón	<i>Crisp2</i>	77	3.00E-06	NM_009420

**Figura I.1. Detección de mRNA epididimario de CRISPs caninas.** **A.** RT-PCR de extractos de RNA totales de epidídimo (caput (cap), corpus (cor) y cauda (cau)) y testículo (test) caninos utilizando *primers* degenerados diseñados contra secuencias conservadas en las proteínas CRISP. Se usó cDNA de epidídimo de ratón como control positivo (+) y agua como control negativo (-). **B.** Secuencia obtenida a partir de la clonación de la banda de epidídimo clonada en un vector TOPO. **C.** Tabla de porcentajes de homología obtenida por búsqueda mediante BLAST Assembled Genomes en la base de datos de NCBI.

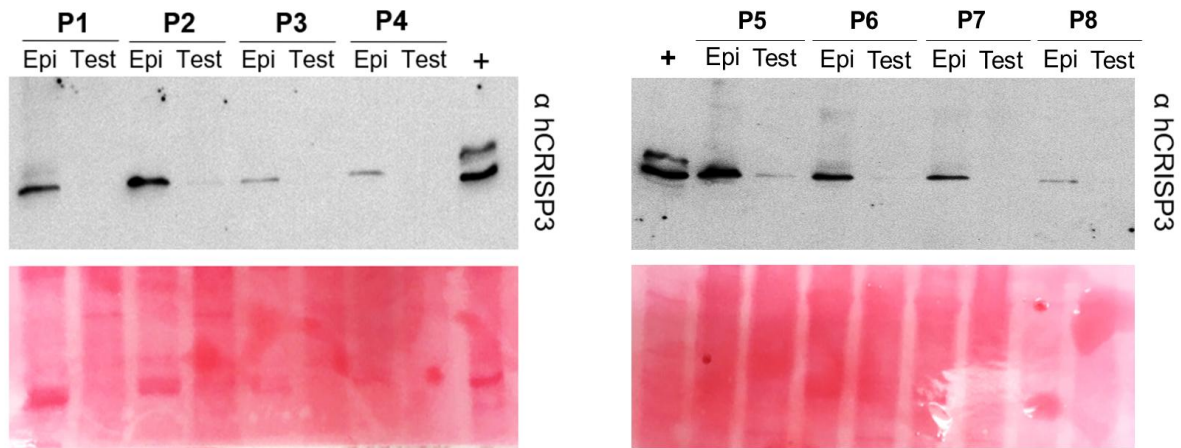
El siguiente paso consistió en analizar la presencia de la proteína CRISP canina epididimaria correspondiente al mensajero identificado anteriormente. Para ello, se realizaron extracciones de proteínas a partir de epidídimos y testículos de perros, las cuales fueron analizadas mediante WB. Dado que no existen anticuerpos comerciales específicos para proteínas CRISP caninas, se utilizaron una serie de anticuerpos policlonales contra proteínas CRISP humanas disponibles en el laboratorio (**Figura I.2.A**). Como resultado, observamos que la proteína CRISP canina fue reconocida por varios de estos anticuerpos, destacándose el dirigido contra CRISP3 humana (hCRISP3) el cual mostró la mayor afinidad. Los resultados revelaron la presencia de una banda correspondiente a una proteína CRISP canina tanto en el epidídimo como en los espermatozoides, y su ausencia en el testículo (**Figura I.2A**). Estas observaciones no sólo confirmaron el origen específicamente epididimario de la proteína detectada, sino también su asociación a los espermatozoides recuperados de dicho tejido, de suma relevancia para un blanco inmuno-anticonceptivo. Por otro lado, observamos que la proteína identificada presentó un peso molecular aparente de aproximadamente 25kDa, consistente con los pesos moleculares característicos de las proteínas CRISP (**Figura I.2B**), como así también un cambio en la movilidad electroforética por tratamiento con  $\beta$ -Mercaptoetanol (**Figura I.2.C**), indicando la reducción de los puentes disulfuro característicos de las proteínas de esta familia y, por ende, apoyando que la banda que estábamos observando correspondía a una proteína CRISP.



**Figura 1.2. Detección de proteína CRISP epididimaria canina. A.** Prueba de anticuerpos heterólogos (anti-DE y anti-hCRISP3) en WB de extractos proteicos de los distintos segmentos del epidídimo (*caput*, *cap*, *corpus*, *cor* y *cauda*, *cau*) y de testículo de caninos. **B.** WB de extractos proteicos de epidídimo (*epi*), espermatozoides (*esp*) y testículo (*test*) caninos utilizando un anticuerpo comercial policlonal anti-CRISP3 humana. **C.** SDS-PAGE de extractos proteicos de epidídimo en presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -Mercaptoetanol utilizando el anticuerpo anti-hCRISP3. En todos los casos  $\beta$ -tubulina fue usada como control de carga.

A diferencia de los modelos animales de laboratorio, los perros presentan una amplia variabilidad genética y fenotípica a nivel global, razón por la cual consideramos fundamental confirmar nuestros resultados en distintas razas de modo tal de asegurar que el posible método a desarrollar tuviera aplicabilidad general en la especie canina. Para ello, repetimos el análisis en un total de ocho perros de diferentes razas, incluyendo Caniche, Pastor Alemán, Golden y animales mestizos, realizándose nuevamente extracciones de proteínas de epidídimos y testículos y evaluación posterior de la presencia de la CRISP canina mediante WB. Los resultados confirmaron que el anticuerpo contra CRISP3 humana reconoció consistentemente una proteína en el epidídimo, pero no así en el testículo, en todos los

perros analizados. Estas observaciones apoyan la idea de que la proteína identificada exhibe un comportamiento conservado entre distintas razas, reforzando su potencial como blanco para inmuno-anticoncepción en la población canina general.



**Figura I.3. Expresión de CRISP epididimaria en diferentes razas caninas.** WB de extractos proteicos de epidídimo (epi) y testículo (test) de perros de diferentes razas utilizando el anticuerpo anti-hCRISP3. Se utilizó saliva humana como control positivo (+) de proteína CRISP3 humana. Se muestra la tinción con Rojo Ponceau como control de carga. (n=8).

Tal como se mencionara en la introducción, la proteína CRISP1 de roedores se localiza en la región dorsal del acrosoma en espermatozoides frescos y relocaliza a la región ecuatorial luego de la capacitación (Rochwerger *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 2000b), cumpliendo un papel fundamental en el reconocimiento, unión y fusión de la membrana del espermatozoide con la del ovocito (Ellerman *et al.*, 2006). Dado que nuestros resultados mostraban la presencia de la proteína CRISP canina en espermatozoides epididimarios frescos, el próximo paso consistió en analizar si la misma permanecía unida al espermatozoide luego de la capacitación, lo cual constituye un requisito esencial para su potencial uso como blanco anticonceptivo. Para tal fin, resultaba necesario, primeramente, lograr capacitar a los espermatozoides caninos *in vitro*. Para ello, establecimos una nueva colaboración con la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, la cual dispone de perros Beagle alojados en caniles bajo un control sanitario periódico, y entrenados para la obtención de muestras de semen. Esta colaboración nos permitió llevar a cabo experimentos con

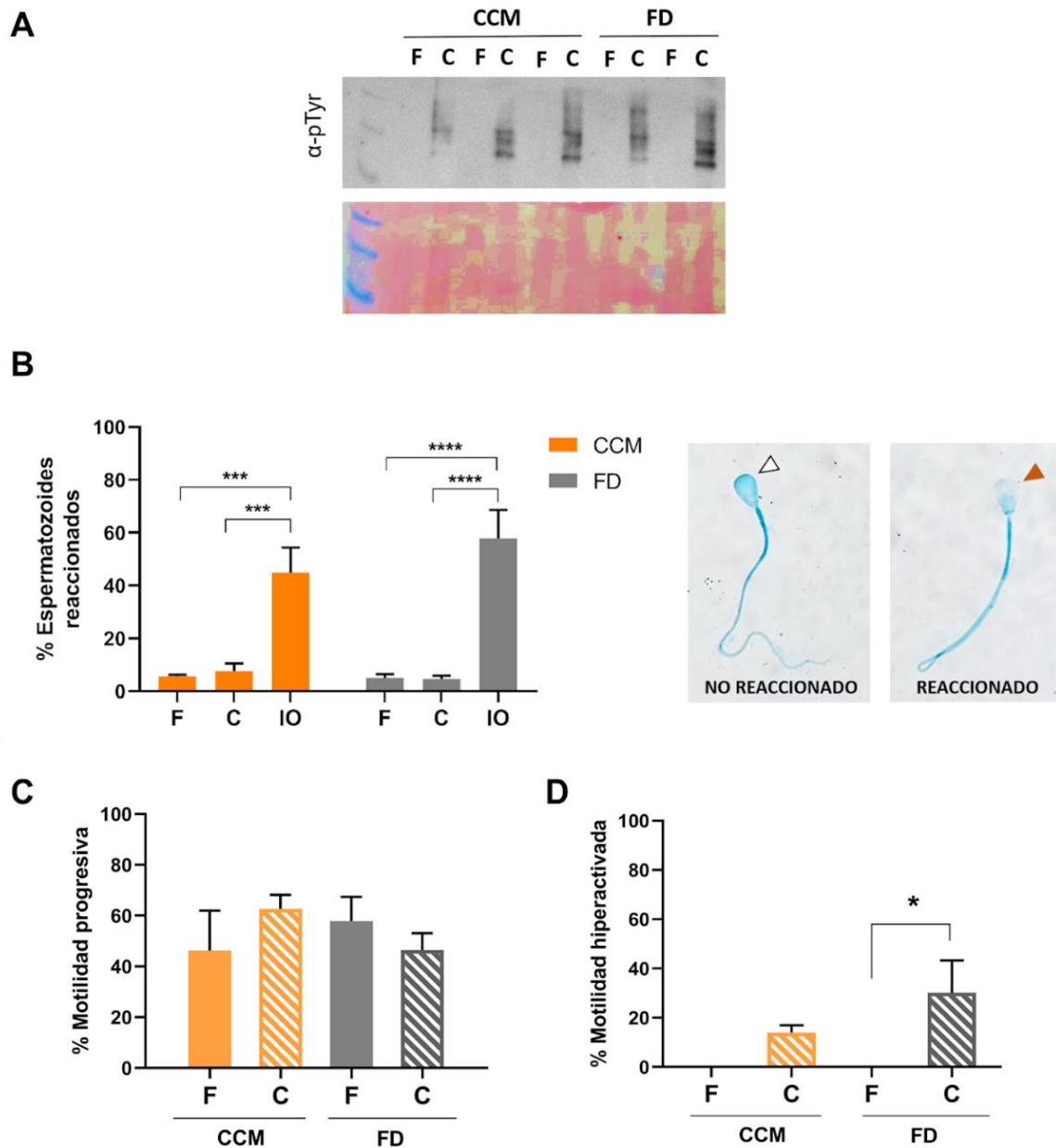
muestras frescas en condiciones adecuadas, avanzando en la caracterización funcional de la proteína CRISP canina.

El hecho de que no existiera un consenso universal sobre el medio óptimo para la capacitación de espermatozoides caninos, y que muchos autores emplearan versiones modificadas del medio de capacitación canino originalmente descrito (en adelante, "CCM" por sus siglas en inglés, *Canine Capacitation Medium*; Mahi & Yanagimachi, 1978), nos llevó a analizar la efectividad de diferentes medios para capacitar espermatozoides caninos *in vitro*. Por un lado, se empleó el medio CCM con las modificaciones particulares utilizado para la generación de los primeros cachorros nacidos por fertilización *in vitro* (Nagashima *et al.*, 2015) el cual incluye el agregado de  $MgCl_2$  y Hepes (**Tabla I.1**). En forma paralela, empleamos el medio de capacitación que es utilizado de rutina en nuestro laboratorio para capacitar espermatozoides murinos (en adelante, "FD"; Fraser & Drury, 1975), descrito como el más adecuado para la realización de ensayos de capacitación *in vitro* en ratón (González *et al.*, 2024). Al analizar la composición de estos medios (Tabla I.1), observamos que si bien comparten la mayoría de sus componentes (excepto el *buffer* Hepes y la sal  $KH_2PO_4$ , ausentes en el medio FD), existen diferencias en la concentración de sales y en la composición iónica resultante. Es así, que el medio FD presenta una menor concentración de  $K^+$  en solución, un ion clave para la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide, y la ocurrencia de la RA (Fraser 1983), y contiene el doble de piruvato y glucosa requeridos por los espermatozoides como fuente de energía. Cabe destacar que ambos medios contienen lactato, un sustrato ausente en algunos de los medios más utilizados para la capacitación *in vitro* (González *et al.*, 2024) y que ha cobrado relevancia en estudios recientes sobre el metabolismo espermático (Romarowski *et al.*, 2023; Balbach *et al.*, 2023). Por último, dado que el pH del medio es uno de los principales desencadenantes de la capacitación en el tracto reproductor femenino, resulta relevante señalar que el medio FD es ligeramente más ácido y posee una menor concentración de bicarbonato de sodio que el medio CCM modificado. Este último aspecto es de particular importancia ya que el flujo de bicarbonato hacia el interior del espermatozoide promueve la activación de sAC, generando un incremento en la concentración de AMPc, un mediador clave en la vía de señalización de la capacitación.

Tabla I.1 Composición de los diferentes medios utilizados para la capacitación de espermatozoides caninos

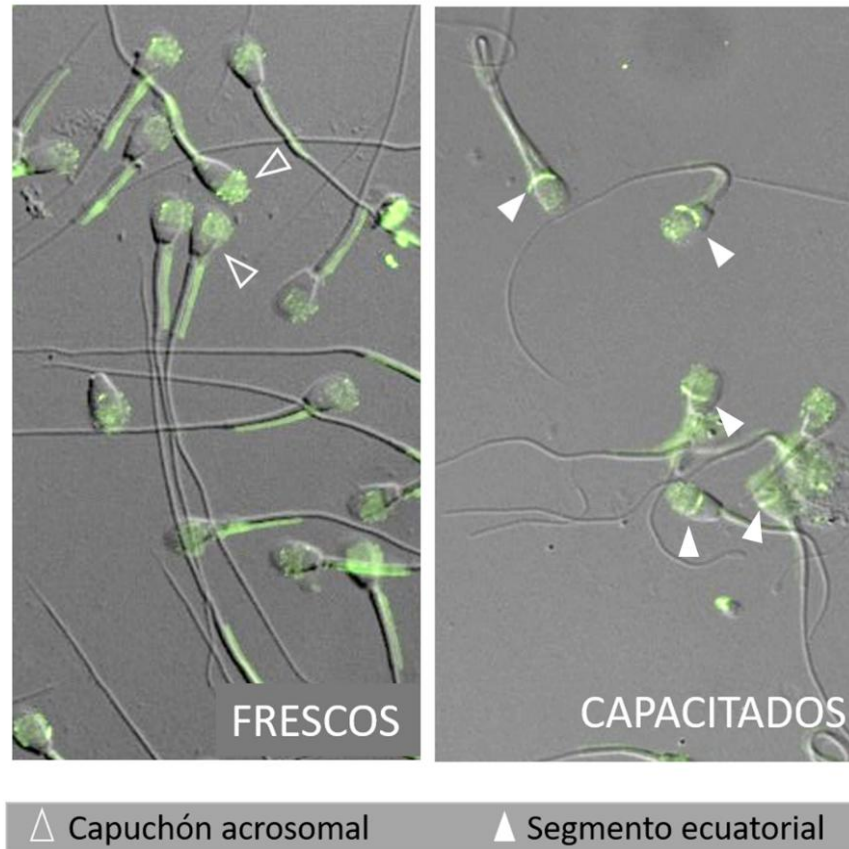
	CCM (Magi Yanagimachi 1978)	CCM modificado (Nagashima et al., 2015)	FD (Fraser and Drury, 1975)
NaCl	83,49 mM	83,49 mM	99,3mM
KCl	4,78 mM	4,78 mM	2,7mM
CaCl <sub>2</sub>	1,71 mM	1,71 mM	1,8mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19 mM	1,19 mM	
NaHCO <sub>3</sub>	37,61 mM	37,61 mM	25mM
Mg Cl <sub>2</sub>		1mM	0,5mM
Na Piruvato	0,25 mM	0,25 mM	0,5mM
Na lactato 60%	21,55 mM	21,55 mM	24,4mM
Glucosa	2,78 mM	2,78 mM	5,6mM
Rojo Fenol	0,020 mg/ml	0,020 mg/ml	0,020 mg/ml
streptomicina	0,050 mg/ml	0,050 mg/ml	0,050 mg/ml
Penicilina	100.000 Unidades	100.000 Unidades	100.000 Unidades
Hepes		25 mM	
pH	7,8	7,8	7,4
BSA	2 mg/ml	2 mg/ml	3mg/ml
Temperatura	37°C	38 °C	37°C
Tiempo de incubacion	7 hs	4 hs	4hs

Para estudiar la ocurrencia de la capacitación, espermatozoides caninos eyaculados en una concentración de  $7.5 \times 10^6$  por ml de medio fueron incubados durante 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (Nagashima *et al.*, 2015) en CCM modificado o FD y, al finalizar dicha incubación, se analizaron pTyr, RA y motilidad tanto progresiva como hiperactivada (HA). A pesar de que la temperatura óptima de capacitación en caninos es 38°C, los resultados mostraron que ambos medios fueron capaces de inducir un aumento en pTyr en las condiciones mencionadas (**Figura I.3**). Asimismo, y tal como ha sido descrito en la bibliografía, los espermatozoides caninos no presentaron un aumento en la RA como consecuencia de la capacitación pero mostraron porcentajes significativamente mayores de RA luego de la inducción con ionóforo (**Figura I.4.B**). Finalmente, al analizar la motilidad de los espermatozoides, observamos que mientras los niveles de motilidad progresiva fueron similares y no se modificaron con la capacitación (**Figura I.4.A**), la HA mostró un aumento significativo con la capacitación sólo en el medio FD (**Figura I.4.C, D**).



**Figura I.4. Análisis de parámetros asociados a la capacitación.** **A.** Extractos proteicos de espermatozoides frescos (F) o capacitados (C) ya sea en el medio CCM modificado o DF fueron sometidos a WB para analizar pTyr. Se muestra la tinción con Rojo Ponceau como control de carga. (n=4) **B.** Porcentaje de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosomal analizado por tinción con Coomassie Blue en espermatozoides frescos (F), capacitados (C), o expuestos durante 1 hora a  $2\mu\text{M}$  ionóforo de calcio A23187 (IO). (n=4). **C.** Porcentaje de espermatozoides frescos o capacitados *in vitro* tanto en medio CCM modificado como en medio FD con motilidad progresiva evaluada por recuento de videos de microscopía. (n=3). **D.** Porcentaje de espermatozoides frescos o capacitados *in vitro* tanto en medio CCM modificado como en medio FD con motilidad hiperactivada evaluada por recuento de videos de microscopía. (n=3). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ;  $p^{***} < 0,001$ ;  $p^{****} < 0,0001$ .

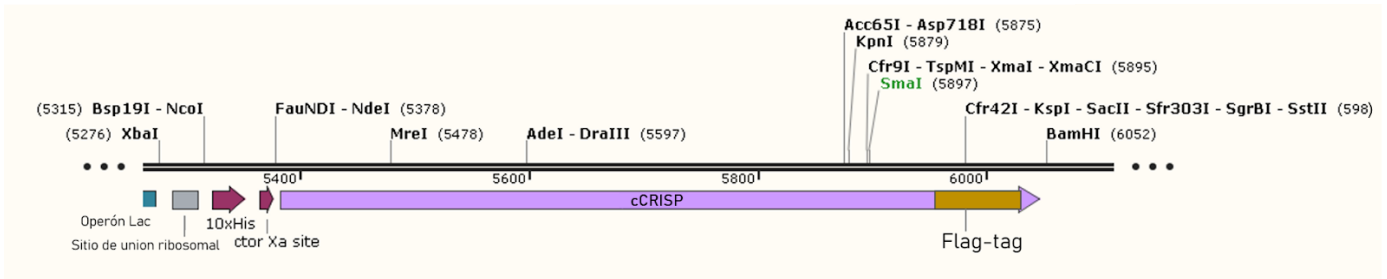
Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que ambos medios serían capaces de sostener la capacitación *in vitro* de los espermatozoides caninos, si bien el medio FD parecería permitir un mejor proceso de capacitación a juzgar por el mayor porcentaje de espermatozoides con HA. Por esta razón, continuamos los estudios utilizando el medio FD y analizamos la localización de cCRISP luego de la incubación en condiciones capacitantes a través del empleo del anticuerpo anti-hCRISP3. Como resultado, observamos que, al igual que lo descrito previamente para la proteína CRISP1 de roedores (Rochwerger *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 2000b), cCRISP se encuentra en la región dorsal del acrosoma en espermatozoides frescos y experimenta una relocalización al segmento ecuatorial, región fusogénica del espermatozoide, en una alta proporción de las células capacitadas *in vitro* (**Figura I.5**). Estos hallazgos confirman la permanencia de la proteína cCRISP en los espermatozoides luego de la capacitación y la accesibilidad de la misma a los anticuerpos generados tras una inmunización. En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento indican el origen epididimario de la cCRISP identificada, su localización en la superficie de los espermatozoides tanto frescos como capacitados y permanencia en los espermatozoides luego de la capacitación, apoyando su potencial participación en el proceso de fertilización.



**Figura I.5. Localización de la proteína CRISP en espermatozoides caninos.** Los espermatozoides eyaculados fueron fijados frescos o luego de ser expuestos a condiciones capacitantes *in vitro* y sometidos a inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-hCRISP3 como anticuerpo primario y la ausencia del mismo como control negativo. Se muestra superposición de fotografías de campo claro y fluorescencia (FITC) obtenidas por microscopía confocal (600X).

Con el fin de analizar la inmunogenicidad de la CRISP canina identificada y obtener anticuerpos específicos contra la misma, el siguiente paso consistió en llevar a cabo la expresión de la proteína cCRISP recombinante en un sistema procarionta. Para ello, utilizamos la secuencia anotada del gen previamente identificado por secuenciación de ADNc (Gene ID: 4749320) para diseñar un vector de expresión. Dado que la participación de la proteínas CRISP en la fusión de gametas se encuentra en el dominio PR-1 del extremo N-terminal, optamos por un vector que no incorporara *tags* de gran tamaño en esa región para evitar interferencias con su potencial rol funcional. El vector comercial elegido fue pET-16b, el cual codifica un *10xHis-Tag* río arriba del sitio de clonación múltiple, permitiendo la purificación de la proteína

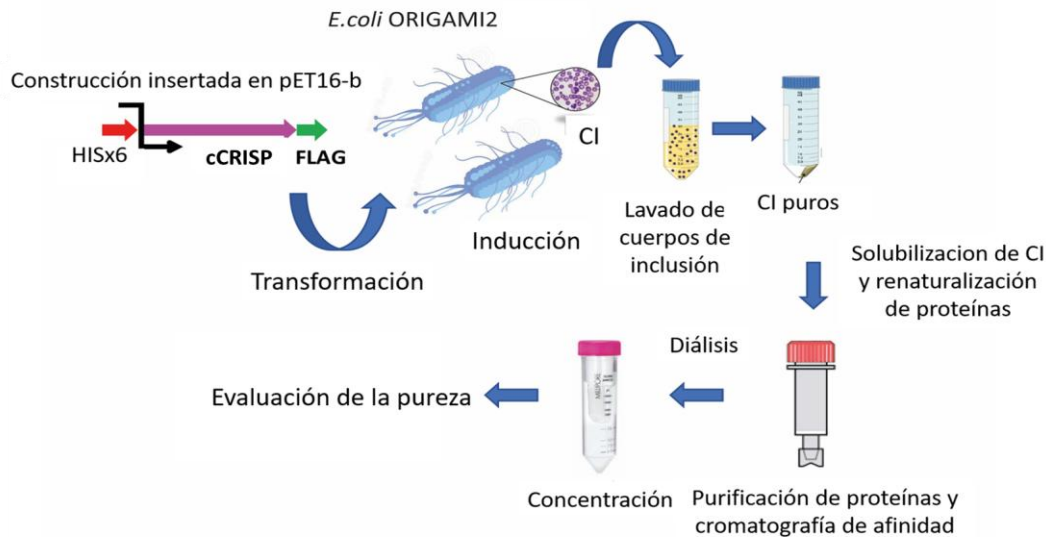
mediante cromatografía de afinidad con columna de níquel. Además, añadimos una secuencia *Flag-Tag* en el extremo 5' del gen para monitorear la expresión de la proteína por WB y asegurar su producción en la totalidad de su extensión (**Figura I.6**).



**Figura I.6. Esquema del vector diseñado para la expresión de la proteína cCRISP recombinante.** El gen de la proteína cCRISP fue insertado en el sitio de clonado múltiple, conteniendo un *10XHis-Tag* en el N-terminal para su purificación y un *Flag-Tag* en el C-terminal para su identificación.

El vector comercial liofilizado fue resuspendido en agua miliQ y, posteriormente transfectado en bacterias *E. coli* DH5- $\alpha$ , una cepa especializada en la amplificación de vectores en alto número de copias. Una vez obtenido un volumen suficiente de material genético, se procedió a la transfección de suspensiones bacterianas de *E. coli* Origami 2 para la expresión de la proteína recombinante. Esta última cepa presenta mutaciones en las enzimas Glutatión Reductasa (*gor*) y Tiorredoxina Reductasa (*trxB*), lo que mejora significativamente la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma bacteriano, de particular utilidad para proteínas ricas en cisteínas como lo son las proteínas CRISP. Una vez establecida la colonia Origami 2 transfectada con el vector conteniendo la secuencia de cCRISP, se procedió a inducir la expresión de la proteína recombinante en suspensión mediante adición de IPTG. Como resultado, encontramos que la proteína lograba expresarse, pero no se encontraba alojada en el sobrenadante bacteriano sino en cuerpos de inclusión. Estas estructuras, si bien presentan características amiloides tales como una organización intermolecular basada en láminas beta, afinidad por colorantes específicos para amiloides y un proceso de depósito selectivo por secuencia, conservan una cantidad significativa de estructura secundaria nativa y contienen cantidades relevantes de polipéptidos funcionales (Gonzalez-Montalban *et al.*, 2008). Es por este motivo que se debió adaptar el esquema de obtención y purificación de la

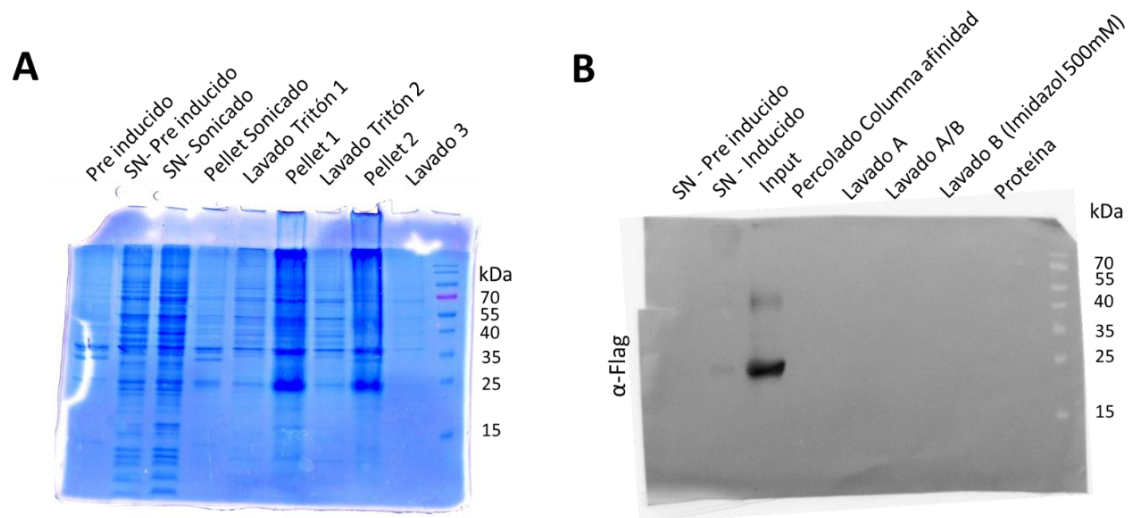
proteína, agregando pasos intermedios de extracción proteica de los cuerpos de inclusión y una re-naturalización previa a la cromatografía de afinidad (**Figura I.7**).



**Figura I.7. Adaptación de la expresión de la proteína cCRISP recombinante en *E. Coli* Origami 2.** El esquema muestra los pasos realizados para expresar y purificar la proteína. Partiendo de un vector comercial conteniendo la secuencia de la proteína previamente identificada, *His-Tag* en su N-terminal y *Flag-Tag* en su C-terminal, se transformaron bacterias *E. Coli* Origami 2 para favorecer la formación de puentes disulfuro en su expresión. Una vez terminada la inducción, se aislaron los cuerpos de inclusión (CI) conteniendo la proteína expresada por centrifugación, los cuales fueron sometidos a un lavado para remover el debris celular. Posteriormente, los CI fueron tratados con un detergente fuerte (N-Lauril Sarcosina) y la proteína renaturalizada mediante un proceso de dilución lenta, cargada en una columna de afinidad de níquel (input), lavada y extraída con concentraciones altas de Imidazol (500mM). Finalmente, la purificación fue seguida de una diálisis para remover el exceso de sal y un proceso de concentración con Vivaspin® 20 (concentración por ultrafiltración en membrana) con el fin de poder utilizar la proteína en ensayos biológicos.

Al analizar los sucesivos pasos del protocolo, encontramos que había habido inducción de la expresión proteica (**Figura I.8.A**, SN-sonicado) como así también enriquecimiento en la proteína en los sucesivos lavados de cuerpos de inclusión (**Figura I.8.A**, Pellet 1 y Pellet 2). Sin embargo, al revelar con anticuerpo anti-Flag, encontramos que la proteína era detectada en el lavado de los cuerpos de inclusión (**Figura I.8.B**, Input) pero no podía ser extraída de la columna ni en el percolado (en el caso de que no hubiera podido adherirse a la columna por haber perdido el His-Tag o que hubiera quedado en un bolsillo hidrofóbico de la proteína), ni

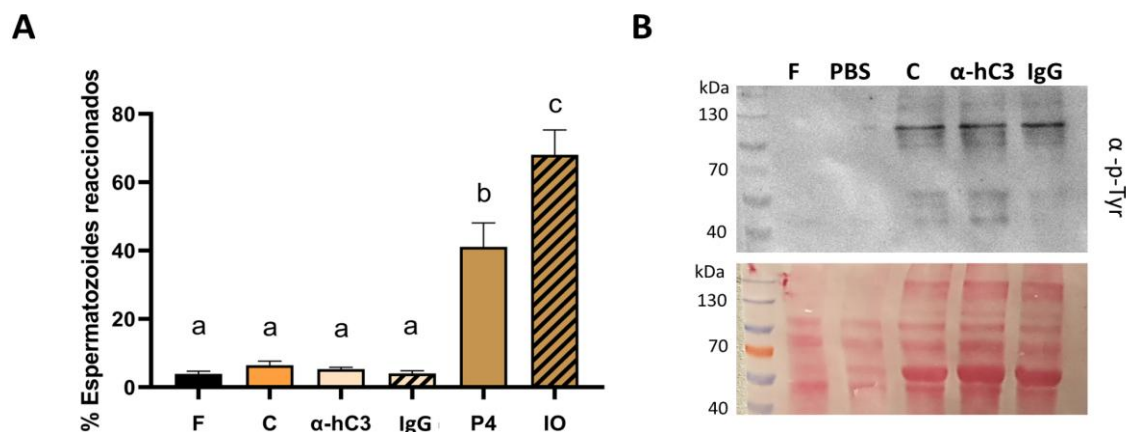
en los sucesivos pasos de lavados para la extracción de la columna de níquel (**Figura I.8.B**, Lavado A, Lavado A/B, Lavado B).



**Figura I.8. Seguimiento del protocolo de expresión y purificación de la proteína recombinante por SDS-PAGE. A.** SDS-PAGE de extractos proteicos para realizar el control del proceso de inducción y lavado de cuerpos de inclusión revelado por tinción proteica con *Coomassie Brilliant Blue*. **B.** SDS-PAGE de extractos proteicos para realizar el control del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de níquel revelado con anticuerpo anti-FLAG.

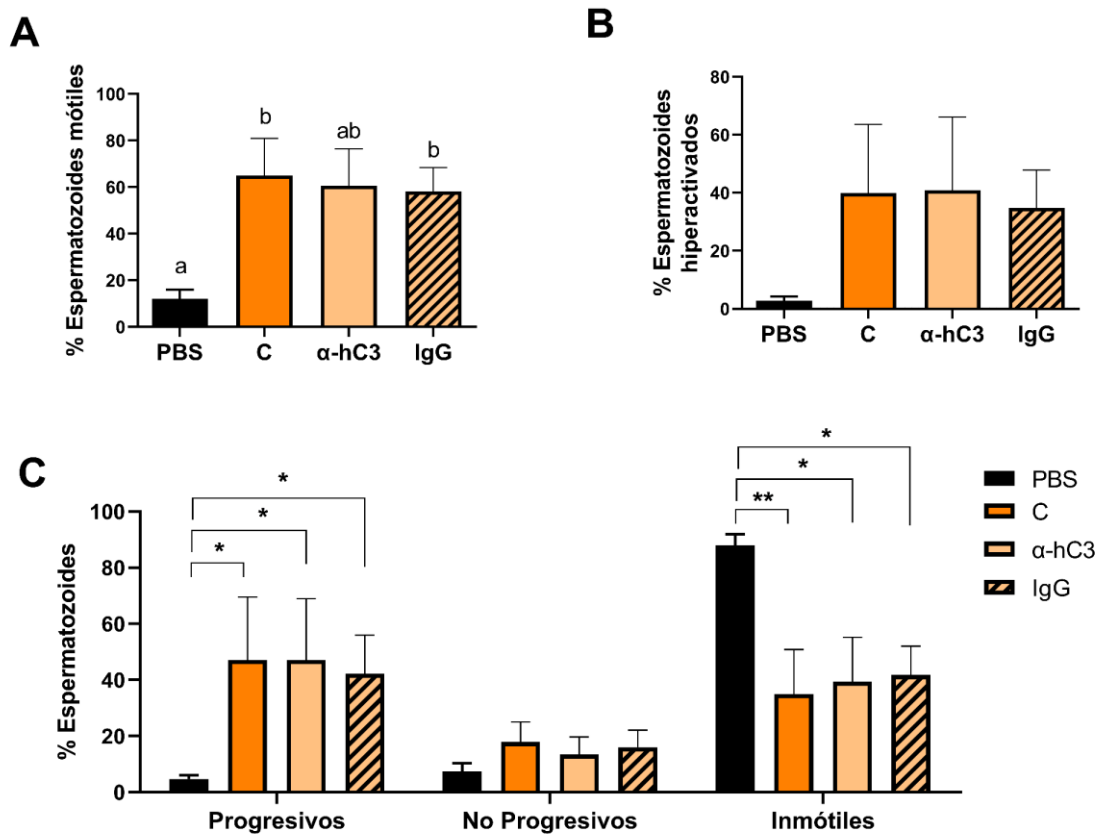
Estas observaciones sugieren que la proteína ingresada en la columna de cromatografía de afinidad precipitaría dentro de ella, impidiendo su interacción con la sal utilizada para su elución (imidazol). Esta hipótesis se ve respaldada por reportes recientes que indican la capacidad de las proteínas CRISP para oligomerizar y formar estructuras amiloides (Sheng *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021), fenómeno que podría afectar negativamente la cromatografía, ya que el aumento en el volumen y peso molecular de los oligómeros podría obstruir la columna, generando el efecto observado de retención. Mientras continuamos trabajando activamente en la resolución de este situación, y con el fin de avanzar con la prueba de concepto sobre la posibilidad de afectar inmunológicamente el funcionamiento de los espermatozoides caninos, realizamos una serie de ensayos funcionales utilizando el anticuerpo heterólogo anti-hCRISP3 que resultó efectivo para la identificación y caracterización de la proteína cCRISP.

En primer lugar, analizamos si la exposición de espermatozoides caninos a este anticuerpo durante la capacitación afectaba dicho proceso. Para ello, tras el lavado de los espermatozoides del semen, los mismos fueron incubados en condiciones no capacitantes (medio PBS sin BSA) y capacitantes, en presencia o ausencia del anti-hCRISP3, utilizando como control la misma concentración de IgG normal de conejo (de la misma procedencia que el anticuerpo heterólogo utilizado), con el fin de descartar que cualquier efecto observado se debiera a la mera presencia de anticuerpos en el medio. Al finalizar las diferentes incubaciones, se procedió a evaluar diferentes parámetros espermáticos asociados a la ocurrencia de la capacitación. Los resultados mostraron que la incubación de espermatozoides caninos, ya sea con anti-hCRISP3 o con IgG normal, no afectó la proporción de espermatozoides reaccionados de forma espontánea (**Figura I.9.A**) ni la fosforilación en residuos de tirosina (**Figura I.9.B**).



**Figura I.9. Efecto del anticuerpo anti-hCRISP3 sobre la ocurrencia de RA y pTyr durante la capacitación. A.** Porcentaje de espermatozoides que sufrieron la RA analizado por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* en espermatozoides frescos (F), incubados en condiciones no capacitantes (PBS) o capacitantes (C) expuestos o no a anti-hCRISP3 ( $\alpha$ -hC3) o a IgG normal de conejo (IgG) durante toda la incubación. La RA inducida se analizó exponiendo a los espermatozoides a  $10\mu\text{M}$  de progesterona (P4) o  $2\mu\text{M}$  ionóforo de calcio A23187 (IO) durante la última hora de incubación ( $n=4$ ). **B.** La fosforilación en residuos tirosina fue evaluada por WB sobre extractos proteicos de espermatozoides frescos (F), incubados en condiciones no capacitantes (PBS) y capacitados (C) expuestos durante toda la capacitación a anti-hCRISP3 ( $\alpha$ -hC3) o a IgG normal de conejo (IgG), utilizando un anticuerpo anti-pTyr. Se muestra la tinción con Rojo Ponceau como control de carga. ( $n=2$ ) Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Por otro lado, estudiamos el efecto del anticuerpo sobre la motilidad espermática mediante el uso de un sistema computarizado CASA SCA® (Computer Aided Semen Analysis), el cual permite un análisis cuantitativo preciso, reproducible y automático de los parámetros asociados a la motilidad de una muestra espermática. Los resultados indicaron que el anticuerpo anti-hCRISP3 no afectaría tampoco la motilidad de los espermatozoides, a juzgar por la proporción de espermatozoides móviles totales (**Figura I.10.A**), de espermatozoides con motilidad hiperactivada (**Figura I.10.B**) y de espermatozoides móviles progresivos, no progresivos e inmóviles observados al finalizar la capacitación (**Figura I.10.C**). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias al analizar diversos parámetros espermáticos específicos asociados a la motilidad de los espermatozoides (Tabla I.2).



**Figura I.10. Efecto del anticuerpo anti-hCRISP3 sobre la motilidad espermática.** Espermatozoides incubados en PBS (PBS), en condiciones capacitantes (C) o expuestos durante toda la capacitación a anti-hCRISP3 ( $\alpha$ -hC3) o a IgG normal de conejo (IgG) fueron analizados por CASA, evaluándose la proporción de espermatozoides móviles (**A**), la proporción de espermatozoides que desarrollaron motilidad hiperactivada (**B**) y la distribución del tipo de motilidad (progresiva, no progresiva o inmóvil) (**C**) al final de la incubación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

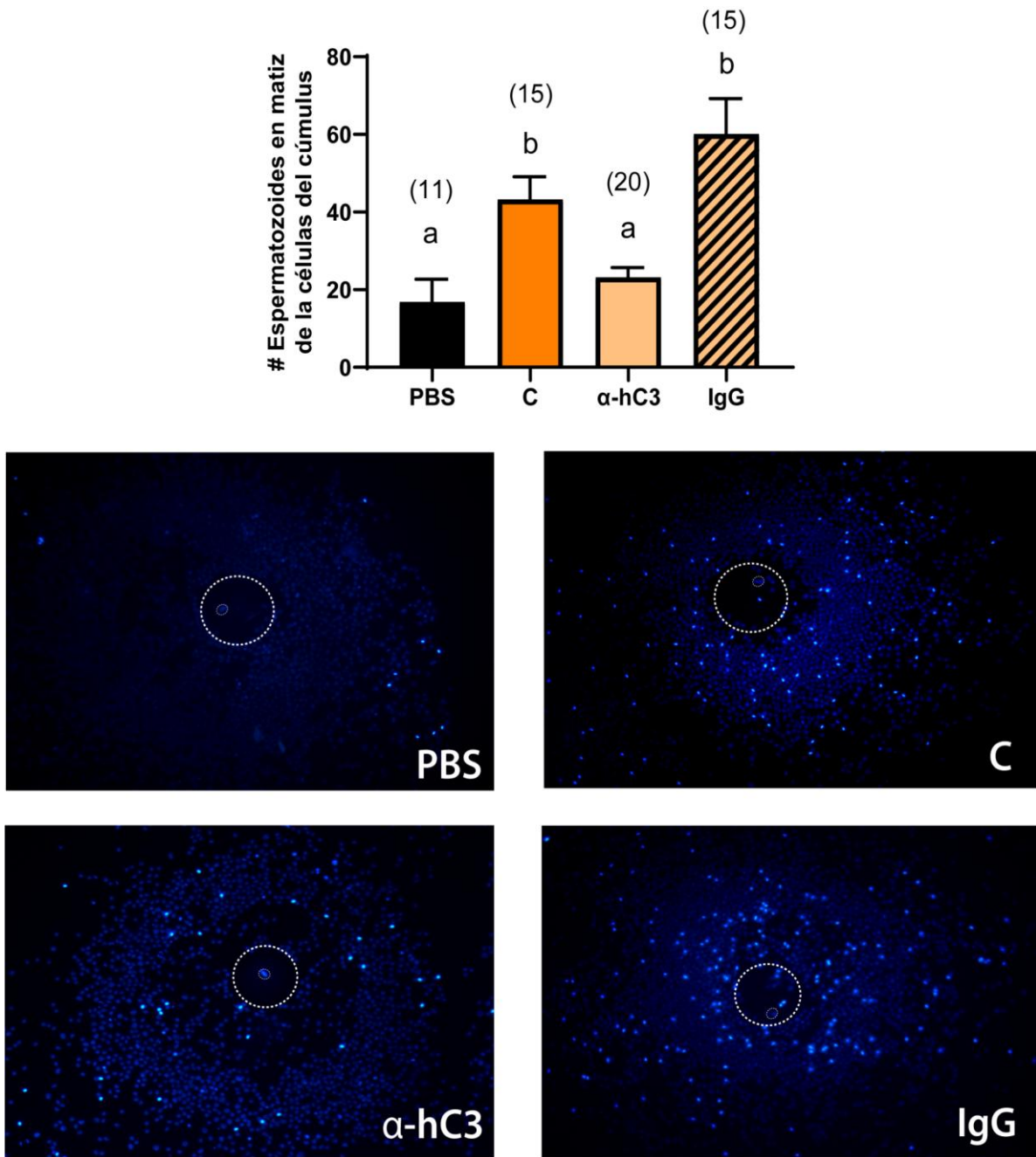
Tabla 1.2. Parámetros espermáticos asociados a la motilidad obtenidos por CASA

	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
<b>PBS</b>	53.45 $\pm$ 12.21 (*)	11.93 $\pm$ 4.36	27.23 $\pm$ 8.35	16.79 $\pm$ 6.23	28.13 $\pm$ 8.66	35.38 $\pm$ 14.72	1.31 $\pm$ 3.04	6.31 $\pm$ 2.94
<b>C</b>	172.6 $\pm$ 70.63	53.20 $\pm$ 22.31	76.85 $\pm$ 30.16	26.71 $\pm$ 1.98	58.17 $\pm$ 5.47	41.31 $\pm$ 13.90	3.46 $\pm$ 1.28	11.75 $\pm$ 2.62
<b><math>\alpha</math>-hC3</b>	179.9 $\pm$ 78.95	50.14 $\pm$ 25.31	76.05 $\pm$ 32.13	24.04 $\pm$ 3.35	55.70 $\pm$ 763	40.87 $\pm$ 9.28	3.70 $\pm$ 1.44	11.61 $\pm$ 2.52
<b>IgG</b>	156.6 $\pm$ 40.30	55.47 $\pm$ 15.38	82.92 $\pm$ 23.17	31.75 $\pm$ 4.26	56.71 $\pm$ 3.80	48.37 $\pm$ 3.82	3.13 $\pm$ 7.13	16.94 $\pm$ 4.46

Espermatozoides incubados en PBS (PBS) o en condiciones capacitantes (C) expuestos a anti-hCRISP3 ( $\alpha$ -hC3) o a IgG normal de conejo (IgG) durante toda la incubación fueron analizados por CASA, evaluándose diferentes parámetros de motilidad. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05.

En conjunto, los resultados descriptos estarían indicando que la exposición de los espermatozoides a un anticuerpo capaz de reconocer a la proteína cCRISP espermática no estaría afectando el proceso de capacitación. En base a ello, el siguiente paso consistió en evaluar el posible efecto de la exposición al anticuerpo anti-hCRISP3 sobre la capacidad de los espermatozoides de interactuar con el ovocito. En este sentido, cabe mencionar la enorme dificultad que representa llevar a cabo ensayos de fertilización *in vitro* en perros debido a la complejidad inherente a la obtención de ovocitos caninos que, además de ser recuperados por laparoscopia siguiendo un ciclo estral a menudo impredecible, son ovulados inmaduros y deben ser sometidos a un posterior proceso de maduración *in vitro*. Debido a esta complejidad decidimos iniciar los estudios funcionales mediante el empleo de ensayos heterólogos tales como la penetración de la matriz de las células del cúmulus de ovocitos de ratón desarrollado en nuestro laboratorio para su uso con espermatozoides humanos (Battistone *et al.*, 2014). Para ello, los espermatozoides caninos incubados en condiciones capacitantes en presencia o ausencia de anti-hCRISP3 fueron previamente teñidos con Hoechst y luego agregados a COC de ratón, analizándose el número de espermatozoides que lograban penetrar la matriz al cabo de 15 min de co-incubación. Los resultados indicaron que mientras ninguno de los espermatozoides incubados en PBS logró penetrar el cúmulus, aquellos incubados en condiciones capacitantes en ausencia de anticuerpo lograron hacerlo,

confirmando que la incubación en las condiciones de capacitación empleadas permite el desarrollo de la capacidad de penetración del cúmulus que se sabe se expresa sólo en espermatozoides capacitados. Asimismo, los resultados mostraron que la presencia del anticuerpo anti-hCRSP3 durante la capacitación produjo una reducción significativa en el número de espermatozoides detectados dentro los cúmulus murinos (**Figura I.11**), indicando que el anticuerpo estaría afectando la etapa de penetración del cúmulus que inicia el proceso de fertilización. Estas observaciones apoyan la participación de la proteína cCRISP identificada en el proceso de fertilización y, por ende, el potencial empleo de esta proteína para el desarrollo de una vacuna inmuno-anticonceptiva canina. En base a ello, se prevé que los próximos pasos estarán dirigidos a la obtención de la proteína cCRISP recombinante y su posterior administración en perros de ambos sexos con el fin de analizar la inmunogenicidad de la proteína expresada, y la seguridad de la estrategia de inmunización.



**Figura I.11. Efecto del anticuerpo hCRISP3 sobre la penetración de la matriz de las células del cúmulus.** Espermatozoides caninos fueron incubados durante 4 hs en PBS (PBS) o en condiciones capacitantes (C) en presencia o no del anticuerpo anti-hCRISP3 ( $\alpha$ -hC3) o suero normal de conejo (IgG), posteriormente teñidos con Hoechst 33342 y, finalmente, co-incubados con COC de ratones control durante 15 minutos, determinándose el número de espermatozoides detectados dentro del cúmulus. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . El número total de ovocitos analizados en cada caso se indica entre paréntesis. Se muestran fotografías representativas de los experimentos realizados. La línea punteada blanca muestra el ovocito y su ADN (200X).

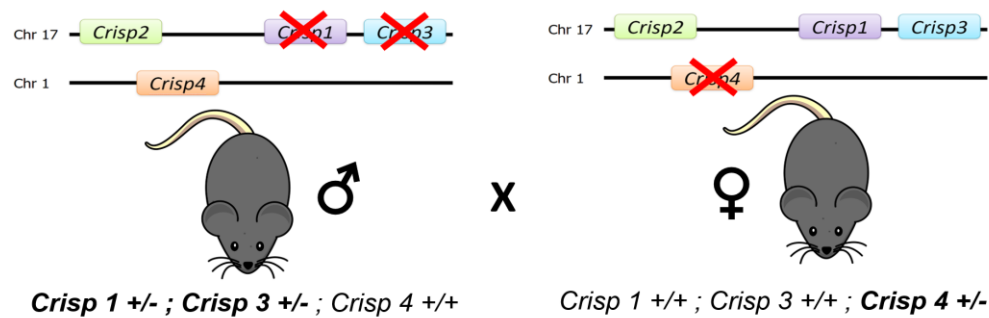
En conjunto, los resultados presentados en este capítulo muestran, por primera vez, la identificación de una proteína CRISP canina (cCRISP) de origen epididimario, su localización en la superficie del espermatozoide, su permanencia y relocalización luego de un proceso de capacitación, y su participación en la etapa de penetración del cúmulus, apoyando el rol funcional de la proteína identificada en el proceso de fertilización. Estas observaciones, junto a la bajada en la capacidad de los espermatozoides caninos de penetrar la matriz del cúmulus luego de su exposición a un anticuerpo capaz de reconocer a la proteína cCRISP espermática apoyan fuertemente el potencial empleo de esta proteína como blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para perros de ambos sexos.

## Capítulo II

### Generación y caracterización de una nueva colonia de animales carentes de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4.

Tal como se mencionara en la introducción, nuestros trabajos muestran que los machos de las colonias carentes de más de una proteína CRISP presentan problemas de fertilidad debidos a la sumatoria de defectos en diferentes etapas del proceso de fertilización. Es así, que mientras los machos DKO 1/4 son subfértiles debido a una disminución en la capacidad de sus espermatozoides de fertilizar ovocitos *in vivo* (Carvajal *et al.*, 2018), los machos DKO 1/3 exhiben una subfertilidad asociada a una menor capacidad de los ovocitos fertilizados de llegar al estadio de blastocisto (Curci *et al.*, 2020). Estas observaciones no solo confirmaron la existencia de mecanismos de compensación entre proteínas homólogas, sino que revelaron la existencia de diferentes módulos funcionales tales como el conformado por las proteínas CRISP1/CRISP4, involucrado en la fertilización y el conformado por las proteínas CRISP1/CRISP3, crítico para el desarrollo embrionario. Más allá de los animales DKO, nuestros resultados indicaron que los machos múltiples KO carentes de más de dos proteínas CRISP (TKO 1/2/3 y CKO) resultaron prácticamente infértiles (Curci *et al.*, 2020), indicando la necesidad de delecionar al menos 3 proteínas CRISP para lograr infertilidad. En base a ello, y con el fin de continuar nuestros estudios sobre la relevancia de las CRISP para la fertilidad y la redundancia funcional entre los miembros de la familia, el segundo objetivo de esta tesis consistió en generar y caracterizar una nueva colonia triple KO carente de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 involucradas en fertilización y desarrollo embrionario.

Para la generación de la nueva colonia denominada de ahora en más TKO, utilizamos la ventaja de poder cruzar por apareo las colonias DKO 1/4 y DKO 1/3 ya disponibles en el laboratorio. Al respecto, dado que los genes *Crisp1* y *Crisp3* de ratón se encuentran en el mismo cromosoma mientras que *Crisp4* se ubica en un cromosoma diferente, decidimos cruzar mediante apareos un macho heterocigota para los genes *Crisp1* y *Crisp3* (colonia DKO 1/3) y una hembra heterocigota para CRISP4 y WT para CRISP1 perteneciente a la colonia DKO 1/4 (**Figura II.1**).



**Figura II.1. Estrategia utilizada para generar ratones deficientes en CRISP1, CRISP3 y CRISP4.**

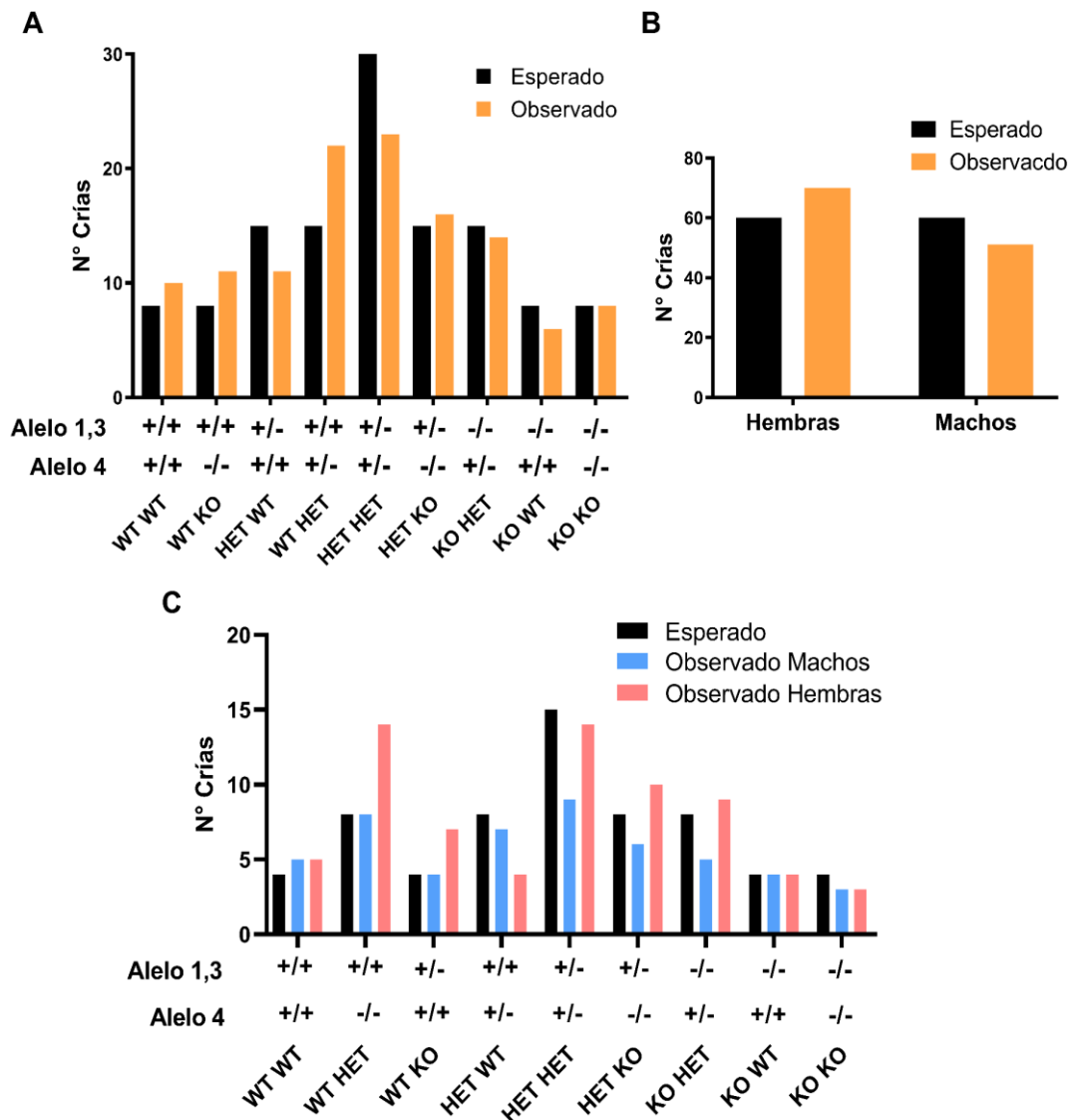
Esquema de la ubicación relativa de los genes *Crisp1*, *Crisp3* y *Crisp4* en los cromosomas 1 y 17 y el cruzamiento inicial realizado para la obtención de ratones heterocigotas para las mutaciones 1/3 y 4. En todos los casos “+/+” significa que el ratón posee los dos alelos salvajes (WT) y “+/-” que posee un alelo mutado (HET), considerando a los genes *Crisp1* y *Crisp3* como un conjunto alélico, ya que, por su proximidad cromosómica, segregan juntos con alta frecuencia.

Dada la proximidad entre los genes *Crisp1* y *Crisp3* en el cromosoma 17, sus mutaciones son heredadas en conjunto y consideradas como un único alelo genético. Sin embargo, teniendo en cuenta que un evento de recombinación (*crossing over*) podría separar dichas mutaciones, verificamos periódicamente la presencia simultánea de dichas mutaciones para asegurar la continuidad del modelo genético. Con esta premisa, se genotificaron las crías por PCR y se seleccionaron aquellas heterocigotas para “ambas” mutaciones para generar los apareos fundacionales de la colonia (HET/HET x HET/HET) (**Figura II.2.A**). Posteriormente, se analizó la frecuencia génica de las crías utilizando el modelo mendeliano de dobles híbridos (Aa/Bb x Aa/Bb) (**Figura II.2.B**) que permite establecer la proporción esperada para cada genotipo siempre que los alelos segreguen de forma independiente, sean igualmente probables, y no generen mutaciones deletéreas (**Figura II.2.C**). Dentro de la proporción establecida, pudimos observar que la doble homocigosis (es decir, ambos alelos WT o KO para ambas mutaciones) presentarían, en condiciones normales, una prevalencia de solamente el 6,25% de las crías (**Figura II.2.C**), por lo cual se llevaron a cabo numerosos apareos de mantenimiento (HET/HET x HET/HET) simultáneo para generar un mayor número de crías y obtener ratones doble homocigotas. Cabe aclarar que, para evitar la fijación de posibles *off targets*, los apareos fundacionales, así como también el resto de los apareos de mantenimiento de la colonia, fueron realizados con



patrones control esperados. **B.** La colonia fue mantenida mediante apareos que cruzan machos y hembras heterocigotas tanto para la mutación de *Crisp1* y *Crisp3*, considerada como una única mutación por no cumplir con la 3era Ley de Mendel de segregación independiente (alelo 1/3), como también para la mutación de *Crisp4* (alelo 4). **C.** Tabla representativa de los genotipos esperados según la herencia mendeliana en un cruce de doble heterocigosis. Cada casilla de la tabla representa un posible genotipo resultante de la combinación de los alelos aportados por ambos progenitores y su proporción esperada.

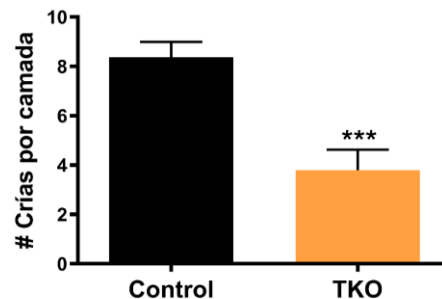
A continuación, analizamos la incidencia de la frecuencia alélica en la descendencia de apareos de mantenimiento, la cual no presentó diferencias significativas con la frecuencia esperada, indicando que la combinación de estas mutaciones no sería deletérea (**Figura II.3.A**). Asimismo, observamos que la cantidad de machos y hembras nacidos de esta colonia no se desviaba de lo esperado tanto sin (**Figura II.3.B**) como con distinción de genotipo (**Figura II.3.C**).



**Figura II.3. Análisis de frecuencia alélica en la descendencia de las crías de la colonia TKO.** **A.** Cantidad de crías obtenidas para cada combinación de alelos en las primeras 121 crías (ns;  $\chi^2$ ). **B.** Cantidad de hembras y machos obtenidos en las primeras 121 crías (ns;  $\chi^2$ ). **C.** Cantidad de crías obtenidas para cada combinación de alelos y sexo analizado por  $\chi^2$  para las primeras 121 crías (ns).

Dado que no existen reportes de expresión de la proteína CRISP4 murina en el tracto reproductor femenino, es de esperar que las hembras TKO sean fenotípicamente similares a las hembras DKO 1/3, cuya fertilidad ya fue evaluada y mostró ser menor a la de los controles (Tesis doctoral Ludmila Curci, 2019). Por esta razón, decidimos dedicarnos a estudiar de qué manera la ausencia simultánea de CRISP1, CRISP3 y CRISP4 afectaba la fertilidad de los

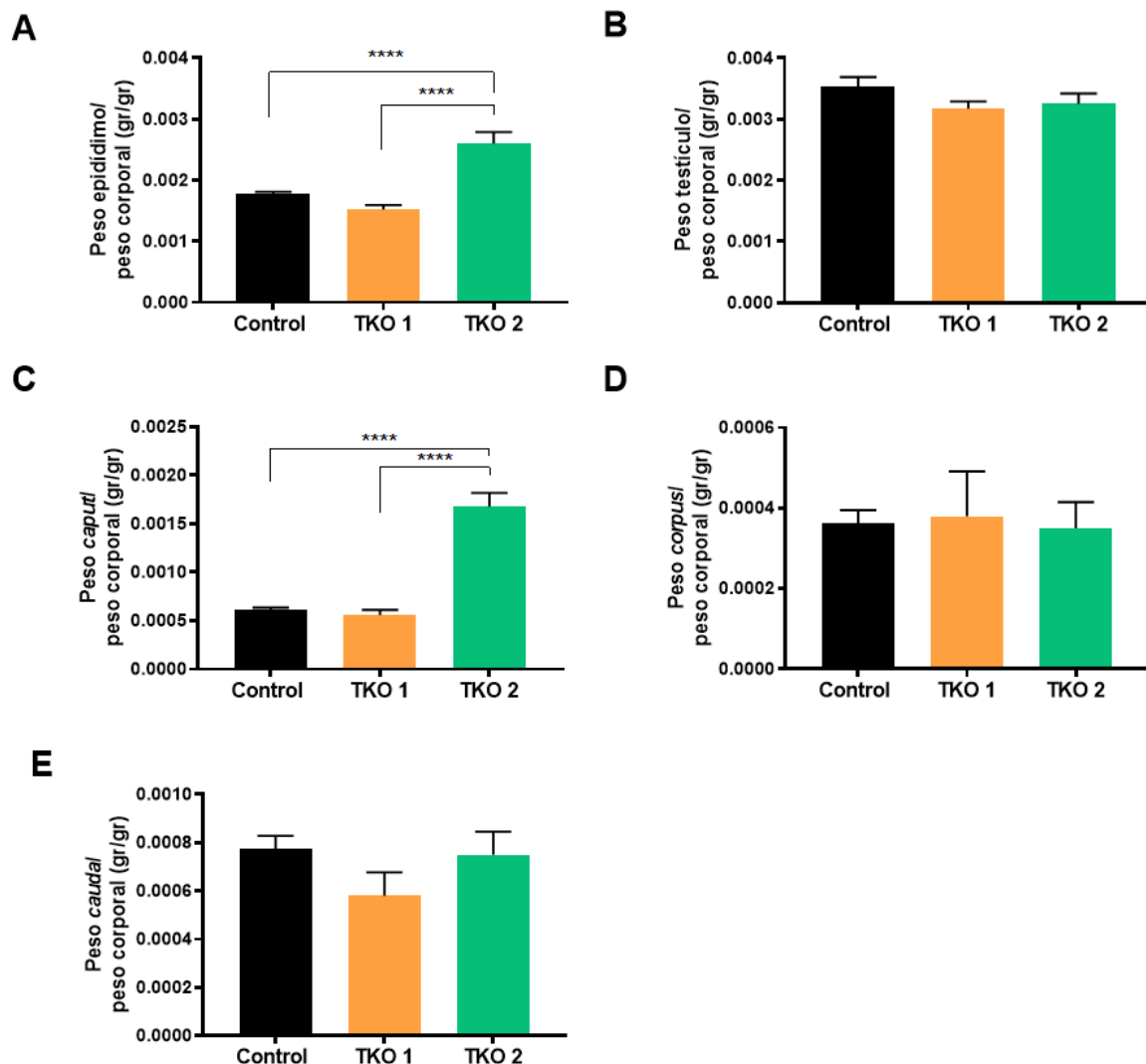
machos. Para ello, machos adultos control o TKO fueron puestos en apareo con hembras adultas control de la misma colonia, examinando durante 4 días, el éxito del apareo mediante la presencia del tapón vaginal. Una vez confirmado el apareo, las hembras fueron separadas con el fin de determinar el número de crías nacidas por hembra. Los resultados mostraron que los ratones TKO exhibían una disminución significativa en el número de crías, indicando que la ausencia de CRISP1, CRISP3 y CRISP4 afectaba la fertilidad (**Figura II.4**).



**Figura II.4. Estudio de fertilidad de machos TKO.** Promedio del número de crías nacidas por camada, donde cada macho fue evaluado al menos dos veces. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $p < 0,001$ . ( $n \geq 7$ ).

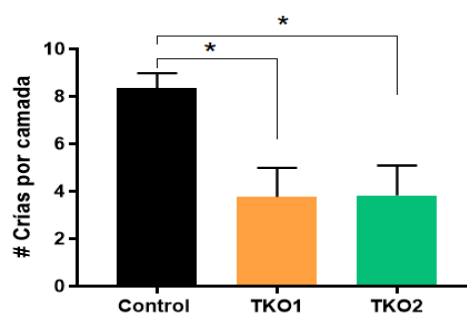
Con el objetivo de explorar los mecanismos responsables del defecto en fertilidad observado en los machos TKO, y dado que previamente habíamos reportado que un 39% de los machos DKO 1/4 padecían epididimitis (ya sea unilateral o bilateral), decidimos analizar si los machos de esta nueva colonia también presentaban este fenotipo inflamatorio. Los resultados mostraron que más de un tercio de los machos TKO (7/17, 41%) tenían epidídimos visiblemente más grandes en comparación con los controles, ya sea de forma unilateral (5/17, 29%) o bilateral (2/17, 12%). En base a estas observaciones, los ratones TKO se clasificaron en dos grupos, tal como había sido realizado previamente para los machos DKO 1/4 (Carvajal et al, 2018). El Grupo 1 (TKO1) incluyó a aquellos animales con epidídimos y testículos de tamaño comparable a los controles mientras que el Grupo 2 (TKO2) incluyó a aquellos con órganos reproductivos visiblemente más grandes, ya sea unilateral o bilateralmente. Estas diferencias en el tamaño de los órganos se corroboraron mediante un incremento significativo en el peso epididimario (1.5 veces mayor, **Figura II.5.A**). Sin embargo, a diferencia de los machos DKO 1/4, los animales del grupo TKO2 no mostraron aumento de tamaño de los testículos en

comparación con los controles (**Figura II.5.B**), sugiriendo un menor nivel de inflamación a nivel testicular. Por su parte, el análisis de las distintas regiones del epidídimo de los animales TKO mostró un peso significativamente mayor (2.7 veces) para la región de *caput* en comparación con los controles (**Figura II.5.C**), sin observarse diferencias significativas para las regiones del *corpus* y del *cauda* (**Figura II.5.D, E**).



**Figura II.5. Análisis del peso epididimario y testicular en ratones TKO.** Peso del epidídimo entero (**A**), del testículo (**B**), y del *caput* (**C**), *corpus* (**D**) y *cauda* (**E**) epididimarios en relación al peso corporal total de ratones Control (WT), Grupo 1 (TKO1) y Grupo 2 (TKO2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ( $n \geq 4$ )

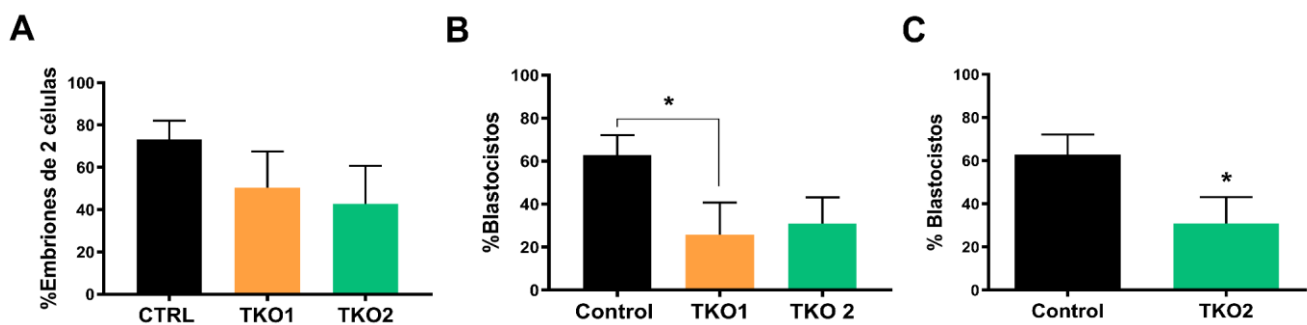
Dado que la presencia de epididimitis puede afectar severamente la viabilidad de los espermatozoides y, en consecuencia, la fertilidad, y considerando que al realizar nuestro estudio inicial de fertilidad en los machos TKO no contábamos con el conocimiento previo de la presencia de epididimitis en algunos animales, decidimos realizar un nuevo análisis de los datos teniendo en cuenta la ausencia o presencia de epididimitis de los machos de los grupos TKO1 y TKO2, respectivamente. Sorprendentemente, si bien los machos de ambos grupos mostraron una bajada significativa en su fertilidad respecto a los controles, no se observaron diferencias significativas en la fertilidad entre los grupos de animales mutantes (**Figura II.6**).



**Figura II.6. Estudio de fertilidad de machos TKO con y sin epididimitis.** Fertilidad expresada como promedio de la cantidad de crías nacidas por camada, donde cada macho fue evaluado al menos dos veces, discriminando a los machos TKO normales (TKO1) y a los machos con epididimitis (TKO2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . (n $\geq$ 5).

Continuando con la caracterización del fenotipo reproductivo de los machos TKO, decidimos evaluar la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides mutantes. Para ello, machos control o TKO fueron puestos en apareo con hembras prepúberes estimuladas hormonalmente durante una noche (18 horas). Finalizado ese periodo, los ovocitos fueron recuperados de las *ampullas* e incubados *in vitro* durante 24 horas para evaluar el porcentaje de ovocitos fertilizados que lograban alcanzar el estadio de dos células al ser incubados *in vitro*. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los porcentajes obtenidos para los machos TKO1 y TKO2 respecto a los controles (**Figura III.7.A**), indicando que la disminución en la fertilidad observada en los machos TKO sería debida, principalmente, a defectos posteriores a la fertilización. El siguiente paso consistió, entonces, en investigar la capacidad de los embriones de dos células correspondientes a los animales mutantes y control de

continuar el desarrollo embrionario hasta alcanzar la etapa de blastocisto luego de ser incubados *in vitro* durante tres días adicionales. Los resultados mostraron que los embriones provenientes de apareos con machos TKO1 presentaron una reducción significativa respecto a los controles en su capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto (**Figura III.7.B**), no observada para los animales TKO2 al realizar el análisis de varianza entre este grupo y el grupo control, y sólo detectada ( $p < 0,05$ ) al hacer un análisis t-test entre estos dos grupos (**Figura II.7.C**).



**Figura II.7. Análisis de fertilización *in vivo* correspondiente a animales TKO con y sin epididimitis.** Los ratones machos TKO o mutantes sin (TKO1) y con (TKO2) epididimitis fueron puestos en apareo con hembras controles superovuladas durante una noche, al cabo de lo cual los ovocitos fueron recuperados de las *ampullas* e incubados bajo diferentes condiciones *in vitro*. **A.** Porcentaje de ovocitos recuperados para los grupos control, TKO1 y TKO2 que alcanzaron el estadio de dos células luego de una incubación *in vitro* por 24 horas. **B.** Porcentaje de ovocitos de dos células recuperados en **A** para cada grupo que alcanzaron el estadio de blastocisto luego de una incubación *in vitro* por 3 días, analizados por test de varianza. **C.** Porcentajes de ovocitos de dos células recuperados en **A** para los grupos TKO2 y control que alcanzaron el estadio de blastocisto luego de una incubación *in vitro* por 3 días, analizado por t-test. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . ( $n \geq 4$ ).

Tal como fuera mencionado, a diferencia de los machos de la colonia DKO 1/3 cuya subfertilidad mostró ser debida exclusivamente a defectos en el desarrollo embrionario, los animales de la colonia DKO 1/4 resultaron subfértiles solo por defectos en la fertilización *in vivo*, razón por la cual el desarrollo embrionario temprano no había sido estudiado en esta última colonia (Carvajal *et al.*, 2018). En base a ello, decidimos analizar si los defectos en el desarrollo embrionario temprano observados en la colonia TKO estaban específicamente

vinculados a mutaciones en los genes *Crisp1* y *Crisp3* o si la ausencia conjunta de las proteínas CRISP1 y CRISP4 también podría estar contribuyendo a dicho fenotipo. Para tal fin, se analizó la capacidad de desarrollo a blastocisto de ovocitos fertilizados *in vivo* por espermatozoides control o DKO de ambas colonias progenitoras (DKO 1/4 y DKO 1/3 como control). Para ello, machos de ambas colonias fueron puestos en apareo con hembras superovuladas, los ovocitos recuperados de la *ampulla* al día siguiente e incubados *in vitro* por 24 horas hasta alcanzar el estadio de dos células y, finalmente, incubados durante 3 días adicionales para analizar el porcentaje de progresión a blastocisto. Los resultados revelaron que mientras que los embriones de dos células del grupo DKO 1/3 mostraron nuevamente una disminución significativa en el porcentaje que alcanzaba el estadio de blastocisto, los embriones correspondientes a los ratones DKO 1/4 no mostraron diferencias en el porcentaje de blastocistos respecto a los controles (**Tabla II.1**), apoyando la idea de que los defectos en el desarrollo embrionario temprano observados en la colonia TKO serían causados específicamente por la mutación simultánea de los genes *Crisp1* y *Crisp3*.

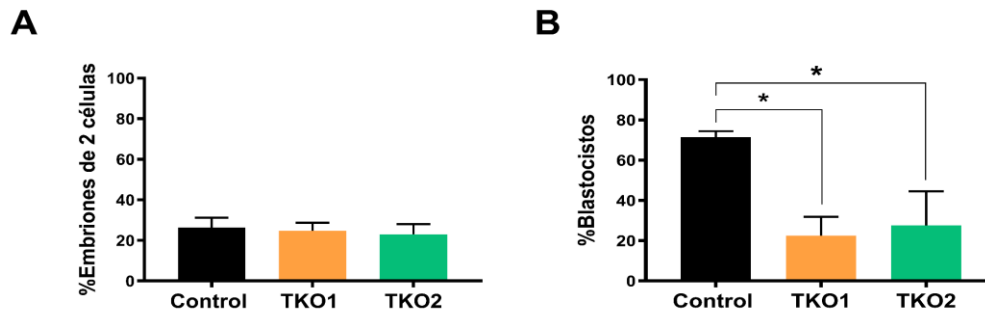
*Tabla II.1. Análisis del desarrollo embrionario temprano correspondiente a los machos DKO 1/3 y DKO 1/4*

	Control	DKO 1/3	Control	DKO 1/4
<b>Embriones de dos células (N°)</b>	53	53	80	76
<b>Blastocistos (N°)</b>	38	23	52	46
<b>Desarrollo embrionario (%)</b>	75,2 ± 8,3%	37,4 ± 10,7% **	67,7 ± 12,1%	66,9 ± 13,4%

*Número total de embriones de dos células y blastocistos obtenidos a partir de fertilizaciones in vivo de hembras control y machos mutantes (DKO 1/3 o DKO 1/4) y controles de cada colonia. Además, se calculó el porcentaje de ovocitos fertilizados in vivo que completaron su desarrollo a blastocisto luego de 3 días de cultivo in vitro. Los resultados se expresan como porcentaje de blastocistos sobre el total de embriones de dos células de la sumatoria de al menos 5 experimentos independientes. \*\*p<0,01.*

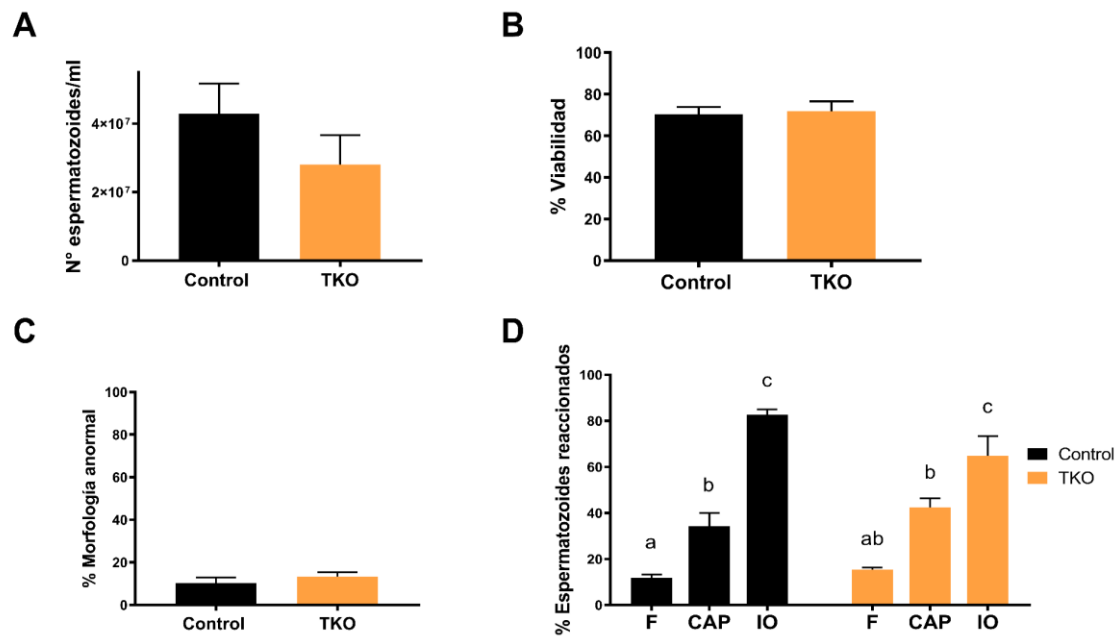
Teniendo en cuenta la similitud de los defectos en desarrollo embrionario causados por los espermatozoides de las colonias TKO y DKO 1/3, decidimos analizar el fluido uterino proveniente de hembras apareadas por machos TKO para determinar si, al igual que lo descrito para los DKO 1/3 (Curci *et al.*, 2020), dichos fluidos presentaban un aumento en la viscosidad y agregados de espermatozoides. Para ello, los machos TKO o controles fueron puestos en apareo con hembras prepúberes estimuladas hormonalmente hasta la aparición del tapón vaginal, luego de lo cual se esperó 4 horas para recuperar los fluidos uterinos sin diluir y analizarlos por microscopía. Al igual que lo observado para los DKO 1/3, los fluidos recuperados luego del apareo con machos TKO resultaron más viscosos y conteniendo espermatozoides mayormente inmóviles y atrapados en agregados (**ver videos representativos: Anexo [Vídeo 1](#), [Vídeo 2](#) y [Vídeo 3](#)**). Cabe aclarar que no ha sido posible realizar un análisis de la viabilidad de los espermatozoides agregados dado que la viscosidad del medio no permite la penetración de los colorantes.

Dado que estudios previos han demostrado que una fertilización tardía puede comprometer el desarrollo embrionario, generando embriones anómalos y de corta viabilidad como consecuencia de una disminución en la calidad ovocitaria (Takahashi *et al.*, 2013), el fenotipo de motilidad reducida en el fluido uterino nos llevó a preguntarnos si el defecto en el desarrollo embrionario temprano correspondiente a la colonia TKO podría deberse a un problema de transporte de los espermatozoides dentro del tracto femenino que retrasara su llegada a la *ampulla*, afectando así la calidad del embrión. Para estudiar esta posibilidad, realizamos ensayos de fertilización *in vivo*, como los previamente mencionados, pero recuperando los ovocitos de la *ampulla* sólo 4 horas luego de la confirmación del apareo por detección de tapón vaginal. Dichos ovocitos fueron incubados durante 24 horas *in vitro*, determinándose el porcentaje que alcanzó el estadio de dos células. Los resultados de este estudio mostraron porcentajes de embriones en dos células menores que los obtenidos luego de un ensayo *in vivo* convencional de 18 horas, tanto para los machos mutantes como controles, debido al acotado tiempo de transporte por el tracto e interacción con los ovocitos en la *ampulla*, pero sin diferencias entre los genotipos (**Figura II.8.A**). Sin embargo, al analizar la capacidad de estos embriones de dos células fertilizados a tiempos cortos de continuar su desarrollo, nuevamente encontramos porcentajes de blastocistos significativamente menores para los animales TKO que para los controles (**Figura II.8.B**).



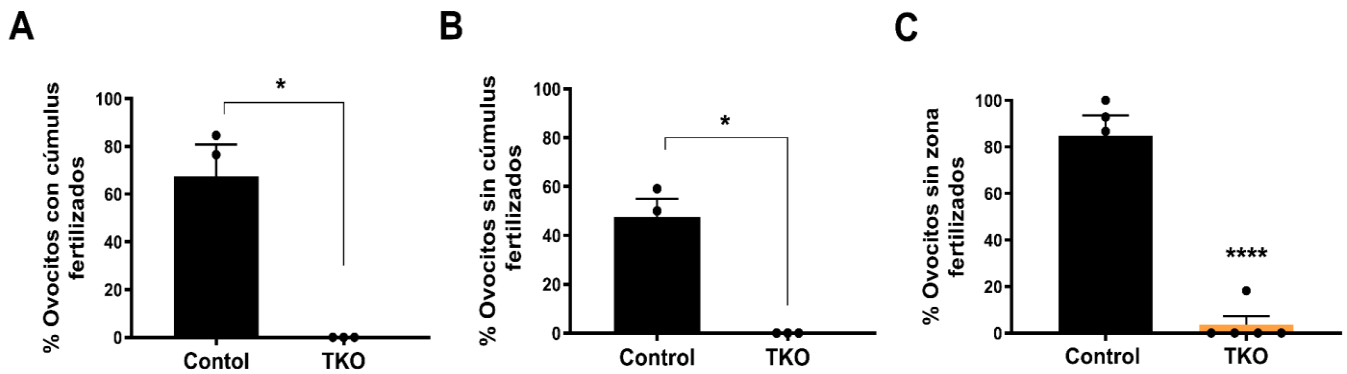
**Figura II.8. Estudio de la fertilización *in vivo* a tiempos cortos y posterior desarrollo embrionario temprano *in vitro*.** Machos control o mutantes sin (TKO1) y con (TKO2) epididimitis fueron puestos en apareo con hembras prepúberes superovuladas y los ovocitos recuperados de la *ampulla* 4 horas después de la confirmación del apareo. **A.** Porcentaje de ovocitos recuperados que alcanzaron el estadio de dos células luego de ser incubados 24 horas *in vitro*. **B.** Porcentaje de blastocistos obtenidos luego de la incubación por 3 días *in vitro* de los embriones de dos células obtenidos en **A**. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ ; \* $p < 0,05$ .

En base a estos resultados, decidimos enfocarnos en investigar los mecanismos que conducían a los defectos de fertilidad observados en aquellos animales que exhibían órganos reproductivos normales y espermatozoides viables, razón por la cual los ensayos *in vitro* que se muestran a continuación fueron realizados utilizando exclusivamente espermatozoides obtenidos de epidídimos sanos. Una vez obtenidos los espermatozoides epididimarios, el siguiente paso consistió en evaluar diversos parámetros relevantes para la capacidad fertilizante de un espermatozoide, observando que los espermatozoides mutantes no exhibían diferencias significativas respecto a los controles en el número (**Figura II.9.A**), viabilidad (**Figura II.9.B**) y porcentaje de malformaciones (**Figura II.9.C**), como así tampoco en su capacidad de sufrir la reacción acrosomal ya sea espontánea (CAP) o inducida con ionóforo de calcio (IO) (**Figura II.9.D**).



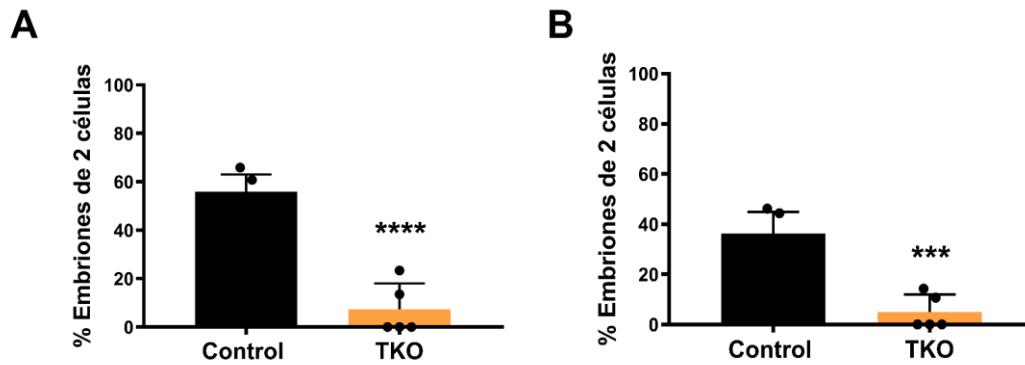
**Figura II.9. Análisis de distintos parámetros de espermatozoides epididimarios.** **A.** Número de espermatozoides de *cauda* por mililitro contado con cámara de Neubauer una vez finalizado el proceso de obtención denominado *swim out*, n=5. **B.** Viabilidad de espermatozoides frescos recuperados del *cauda*, determinada mediante tinción con eosina y observación bajo microscopio óptico (x400), n=6. **C.** Proporción de espermatozoides frescos recuperados del *cauda* con anomalías en la cabeza determinado por observación bajo microscopio óptico (x400), n=3. **D.** Porcentaje de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosomal analizado por tinción con Coomassie Blue en espermatozoides frescos (F), capacitados (CAP), o expuestos durante 15 minutos a 10 $\mu$ M ionóforo de calcio A23187 (IO), n=4. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Grupos que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre sí con un  $p^* < 0.05$ .

Con el fin de analizar la capacidad fertilizante de los espermatozoides TKO, ovocitos de hembras control, ya sea con células del cúmulus y ZP, sólo con ZP o sin cúmulus ni ZP (completamente desnudos) fueron incubados *in vitro* con espermatozoides TKO o control, evaluando el porcentaje de fertilización por determinación de la presencia de DNA paterno dentro del ovocito a través de la tinción con Hoechst. Los resultados obtenidos mostraron bajadas significativas en los porcentajes de fertilización para los espermatozoides TKO respecto a los controles en las tres condiciones evaluadas (**Figura II.10.A-C**).



**Figura II.10. Estudio de la capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides TKO analizado por tinción de ADN.** Espermatozoides del *cauda* epididimario de animales TKO o control capacitados *in vitro* fueron co-incubados con complejos cúmulus ovocitos (A), con ovocitos sin cúmulus (B) o con ovocitos desnudos de ambas envolturas (C). La fertilización se evaluó como la presencia de ADN paterno en el citoplasma del ovocito (cabeza decondensada o pronúcleos) mediante tinción con Hoechst al momento de finalización de la co-incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ( $n \geq 3$ ).

Habiendo detectado defectos en la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides TKO, nos preguntamos si bajo estas condiciones también era posible observar la bajada en el desarrollo embrionario observado para los ovocitos fertilizados *in vivo*. Para ello, llevamos a cabo ensayos de fertilización *in vitro* incubando tanto COC como ovocitos sin cúmulus con espermatozoides epididimarios mutantes o control, dejando que los ovocitos fertilizados alcancen el estadio de embriones de dos células para luego analizar su capacidad de llegar a blastocisto. Sin embargo, tal como se había visto en los estudios de fertilización *in vitro* analizados por tinción con Hoechst, (Figura II.10), el número de ovocitos en dos células obtenido fue bajo (17 para COC y 7 para ovocitos sin cúmulus, Figura II.11.A-B), permitiendo que el ensayo de desarrollo hasta blastocisto pudiera llevarse a cabo solo con los embriones de dos células obtenidos a partir de los COC (Tabla II.2). Los resultados mostraron una disminución en el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, indicando que los defectos que llevan a problemas en el desarrollo embrionario temprano de la colonia TKO estarían siendo acarreados por los espermatozoides y no dependerían del entorno del tracto femenino.



**Figura II.11. Estudio de la capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides TKO analizado por desarrollo a embriones de dos células.** Espermatozoides de *cauda* epididimario TKO o control capacitados *in vitro* fueron co-incubados con complejos cúmulus ovocitos (A) o sin cúmulus (B). La fertilización se evaluó como la progresión de ovocitos fertilizados a embriones de dos células luego de 24 horas de incubación *in vitro*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ( $n \geq 5$ ).

*Tabla II.2. Desarrollo de complejos cúmulus-ovocitos fertilizados in vitro*

	Control	TKO
Embriones de dos células (N°)	111	17
Blastocistos (N°)	76	3
Desarrollo embrionario (%)	68,5%	17,7%****

*Porcentaje de embriones que llegan al estadio de blastocisto luego de 3 días de cultivo in vitro. Los resultados se expresan como porcentaje de blastocistos sobre el total de la sumatoria de al menos 2 experimentos independientes. Test de Fisher. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  vs. Control.*

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo indican que la ausencia de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 conduce a una subfertilidad en los machos asociada, principalmente, a defectos en el desarrollo embrionario temprano tal como se observara para la colonia DKO 1/3. Asimismo, el hecho de que esta colonia no alcance la infertilidad observada en la colonia TKO 1/2/3 indica que no bastaría la delección de tres proteínas CRISP para alcanzar la infertilidad, sino que la misma dependería de cuáles sean las proteínas delecionadas.

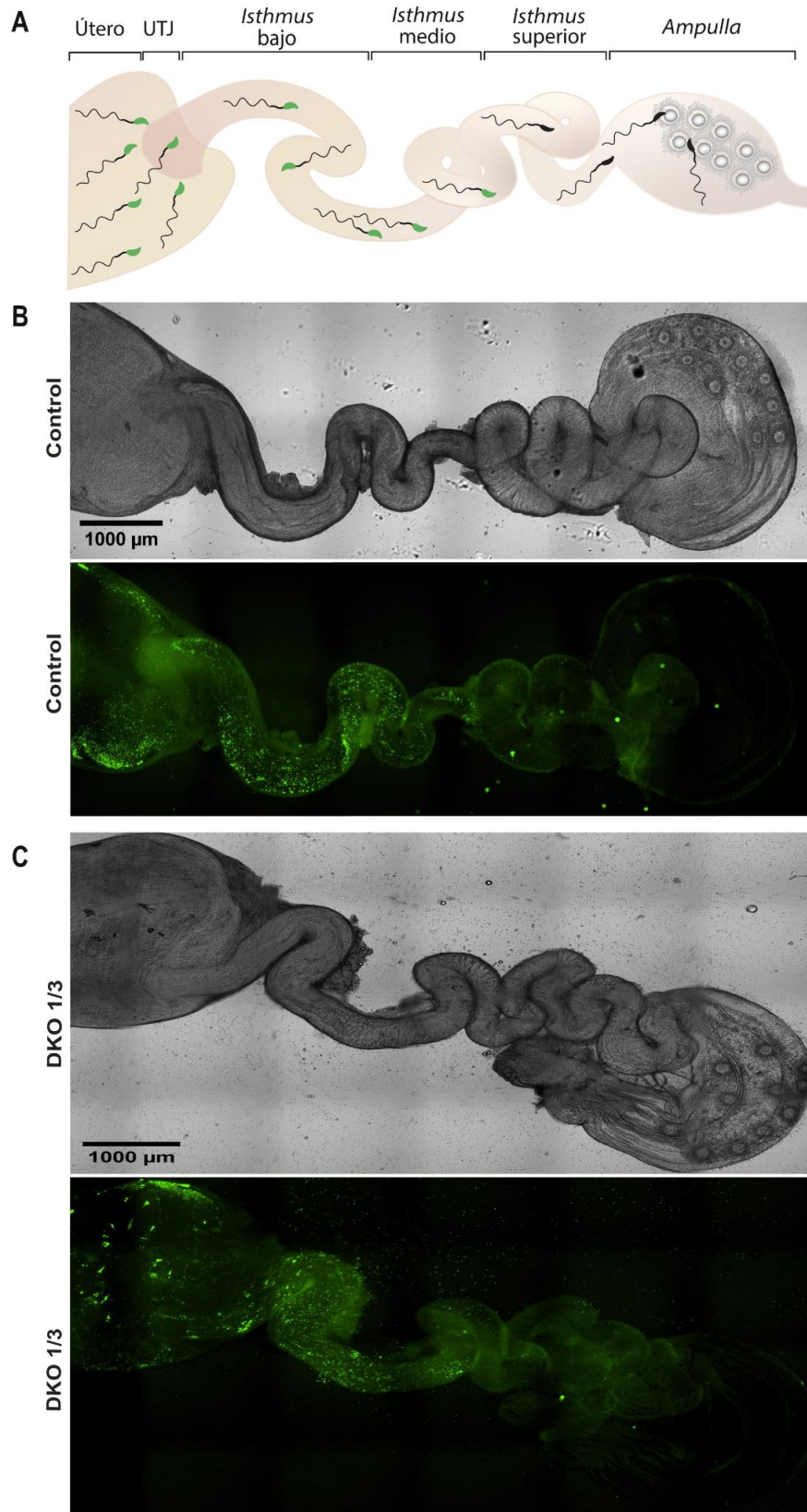
### Capítulo III

#### Estudio de la contribución de las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP3 al desarrollo embrionario

Como ya fuera mencionado, recientemente hemos generado la colonia doble KO para las proteínas CRISP1 y CRISP3 (DKO 1/3), la cual presentó una bajada significativa en la fertilidad de los machos causada exclusivamente por defectos en el desarrollo embrionario temprano indicando, por primera vez, la participación de las proteínas CRISP en eventos posteriores a la fertilización (Curci *et al.*, 2020). En base a ello, el tercer objetivo de esta tesis consistió en investigar los mecanismos moleculares que conducen a las fallas en desarrollo embrionario temprano por ausencia de las proteínas CRISP1 y CRISP3. Si bien los defectos en desarrollo embrionario también fueron observados en las colonias TKO 1/2/3, TKO 1/3/4 y CKO estos estudios fueron realizados utilizando los animales DKO para las proteínas CRISP1 y CRISP3 los cuales exhiben solo defectos en desarrollo embrionario temprano sin involucrar los defectos adicionales en el proceso de fertilización que presentan el resto de los modelos mencionados.

Nuestros estudios previos habían mostrado que los espermatozoides de los animales DKO 1/3 eran capaces de fertilizar *in vivo* pero que los embriones formados fallaban en completar su desarrollo. Dado que se ha reportado que una fertilización *in vivo* tardía puede afectar el desarrollo embrionario (Brackett *et al.*, 1978; Lacham-Kaplan & Trounson, 1991; 1994; Orgebin-Crist, 1968; Orgebin-Crist y Jahad, 1977), y considerando la presencia de agregados de espermatozoides inmóviles en el útero de hembras apareadas con machos DKO 1/3 (Curci *et al.*, 2020), iniciamos nuestros estudios evaluando si el defecto en el desarrollo embrionario temprano observado en esta colonia podría estar relacionado con un transporte espermático deficiente en el tracto reproductor femenino que resultara en una llegada tardía de los espermatozoides al sitio de fertilización. Con este objetivo, decidimos analizar la capacidad de los espermatozoides DKO 1/3 de atravesar la unión útero-tubárica (UTJ) y migrar desde el isthmus a la *ampulla*. Para ello, utilizamos machos DKO 1/3 o control que fueran además transgénicos para el gen de EGFP (proteína fluorescente verde) fusionado al péptido señal de pro-acrosina bajo el control del promotor de actina, razón por la cual los

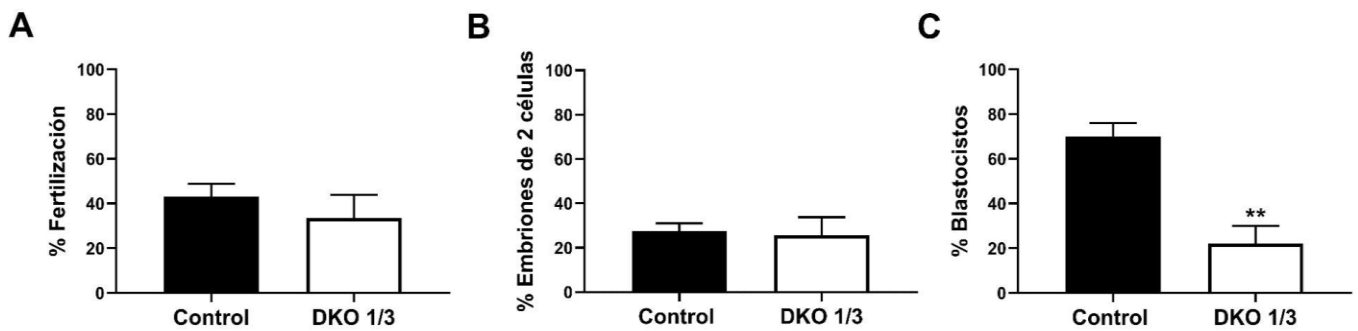
espermatozoides intactos pueden visualizarse bajo microscopio de epifluorescencia (**Figura III.1.A**). Sabiendo que después de la formación del tapón vaginal, la mayoría de los ovocitos son fertilizados entre las primeras 2 a 8 horas, con tasas de fertilización que aumentan con el tiempo (0-5% a las 1,5 horas post apareo; 40% a las 4 horas post apareo y más del 90%, a las 7 horas después del apareo) (Muro *et al.*, 2016; La Spina *et al.*, 2016), decidimos examinar la migración espermática dentro del oviducto solo 4 horas después de la observación del tapón vaginal. La premisa de este estudio consistió en que si los espermatozoides mutantes presentaran un retraso en su transporte no detectable a tiempos largos post apareo por haber tenido el tiempo suficiente para llegar a la ampulla, una evaluación a tiempos cortos permitirá detectar aquellos espermatozoides retrasados que aún no han llegado a la ampulla. Los resultados indicaron que tanto los espermatozoides mutantes como los controles no presentaron dificultades ni para pasar la UTJ ni para migrar dentro del oviducto, como lo demuestra la presencia de espermatozoides fluorescentes tanto en el *isthmus* inferior como en el *isthmus* medio (**Figura III.1.B, C**). La razón por la cual se observan muy pocos espermatozoides fluorescentes más allá del *isthmus* medio (**Figura III.1.B, C**) se debe a la pérdida reportada del capuchón acrosomal *in vivo* de los espermatozoides en dicha región (La Spina *et al.*, 2016; Muro *et al.*, 2016).



**Figura III.1. Estudio de la migración espermática a través del tracto reproductor femenino.**  
**A.** Diagrama representativo de los espermatozoides en las diferentes regiones del tracto femenino. En las regiones más cercanas al útero, los espermatozoides se encuentran intactos (cabezas verdes), y, a medida que avanzan hacia la *ampulla* y se capacitan, pierden el

capuchón acrosomal (cabezas negras). UTJ, unión útero-tubárica. Hembras prepúberes superovuladas fueron apareadas por machos control o DKO 1/3, ambos portantes del transgén EGPF en la región acrosomal, y, 4 horas después de la confirmación del apareo por presencia de tapón vaginal, se analizaron los espermatozoides dentro del tracto mediante microscopía de fluorescencia. **B.** Imágenes de campo claro (panel superior) y fluorescencia (panel inferior) del tracto reproductor de una hembra apareada con un macho control (x40). **C.** Imágenes de campo claro (panel superior) y fluorescencia (panel inferior) del tracto reproductor de una hembra apareada con un macho C1/C3 DKO (x40). Las figuras son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

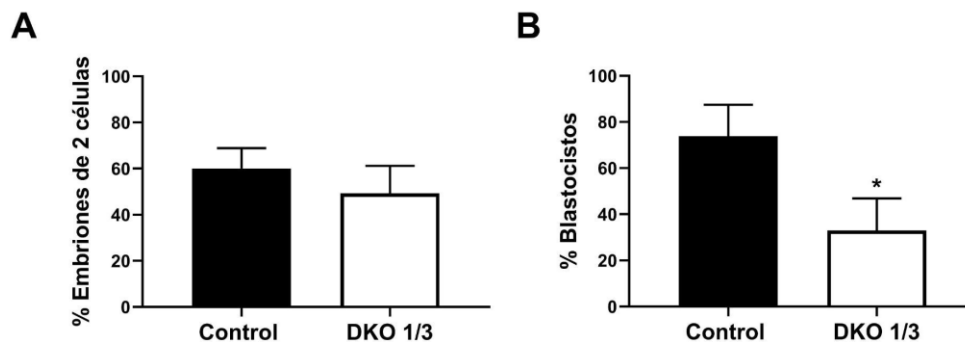
Como segunda estrategia para evaluar una posible llegada tardía de los espermatozoides al sitio de fertilización, decidimos analizar el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la ampulla solo 4 horas post apareo. Si bien, y como era de esperar, los porcentajes de fertilización fueron menores que aquellos obtenidos al recuperar los ovocitos de la *ampulla* al día siguiente del apareo (18 horas post detección de tapón vaginal) (Curci *et al.*, 2020), no mostraron diferencias significativas entre los grupos al ser evaluado tanto por tinción del ADN paterno dentro del citoplasma del ovocito (**Figura III.2.A**) como por el porcentaje de ovocitos recuperados de la *ampulla* que desarrollaron a embriones de dos células al cabo de una incubación de 24 horas *in vitro* (**Figura III.2.B**). A pesar de no observarse diferencias en los porcentajes de fertilización, los ovocitos fertilizados *in vivo* correspondientes al grupo mutante mostraron claros defectos para alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro* en comparación con los controles (**Figura III.2.C**), indicando que no sería un retraso en la llegada de los espermatozoides a la *ampulla* el responsable de la bajada en el desarrollo embrionario de la colonia DKO 1/3.



**Figura III.2. Estudio de la fertilización *in vivo* a tiempos cortos y posterior desarrollo embrionario temprano.** Machos DKO 1/3 y control fueron puestos en apareo con hembras prepúberes superovuladas y el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla* 4 horas después de la confirmación del apareo fue evaluado por **A.** la presencia de ADN paterno en el citoplasma del ovocito mediante tinción con Hoechst o **B.** la capacidad de alcanzar el estadio de embrión de dos células *in vitro* luego de 24 horas. **C.** Los embriones de dos células obtenidos en **B** se incubaron *in vitro* durante 3 días adicionales determinándose el porcentaje que alcanzó el estadio de blastocisto. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$ . ( $n > 4$ ).

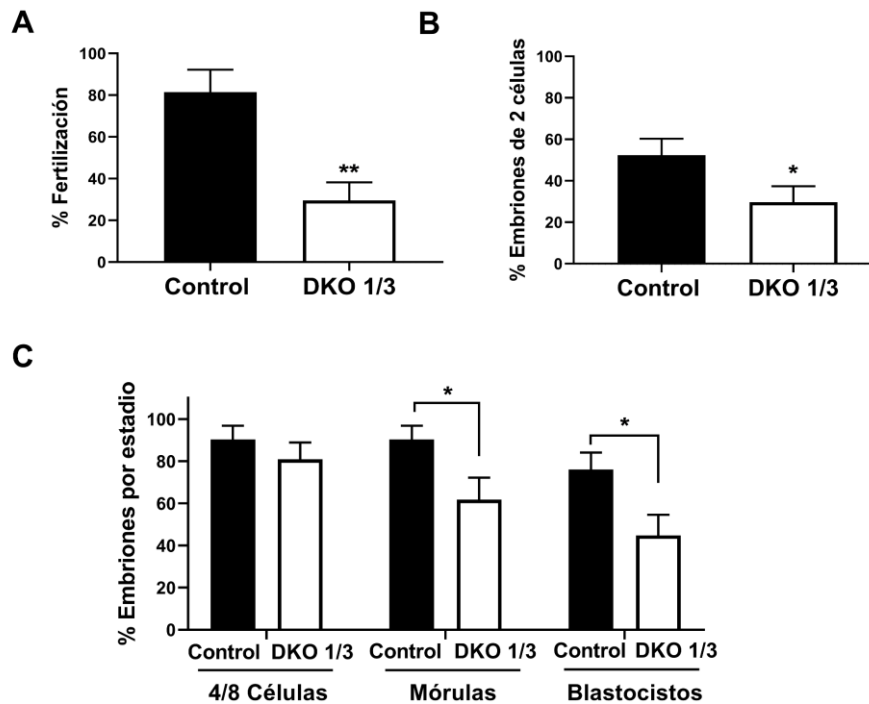
En todos los casos en los que se observaron defectos en el desarrollo embrionario con la colonia DKO 1/3, los embriones habían sido obtenidos mediante apareo natural, indicando que los espermatozoides eran eyaculados y habían estado en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias. Dado que CRISP1 y CRISP3 han sido identificadas en el plasma seminal (Bu et al., 2024; Légaré et al., 2013; 2010; Udby et al., 2015), decidimos investigar si las alteraciones espermáticas responsables del desarrollo embrionario defectuoso de la colonia DKO 1/3 estaban asociadas a la incorporación de las secreciones de las glándulas accesorias durante la eyaculación o si se originaban durante el tránsito epididimario. Para ello, espermatozoides de *cauda* epididimario fueron inseminados directamente dentro de los cuernos uterinos de una hembra superovulada, analizándose el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*. Los resultados mostraron que, aunque no se observaron diferencias en el porcentaje de embriones de dos células obtenidos con espermatozoides DKO 1/3 o control (**Figura III.3.A**), el porcentaje de embriones de dos células que progresaron a blastocistos fue nuevamente menor para los embriones generados por espermatozoides mutantes (**Figura III.3.B**), revelando que los defectos espermáticos que

contribuyen a las deficiencias en el desarrollo embrionario en la colonia DKO 1/3 ya estarían presentes en los espermatozoides epididimarios.



**Figura III.3. Estudio de la fertilización *in vivo* con espermatozoides epididimarios y posterior desarrollo embrionario.** **A.** Porcentaje de embriones de dos células obtenidos 24 horas después de incubación *in vitro* de ovocitos recuperados de ampullas de hembras inseminadas en sus cuernos uterinos con espermatozoides epididimarios DKO 1/3 o control. **B.** Porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de la incubación *in vitro* por 3 días de los embriones de dos células obtenidos en A. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; n=5; \*p<0,05.

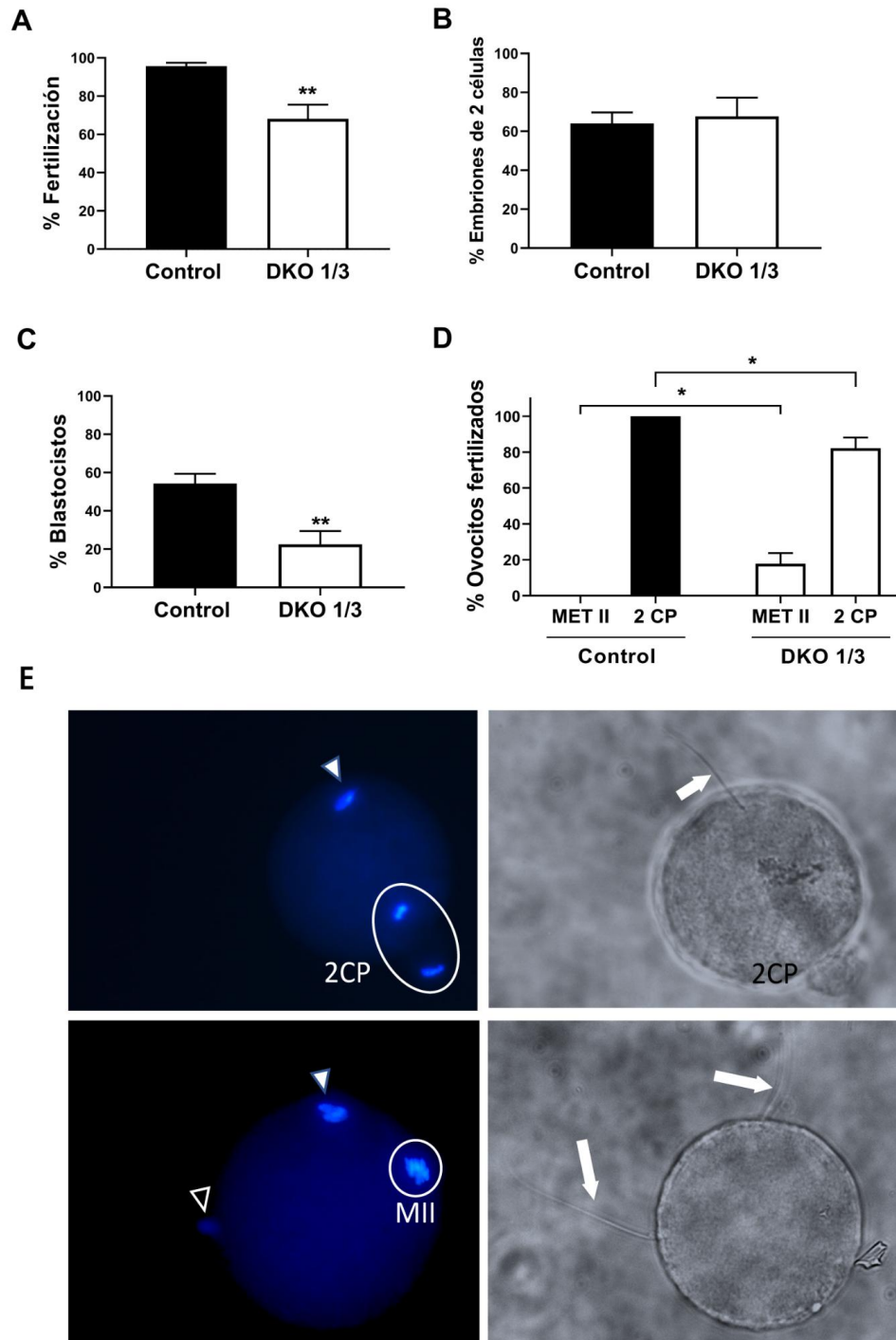
Con el fin de analizar la capacidad fertilizante de los espermatozoides epididimarios DKO 1/3, realizamos una serie de estudios de fertilización *in vitro* utilizando espermatozoides de cauda epididimario y ovocitos rodeados o no de sus envolturas. Los resultados utilizando COC mostraron porcentajes significativamente más bajos de ovocitos fertilizados cuando los mismos fueron analizados tanto por tinción con Hoechst (**Figura III.4.A**) como por su capacidad de progresar a embriones de dos células (**Figura III.4.B**). Cabe destacar que, además de estos defectos en la fertilización, cuando se permitió que los embriones de dos células continuaran su incubación *in vitro* evaluándose su desarrollo durante 3 días consecutivos, el grupo mutante mostró una disminución significativa en el porcentaje de embriones que alcanzaron las etapas de mórula y blastocisto (**Figura III.4.C**), confirmando que los defectos que conducen a la bajada en el desarrollo embrionario ya estarían presentes en los espermatozoides epididimarios.



**Figura III.4. Fertilización *in vitro* de complejos cúmulus-ovocitos y posterior desarrollo embrionario.** Espermatozoides del *cauda* epididimario DKO 1/3 o control capacitados *in vitro* fueron co-incubados con COC, evaluándose la fertilización como **A**, la presencia de ADN paterno en el citoplasma del ovocito (cabeza decondensada o pronúcleos) mediante tinción con Hoechst en el momento de finalización de la co-incubación (n=3), o **B**, el porcentaje de ovocitos fertilizados que alcanzó el estadio de embriones de dos células luego de una incubación *in vitro* por 24 horas (n=7). **C**. Los embriones de dos células obtenidos en **B** se incubaron durante 3 días *in vitro*, determinándose el porcentaje que alcanzaba los estadios de 4/8 células (día 1), mórula (día 2) o blastocisto (día 3) (n=7). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

La bajada en el porcentaje de fertilización *in vitro* observada nos llevó a plantear que la misma fuera debida a una dificultad de los espermatozoides de penetrar las envolturas que rodean al ovocito, llevando a un retraso en la fertilización y, por ende, a los defectos en el desarrollo embrionario. Con el fin de investigar esta posibilidad, se realizaron ensayos de fertilización *in vitro* utilizando ovocitos despojados tanto de las células del cúmulus como de la ZP. Bajo estas condiciones, observamos nuevamente una bajada significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados por espermatozoides DKO 1/3 al ser evaluados por tinción de ADN inmediatamente luego de finalizada la hora de co-incubación (**Figura III.5.A**). Si bien

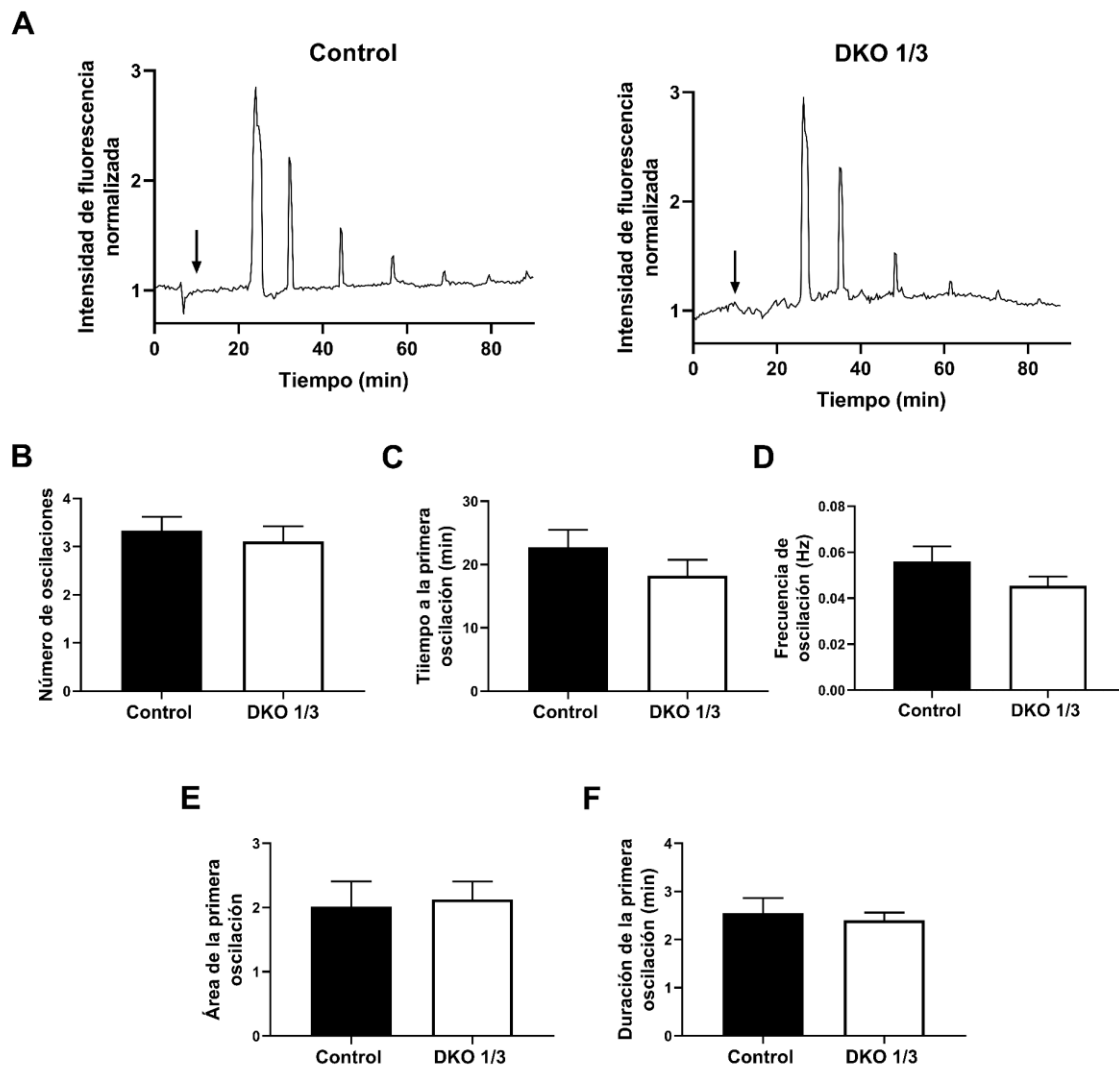
los ovocitos fertilizados no presentaron problemas para llegar al estadio de dos células (**Figura III.5.B**), se observó nuevamente una bajada significativa en el porcentaje de ovocitos de dos células que alcanzaron el estadio de blastocisto (**Figuras III.5.C**). Estos resultados, sumado a los reportes que indican la importancia en la cinética del desarrollo para el éxito en la formación del embrión (Basile *et al.*, 2015, Esbert *et al.*, 2018; Meseguer *et al.*, 2011; Fujiwara *et al.*, 2025) nos llevaron a preguntarnos si estos defectos aparecían inmediatamente luego de la fertilización, pero previamente a la formación del embrión de dos células. Para estudiar este posible retraso en etapas tempranas de formación del cigoto, se volvieron a analizar los ovocitos fertilizados en los ensayos de fertilización *in vitro* con ovocitos desnudos (**Figura III.5.A**) pero esta vez enfocando el análisis en el estado del ADN materno de los ovocitos fertilizados. Los resultados mostraron que mientras todos los ovocitos con cabezas decondensadas del grupo control ya habían extrudado el segundo corpúsculo polar (2CP), en 4 de 6 experimentos, una proporción de ovocitos con cabezas decondensadas correspondientes al grupo mutante todavía estaba en Metafase II (Met II) (**Figura III.5.D, E**). Estas observaciones revelaron defectos en eventos tempranos posteriores a la fertilización como posibles responsables del fenotipo observado en la colonia mutante.



**Figura III.5. Fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario de ovocitos denudados.** Espermatozoides epididimarios capacitados *in vitro* DKO 1/3 o control se co-incubaron con ovocitos sin ZP durante 1 hora. La fertilización se evaluó como **A**, la presencia de ADN paterno en el citoplasma del ovocito (cabeza decondensada) mediante tinción con Hoechst en el momento de finalización de la co-incubación (n=5), o **B**, la capacidad de los ovocitos fertilizados de alcanzar el estadio de embrión de dos células luego 24 horas de incubación *in vitro* (n=5). **C**, Los embriones en dos células obtenidos en **B** se incubaron durante 3 días *in vitro*, determinándose el porcentaje de los mismos que alcanzó el estadio de blastocisto (n=5).

**D.** Los ovocitos fertilizados en **A.** se analizaron para determinar el estado del ADN materno y se clasificaron como detenidos en Metafase II (Met II) o con 2do corpúsculo polar (2CP). **E.** Imágenes de microscopía mostrando ovocitos fertilizados con su ADN teñido con Hoechst y ya habiendo extrudado el segundo corpúsculo polar (2CP, arriba) o arrestados en Metafase II (MII, abajo). Se muestran imágenes de fluorescencia (izquierda) donde se ve el ADN de espermatozoides (cabezas decondensadas) (puntas de flecha blancas) o espermatozoides unidos al oolema (punta de flecha sin pintar). En el campo claro (derecha) se ven los ovocitos y las colas de los espermatozoides señalados en fluorescencia (flechas blancas). Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

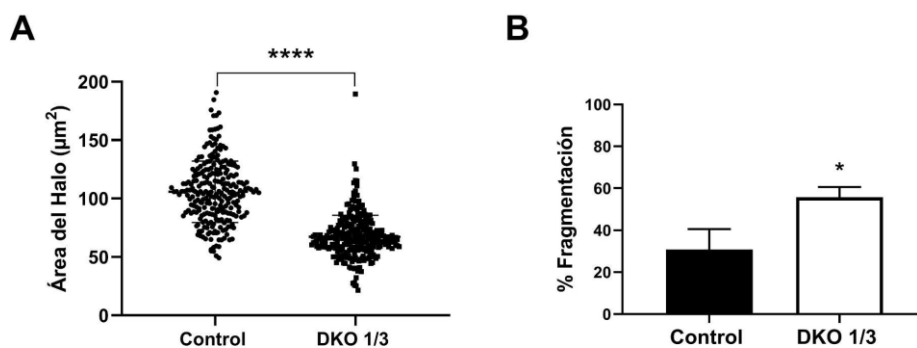
El hallazgo de que una proporción de ovocitos fertilizados por espermatozoides epididimarios mutantes *in vitro* todavía se encontrara en Metafase II sugirió la posibilidad de que estos espermatozoides estuvieran generando defectos en la activación ovocitaria, proceso que comienza inmediatamente después de la fusión de las gametas y del cual depende el reinicio de la meiosis (Vitullo & Ozil, 1992). En base a ello, decidimos estudiar la capacidad de los espermatozoides DKO 1/3 de gatillar correctamente las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  del ovocito que ocurren durante la activación. Para ello, ovocitos sin ZP fueron incubados con la sonda Fluo-4-AM y Hoechst, e inseminados *in vitro* con espermatozoides epididimarios capacitados DKO 1/3 o control, realizándose un seguimiento de la fusión de las gametas y de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en el ovocito cada 20 segundos mediante fluorescencia confocal. Los resultados no mostraron diferencias entre los dos genotipos en el patrón de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  (**Figura III.6.A**) al comparar los principales parámetros asociados a las oscilaciones tales como el número de oscilaciones dentro de los 90 minutos, el tiempo hasta la primera oscilación (relacionado al tiempo requerido para la fertilización), la frecuencia de oscilaciones, el área bajo el pico de la primera oscilación (relacionado con la cantidad de  $Ca^{2+}$  que ingresa al ooplasma) o la duración de la primera oscilación (**Figura III.6.B-F**). En conjunto, estas observaciones indicaron que la presencia de ovocitos arrestados en Metafase II correspondientes al grupo mutante no sería debida a defectos en la dinámica de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  durante la activación ovocitaria.



**Figura III.6. Oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos fertilizados *in vitro*.** **A.** Patrones representativos de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la fertilización *in vitro* de ovocitos sin ZP teñidos con Fluo-4-AM y Hoechst, y co-incubados con espermatozoides DKO 1/3 o control. Las flechas indican el momento de la inseminación. **B.** Número de oscilaciones a los 90 minutos, **C.** Tiempo hasta la primera oscilación, **D.** Frecuencia de oscilación, **E.** Área bajo la curva de la primera oscilación y **F.** Duración de la primera oscilación. Los valores fueron normalizados a los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  registrados antes de la adición de los espermatozoides. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos 9 ovocitos de 3 experimentos independientes; A-F: NS.

Considerando que los retrasos en el desarrollo embrionario temprano pueden resultar del tiempo que requiere el ovocito para reparar el ADN paterno dañado (Ebert *et al.*, 2018; Newman *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2023), decidimos analizar la existencia de posibles

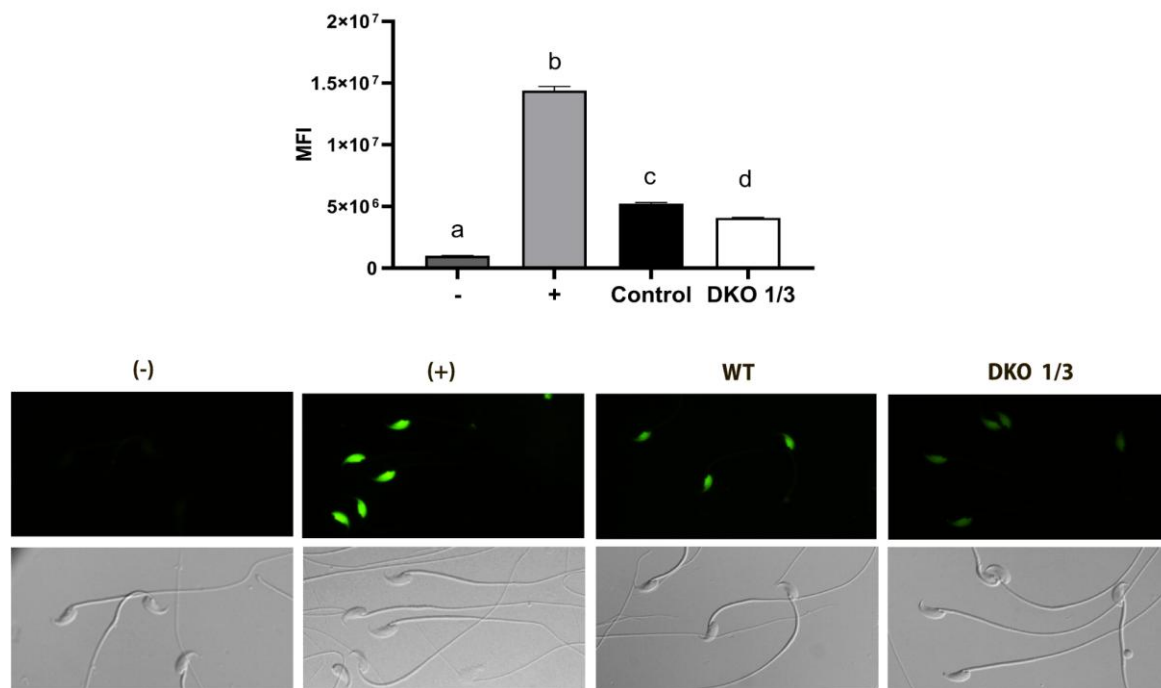
defectos en la integridad del ADN en los espermatozoides epididimarios DKO 1/3. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando el ensayo de dispersión de cromatina espermática (SCD por sus siglas en inglés) el cuál se basa en que, al lisar las membranas del espermatozoide y librarlo de las proteínas asociadas en un medio viscoso, el ADN espermático en buenas condiciones se dispersa en forma de bucles largos dando lugar a un halo alrededor de la cabeza, mientras que el ADN fragmentado genera un halo pequeño o, inclusive, no produce halo (Fernández *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio confirmaron un nivel significativamente más alto de fragmentación de ADN en espermatozoides del *cauda* DKO 1/3 en comparación con los controles, indicado tanto por la distribución de células individuales en función del área de su halo (**Figura III.7.A**) como por el porcentaje de fragmentación, definiendo como no fragmentados a los espermatozoides cuyos halos fueran al menos el doble del tamaño de la cabeza del espermatozoide (**Figura III.7.B**).



**Figura III.7. Integridad del ADN de los espermatozoides.** La fragmentación del ADN en espermatozoides del cauda epididimario DKO 1/3 o control se analizó mediante el ensayo SCD, determinándose **A.** la distribución del tamaño de los halos de ADN de las células y **B.** el porcentaje de cabezas de espermatozoides con halo pequeño o sin halo (fragmentados). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . (n=5).

A continuación, dado que se ha establecido una clara relación entre la fragmentación del ADN y el estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2003; Dizdaroglu 2012), evaluamos los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en espermatozoides del *cauda* epididimario de ambos genotipos por microscopía de fluorescencia. Sin embargo, los resultados indicaron que los

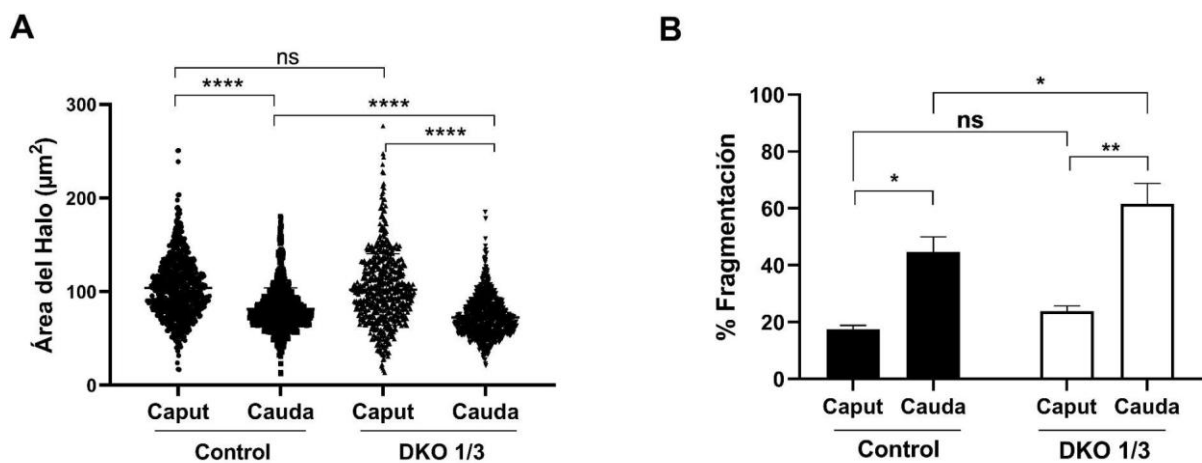
niveles de ROS en los espermatozoides mutantes fueron incluso más bajos que los observados en el grupo control (**Figura III.8**).



**Figura III.8. Estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios.** Niveles de ROS medidos como intensidad de fluorescencia media (MFI) en espermatozoides recuperados del *cauda* DKO 1/3 o control expuestos a la sonda CellROX-Green y analizados por microscopía de fluorescencia confocal. Como control negativo (-), se registró la auto-fluorescencia de los espermatozoides en ausencia de sonda y como control positivo (+), se utilizó el desacoplante mitocondrial Oligomicina como generador de grandes cantidades de ROS. Se muestran microfotografías de fluorescencia y DIC representativas de cada tratamiento. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Se midieron al menos 200 células en 4 experimentos independientes.

Dado que el aumento en la fragmentación de ADN no parecía deberse al daño oxidativo, nos preguntamos qué podría estar causando dicho daño en el ADN. En ese sentido, es sabido que el paso por el epidídimo no solo contribuye a la maduración de los espermatozoides, sino que también genera aumentos en la fragmentación del ADN en los mismos (Greco *et al.*, 2005; Suganuma *et al.*, 2005), posiblemente con el fin de descartar células no funcionales (Sakkas *et al.*, 2010). En base a ello, decidimos estudiar si había un aumento de la fragmentación del DNA durante el tránsito de los espermatozoides mutantes

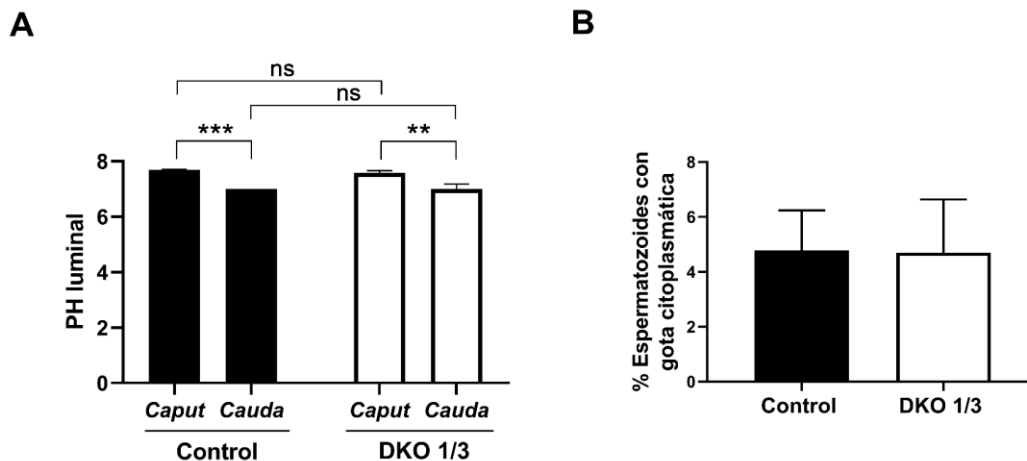
por el epidídimo. Para ello, utilizamos nuevamente el ensayo SCD pero esta vez sobre espermatozoides tanto del *caput* como del *cauda* de los animales DKO 1/3 y control. Los resultados mostraron que mientras no se observaban diferencias entre genotipos en la fragmentación del ADN de los espermatozoides del *caput* epididimario, se detectaba un aumento de fragmentación en los espermatozoides del *cauda* para ambos genotipos, siendo, una vez más, significativamente mayor la fragmentación en los espermatozoides mutantes que en los controles (**Figura III.9.A, B**).



**Figura III.9. Estudio de la fragmentación del ADN en espermatozoides de diferentes regiones del epidídimo.** Espermatozoides de *caput* y de *cauda* de animales DKO 1/3 o control fueron analizados mediante el ensayo de SCD para evaluar la fragmentación de ADN de los mismos, determinándose **A.** la distribución del tamaño de los halos de ADN de las células y **B.** el porcentaje de cabezas de espermatozoides con halo pequeño o sin halo (fragmentados). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (n=5).

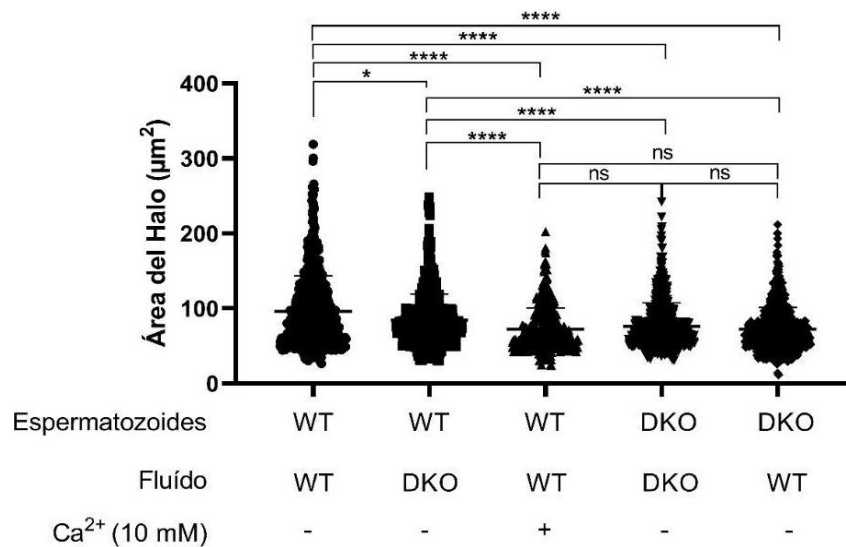
Habiendo observado que el aumento del daño en el ADN de los espermatozoides DKO 1/3 ocurre durante su tránsito por el epidídimo, lo primero que decidimos analizar fue pH del fluido luminal, ya que se conoce que su disminución a lo largo de las regiones del epidídimo es fundamental para preservar a los espermatozoides en un estado de quiescencia durante su almacenamiento en el *cauda* (Dai *et al.*, 2024; Weigel Muñoz *et al.*, 2024). Los resultados mostraron la disminución del pH luminal esperada entre el *caput* y el *cauda*, sin evidenciar diferencias entre ambos genotipos (**Figura III.10.A**). Asimismo, tampoco encontramos diferencias en la tasa de espermatozoides del *cauda* epididimario con permanencia de gota

citoplasmática, un indicador fácilmente medible de maduración de los espermatozoides (Figura III.10.B).



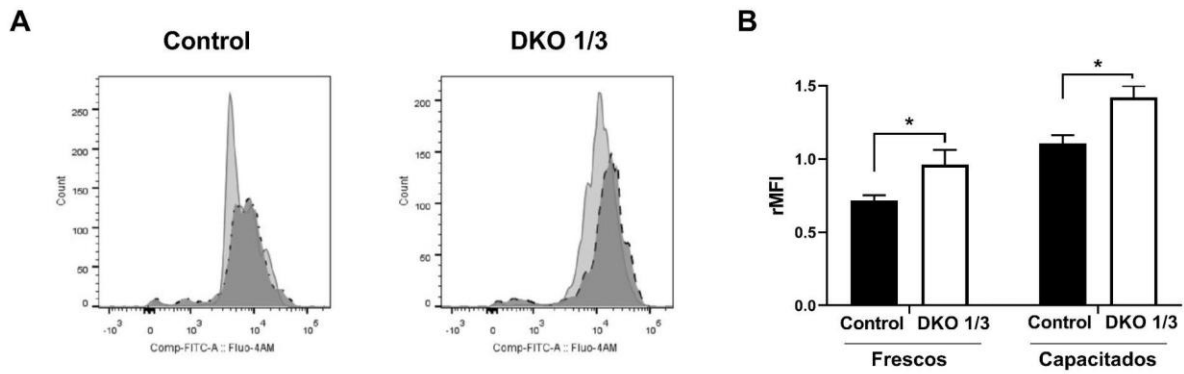
**Figura III.10. Estudio del pH epididimario y de la permanencia de la gota citoplasmática. A.** pH del fluido luminal del *caput* y *cauda* epididimarios de ratones DKO 1/3 y control. **B.** Porcentaje de espermatozoides frescos del *cauda* mostrando presencia de gota citoplasmática evaluado por microscopía. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . (n=4).

El próximo paso consistió en investigar si los defectos en la integridad del ADN observados en los espermatozoides DKO 1/3 podría originarse a partir de señales alteradas del microambiente epididimario. Para investigar dicha posibilidad, realizamos un ensayo de intercambio de fluidos epididimarios en el cual los espermatozoides fueron separados de su fluido, lavados por sucesivas centrifugaciones, incubados durante 1 hora ya sea con el fluido propio o con el fluido del genotipo contrario, y analizados por SCD. La exposición de espermatozoides tanto al fluido DKO 1/3 como a un fluido control conteniendo 10mM  $\text{Ca}^{2+}$ , produjo un aumento significativo en los niveles de fragmentación de ADN a juzgar por la disminución en el diámetro medio del halo de los espermatozoides (Figura III.11). Asimismo, la incubación de espermatozoides DKO 1/3 con fluido diluido control no fue suficiente para revertir el daño de ADN de los mismos. Cabe destacar que la media del tamaño del halo obtenido al incubar con  $\text{Ca}^{2+}$  no fue distinta que la acarreada por espermatozoides DKO 1/3.



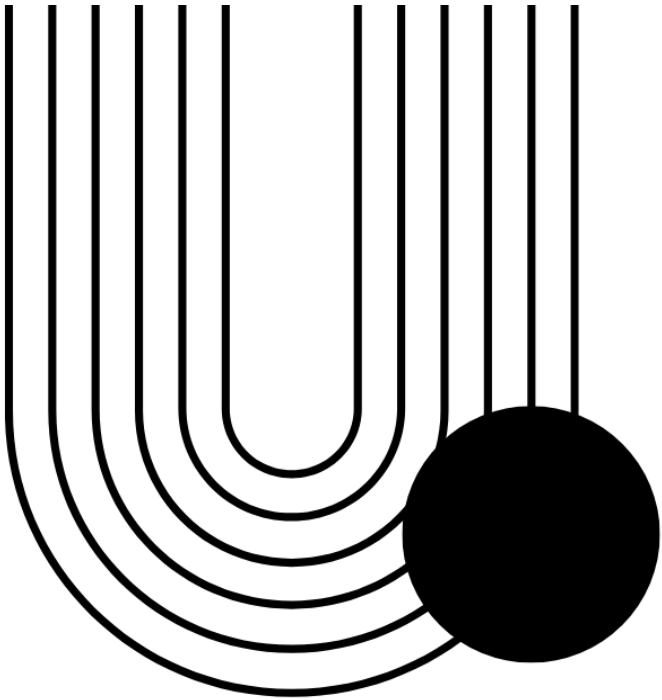
**Figura III.11. Inducción de fragmentación de ADN de espermatozoides con fluido epididimario.** Distribución del tamaño del halo de ADN generado mediante el ensayo de SCD de los espermatozoides del *cauda* DKO 1/3 o control luego de ser incubados con el fluido de *cauda* epididimario propio o del genotipo contrario. Adicionalmente, se incubó a los espermatozoides WT con 10mM de Ca<sup>2+</sup>. Los datos son media de al menos 150 espermatozoides por genotipo  $\pm$  SEM, de 4 experimentos independientes; \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Otra posible alteración asociada a fallas en la maduración epididimaria involucra la concentración de Ca<sup>2+</sup>, la cuál se sabe que disminuye drásticamente en el lumen del *cauda* epididimario para asegurar la quiescencia espermática (Ma, *et al.*, 2019; Shum *et al.*, 2022). Asimismo, se ha reportado que los cationes divalentes pueden inducir fragmentación del ADN espermático (Gawecka *et al.*, 2015; Shaman *et al.*, 2006). En este contexto, y considerando que las proteínas CRISP son todas reguladoras de canales de Ca<sup>2+</sup> (Ernesto *et al.*, 2015; Gibbs *et al.*, 2006; Gibbs *et al.*, 2011), analizamos los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en espermatozoides provenientes del cauda epididimario mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron niveles significativamente más altos de Ca<sup>2+</sup> intracelular para los espermatozoides mutantes que para con los controles tanto antes como después de la capacitación (Figura III.12.A, B), apoyando la idea de que los cambios en la integridad del ADN espermático en el *cauda* epididimario podrían estar vinculados a defectos en del Ca<sup>2+</sup> intracelular en los machos mutantes.

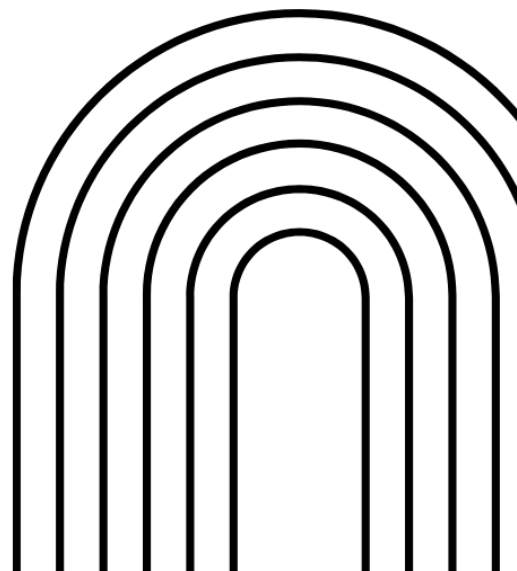


**Figura III.12. Concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de espermatozoides de *cauda*.** Los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se evaluaron por citometría de flujo utilizando la sonda Fluo-4-AM. Los resultados se muestran como **A.** histogramas representativos de los resultados y **B.** intensidad de fluorescencia media normalizada (rMFI) de Fluo-4-AM en comparación con la condición de control en cada experimento para espermatozoides no capacitados (Frescos) y capacitados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ . (n=4).

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo apoyan la idea de que la ausencia de las proteínas de CRISP1 y CRISP3 llevaría a una desregulación del calcio del espermatozoide mediada por el entorno epididimario que llevaría a un aumento en la fragmentación del ADN y las consecuentes fallas en el reinicio de la meiosis que conducen, finalmente, a los defectos en la progresión del desarrollo embrionario.



# Discusión



## Capítulo I

### **Identificación y caracterización de las proteínas CRISP epididimarias caninas como blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva**

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han demostrado que la inmunización de ratas con la proteína CRISP1 epididimaria tanto nativa (Perez-Martinez *et al.*, 1995, Ellerman *et al.*, 1998) como recombinante (Ellerman *et al.*, 2008) es capaz de reducir significativamente la fertilidad en ambos sexos sin generar efectos patológicos a través de un mecanismo específico en el que los anticuerpos generados contra la proteína ingresan al tracto reproductivo, se asocian a los espermatozoides y afectan su capacidad fertilizante (Ellerman *et al.*, 2008). Estos estudios se extendieron posteriormente a primates (*Macaca fascicularis*) en los cuales se observó que la proteína CRISP1 humana recombinante generaba una respuesta inmune específica en machos y en hembras y que los anticuerpos generados se unían *in vivo* a la proteína nativa presente en los espermatozoides sin afectar el número, morfología o motilidad de los mismos, descartando así efectos negativos sobre los procesos de espermatogénesis y maduración epididimaria (Ellerman *et al.*, 2010). En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente el potencial empleo de las proteínas CRISP epididimarias como base para una vacuna anticonceptiva. En base a ello, y teniendo en cuenta la alta conservación evolutiva de las proteínas CRISP y su rol esencial en la fertilización en las diferentes especies estudiadas hasta el momento, decidimos explorar el potencial empleo de las CRISP para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para el control de la fertilidad de animales domésticos.

Se estima que alrededor del 75 % de los perros en el mundo deambulan libremente y se reproducen sin control, lo que contribuye a una sobrepoblación canina en diversas regiones (Massei *et al.*, 2013). Esta situación no solo representa un problema de salud pública debido a la posibilidad de transmisión de enfermedades a humanos y ganado, la depredación de animales de granja, los ataques a personas y los accidentes de tránsito, sino que también implica un impacto negativo en el bienestar animal ya que muchos de estos perros enfrentan condiciones de vida adversas. Si bien se realizan grandes esfuerzos a través de campañas de castración quirúrgica, su implementación enfrenta desafíos significativos como los altos

costos, la complejidad logística de capturar a los animales, la necesidad de un grupo quirúrgico y los cuidados postoperatorios, incluyendo la recuperación en caniles y la administración de medicamentos. Como resultado, estas medidas no han logrado frenar el crecimiento acelerado de la población de perros callejeros. En este contexto, el control de la fertilidad mediante métodos no quirúrgicos está ganando reconocimiento como una alternativa más accesible y viable que no pretende reemplazar por completo a la castración quirúrgica sino complementar y reforzar su impacto en la regulación de las poblaciones caninas. Dentro de las posibles alternativas a la castración quirúrgica, se encuentra la administración de una vacuna anticonceptiva contra hormonas involucradas en la espermatogénesis o contra proteínas críticas para la fertilización. En base a ello, y dadas las evidencias de inmunogenicidad de las proteínas CRISP obtenidas en modelos de roedores y primates y el importante rol de las mismas en el proceso de fertilización, como primer objetivo de esta Tesis nos propusimos identificar y caracterizar a las proteínas CRISP caninas como posibles blancos para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para ambos sexos.

El primer paso hacia el desarrollo de una vacuna anticonceptiva canina basada en el bloqueo de las proteínas CRISP consistió en identificar la presencia de proteínas CRISP en perros ya que las mismas no habían sido descritas hasta el momento. En este sentido, consideramos de suma importancia identificar una proteína de expresión exclusivamente epididimaria para evitar el empleo de antígenos testiculares que pudieran desencadenar una orquitis autoinmune con los consecuentes efectos colaterales sobre la producción hormonal y, por ende sobre el comportamiento, como así también la posible aparición de dolor. Por el contrario, las proteínas epididimarias, presentes en la superficie de los espermatozoides, constituyen excelentes candidatos para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva ya que el bloqueo inmunológico de las mismas inhibiría específicamente su adquisición durante la maduración epididimaria y su rol en el proceso de fertilización sin afectar la producción de espermatozoides, la síntesis hormonal o la libido del animal. Además, dado que los antígenos epididimarios pueden permanecer asociados a los espermatozoides aún mientras los mismos transitan por el tracto femenino, el enfoque inmunológico podría emplearse tanto en machos como en hembras.

Con el fin de iniciar la identificación de proteínas CRISP en caninos, el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur nos proporcionó testículos y epidídimos de animales castrados en sus instalaciones. Dado que las proteínas CRISP presentan regiones altamente conservadas denominadas *Signature 1* y *Signature 2* (Ellerman *et al.*, 2006), realizamos un análisis mediante RT-PCR utilizando primers degenerados dirigidos a estas secuencias. La detección de una única banda del tamaño esperado (120 pb) la cual se encontraba ausente en el testículo nos indicó la presencia de un transcripto de la familia CRISP con expresión específica en el epidídimo. Si bien la secuenciación y el análisis mediante BLAST Assembled Genomes de esta banda contra el genoma canino (CanFam3.1 reference, NCBI Annotation Release 103) revelaron una alta similitud con el gen *Crisp2* (Gene ID: 474932), la elevada conservación de secuencia entre las proteínas CRISP no permite descartar la posibilidad de que se trate de un gen homólogo a *Crisp1* murina. Esta hipótesis se sustenta no solo en la predicción de otro gen homólogo a CRISP (*Crisp1*, Gene ID: 100855553) en una versión más reciente del genoma anotado del perro (NCBI Annotation Release 104), sino también en la expresión epididimaria de la secuencia detectada. No obstante, independientemente la correspondencia a CRISP1 o CRISP2 de la secuencia, su expresión específica en el epidídimo y su pertenencia a esta familia de proteínas la convierte en un blanco potencialmente relevante para estrategias anticonceptivas, principal objetivo de este trabajo.

Con el fin de analizar la expresión proteica del gen identificado, analizamos la presencia de la proteína correspondiente tanto en órganos reproductivos como en espermatozoides mediante WB, utilizando una serie de anticuerpos heterólogos. La banda finalmente detectada en tejido epididimario por el anticuerpo anti-hCRISP3 mostró un peso molecular de entre 25-35kDa, característico de las CRISP, y un cambio en su movilidad electroforética bajo condiciones reductoras, comportamiento previamente observado para todas las CRISP debido a la reducción de sus múltiples puentes disulfuro (Cohen *et al.*, 2000a), apoyando la idea de que la proteína detectada correspondiera efectivamente a la familia CRISP. Los resultados del análisis por WB también confirmaron la presencia de una banda a la misma altura que la presente en epidídimo en los extractos proteicos de perros de múltiples razas, reforzando la idea de que la proteína identificada se encuentra conservada a lo largo de las diferentes razas y apoyando un rol funcional relevante. Más aún, la detección de esta proteína en espermatozoides recuperados del epidídimo abrió la posibilidad de que, al igual

que lo observado en ratas, ratones y humanos (Rochwerger & Cuasnicu, 1992, Cohen *et al.*, 2000a; Cohen *et al.*, 2001), la CRISP epididimaria canina se une a la superficie de los espermatozoides durante la maduración y sea accesible a los anticuerpos dentro del epidídimo.

Tal como se mencionara previamente, los espermatozoides eyaculados carecen inicialmente de la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito, la cual adquieren luego de un proceso de capacitación en el tracto reproductor femenino que les permite sufrir la RA y desarrollar la motilidad hiperactivada. Durante la RA, se fusionan la membrana plasmática y la acrosomal externa permitiendo la exposición de la membrana acrosomal interna y la relocalización de diversas proteínas al segmento ecuatorial (Florman & Fissore, 2015). Entre las proteínas que se redistribuyen al segmento ecuatorial se encuentra CRISP1, ampliamente estudiada en roedores y humanos en los cuales se ha observado su presencia en la región dorsal del acrosoma de espermatozoides frescos y su posterior relocalización a la región ecuatorial de espermatozoides capacitados y/o reaccionados (Rochwerger *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 2000b; Cohen *et al.*, 2001). Esta redistribución al segmento ecuatorial es clave para su función en el reconocimiento, unión y fusión del espermatozoide al oolema dado que es sabido que los espermatozoides se fusionan con el ovocito a través del segmento ecuatorial (Florman & Fissore, 2015). En este contexto, la identificación de una CRISP canina en espermatozoides epididimarios frescos planteó el interrogante de si esta proteína se encontraba presente en la superficie del espermatozoide, si permanecía unida al mismo después de la capacitación y si era capaz de relocalizarse al segmento ecuatorial como se había observado para sus homólogos en otras especies. Estas características resultan relevantes no sólo para comprender la función de la cCRISP identificada en el proceso de fertilización sino también para su potencial aplicación en inmuno-anticoncepción. Para abordar este interrogante, inicialmente evaluamos la ocurrencia de la capacitación espermática utilizando muestras frescas de semen incubadas en diferentes medios dado que, hasta el momento, no hay consenso sobre el medio óptimo para la capacitación de espermatozoides caninos. Al respecto, cabe mencionar que a lo largo de los años, diversos estudios han empleado versiones modificadas del CCM original (*Canine Capacitation Medium*; Mahi & Yanagimachi, 1976), ajustando su composición según las necesidades experimentales y describiendo detalladamente dichas modificaciones (Kawakami *et al.*, 1998; 2000;

Petrunkina *et al.*, 2013; Nagashima *et al.*, 2015). Es por ello, que con el fin de analizar la ocurrencia del proceso de capacitación, evaluamos diversos parámetros asociados a la capacitación en espermatozoides incubados en el medio CCM modificado empleado en el primer reporte de nacimiento de cachorros a partir de una fertilización *in vitro* (Nagashima *et al.*, 2015), como así también en el medio de capacitación denominado "FD" (Fraser & Drury, 1975). Los resultados encontrados mostrando la ocurrencia tanto de pTYr como de RA e HA en espermatozoides incubados en ambos medios no solo apoya la ocurrencia del proceso de capacitación en nuestras manos sino que indica la posibilidad de emplear cualquiera de dichos medios para tal fin. Sin embargo, cabe mencionar que el medio FD mostró una tendencia a permitir el desarrollo de una mayor motilidad hiperactivada, posiblemente debido a su mayor concentración de piruvato y glucosa en comparación con el CCM, lo cual podría influir en el metabolismo espermático y, en consecuencia, en la adquisición de hiperactivación. Por otro lado, a pesar de la diferencia entre los medios en cuanto a la concentración de  $K^+$ , ion clave para la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Santi *et al.*, 2010), la ausencia de diferencias en la incidencia de la RA sugiere que la menor concentración de  $K^+$  en el medio FD ya sería suficiente para sostener el proceso de capacitación espermática. En conjunto, nuestros hallazgos indican que tanto el medio CCM modificado ya probado con éxito en FIV en caninos, como el medio FD evaluado en nuestros estudios son capaces de permitir la capacitación de los espermatozoides caninos. No obstante, dado que el FD favoreció el desarrollo de la HA, y que estudios previos de nuestro laboratorio lo identificaron como el medio más eficiente para ensayos funcionales en ratón (González *et al.*, 2024), seleccionamos al FD como un medio de fertilización promisorio para los estudios sobre el rol de las proteínas cCRISP en el proceso de fertilización. En base a estas observaciones, procedimos a analizar la localización de la proteína CRISP canina previamente identificada sobre espermatozoides frescos y capacitados mediante inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo contra hCRISP3 utilizado previamente para la identificación de la proteína por WB. Consistente con lo observado en roedores y humano (Rochwerger *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 2000b, Cohen *et al.*, 2001), los resultados revelaron la presencia de la cCRISP identificada en la región dorsal del acrosoma de espermatozoides frescos y su relocalización al segmento ecuatorial en una proporción significativa de espermatozoides capacitados *in vitro*. Estas observaciones, no solo confirmaron la accesibilidad de la cCRISP a los anticuerpos generados tras una inmunización sino también apoyaron su posible participación en la fusión de

gametas, reforzando la idea de que la cCRISP identificada corresponda efectivamente a un homólogo funcional de CRISP1 de roedores y humano, pudiendo ser empleada como blanco anticonceptivo.

La siguiente etapa de este estudio consistió en la expresión de la proteína cCRISP recombinante en un modelo procarionta con el objetivo de contar con la misma para futuras inmunizaciones en caninos destinadas a evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de su administración. La expresión proteica se llevó a cabo utilizando la secuencia anotada del gen previamente identificado mediante secuenciación de ADNc como base para el diseño de un vector de expresión. A pesar de que la expresión de la proteína recombinante fue confirmada mediante detección con anti-Flag, ésta se localizó en cuerpos de inclusión, dificultando su purificación. Recientemente, observamos el mismo fenómeno al expresar las proteínas CRISP1 y CRISP4 murinas recombinantes, lo que sugiere un comportamiento común dentro de esta familia de proteínas. Dado que los cuerpos de inclusión presentan características amiloides conteniendo cantidades relevantes de polipéptidos funcionales (Gonzalez-Montalban *et al.*, 2008), la presencia de las CRISP en estas estructuras es consistente con estudios reportando la capacidad amiloidogénica y oligomérica de las proteínas CRISP (Zhang *et al.*, 2021; Sheng *et al.*, 2021), posiblemente facilitadas por la afinidad de las CRISP por el zinc (Maldera *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2019). Sin embargo, el protocolo previamente utilizado para recuperar las CRISP murinas de los cuerpos de inclusión (González *et al.*, *en preparación*) no fue suficiente para recuperar la proteína recombinante canina, la cual precipitó una vez introducida en la columna de cromatografía, afectando el flujo de los *buffers* e impidiendo su elución, muy probablemente por el elevado peso molecular resultante.

En nuestra búsqueda por resolver este problema de purificación, encontramos que otro grupo había expresado previamente CRISP murina recombinante enfrentando dificultades similares debido a la presencia de "grandes fracciones de proteína impura". Para sortear este obstáculo, los autores habían optado por escalar la producción a grandes volúmenes, logrando así obtener pequeñas cantidades de proteína soluble (Gibbs *et al.*, 2006; 2011). Un enfoque similar fue utilizado por nuestro propio grupo para la expresión de CRISP1 en roedores y humanos (Ellerman *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 1996, Cohen *et al.*, 2001). Si bien

aumentar la escala de producción podría haber permitido la obtención de pequeñas cantidades de proteína soluble, dado que el objetivo final es la transferencia de esta técnica a la industria, el desarrollo de protocolos de expresión más eficientes resulta prioritario. En este sentido, aunque algunos estudios han optado por la expresión de proteínas CRISP mediante el sistema de baculovirus (Gaikwad *et al.*, 2020), actualmente nos enfrentamos al desafío de utilizar un sistema de expresión eucariota debido a su mayor capacidad para favorecer el complejo plegamiento de estas proteínas, representando una alternativa prometedora utilizada con éxito para la expresión de hCRISP3 (Volpert *et al.*, 2014).

En paralelo a los diferentes ensayos de expresión de la proteína procariota, se iniciaron los estudios destinados a analizar si el anticuerpo anti-hCRISP3 empleado previamente para la identificación de la proteína canina era capaz de afectar la funcionalidad espermática. El análisis de los diversos parámetros asociados a la capacitación reveló que la incubación de espermatozoides con el anticuerpo anti-hCRISP3 no alteró el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, siendo ésta la primera evidencia de que la presencia de anticuerpos contra las proteínas CRISP durante la capacitación no afecta la cascada de señalización de las fosfoquinasas involucradas en este proceso. Si bien la exposición de espermatozoides al anticuerpo anti-hCRISP3 no afectó la ocurrencia de la RA espontánea, el hecho de que los espermatozoides caninos capacitados no exhiban un aumento en la RA espontánea con respecto a los frescos podría estar enmascarando un posible efecto inhibitorio por parte de los anticuerpos. Sin embargo, el hecho de que los anticuerpos anti-CRISP1 tampoco hayan afectado la RA en ratas (Perez-Martinez *et al.*, 1995) ni en humanos (Cohen *et al.*, 2001), es consistente con nuestras observaciones en caninos y apoya la idea de que el anti-hCRISP3 efectivamente no estaría afectando la RA en esta especie.

El efecto del anticuerpo sobre la HA de los espermatozoides caninos se evaluó utilizando un sistema computarizado de análisis de semen (CASA SCA®), el cual permite una evaluación precisa y automatizada de los parámetros cinéticos de la muestra. Al respecto, es interesante destacar que los niveles de motilidad de los espermatozoides capacitados arrojados por este software fueron similares a los observados mediante recuento de videos realizado en forma subjetiva y previamente descriptos en este mismo capítulo. Esto hace un llamado de atención a la creciente necesidad de la obtención de resultados provenientes de

sistemas automatizados por parte de la comunidad científica, dado que si bien estos sistemas de análisis computarizado son precisos y generan resultados altamente reproducibles, el correcto entrenamiento de operadores puede suplir la falta de estos sistemas de alto costo. De este modo, si bien los sistemas computarizados representan una herramienta valiosa, su disponibilidad no debería considerarse una limitación determinante para la producción de conocimiento de calidad. Los resultados de motilidad obtenidos mediante este sistema revelaron que la presencia del anticuerpo anti-hCRISP3 durante la capacitación tampoco generó diferencias en la proporción de espermatozoides motiles ni en la de aquellos que exhibían motilidad hiperactivada tras la capacitación, consistente con lo visto previamente para la motilidad de espermatozoides tanto de rata como de primates no humanos en presencia de los anticuerpos contra CRISP1 (Perez Martinez *et al.*, 1995; Ellerman *et al.*, 2010). El hecho de que el anticuerpo anti-hCRISP3 no afectara ninguno de los parámetros asociados a la capacitación, tal cual se había reportado para las proteínas CRISP de las otras especies estudiadas, no solo apoya que la proteína identificada por este anticuerpo heterólogo corresponda a un miembro de la familia CRISP sino también representa una evidencia de que el anticuerpo podría estar afectando específicamente el rol funcional de la proteína.

Debido a las dificultades inherentes a la obtención y maduración *in vitro* de ovocitos caninos (Chastant-Maillard *et al.*, 2011), nos propusimos evaluar el impacto del bloqueo de esta proteína sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides a través del empleo de ensayos heterólogos tales como el ensayo de penetración de ovocitos de hámster (HOPT, *Hamster Oocyte Penetration Test*) utilizado para evaluar la capacidad de los espermatozoides de diferentes especies de capacitarse, sufrir la RA, fusionarse con la membrana plasmática del ovocito y decondensar el núcleo en el ooplasma (Yanagimachi *et al.*, 1976). Sin embargo, y a pesar de la reconocida capacidad de la proteína JUNO de hámster de unirse y permitir la fusión con espermatozoides de múltiples especies (humanos, cerdo, ratón; Bianchi *et al.*, 2015), los espermatozoides caninos no han mostrado ser capaces de reconocer y fusionarse con el ovocito de hámster (Kim 1992; Kim & Lee 1993). Al respecto, cabe mencionar que nos encontramos desarrollando un nuevo ensayo de fusión de gametas heterólogo, utilizando ovocitos murinos en lugar de ovocitos de hámster que podría no sólo ser de ayuda a nuestros estudios sino constituir una herramienta útil para otros grupos que investigan la fertilización con gametas caninas.

Como otra aproximación al estudio del efecto del anticuerpo sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides optamos por analizar el efecto del anticuerpo anti-hCRISP3 sobre la capacidad de los espermatozoides caninos de penetrar el cúmulus, que constituye la primera etapa del proceso de fertilización. Para ello, empleamos un ensayo de penetración de cúmulus heterólogo desarrollado en nuestro laboratorio (Battistone *et al.*, 2014) que evalúa la capacidad de los espermatozoides de penetrar el cúmulus oophorus de complejos cúmulus-ovocito murinos y, por ende, el estado de capacitación de dichos espermatozoides, ya que es sabido que solo los espermatozoides capacitados son capaces de penetrar esta envoltura (Yanagimachi 1994; Bedford, 2004; Darszon *et al.*, 2011). Los resultados indicando que el anticuerpo anti-hCRISP3 fue capaz de inhibir significativamente la capacidad de los espermatozoides de atravesar la matriz de células del cúmulus murino indican que la proteína cCRISP identificada jugaría un rol en la primera etapa de la fertilización, sin excluir la posibilidad de que la misma participe, además, en otras etapas de la fertilización como ha sido reportado para otras especies. Dado que el anticuerpo anti-hCRISP3 no mostró efectos sobre la RA ni sobre la HA, resulta difícil postular los mecanismos por los cuales el anticuerpo afecta la penetración del cúmulus. En ese sentido, si bien el rol de la RA e HA en las etapas tanto de penetración de ZP como de fusión han sido claramente descritas, la información sobre el rol de la RA e HA en la penetración del cúmulus es aún limitada. Al respecto cabe recordar que, al menos en murinos, los espermatozoides que llegan al cúmulus luego de un apareo ya han experimentado la reacción acrosomal, apoyando la idea de que la RA inducida en el *isthmus* inferior podría constituir un requisito para la penetración de esta envoltura. La evaluación del efecto del anticuerpo anti-hCRISP3 sobre la RA inducida por progesterona podría aportar información relevante en este sentido. Asimismo, si bien no es clara la participación de la HA en la penetración del cúmulus, se ha reportado la existencia de factores quimioattractantes presentes en su matriz entre los cuales se encuentra la proteína CRISP1. Nuestros resultados utilizando hembras KO para la proteína CRISP1 indicaron que la misma inhibiría la HA de los espermatozoides que están penetrando el cúmulus, aumentando su orientación y, por ende, su capacidad de penetrarlo (Ernesto *et al.*, 2015). En base a ello, no descartamos que la presencia del anticuerpo anti-CRISP3 durante la penetración de cúmulus pueda inhibir a la proteína CRISP presente en el cúmulus, afectando su capacidad quimioattractante e inhibiendo la penetración del cúmulus y/o algún otro parámetro espermático asociado a la capacitación y diferente a los estudiados (pTyr, RA, HA).

En conjunto, los resultados obtenidos y descritos en este primer capítulo muestran la identificación de una proteína cCRISP epididimaria que se asocia a la superficie de los espermatozoides, permanece en los mismos luego de la capacitación, relocalizándose a la región fusogénica de la cabeza tal como ocurre en el resto de las especies estudiadas y que participaría en la primera etapa de penetración del cúmulus durante la fertilización. A partir de estos resultados, los futuros estudios estarán dirigidos a la obtención de la proteína canina recombinante para su empleo en ensayos de inmunización en caninos con el fin de analizar su capacidad inmunogénica y la seguridad de su administración.

Consideramos que estos resultados representan un importante avance hacia el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para perros de ambos sexos y, por ende, hacia el futuro control de la sobrepoblación canina callejera.

## Capítulo II

### Generación y caracterización de una nueva colonia de animales carentes de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4.

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 en diversos procesos biológicos. En este contexto, nuestro laboratorio generó y caracterizó el primer modelo KO para un miembro de la familia CRISP, la proteína epididimaria CRISP1 (Da Ros *et al.*, 2008). Posteriormente, tanto nuestro grupo como otros hemos desarrollado y caracterizado ratones simples KO para CRISP2 (Brukman *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2019) y CRISP4 (Gibbs *et al.*, 2011; Turunen *et al.*, 2012; Carvajal *et al.*, 2018). Por su parte, mientras que un grupo reportó una colonia KO para CRISP3 sin detallar una caracterización reproductiva (Volpert *et al.*, 2020), los resultados sobre el simple KO de CRISP3 de nuestro grupo sugieren que esta proteína podría regular la expresión de CRISP1 (Curci *et al.*, 2020). A pesar de haberse demostrado que las CRISP son relevantes para la fertilización (Gonzalez *et al.*, 2021), los animales KO simples resultaron fértiles, lo que nos llevó a pensar que podrían existir mecanismos de redundancia funcional y compensación entre los distintos miembros de esta familia. Por este motivo, en los últimos años nuestro grupo comenzó a estudiar animales con delección simultánea de más de una proteína CRISP.

El análisis de las colonias DKO reveló que solo algunas combinaciones son capaces de afectar la fertilidad. Por ejemplo, los machos DKO 1/4 fueron subfértiles, con defectos en la fertilización tanto *in vivo* como *in vitro* (Carvajal *et al.*, 2018), mientras que los DKO 2/4 resultaron fértiles a pesar de presentar claros defectos en la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Curci *et al.*, 2020), sugiriendo un rol compensatorio de CRISP1 en esta combinación. Por otro lado, los DKO 1/3 también fueron subfértiles, pero, en este caso particular, defectos en el desarrollo embrionario temprano fueron los responsables del fenotipo, lo que sugirió, por primera vez, un rol de las CRISP más allá de la fertilización. Finalmente, al deleccionar más de dos proteínas CRISP simultáneamente observamos que los machos eran prácticamente infértiles y que esta infertilidad estaba asociada a fallas severas tanto en la fertilización como en el desarrollo embrionario (Curci *et al.*, 2020; Gonzalez *et al.*,

2021), confirmando la importancia crítica de esta familia de proteínas para la fertilidad. A partir de estas observaciones, nos preguntamos si la infertilidad de los animales carentes de tres proteínas era consecuencia de haber delecionado más de dos proteínas simultáneamente o si, al igual que lo observado para los DKO, era determinante cuáles tres proteínas eran las delecionadas. Es por ello que durante el segundo capítulo de esta tesis nos dedicamos a desarrollar y caracterizar una nueva colonia triple KO para las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 (TKO).

La colonia TKO fue generada a partir de cruzamientos de las colonias DKO 1/3 y DKO 1/4 que, como se mencionara anteriormente, estaban disponibles en el laboratorio. De esta manera, a través de la genotipificación por PCR de las crías de estos apareos pre-fundacionales, seleccionamos los primeros ratones heterocigotas para los 2 alelos (CRISP 1/3 y CRISP4) y realizamos los apareos fundacionales (F0) de la colonia TKO 1/3/4. Como resultado de la primera caracterización, encontramos que la deleción simultánea de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 no tuvo un efecto deletéreo en los individuos según el análisis de frecuencia alélica por dobles híbridos. Asimismo, la proporción entre sexos tampoco se vio afectada. Estas observaciones son importantes ya que, en caso de que las mutaciones hubieran sido deletéreas, una posible disminución en la fertilidad podría adjudicarse a la inviabilidad de ciertos embriones para implantarse y/o desarrollarse. El hecho de no haber encontrado efectos deletéreos es consistente con lo observado en otros modelos KO para proteínas CRISP generados en el laboratorio y nos permitió llevar a cabo el análisis de fertilidad mediante el conteo de crías.

Los estudios de la fertilidad revelaron que los machos TKO no alcanzaban la infertilidad observada para los TKO 1/2/3 previamente mencionada (Curci *et al.*, 2020), si bien exhibían una subfertilidad comparable a la reportada para los DKO 1/4 y DKO 1/3 (Carvajal *et al.*, 2018; Curci *et al.*, 2020) (**Tabla II.3**). Estas observaciones revelaron que la ausencia de 3 proteínas CRISP no sería suficiente para generar una interrupción total de la fertilidad, siendo determinante cuáles CRISP son delecionadas.

Estudios previos indicaron que una proporción de los machos DKO 1/4, TKO 1/2/3 y CKO presentaba inflamación en los órganos sexuales (epidídimo-orquitis), acompañada de espermatozoides no viables en el cauda epididimario (Carvajal *et al.*, 2018; Curci *et al.*, 2020).

En contraste, los machos simple KO, los DKO 1/3 y los DKO 2/4 no mostraban este fenotipo inflamatorio. Para profundizar en este fenómeno, investigamos la presencia de inflamación en los machos de la nueva colonia TKO. Encontramos que el 41% de los machos TKO presentaban inflamación en los órganos sexuales tal como fuera reportado previamente para las otras colonias. El hecho de que todos los machos con inflamación (DKO 1/4, TKO 1/2/3, CKO y TKO 1/3/4) compartan el fondo genético mixto (C57/DBA), que la inflamación no se detecte en aquellas colonias con el mismo fondo genético carentes de CRISP2, CRISP4 o CRISP2/CRISP4 y que las colonias de animales carentes de CRISP1 o de CRISP1/CRISP3 en fondo C57 puro no presenten inflamación, parecería indicar que el desarrollo del cuadro inflamatorio dependería de la falta de la proteína CRISP1 en un fondo genético mixto (C57/DBA). Teniendo en cuenta estudios aún no publicados de nuestro grupo mostrando que los animales carentes de CRISP1 en fondo genético mixto no muestran signos de inflamación, se puede concluir que la expresión del fenotipo inflamatorio requeriría no sólo la ausencia de CRISP1 en un fondo genético mixto sino la delección de otras CRISP.

A diferencia de las colonias con epidídimo-orquitis previamente estudiadas, los machos TKO presentaron inflamación del *caput* epididimario (epididimitis) y no del testículo (orquitis), sugiriendo que esta nueva combinación de proteínas delecionadas generaría una disrupción de la inmunotolerancia diferente a la reportada previamente. Mientras la presencia de epidídimo-orquitis estaría asociada a la ausencia de CRISP1 y CRISP4, las cuales contribuyen a la integridad de la barrera hemato-epididimaria (BEB), evitando la activación de una respuesta inmune contra los espermatozoides (Carvajal *et al.*, 2018), no es claro por qué los animales TKO carentes, además, de la proteína CRISP3, presentan inflamación restringida al *caput* epididimario sin mostrar compromiso testicular. Si bien los mecanismos responsables de este perfil inflamatorio aún se desconocen, la presencia de CRISP3 en neutrófilos y otras células del sistema inmune (Udby *et al.*, 2002) permite postular un posible rol inmunomodulador de CRISP3. Apoyando esta hipótesis, mientras que la inhibición estable de la expresión de CRISP3 en células LNCaP, una línea celular humana derivada de carcinoma prostático metastásico, no afectó la viabilidad celular, pero resultó en una disminución de su actividad invasiva, la sobreexpresión de CRISP3 se asoció con una reducción en la expresión de ANXA1, un gen con propiedades anti-inflamatorias, lo que conllevó al establecimiento de un estado pro-inflamatorio (Pathak *et al.*, 2016). En línea con estas observaciones, se ha

reportado un aumento de los niveles de CRISP3 en el plasma seminal de pacientes con varicocele, los cuales se vieron disminuídos significativamente tras la corrección quirúrgica mediante varicocelectomía (Belardin *et al.*, 2018), reforzando la asociación entre CRISP3 y procesos inflamatorios en el tracto reproductor masculino. En base a ello y teniendo en cuenta nuestras observaciones, es posible que las proteínas CRISP regulen en forma diferencial la inmunotolerancia del tracto reproductor, y que el fenotipo inflamatorio observado no se deba solo a la ausencia de proteínas específicas, sino a un desbalance funcional entre múltiples miembros de esta familia y su interacción con el contexto genético. Esta compleja red regulatoria abre nuevas perspectivas para comprender los mecanismos que subyacen a la inmunotolerancia testicular y su disrupción en el contexto de patologías inflamatorias del sistema reproductivo masculino.

La evaluación de la fertilidad de los machos de la colonia TKO teniendo en cuenta la presencia o no del fenotipo inflamatorio reveló que la fertilidad de los machos sin epididimitis (TKO1) continuaba siendo marcadamente menor que la de los controles y no era diferente a la observada para animales con epididimitis uni o bilateral (TKO2). La similar bajada de fertilidad de los machos TKO1 y TKO2 difiere de lo observado en los animales DKO 1/4 en los cuales los machos sin cuadro inflamatorio presentaban una bajada sutil de su fertilidad en comparación con la pronunciada bajada de la fertilidad de aquellos con epidídimo-orquitis (Carvajal *et al.*, 2018). Estos resultados apoyan la idea de que la mayor bajada de fertilidad de los animales TKO sin inflamación respecto a los DKO 1/4 estaría asociada a la falta de más de dos proteínas CRISP simultáneamente y, más específicamente, a la ausencia de CRISP3. Al respecto, los estudios *in vivo* dirigidos a dilucidar las causas de la disminución en la fertilidad de los machos TKO mostraron que, contrariamente a lo esperado, los animales no exhibieron bajada en los niveles de fertilización *in vivo* tal como se había observado para la colonia DKO 1/4, sino sólo una reducción en las tasas de desarrollo embrionario, en concordancia con lo reportado para los animales DKO 1/3 (Cruci *et al.*, 2020). La similitud en la reducción de los porcentajes de desarrollo observada entre los animales TKO y DKO 1/3, sumado a la ausencia de problemas en desarrollo embrionario en la colonia DKO 1/4, sugiere que los defectos en desarrollo embrionario de la colonia TKO se deberían, principalmente, a la ausencia conjunta de CRISP1 y CRISP3. Estas evidencias dejan en claro, una vez más, la complejidad de los mecanismos de redundancia y compensación entre los miembros de la familia CRISP y la

dificultad de predecir el impacto de las deleciones en los fenotipos resultantes (Gonzalez *et al.*, 2021).

Consistente con la predominancia del fenotipo reproductivo de la colonia DKO 1/3, la colonia TKO también mostró agregados y severos defectos de motilidad en los espermatozoides recuperados del útero 4 horas luego de apareo, abriendo la posibilidad de que dichos defectos contribuyan a un retraso en la fertilización que derive en las alteraciones en el desarrollo embrionario (Takahashi *et al.*, 2013), tal como fuera previamente descrito para espermatozoides inmaduros (Brackett *et al.*, 1978; Lacham-Kaplan y Trounson, 1991; 1994; Orgebin-Crist, 1968; Orgebin-Crist y Jahad, 1977). El hecho de que este fenotipo no fuera observado en los machos simples KO para CRISP1 ni en los DKO 1/4 apoya la hipótesis de que tanto la falta de motilidad espermática como la formación de agregados en el útero estarían asociadas a la ausencia conjunta de CRISP1 y CRISP3. En este sentido, se ha descrito la expresión de CRISP3 en el plasma seminal humano (Udby, 2005) y equino (Schambony *et al.*, 1998), y se han reportado distintos roles para esta proteína que podrían explicar el fenotipo observado. Por un lado, se ha demostrado que CRISP3 equina interfiere en la interacción entre los espermatozoides y las células inmunes (Doty *et al.*, 2011), lo que sugiere que la ausencia de CRISP3 en el plasma seminal murino podría desproteger a los espermatozoides y conducir a la inmotilidad observada en los animales TKO. Por otro lado, existe evidencia de 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 cumpliera un rol similar en el ratón, su ausencia podría afectar la licuefacción del semen, generando el fenotipo visto en el fluido uterino luego del apareo con machos TKO. En este contexto, resulta relevante mencionar observaciones previas de nuestro laboratorio que indican que CRISP1 contiene sitios de unión a 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). Dada la gran similitud de secuencia entre CRISP1 y CRISP3, es altamente probable que CRISP3 posea propiedades similares. En línea con estas observaciones, un estudio reciente reportó que las proteínas CRISP pueden inducir la formación de amiloides (Sheng *et al.*, 2019), los cuales están naturalmente presentes en el semen y tienen la capacidad de unirse e inmovilizar espermatozoides defectuosos (Roan *et*

*al.*, 2017). Basándonos en estos hallazgos, es posible también que la ausencia de CRISP3 altere la formación de estos amiloides fisiológicos, resultando en un atrapamiento anómalo de los espermatozoides.

Es importante destacar que los espermatozoides TKO 1/2/3 y CKO, también carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP3, fueron encontrados inmóviles en el fluido uterino, con la particularidad de que, en ambos casos, los espermatozoides también carecían de la proteína testicular CRISP2 cuya ausencia provoca rigidez en la pieza media del espermatozoide (Lim *et al.*, 2019; Curci *et al.*, 2020), inhibiendo el desarrollo de la hiperactividad y llevando a defectos en la migración oviductal y la penetración de las envolturas que rodean al ovocito (Curci *et al.*, 2020). En el modelo TKO generado, al igual que en el DKO 1/3 cuyo análisis se abordará en mayor profundidad en el siguiente capítulo, los espermatozoides no presentan dicha rigidez debido a la presencia de CRISP2. Además, el hecho de que la fertilización *in vivo* correspondiente a ambos grupos (TKO1 y TKO2) sea normal, apoya la idea de que, o bien los espermatozoides logran escapar de los agregados, o que los agregados se forman después de que los espermatozoides lleguen al sitio de fertilización.

Con el fin de estudiar la llegada de los espermatozoides al sitio de fertilización, evaluamos el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla* a solo 4 horas de confirmado el apareo. La premisa de este estudio fue que si el defecto en desarrollo se debiera a que los espermatozoides demoran en llegar, la determinación de los ovocitos fertilizados en la *ampulla* a tiempos cortos post-apareo permitiría detectar una bajada en los porcentajes de fertilización que podría estar enmascarada a tiempos largos post-apareo (18 horas) por darles a los espermatozoides el tiempo suficiente para llegar a la *ampulla*. Si bien los porcentajes de fertilización *in vivo* obtenidos 4 horas post apareo fueron bajos como era de esperar (La Spina *et al.*, 2016), no se observaron diferencias entre los TKO con o sin epididimitis y los controles. Sin embargo, al estudiar la capacidad de los ovocitos fertilizados de alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro*, nuevamente encontramos que aquellos fertilizados por espermatozoides TKO fallaban en completar su desarrollo embrionario temprano, excluyendo la idea de que los defectos de desarrollo embrionario se debieran a un retraso en la llegada de los espermatozoides a la *ampulla*.

El análisis *in vitro* de diversos parámetros funcionales de los espermatozoides de animales TKO sin inflamación reveló que, si bien los espermatozoides mutantes mostraron una cuenta espermática, viabilidad, morfología y reacción acrosomal normales, exhibieron una marcada disminución en su capacidad fertilizante *in vitro* al ser co-incubados tanto con ovocitos intactos como desprovistos de sus envolturas. Esta disminución tan drástica en la capacidad fertilizante *in vitro* es una característica distintiva de los espermatozoides carentes de CRISP4 (KO CRISP4, DKO 1/4 y CKO), aparentemente atribuida a la incapacidad de los espermatozoides no sólo de penetrar las envolturas sino también de fusionarse con el ovocito (Carvajal *et al.*, 2018; Curci *et al.*, 2020). A diferencia de lo que ocurre con los espermatozoides carentes de CRISP1 y CRISP4, los espermatozoides DKO 1/3 exhiben una reducción leve en las tasas de fertilización *in vitro* al ser co-incubados con ovocitos con o sin envolturas (Ver Capítulo III), la cual es ligeramente superior a la observada en los simples KO para CRISP1 (Weigel Muñoz *et al.*, 2018), indicando que la capacidad prácticamente nula de fertilización *in vitro* observada en los espermatozoides TKO se deba principalmente de la ausencia de CRISP4.

Al igual que lo observado para los animales simples KO para CRISP4, la bajada tan prominente en la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides TKO no condice con los porcentajes normales de fertilización *in vivo* observados para esta colonia. Al respecto, cabe mencionar que todos los modelos de animales simples y múltiples KO generados por nuestro laboratorio (Da Ros *et al.*, 2008; Brukman *et al.*, 2016; Weigel Muñoz *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*, 2018; Curci *et al.*, 2020) y por otros grupos (Okabe *et al.*, 2007) exhiben tasas de fertilización *in vitro* significativamente menores que los controles acompañadas o no de defectos en la fertilización *in vivo*. En este sentido, se ha establecido de manera clara que, aunque millones de espermatozoides son eyaculados en el tracto reproductivo femenino, solo unos pocos llegan al sitio de fertilización (aproximadamente uno por ovocito) (Cummins y Yanagimachi, 1982). Este eficiente sistema de selección del tracto reproductivo femenino conduce a que solo los mejores espermatozoides lleguen al sitio de fertilización, incluso en machos con deficiencias reproductivas, enmascarando posibles defectos espermáticos que son solo detectados bajo condiciones *in vitro* debido a la competencia entre espermatozoides de buena y mala calidad por el ovocito. Así, aunque no podemos excluir otros mecanismos para explicar las diferencias comúnmente observadas entre las tasas de fertilización *in vivo* e

*in vitro*, nuestra hipótesis es que el proceso natural y eficiente de selección de espermatozoides que ocurre dentro del tracto reproductivo femenino es el responsable de enmascarar los defectos espermáticos que pueden ser detectados bajo las condiciones competitivas de la fertilización *in vitro* (Brukman *et al.*, 2016).

Por otro lado, nos preguntamos si los ovocitos fertilizados *in vitro* por espermatozoides mutantes también presentarían defectos en el desarrollo embrionario. Sin embargo, la tasa de embriones en estadio de dos células obtenidos a partir de fertilización *in vitro* con espermatozoides TKO fue extremadamente baja, e incluso nula en múltiples ocasiones, tanto para ovocitos con o sin cúmulus. De todas maneras, fuimos capaces de identificar que los embriones generados *in vitro* por espermatozoides epididimarios TKO también presentan problemas para completar su desarrollo embrionario temprano, indicando que el defecto en desarrollo no estaría asociado a problemas de transporte por el tracto femenino y que es independiente del ambiente en el que ocurra la fertilización. No obstante, la baja tasa de fertilización *in vitro* hace que el modelo TKO no sea el más adecuado para estudiar el efecto de las proteínas CRISP en eventos posteriores a la fertilización.

Los mecanismos de redundancia y compensación observados dentro de la familia de proteínas CRISP son particularmente relevantes en el caso de los espermatozoides ya que los mismos son células transcripcional y traduccionalmente inactivas que acarrean diversas familias de proteínas para asegurar su funcionalidad (por ejemplo, ADAMs, defensinas, CRISP, etc.). Esto subraya la importancia de generar animales múltiples KO para las proteínas de estas familias, dado que los modelos simples KO podrían estar enmascarando la verdadera relevancia funcional de estas proteínas. Esto se ve particularmente al comparar el fenotipo reproductivo de las diferentes variantes de mutantes generadas y caracterizadas por nuestro laboratorio (**Tabla II.3**). Tal como puede observarse es claro que no es sino hasta que faltan al menos dos proteínas CRISP simultáneamente que los ratones comienzan a mostrar cierto grado de subfertilidad.

En este contexto, la colonia DKO 1/3 resulta particularmente útil para investigar el desarrollo embrionario dado que no presenta defectos en la fertilización y permite la generación de embriones de dos células que pueden ser evaluados en cuanto a su capacidad de desarrollo hasta blastocisto (**Tabla II.3**). Por su parte, la colonia DKO 1/4 constituye un

modelo ideal para el estudio del proceso de fertilización ya que no presenta defectos en la etapa posterior de desarrollo embrionario. De este modo, mientras el animal DKO 1/3 resulta un modelo especialmente útil para analizar mejoras en protocolos de reproducción asistida, el animal DKO 1/4 representa un excelente modelo para analizar a las proteínas CRISP como blancos anticonceptivos. En cuanto a las colonias triples KO, la comparación de la nueva colonia subfertil TKO 1/3/4 respecto a la colonia infértil TKO 1/2/3, dejan en claro la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad masculina. De todos modos, el hecho de que los animales simple KO para CRISP2 o DKO 2/4 sean fértiles, confirma una vez más la importancia de las otras CRISP deletionadas conjuntamente.

*Tabla II.3. Comparación del fenotipo reproductivo de los diferentes colonias KO*

<b>Genotipo</b>	<b><math>\Delta</math> Fertilidad vs Control</b>	<b>Fertilización in vivo</b>	<b>Desarrollo embrionario</b>	<b>Fertilización in vitro</b>	<b>Epididimitis</b>
<i>KO CRISP 1</i>	=	=	NE	↓	no
<i>KO CRISP 4</i>	=	=	NE	↓↓↓	no
<i>KO CRISP 2</i>	=	=	NE	↓	no
<i>KO CRISP 3</i>	=	NE	NE	NE	NE
<i>DKO 2/4</i>	=	=	NE	↓	no
<b><i>DKO 1/3</i></b>	<b>-38% (**)</b>	=	↓↓	↓	no
<b><i>DKO 1/4</i></b>	<b>-46% (**)</b>	↓	=	↓↓↓	39%
<b><i>TKO 1/3/4</i></b>	<b>-60% (***)</b>	=	↓↓	↓↓↓	<b>41%</b>
<i>TKO 1/2/3</i>	<i>Infértil</i>	↓↓	↓	↓↓↓	<i>Sí</i>
<i>CKO 1/2/3/4</i>	<i>Infértil</i>	↓↓	↓	↓↓↓	<i>Sí</i>

*Tabla comparando el fenotipo reproductivo de los machos de las diferentes colonias KO realizadas y estudiadas en nuestro laboratorio. NE, no estudiado. Fuente de los datos: Da Ros et al., 2008; Weigel Muñoz et al., 2018; Brukman et al., 2016; Carvajal et al., 2018; Curci et al., 2020; Gibbs et al., 2011; Turunen et al., 2012; Lim et al., 2019; Volpert et al., 2020.*

Como se mencionara anteriormente, si bien en roedores existen cuatro proteínas CRISP, en humanos sólo se han identificado tres proteínas CRISP. Observaciones de nuestro grupo y otros han permitido establecer la homología entre estas proteínas en las principales

especies de estudio (Arévalo *et al.*, 2020), determinando que la proteína humana CRISP1 es homóloga a las proteínas CRISP4 y CRISP1 murinas y como ellas, participa en la fusión de gametas a través de sitios complementarios en el ovocito (Cohen *et al.*, 2001, Maldera *et al.*, 2014). Por otro lado, CRISP2 humana es la única CRISP sintetizada en el testículo y la más conservada evolutivamente tanto en secuencia como en función, manteniendo el mismo nombre en ratones y humanos. Finalmente, la proteína CRISP3 humana comparte homología con las proteínas CRISP1 y CRISP3 murinas, siendo esta última el resultado de una duplicación genética de CRISP1 en roedores (Arévalo *et al.*, 2020). En base a ello, la nueva colonia TKO descrita en esta Tesis representaría un modelo de la ausencia de las proteínas CRISP1 y CRISP3 humanas. Considerando la alta homología de secuencia y función entre las proteínas CRISP de roedores y humanos, es probable que los mismos mecanismos de redundancia y especificidad operen en la familia CRISP humana, y que la falta de las proteínas CRISP1 y CRISP3 también conduzca a defectos en el desarrollo embrionario en humanos. Asimismo, dado que los tres genes CRISP humanos están ubicados muy cerca entre sí dentro del mismo cromosoma, es posible que una única reorganización en esa región sea responsable de algunos de los casos de infertilidad masculina de etiología desconocida, apoyando la relevancia de nuestras observaciones para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.

### Capítulo III

#### Estudio de la contribución de las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP3 al desarrollo embrionario

Observaciones previas de nuestro laboratorio habían mostrado que los machos DKO 1/3 eran subfértiles debido a problemas específicos en el desarrollo embrionario temprano revelando por primera vez, el rol de las CRISP en etapas posteriores a la fertilización (Curci *et al.*, 2020; Vallet-Buisan *et al.*, 2023). Estas observaciones, junto al hecho de que todos los modelos KO carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP3 (TKO 1/2/3, el cuádruple KO y el nuevo TKO 1/3/4 descrito en el Capítulo II de esta Tesis) también exhiban defectos en el desarrollo embrionario, confirman la relevancia de las proteínas CRISP1 y CRISP3 para el éxito del desarrollo embrionario temprano. Profundizando en estas observaciones, el hallazgo de que los ovocitos fertilizados por espermatozoides de machos mutantes para los genes *Crisp1* y *Crisp4* (DKO 1/4) no exhibieran defectos en el desarrollo embrionario (detallado en el Capítulo II) confirman que los defectos en el desarrollo embrionario están asociados específicamente a la mutación de los genes *Crisp1* y *Crisp3*.

Nuestra observación previa mostrando agregados de espermatozoides inmóviles en el fluido uterino de hembras apareadas con machos DKO 1/3 (Curci *et al.*, 2020), también reportada en el Capítulo II para el TKO, sugería que una llegada tardía a la *ampulla* podría comprometer el desarrollo embrionario por pérdida de calidad ovocitaria (Takahashi *et al.*, 2013), como ocurre con espermatozoides inmaduros (Brackett *et al.*, 1978; Lacham-Kaplan & Trounson, 1991; 1994; Orgebin-Crist, 1968; Orgebin-Crist & Jahad, 1977). Sin embargo, la evaluación de la migración espermática dentro del tracto reproductor femenino por microscopía poco después del apareo mostró que los espermatozoides mutantes eran capaces de atravesar la unión útero-tubárica y alcanzar el *isthmus* medio de manera similar a los espermatozoides control, indicando que las fallas en el desarrollo embrionario causadas por los espermatozoides mutantes no se debería a defectos en el transporte espermático desde el útero al oviducto ni a la migración oviductal. Adicionalmente, el hecho de que la fertilización *in vivo* a las 4 horas posteriores del apareo haya sido normal para los espermatozoides mutantes sugiere no sólo que el tiempo de llegada de los espermatozoides

DKO 1/3 a la *ampulla* es comparable al de los espermatozoides control, sino que también es suficiente para que reconozcan y fertilicen a los ovocitos. No obstante, a pesar de esta falta de diferencias en la fertilización *in vivo* a tiempos cortos, los ovocitos fertilizados por espermatozoides mutantes mostraron nuevamente defectos para alcanzar la etapa de blastocisto, indicando que, al igual que lo observado para el TKO 1/3/4 en el Capítulo II, no serían ni una fertilización retrasada ni una calidad comprometida del ovocito las responsables de los defectos en el desarrollo temprano del embrión observados en la colonia DKO 1/3.

Considerando los trabajos mostrando que las glándulas accesorias masculinas contribuyen al desarrollo adecuado del embrión sin afectar las tasas de fertilización (Jodar, 2019; Ma *et al.*, 2022; Vallet-Buisan *et al.*, 2023; W.S. *et al.*, 1988), y la presencia de CRISP1 y CRISP3 en el fluido seminal (Bu *et al.*, 2024; Doty *et al.*, 2011; Légaré *et al.*, 2013; 2010; Udby *et al.*, 2015), existía la posibilidad de que los defectos en los espermatozoides que llevan al fenotipo de desarrollo embrionario estuvieran asociados a la ausencia de CRISP1 y CRISP3 en las secreciones de las glándulas accesorias. Sin embargo, cuando inseminamos espermatozoides epididimarios directamente dentro de los cuernos uterinos observamos, nuevamente, tasas normales de fertilización acompañadas de defectos en el desarrollo embrionario temprano, revelando que los defectos ya estaban presentes en los espermatozoides epididimarios.

El análisis de fertilización bajo condiciones *in vitro* reveló defectos leves pero significativos en la fertilización no detectados *in vivo*, probablemente debido al mecanismo altamente eficiente de selección espermática en el tracto reproductor femenino previamente mencionado (Brukman *et al.*, 2016; Cummins & Yanagimachi, 1982). No obstante, el hallazgo de que los espermatozoides DKO 1/3 exhiban una capacidad fertilizante *in vitro* parecida a la reportada para espermatozoides carentes únicamente de CRISP1 (Da Ros *et al.*, 2008) no apoya un papel relevante de CRISP3 murina en la interacción de gametas, en concordancia con nuestras observaciones previas para CRISP3 humana (Da Ros *et al.*, 2015). Más allá de no encontrar defectos significativos en la fertilización, los ovocitos fertilizados *in vitro* también presentaron defectos para alcanzar el estadio de blastocisto. El hecho de que para el grupo mutante, tanto los ovocitos fertilizados *in vivo* luego de la inseminación uterina como los

fertilizados *in vitro* exhibieran defectos en su desarrollo indica claramente que dichos defectos ya serían acarreados por los espermatozoides epididimarios.

Si bien no se observó un retraso en la llegada de los espermatozoides mutantes a la *ampulla* ni diferencias en el porcentaje de fertilización *in vivo* a tiempos cortos, existía la posibilidad de que el defecto en el desarrollo embrionario fuera causado por un retraso en el proceso de fertilización debido a una mayor dificultad de los espermatozoides mutantes para penetrar las envolturas que rodean al ovocito (matriz de células del cúmulus y ZP). Al analizar los porcentajes de fertilización utilizando ovocitos completamente desnudos, encontramos que, al igual que en el KO de CRISP1 (Da Ros *et al.*, 2008), los espermatozoides DKO 1/3 mostraron menores tasas de fertilización de ovocitos sin ZP evaluado por tinción de ADN. Sin embargo, al evaluar el porcentaje de embriones de dos células obtenidas a partir de dichos ovocitos luego de una incubación de 24 horas *in vitro*, ya no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Esta aparente contradicción podría deberse a que, en los controles, una proporción de los ovocitos fertilizados (~25%) presentaban más de una cabeza de espermatozoide decondensada (polispermia), lo que posiblemente impidió que completaran la primera división mitótica (Li *et al.*, 2014). De todas formas, la observación de que ovocitos sin ZP fertilizados *in vitro* por espermatozoides epididimarios DKO 1/3 también mostraran una menor capacidad para alcanzar la etapa de blastocisto excluyó las deficiencias en la penetración de las envolturas del ovocito como causa de las fallas en el desarrollo embrionario, indicando la existencia de defectos distintos a aquellos asociados directamente con la interacción de gametas como responsables del fenotipo de la colonia mutante.

Curiosamente, al volver a analizar el ensayo de fertilización de ovocitos desnudos pero enfocándose en el estado del ADN materno, encontramos que mientras todos los ovocitos fertilizados por espermatozoides control exhibían el segundo corpúsculo polar al finalizar el ensayo, una proporción de ovocitos fertilizados por espermatozoides mutantes permanecían en Met II, sugiriendo que alteraciones inmediatamente posteriores a la fertilización podrían estar comprometiendo la progresión a blastocisto. En este sentido, la incorporación de tecnología de imágenes en tiempo real en los tratamientos de fertilización asistida en humanos ha mostrado la relevancia de la duración de los eventos posteriores a la fertilización y las divisiones tempranas como predictores robustos tanto del desarrollo

embrionario hasta blastocisto como del éxito de la implantación (Basile *et al.*, 2015; Esbert *et al.*, 2018; Meseguer *et al.*, 2011).

Nuestras observaciones mostrando defectos en el reinicio de la meiosis en ovocitos fertilizados por espermatozoides mutantes abrieron la posibilidad de que una activación ovocitaria deficiente fuera la causante de las fallas en el desarrollo embrionario. Al respecto, es sabido que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito luego de la fertilización son indispensables para que tanto el reinicio de la meiosis como el desarrollo embrionario ocurran de manera adecuada (Miyazaki *et al.*, 2006; Wakai *et al.*, 2019). Sin embargo, los ovocitos fertilizados por espermatozoides mutantes mostraron un patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  similar al de los ovocitos fertilizados por espermatozoides control, descartando que la alteración en las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación ovocitaria fuera la causa del defecto en el desarrollo embrionario en los ratones mutantes.

Las numerosas evidencias vinculando altos niveles de fragmentación del ADN espermático con un desarrollo embrionario anómalo (Marinero *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2023; Simon *et al.*, 2014), sumado a los estudios que demuestran que el ovocito requiere un intervalo de tiempo antes de la primera división celular embrionaria para activar su maquinaria de reparación del ADN (Martin *et al.*, 2019; Newman *et al.*, 2022), nos llevaron a considerar que el arresto en el reinicio de la meiosis podría estar relacionado con alteraciones en la integridad del ADN del espermatozoide DKO 1/3. Cabe mencionar que, dado que los espermatozoides que portan daño en el ADN carecen de mecanismos propios para su reparación pero conservan su capacidad para atravesar el tracto reproductor femenino, llegar al sitio de fertilización y fertilizar ovocitos, la actividad reparadora del ADN depende del ovocito una vez ocurrida la fertilización (González-Marín *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2019), representando un paso crítico en la generación de embriones viables. Nuestros estudios mostraron niveles significativamente más altos de fragmentación del ADN en los espermatozoides mutantes provenientes del *cauda* epididimario en comparación con los controles, apoyando la idea de que un daño en el ADN espermático podría ser la causa de los defectos tempranos observados inmediatamente luego de la fertilización. En línea con esta posibilidad, varios estudios de cinética embrionaria mostraron un retraso significativo en la etapa temprana de extrusión del segundo corpúsculo polar en ovocitos humanos fertilizados

por espermatozoides con muestras de semen con altos niveles de ADN fragmentado (Casanovas *et al.*, 2019; Eibert *et al.*, 2018; Wdowiak *et al.*, 2015). En conjunto, nuestros hallazgos permiten proponer que las proteínas CRISP actúan como mediadores clave en el mantenimiento de la integridad del ADN espermático y en la regulación del desarrollo embrionario temprano. El hecho de que los defectos que conducen a un menor desarrollo embrionario en la colonia mutante estén presentes en los espermatozoides epididimarios, junto con la ausencia de expresión de CRISP1 y CRISP3 en los testículos (González *et al.*, 2021), sugiere que el daño del ADN espermático ocurriría durante el tránsito epididimario. Esta última hipótesis está respaldada por nuestros resultados indicando que los espermatozoides mutantes del *cauda* pero no así los del *caput* epididimario presentan niveles elevados de fragmentación del ADN respecto a los controles. En concordancia, diferentes publicaciones indican que las principales vías que conducen al daño en el ADN se desencadenan durante el tránsito epididimario (Okada *et al.*, 2020; Sakkas *et al.*, 2010; Suganuma *et al.*, 2005), probablemente para permitir la eliminación de espermatozoides defectuosos (Gawecka *et al.*, 2015). En base a ello, podemos especular que la ausencia de CRISP1 y CRISP3 en el epidídimo lleva a los espermatozoides a un estado de mayor susceptibilidad a la degradación del ADN.

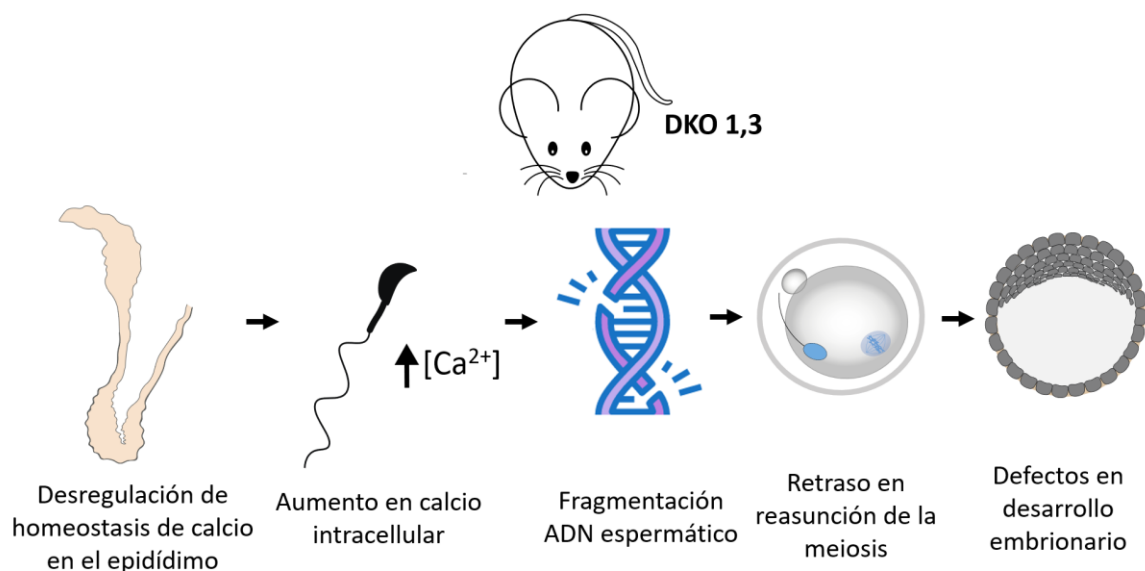
El estrecho vínculo ampliamente documentado entre fragmentación del ADN espermático y altos niveles de ROS (Aitken & De Iulius, 2007; Tremellen, 2008), junto a las evidencias indicando la existencia fisiológica de ROS durante la maduración epididimaria (Juárez-Rojas *et al.*, 2022), abrieron la posibilidad de que los mayores niveles de fragmentación de ADN en los espermatozoides mutantes fueran debidos a estrés oxidativo. En ese sentido, nuestros resultados mostrando niveles de ROS aún menores en los espermatozoides mutantes que en los controles no favorecen la idea de que el estrés oxidativo sea responsable del mecanismo que lleva a la fragmentación del ADN en nuestra colonia mutante. De todas formas, considerando que las mediciones de ROS son sensibles al momento en las que son realizadas, no se puede descartar que un incremento transitorio de ROS en regiones proximales del epidídimo haya inducido daño oxidativo en el ADN espermático, aun cuando los niveles de ROS se encuentren normalizados en el *cauda* al momento del análisis. Por esta razón, serían necesarios estudios adicionales que evalúen los niveles de ROS en espermatozoides de distintos segmentos del epidídimo a fin de descartar

completamente el papel del estrés oxidativo como responsable del fenotipo observado en los animales DKO 1/3.

Dada la importancia de la acidificación del lumen que ocurre a lo largo del epidídimo que permite la maduración espermática y la quiescencia durante su almacenamiento en el *cauda* (Dai *et al.*, 2024), decidimos evaluar si el pH luminal se encontraba alterado en los machos mutantes. Sin embargo, y a diferencia de la alcalinización que habíamos observado previamente en el *cauda* de los machos DKO 1/4 (Carvajal *et al.*, 2019), no encontramos diferencias en el pH luminal DKO 1/3, indicando que no sería un desbalance en el pH el causante del aumento en la susceptibilidad del ADN de los espermatozoides DKO 1/3. Por otro lado, tampoco observamos diferencias en el porcentaje de espermatozoides del *cauda* con persistencia de gota citoplasmática, lo que sugiere que, de existir una alteración en la maduración espermática, esta no se estaría manifestando a nivel estructural. Notablemente, en el modelo de ratones deficientes en la glutatión peroxidasa epididimaria GPX5, se ha reportado que los machos envejecidos presentan defectos en el desarrollo embrionario, los cuales estarían relacionados no solo con un aumento en la fragmentación del ADN espermático causado por un incremento en los ROS (Chabory *et al.*, 2009), sino también por alteraciones en el perfil de sncARN epididimarios (Chu *et al.*, 2020). Considerando que las modificaciones en la composición de ARN a lo largo del epidídimo resultan importantes para el desarrollo embrionario (Yuan *et al.*, 2016), es posible que en los animales DKO 1/3 exista una alteración en los niveles de ARN, aún no analizada, que esté contribuyendo al fenotipo de desarrollo embrionario observado.

Considerando que las proteínas CRISP funcionan como reguladoras de canales, principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ernesto *et al.*, 2015; Gibbs *et al.*, 2006; 2011; González *et al.*, 2021), nos planteamos la posibilidad de que alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el tránsito epididimario pudieran estar involucradas en el aumento de la fragmentación del ADN observado en los espermatozoides mutantes. Esta hipótesis surge, no sólo de la reportada importancia de dicha homeostasis durante la maduración epididimaria (Shum *et al.*, 2022), sino también de diferentes estudios que demostraron que la exposición de espermatozoides epididimarios de ratón a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , en presencia de fluido luminal, es capaz de inducir la fragmentación del ADN espermático (Gawecka *et al.*, 2015; Shaman *et al.*, 2006). Consistente

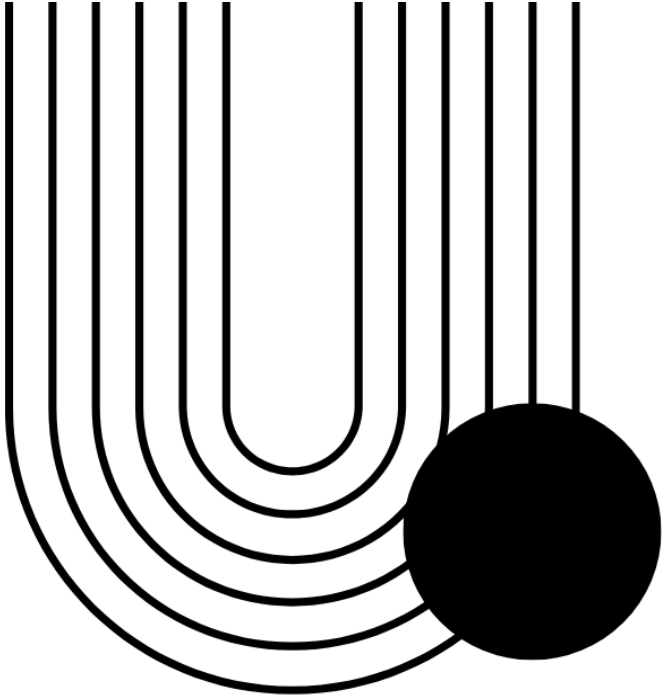
con esta idea, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la fragmentación del ADN cuando los espermatozoides controles fueron expuestos al fluido epididimario mutante o al fluido epididimario control en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas observaciones, junto con los niveles intracelulares más altos de  $\text{Ca}^{2+}$  detectados por citometría en los espermatozoides DKO 1/3, respaldan los cambios en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  como los principales responsables de los defectos de integridad del ADN observados en dichos espermatozoides (**Figura III.14**). En este sentido, si bien el estrés oxidativo ha sido históricamente el principal mecanismo asociado a la fragmentación del ADN espermático durante el tránsito epididimario, nuestros resultados introducen, por primera vez, a la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como una vía alternativa conducente al daño en la integridad del ADN. La posibilidad de que niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  activen mecanismos nucleolíticos, posiblemente mediante la activación de nucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes tanto en el fluido como en las células espermáticas (Gawecka *et al.*, 2015; Shaman *et al.*, 2006), representa una nueva perspectiva fisiopatológica para entender cómo el ambiente epididimario puede comprometer la calidad espermática y, consecuentemente, el desarrollo embrionario.



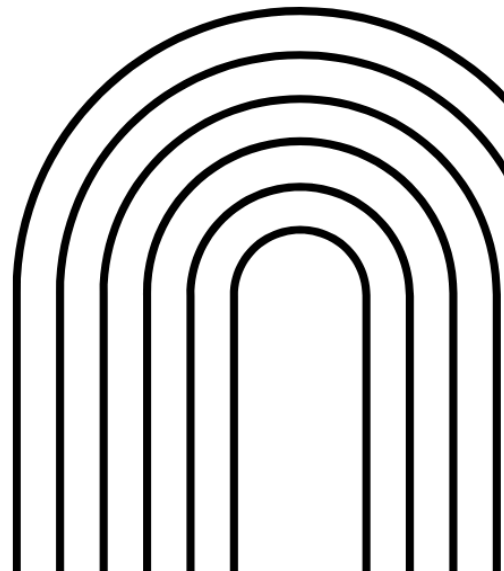
**Figura III.14. Esquema resumiendo el fenotipo causado por la ausencia de las proteínas CRISP1 y CRISP3.** La desregulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del *cauda* epididimario generaría un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides, estimulando la fragmentación del ADN espermático. Este daño en el espermatozoide llevaría a un retraso en el reinicio de la meiosis del ovocito fertilizado debido al tiempo requerido para reparar el daño en el ADN espermático, generando retrasos en la cinética del desarrollo y dando como resultado final

defectos en el desarrollo embrionario temprano y la consecuente subfertilidad de los machos DKO 1/3.

Mientras que la participación del epidídimo en la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ha sido ampliamente demostrada (Björkgren & Sipilä, 2019), su posible influencia sobre etapas posteriores, como el desarrollo embrionario temprano, ha sido muy poco explorada desde que fuera propuesta en trabajos pioneros de los años 60 y 70 (Cummins & Orgebin-Crist, 1971; Orgebin-Crist, 1967; 1968; Overstreet & Bedford, 1976). Recién en la última década, los trabajos de Rando y colaboradores reintrodujeron esta idea enfocándose en el impacto de los ARN transferidos a los espermatozoides durante la maduración epididimaria sobre el desarrollo embrionario (Conine *et al.*, 2018). El hecho de que el hambreado de espermatozoides maduros sea capaz de mejorar el desarrollo embrionario (Navarrete *et al.*, 2019), sumado a los estudios recientes indicando que tsARN mitocondriales presentes en los espermatozoides podrían regular eventos tempranos de la expresión génica embrionaria (Liu *et al.*, 2024), demuestran la existencia de un efecto paterno directo en el desarrollo embrionario sobre el cual queda aún mucho por explorar. En este contexto, nuestras observaciones proporcionan evidencia sólida que respalda la contribución del epidídimo más allá de la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, identificando a CRISP1 y CRISP3 como nuevos factores masculinos relevantes para la integridad del ADN espermático y el desarrollo embrionario temprano. Además, hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra la relevancia de las proteínas epididimarias en eventos tempranos posteriores a la fertilización. Dada la existencia de proteínas CRISP humanas homólogas en el epidídimo y los espermatozoides, que desempeñan roles equivalentes a sus contrapartes en roedores (Arévalo *et al.*, 2020; Curci *et al.*, 2020; Gonzalez *et al.*, 2021), es posible que las CRISP también estén involucradas en la embriogénesis humana a través de mecanismos similares. Considerando la alta incidencia de fragmentación del ADN espermático en la infertilidad masculina (Agarwal *et al.*, 2020; Esteves *et al.*, 2020), consideramos que nuestros hallazgos no sólo proporcionan información clave sobre el impacto de los factores epididimarios en el desarrollo embrionario de mamíferos, sino que también contribuirán a una mejor comprensión, diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.



# Conclusión



En base a evidencias de nuestro laboratorio mostrando la participación de las proteínas CRISP en diferentes etapas del proceso de fertilización y su relevancia para la fertilidad masculina, en la presente Tesis decidimos avanzar en nuestras investigaciones explorando el posible empleo de las CRISP para el desarrollo de nuevas estrategias anticonceptivas como así también profundizar nuestros conocimientos sobre el funcionamiento de los miembros de esta familia a través de la generación y caracterización de líneas murinas genéticamente modificadas. Los resultados obtenidos forman parte de tres capítulos cuyos resultados más importantes se resumen a continuación.

El primer capítulo describe, por primera vez, la identificación y caracterización de una proteína CRISP de expresión epididimaria en perro, una especie con alto crecimiento poblacional y, por ende, de interés sanitario. Nuestras observaciones muestran que la proteína CRISP canina identificada se asocia a la superficie de los espermatozoides y permanece asociada luego de la capacitación, relocalizando al segmento ecuatorial de la cabeza involucrado en la fusión de gametas, apoyando la idea de que, al igual que las CRISP homólogas en otras especies, la proteína CRISP canina identificada participe también en el proceso de fertilización. Al respecto, nuestros resultados mostrando que la exposición de los espermatozoides eyaculados caninos al anticuerpo utilizado para la identificación de la proteína inhibe significativamente la penetración del cúmulus en un ensayo heterólogo, apoyan el rol de la CRISP canina en el proceso de fertilización y, por ende, su potencial empleo como blanco para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva para perros de ambos sexos. En ese sentido, resulta de sumo interés que esta proteína no se detecte en testículo, evitando posibles efectos tóxicos a nivel testicular y/o alteraciones hormonales que pudieran afectar la salud y/o el comportamiento del animal. Consideramos que estos resultados representan un avance significativo hacia el desarrollo de una vacuna anticonceptiva canina efectiva y segura que pueda complementar las campañas de castración destinadas a controlar la población animal y mejorar la calidad de vida tanto de los animales como de los habitantes de áreas con alta densidad de poblaciones callejeras.

El segundo capítulo de esta Tesis estuvo enfocado a la generación y caracterización de una nueva línea murina TKO para CRISP1, CRISP3 y CRISP4 que nos permitió estudiar el impacto de la ausencia simultánea de estas tres proteínas en la fertilidad masculina. A

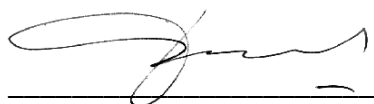
diferencia de lo observado en los animales TKO 1/2/3, los animales TKO 1/3/4 presentaron un fenotipo subfétil sin alcanzar la infertilidad. El análisis de los mecanismos subyacentes a dicha subfertilidad reveló que los machos de la nueva colonia TKO presentaban tasas normales de fertilización *in vivo* pese a observarse una motilidad espermática reducida en el fluido uterino post-apareo indicando que la disminución en la fertilidad se debería a defectos en el desarrollo embrionario, en concordancia con el fenotipo descrito para el modelo DKO 1/3. A diferencia de la normal fertilización *in vivo*, se observó una reducción drástica de la capacidad fertilizante de los espermatozoides *in vitro*, consistente con lo observado en el modelo DKO 1/4. En conjunto, el hecho de que los animales de la nueva colonia TKO carentes de las proteínas CRISP1, CRISP3 y CRISP4 no sólo no hayan alcanzado la infertilidad previamente observada para los TKO 1/2/3, sino que tampoco hayan exhibido un fenotipo correspondiente a la sumatoria de los observados en las colonias DKO 1/3 y DKO 1/4, revela que el fenotipo reproductivo resultante no depende solamente de cada proteína delecionada sino también de las restantes proteínas delecionadas simultáneamente. Estos resultados subrayan la necesidad de estudiar diferentes modelos múltiples KO para esclarecer los mecanismos de redundancia y compensación funcional que operan entre los miembros de una familia de proteínas.

Por último, el tercer capítulo de esta Tesis estuvo enfocado a investigar los mecanismos que conducen a los defectos en el desarrollo embrionario detectados en todos los modelos carentes de las proteínas CRISP1 y CRISP3. El hecho de que las alteraciones en el desarrollo embrionario se observaran tanto luego de una inseminación uterina como una fertilización *in vitro* reveló que los defectos que llevaban a este fenotipo ya se encontrarían presentes en los espermatozoides epididimarios, excluyendo una contribución significativa de las proteínas que se asocian a los espermatozoides en el momento de la eyaculación. Uno de los hallazgos más interesantes de este capítulo fue que ovocitos sin cúmulus ni ZP fertilizados *in vitro* por espermatozoides DKO 1/3 no solo exhibieran defectos en su desarrollo embrionario sino un arresto en Metafase II no asociado a defectos en la activación ovocitaria sino a un aumento en la fragmentación del ADN espermático. El hecho de que los espermatozoides control expuestos tanto a fluidos de animales DKO 1/3 como a fluidos controles en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  presentaran mayores niveles de fragmentación, junto a los mayores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  detectados en los espermatozoides mutantes, nos llevaron a

proponer que una desregulación en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  sería la responsable de los mayores niveles de fragmentación de ADN en los espermatozoides DKO 1/3 que llevan al retraso en el reinicio de la meiosis y, en consecuencia, a los defectos en el desarrollo embrionario temprano. Estos hallazgos proponen un novedoso mecanismo de mantenimiento de la integridad del DNA durante la maduración epididimaria en el cual la regulación del calcio juega un rol esencial y muestran, claramente, que el epidídimo no estaría involucrado solamente en la conocida adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides sino también en mantener la integridad del ADN espermático y garantizar el correcto desarrollo embrionario de los ovocitos fertilizados. Dada la conservación evolutiva de la familia de proteínas CRISP y su presencia en los espermatozoides humanos, es posible que mecanismos similares a los propuestos en estos capítulos estén involucrados en el proceso de embriogénesis humana, particularmente en casos de infertilidad inexplicada asociada a fragmentación del ADN espermático. Estas observaciones cobran especial relevancia considerando que en el humano los genes *Crisp* están localizados muy cercanamente dentro del mismo cromosoma, siendo posible que existan individuos carentes de varias proteínas CRISP simultáneamente.

En conjunto, consideramos que los resultados presentados en esta Tesis contribuyen a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de fertilización y embriogénesis en mamíferos a la vez que brindan valiosas herramientas para el desarrollo de nuevos métodos tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.

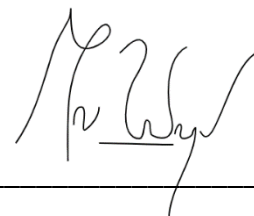
Los resultados obtenidos en esta Tesis forman parte de un manuscrito ya publicado en la revista *eLife* (Sulzyk *et al.*, 2025) y otros dos en preparación.



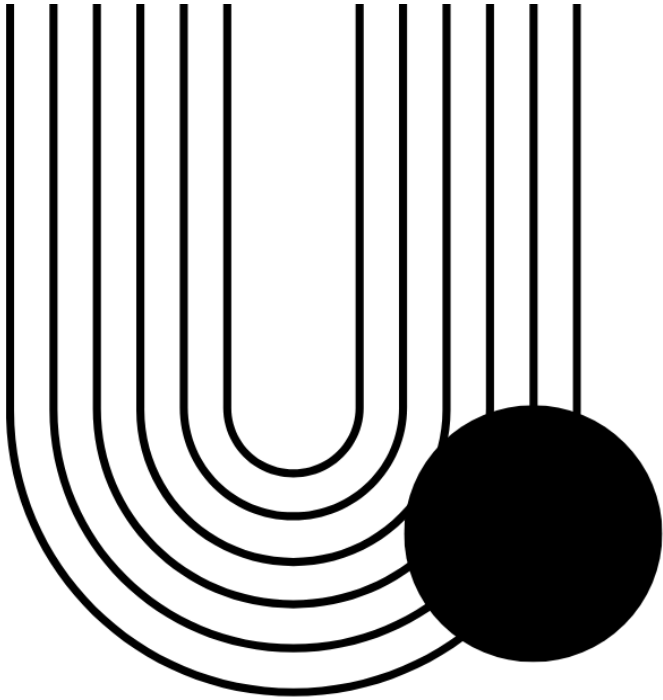
Dra. Patricia S. Cuasnicú  
Directora de tesis



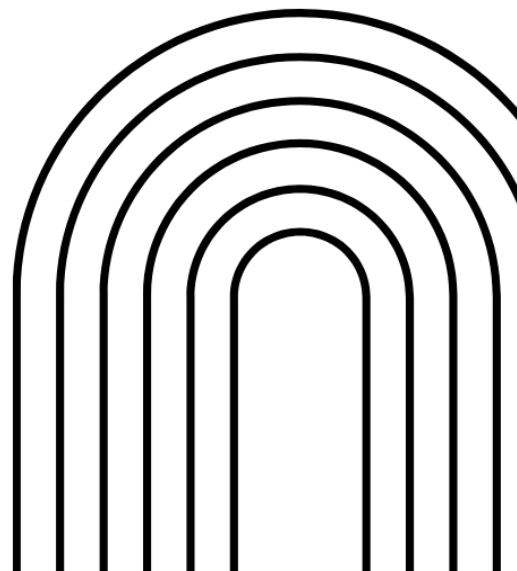
Lic. Valeria Sulzyk



Dra. Mariana Weigel Muñoz  
Directora adjunta de tesis

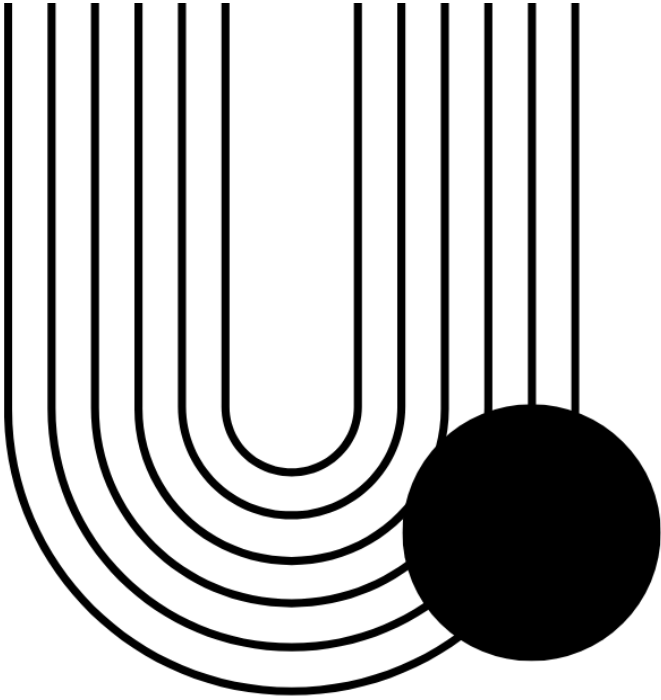


# Abreviaturas

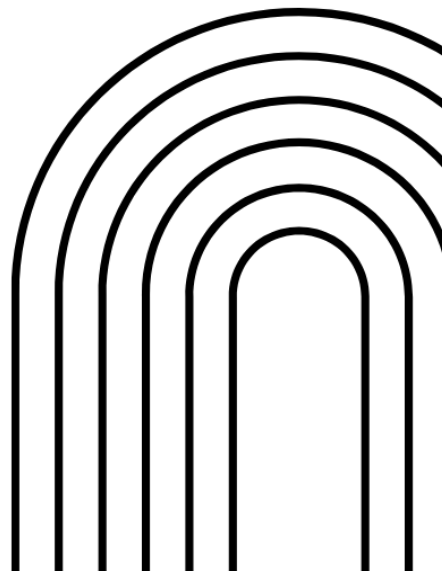


AMPc	AMP cíclico
BEB	Barrera hemato-epididimaria
COC	Complejo Cumulus-Ovocito
cCRISP	Proteína CRISP canina
CRISP	<i>Cysteine-Rich Secretory Protein</i>
CI	Cuerpos de Inclusión
CP	Corpúsculo Polar
CKO	Cuadruple <i>knockout</i>
DKO	Doble <i>knockout</i>
hCRISP	Proteína CRISP humana
HA	Hiperactivación
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
KO	<i>Knockout</i>
MII	Metafase II
MCI	Macizo Celular Interno
RA	Reacción Acrosomal
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
P4	Progesterona
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína quinasa A
UTJ	Unión útero-tubárica
RyR	Receptores de Ryanodina
S2	<i>Signature 2</i>

SI	Segmento Inicial
sAC	Adenilato Ciclasa soluble
SE	Segmento ecuatorial
SFK	Src familia de quinasas
TKO	Triple <i>knockout</i>
ZP	Zona Pellucida
pTyr	Fosforilación en tirosina
WB	<i>Western Blot</i>



# Referencias



- 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.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., et al. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *World J. Mens. Health* 38, 412.
- Aitken RJ, De luliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010 Jan;16(1):3-13.
- Aitken, R. John and Brett Nixon. 2013. "Sperm Capacitation: A Distant Landscape Glimpsed but Unexplored." *Molecular Human Reproduction* 19(12):785–93.
- 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.
- Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, De la Vega-Beltran JL, Da Ros VG, Greer PA, Darszon A, Krapf D, Salicioni AM, Cuasnicu PS, Visconti PE. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development.* 2016 Jul 1;143(13):2325-33. doi: 10.1242/dev.136499.
- Anup, Abraham and Chandler E, Douglas. 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.
- Arévalo L, Brukman NG, Cuasnicú PS, Roldan ERS. Evolutionary analysis of genes coding for Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) in mammals. *BMC Evol Biol.* 2020 Jun 8;20(1):67.
- 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.
- 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*
- Austin, C. R. 1952. "The Capacitation of the Mammalian Sperm." *Nature* 170(4321):326.
- Austin, CR. 1982. "The Egg." Cambridge University Press
- Austin, C. R., & Short, R. V. (Eds.). (1972). *Reproduction in mammals: Volume 1, Germ cells and fertilization* (Reproduction in Mammals Series, Series No. 1, Vol. 1, 177 pp.). Cambridge University Press.
- 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.
- 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.
- Balbach M, Ghanem L, Violante S, Kyaw A, Romarowski A, Cross JR, Visconti PE, Levin LR, Buck J. Capacitation induces changes in metabolic pathways supporting motility of epididymal and ejaculated sperm. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jun 27;11:1160154.
- 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.
- Basile, N., Vime, P., Florensa, M., Aparicio Ruiz, B., García Velasco, J. A., Remohí, J. and Meseguer, M. (2015). The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum. Reprod.* 30, 276–283.
- 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. Michael. 2004. "Enigmas of Mammalian Gamete Form and Function." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79(2):429–60.
- 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.
- Belardin L, Camargo M, Intasqui P, Antoniassi M, Fraietta R, Bertolla R. Cysteine-rich secretory protein 3: inflammation role in adult varicocele. *Andrology.* 2019 Jan;7(1):53-61.
- 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.
- Bianchi E, Wright GJ. Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Feb 5;370(1661):20140101.
- 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.
- Björkgren, I. and Sipilä, P. (2019). The impact of epididymal proteins on sperm function. *Reproduction* 158, R155–R167.

- Borges, Beatriz C., David Garcia-Galiano, Sanseray da Silveira Cruz-Machado, Xingfa Han, Galina B. Gavrulina, 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.
- Brackett, B. G., Hall, J. L. and Oh, Y. K. (1978). In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil. Steril.* 29, 571–82.
- 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.
- Brukman, N. G., Miyata, H., Torres, P., Lombardo, D., Caramelo, J. J., Ikawa, M., Da Ros, V. G. and Cuasnicú, P. S. (2016). Fertilization defects in sperm from Cysteine-rich secretory protein 2 (Crisp2) knockout mice: implications for fertility disorders. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 240–51.
- Brukman NG, Nakajima KP, Valansi C, Flyak K, Li X, Higashiyama T, Podbilewicz B. A novel function for the sperm adhesion protein IZUMO1 in cell-cell fusion. *J Cell Biol.* 2023 Feb 6;222(2):e202207147.
- Bu Y, Wang P, Li S, Li L, Zhang S, Wei H. "Semen Protein CRISP3 Promotes Reproductive Performance of Boars through Immunomodulation." *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 14;25(4):2264.
- Buffone, Mariano G, Takashi W. Ijiri, Wenlei Cao, Tanya Merdushev, 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.
- 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, D., Cohen, D. J., Maldera, J. A., Dematteis, A. and Cuasnicu, P. S. (2007). A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol. Reprod.* 77, 848–54.
- 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.
- Cameo, M. S. and Blaquier, J. A. (1976). Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocrinol.* 69, 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.
- 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, G., Brukman, N. G., Weigel Muñoz, M., Battistone, M. A., Guazzone, V. A., Ikawa, M., Haruhiko, M., Lustig, L., Breton, S. and Cuasnicu, P. S. (2018). Impaired male fertility and abnormal epididymal epithelium differentiation in mice lacking CRISP1 and CRISP4. *Sci. Rep.* 8, 17531.
- Casanovas, A., Ribas-Maynou, J., Lara-Cerrillo, S., Jimenez-Macedo, A. R., Hortal, O., Benet, J., Carrera, J. and García-Peiró, A. (2019). Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil. Steril.* 111, 699-707.e1.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., et al. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* 119(7):2074-85.
- 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.
- Chang, Haixin and Susan S. Suarez. 2011. "Two Distinct Ca<sup>2+</sup> Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice." *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.
- Chastant-Maillard S, Viaris de Lesegno C, Chebrou M, Thoumire S, Meylheuc T, Fontbonne A, Chodkiewicz M, Saint-Dizier M, Reynaud K. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23(3):391-402.
- 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.
- Cheng JM, Tang JX, Li J, Wang YQ, Wang XX, Zhang Y, Chen SR, Liu YX. Role of WNT signaling in epididymal sperm maturation. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Feb;35(2):229-236.
- 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.
- Chu, C., Yu, L., Henry-Berger, J., Ru, Y.-F., Kocer, A., Champroux, A., Li, Z.-T., He, M., Xie, S.-S., Ma, W.-B., et al. (2020). Knockout of glutathione peroxidase 5 down-regulates the piRNAs in the caput epididymidis of aged mice. *Asian J. Androl.* 22, 590.

- 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 $\gamma$  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., Rochwerger, L., Ellerman, D. A., Morgenfeld, M. M., Busso, D. and Cuasnicú, P. S. (2000a). Relationship between the association of rat epididymal protein DE with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 180–8.
- Cohen, D. J., Ellerman, D. A. and Cuasnicú, P. S. (2000b). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol. Reprod.* 63, 462–8.
- 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.
- Cran DG, Moor RM, Irvine RF. Initiation of the cortical reaction in hamster and sheep oocytes in response to inositol trisphosphate. *J Cell Sci.* 1988 Sep;91 ( Pt 1):139-44.
- 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
- 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 *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice.* Springer US.
- Cummins JM, Orgebin-Crist MC. Investigations into the fertility of epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 1971 Aug;5(1):13-9. doi: 10.1093/biolreprod/5.1.13. PMID: 5128200.
- Cummins JM, Yanagimachi R. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Research.* 1982;5:239–256.
- Curci, L., Brukman, N. G., Weigel Muñoz, M., Rojo, D., Carvajal, G., Sulzyk, V., Gonzalez, S. N., Rubinstein, M., Da Ros, V. G. and Cuasnicú, P. S. (2020). Functional redundancy and compensation: Deletion of multiple murine Crisp genes reveals their essential role for male fertility. *FASEB J.*

- Dai P, Zou M, Cai Z, Zeng X, Zhang X, Liang M. pH Homeodynamics and Male Fertility: A Coordinated Regulation of Acid-Based Balance during Sperm Journey to Fertilization. *Biomolecules*. 2024 Jun 12;14(6):685.
- Da Ros, V. G., Maldera, J. A., Willis, W. D., Cohen, D. J., Goulding, E. H., Gelman, D. M., Rubinstein, M., Eddy, E. M. and Cuasnicu, P. S. (2008). Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev. Biol.* 320, 12–18.
- Da Ros, V. G., Muñoz, M. W., Battistone, M. A., Brukman, N. G., Carvajal, G., Curci, L., Gómez-Ellas, M. D., Cohen, D. B. J. and Cuasnicu, P. S. (2015). From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammalian fertilization. *Asian J. Androl.* 17, 711–5.
- Darszon A, Takuya Ni, Beltran C, and Treviño CL. 2011. “Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa.” *Physiological Reviews* 91(4):1305–55.
- 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.
- Delgado-Bermúdez A, Yeste M, Bonet S, Pinart E. A Review on the Role of Bicarbonate and Proton Transporters during Sperm Capacitation in Mammals. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 6;23(11):6333.
- 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.
- Deneke VE, Blaha A, Lu Y, Suwita JP, Draper JM, Phan CS, Panser K, Schleiffer A, Jacob L, Humer T, Stejskal K, Krssakova G, Roitinger E, Handler D, Kamoshita M, Vance TDR, Wang X, Surm JM, Moran Y, Lee JE, Ikawa M, Pauli A. A conserved fertilization complex bridges sperm and egg in vertebrates. *Cell.* 2024 Dec 12;187(25):7066-7078.e22.
- Deneke VE, Pauli A. The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2021 Oct 6;37:391-414.
- 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.
- Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1-2):26-47.
- 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., Buhi, W. C., Benson, S., Scoggin, K. E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M. and Troedsson, M. H. T. (2011). Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biol. Reprod.* 85, 157–164.
- Doty AL, Miller LMJ, Fedorka CE, Troedsson MHT. The role of equine seminal plasma derived cysteine rich secretory protein 3 (CRISP3) in the interaction between polymorphonuclear neutrophils

- (PMNs) and populations of viable or dead spermatozoa, and bacteria. *Theriogenology*. 2024 Apr 15;219:22-31.
- 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, Paul Duffy, and Jan Buetow. 1994. *Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse*. Vol. 50.
- Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, Fissore R, Madoux S, Ozil JP. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. *Dev Biol*. 2002 Oct 15;250(2):280-91.
- 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. *Gametes - The Spermatozoon. Cambridge Reviews in Human Reproduction*.
- 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.
- Eppig, John J. 1979. "FSH Stimulates Hyaluronic Acid Synthesis by Oocyte-Cumulus Cell Complexes from Mouse Preovulatory Follicles [13]." *Nature* 281(5731):483–84.
- 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 Ability<sup>1</sup>." *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 &quot;DE&quot; 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.
- Erbach, G. T., Lawitts, J. A., Papaioannou, V. E. and Biggers, J. D. (1994). Differential Growth of the Mouse Preimplantation Embryo in Chemically Defined Media<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 50, 1027–1033.
- Ernesto, J. I., Weigel Muñoz, M., Battistone, M. A., Vasen, G., Martínez-López, P., Orta, G., Figueiras-Fierro, D., De la Vega-Beltran, J. L., Moreno, I. A., Guidobaldi, H. A., et al. (2015). CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J. Cell Biol.* 210, 1213–24.

- Esbert, M., Pacheco, A., Soares, S. R., Amorós, D., Florensa, M., Ballesteros, A. and Meseguer, M. (2018). High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology* 6, 697–706.
- Esteves, S. C., Santi, D. and Simoni, M. (2020). An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology* 8, 53–81.
- 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).
- 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.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24, 59–66.
- Florman, H. M., & Ducibella, T. (2006). "Fertilization in mammals. En J. D. Neill (Ed.), *Physiology of reproduction*" (Vol. 1, pp. 55–112). Elsevier.
- Florman, H. M. and Fissore, R. A. (2015). "Fertilization in Mammals. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*", pp. 149–196. Elsevier.
- Fomichova O, Oliveira PF, Bernardino RL. Exploring the interplay between inflammation and male fertility. *FEBS J.* 2024 Dec 19.
- Foster JA, Gerton GL. The Acrosomal Matrix. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;220:15-33.
- 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. "Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro". *J Reprod Fertil.* 1983 Nov;69(2):539-53.
- Fraser, L. 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, L. R. and Drury, L. M. (1975). "The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs". *Biol. Reprod.* 13, 513–8.
- 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.
- 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.

- 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.
- Fujiwara N, Ezoe K, Coticchio G, Cimadomo D, Rienzi L, Kato K. "Diverse developmental velocities of blastocyst development emerge as early as a few hours after insemination: morphokinetic analysis of fertilisation in days 4-7 blastocysts." *J Assist Reprod Genet.* 2025 Apr 16.
- 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.
- Gaikwad AS, Lee Loh K, O'Connor AE, Reid HH, O'Bryan MK. Expression and purification of recombinant mouse CRISP4 using a baculovirus system. *Protein Expr Purif.* 2020 Mar;167:105543.
- 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.
- Gao F, Wang P, Wang K, Fan Y, Chen Y, Chen Y, Ye C, Feng M, Li L, Zhang S, Wei H. Investigation Into the Relationship Between Sperm Cysteine-Rich Secretory Protein 2 (CRISP2) and Sperm Fertilizing Ability and Fertility of Boars. *Front Vet Sci.* 2021 Apr 30;8:653413.
- 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.
- Gawecka, J. E., Boaz, S., Kaspersen, K., Nguyen, H., Evenson, D. P. and Ward, W. S. (2015). Luminal fluid of epididymis and vas deferens contributes to sperm chromatin fragmentation. *Hum. Reprod.* 30(12):2725-36.
- Gholami, D., Amirmahani, F., Yazdi, R. S., Hasheminia, T. and Teimori, H. (2021). MiR-182-5p, MiR-192-5p, and MiR-493-5p Constitute a Regulatory Network with CRISP3 in Seminal Plasma Fluid of Teratozoospermia Patients. *Reprod. Sci.* 28, 2060–2069.
- Gholami D, Amirmahani F, Yazdi RS, Nemati-Dehkordi M, Teimori H. Characterizing the Impact of Dysregulated Micrnas on CRISP3 Isoforms in Male Infertility. *Reprod Sci.* 2024 Dec;31(12):3768-3778.
- Gholami D, Salman Yazdi R, Jami MS, Ghasemi S, Sadighi Gilani MA, Sadeghinia S, Teimori H. The expression of Cysteine-Rich Secretory Protein 2 (CRISP2) and miR-582-5p in seminal plasma fluid and spermatozoa of infertile men. *Gene.* 2020 Mar 10;730:144261.
- Gibbs, G. M., Scanlon, M. J., Swarbrick, J., Curtis, S., Gallant, E., Dulhunty, A. F. and O'Bryan, M. K. (2006). The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 4156–63.

- Gibbs, G. M., Roelants, K. and O'Bryan, M. K. (2008). "The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense". *Endocr. Rev.* 29, 865–97.
- Gibbs, G. M., Orta, G., Reddy, T., Koppers, A. J., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Lo, J. C. Y., Veldhuis, N., Jamsai, D., McIntyre, P., et al. (2011). Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7034–9.
- 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.
- 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.
- González LN, Giaccagli MM, Herzfeld JD, Cuasnicú PS, Da Ros VG, Cohen DJ. A side-by-side comparison of different capacitation media in developing mouse sperm fertilizing ability. *Sci Rep.* 2024 Jun 21;14(1):14287.
- Gonzalez, S. N., Sulzyk, V., Weigel Muñoz, M. and Cuasnicu, P. S. (2021). Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) are Key Players in Mammalian Fertilization and Fertility. *Front. Cell Dev. Biol.* 9,.
- González-Marín, C., Gosálvez, J. and Roy, R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14026–14052.
- Gonzalez-Montalban N, Natalello A, García-Fruitós E, Villaverde A, Doglia SM. In situ protein folding and activation in bacterial inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Jul 1;100(4):797-802
- 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.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005 Jan;20(1):226-30.
- Green DP, Hockaday AR. The histochemical localization of acrosin in guinea-pig sperm after the acrosome reaction. *J Cell Sci.* 1978 Aug;32:177-84.
- Haendler, B., Habenicht, U. F., Schwidetzky, U., Schüttke, I. and Schleuning, W. D. (1997). Differential androgen regulation of the murine genes for cysteine-rich secretory proteins (CRISP). *Eur. J. Biochem.* 250, 440–6.
- Haendler, B., J. Krätzschmar, 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)
- 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.

- 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.
- Hanada, A. and M. C. Chang. 1972. "Penetration of Zone-Free Eggs by Spermatozoa of Different Species." *Biology of Reproduction* 6(2):300–309.
- 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  $[Ca^{2+}]_i$  Oscillations and Cyclical Transitions in Flagellar Beating." *Journal of Biological Chemistry* 279(44):46315–25.
- 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 (AEG1)." *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, 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.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS, Smith RJ. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet.* 2010 Nov;18(11):1178-84.
- 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.
- 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.

- 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.
- Hu J, Merriner DJ, O'Connor AE, Houston BJ, Furic L, Hedger MP, O'Bryan MK. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Mol Hum Reprod.* 2018 Mar 1;24(3):111-122.
- Hunter, Ronald H. F. 1995. "Human Sperm Reservoirs and Fallopian Tube Function: A Role for the Intramural Portion?" *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 74(9):677–81.
- Hwang JY, Chung JJ. CatSper Calcium Channels: 20 Years On. *Physiology (Bethesda).* 2023 May 1;38(3):0.
- Hyslop LA, Nixon VL, Levasseur M, Chapman F, Chiba K, McDougall A, Venables JP, Elliott DJ, Jones KT. Ca(2+)-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev Biol.* 2004 May 1;269(1):206-19.
- 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.
- Isotani A, Matsumura T, Ogawa M, Tanaka T, Yamagata K, Ikawa M, Okabe M. A delayed sperm penetration of cumulus layers by disruption of acrosin gene in rats. *Biol Reprod.* 2017 Jul 1;97(1):61-68.
- Jalkanen, J., Huhtaniemi, I. and Poutanen, M. (2005). Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol. Reprod.* 72, 1268–74.,
- 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.
- Jodar, M. (2019). Sperm and seminal plasma RNAs: what roles do they play beyond fertilization? *Reproduction* 158, R113–R123.
- 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.
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). Chapter 2 - The female reproductive system. En R. E. Jones & K. H. Lopez (Eds.), *Human reproductive biology* (4.ª ed., pp. 23–50). Academic Press.
- Juárez-Rojas L, Casillas F, López A, Betancourt M, Ommati MM, Retana-Márquez S. Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. *Andrologia.* 2022 May;54(4):e14367.
- 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.

- Kasahara, M., Figueroa, F. and Klein, J. (1987). Molecular cloning of a testis-specific gene from mouse chromosome 17. *Transplant. Proc.* 19, 815–6.
- 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.
- Kawakami E, Arai T, Oishi I, Hori T, Tsutsui T. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J Vet Med Sci.* 2000 Jan;62(1):65-8.
- Kawakami E, Hori T, Tsutsui T. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J Vet Med Sci.* 1998 Feb;60(2):197-202.
- 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*
- Kim, Y. 1992 "Assessment of the fertilizing capacity of domestic animal spermatozoa by hamster test I. Comparison of storage temperatures for boar sperm and results of hamster test between boar and dog sperm" *Korean J Vet Res*; 32(3):435-450.
- Kim Yong-jun, Lee Hae-iee 1993. "Semen treatment to enhance the use of hamster test in the dog" *Korean J Vet Res*; 33(2): 337~343
- Kim, Kye-Seong, James A. Foster, and George L. Gerton. 2001. "Differential Release of Guinea Pig Sperm Acrosomal Components During Exocytosis<sup>1</sup>." *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 Mouse<sup>1</sup>." *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.
- Kohane, A. C., M. S. Cameo, L. Piñeiro, J. C. Garberi, and J. A. Blaquier. 1980a. "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. 1980b. "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.
- 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 A., Poliandri A., Cabrera-Sharp V., Dacheux J.L., Poutanen M., and Huhtaniemi I. 2012. "Epididymal Protein Rnase10 Is Required for Post-Testicular Sperm Maturation and Male

- Fertility." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(10):4198–4209.
- La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N. and Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev. Biol.* 411, 172–182.
- Lacham-Kaplan O and Trounson A. (1994). "Embryo development capacity of oocytes fertilized by immature sperm and sperm treated with motility stimulants." *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 113–116.
- Lacham-Kaplan O and Trounson A. (1991). "Fertilizing capacity of epididymal and testicular spermatozoa microinjected under the zona pellucida of the mouse oocyte". *Mol. Reprod. Dev.* 29, 85–93.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- 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.
- Lee KH, Hwang JY. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and male fertility: a target for a new male contraceptive system. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2024 Apr 28;28(1):171-183.
- Lefièvre, L, SJ Conner, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, and Barratt CLR. 2004. "Four Zona Pellucida Glycoproteins Are Expressed in the Human." *Human Reproduction* 19(7):1580–86.
- Légaré C, Bérubé B, Boué F, Lefièvre L, Morales CR, Ell-Alfy M, and Sullivan R. 1999. "Hamster Sperm Antigen P26h Is a Phosphatidylinositol-Anchored Protein." *Molecular Reproduction and Development* 52(2):225–33.
- Légaré C, Boudreau L, Thimon V, Thabet M, Sullivan R. "Vasectomy affects cysteine-rich secretory protein expression along the human epididymis and its association with ejaculated spermatozoa following vasectomy surgical reversal." *J Androl.* 2010 Nov-Dec;31(6):573-83.
- Légaré C, Cloutier F, Makosso-Kallyth S, Laflamme N, Jarvi K, Tremblay RR, Sullivan R. "Cysteine-rich secretory protein 1 in seminal plasma: potential biomarker for the distinction between obstructive and nonobstructive azoospermia". *Fertil Steril.* 2013 Nov;100(5):1253-60.
- Li L, Lu X, Dean J. "The maternal to zygotic transition in mammals". *Mol Aspects Med.* 2013 Oct;34(5):919-38. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.003 .
- 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.
- 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’Byran. 2019. "CRISP2 Is a Regulator of Multiple Aspects of Sperm Function and Male Fertility." *Endocrinology* 160(4):915–24.
- 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.
- Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem.* 2007 Jun 29;282(26):18945-52.
- Liu S, Holmes AD, Katzman S, Sharma U. A sperm-enriched 5'fragment of tRNA-Valine regulates preimplantation embryonic transcriptome and development. *bioRxiv [Preprint]*. 2024 Aug 27:2024.08.08.607197.

- Ma H, Zhang BL, Liu BY, Shi S, Gao DY, Zhang TC, Shi HJ, Li Z, Shum WW. Vitamin K2-Dependent GGCX and MGP Are Required for Homeostatic Calcium Regulation of Sperm Maturation. *iScience*. 2019 Apr 26;14:210-225.
- Ma, Y., Wang, J., Qiao, F. and Wang, Y. (2022). Extracellular vesicles from seminal plasma improved development of *in vitro* -fertilized mouse embryos. *Zygote* 30, 619–624.
- Machado DA, Ontiveros AE, Behringer RR. Mammalian uterine morphogenesis and variations. *Curr Top Dev Biol*. 2022;148:51-77.
- Maeda, T., Sakashita, M., Ohba, Y. and Nakanishi, Y. (1998). Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 140–6.
- 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.
- Maggiulli, R., Ubaldi, F., Rienzi, L. (2012). Oocyte Denuding. In: Nagy, Z., Varghese, A., Agarwal, A. (eds) *Practical Manual of In Vitro Fertilization*. Springer, New York, NY.
- Mahé C, Zlotkowska AM, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X, Schoen J, Saint-Dizier M. "Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct". *Biol Reprod*. 2021 Aug 3;105(2):317-331.
- Mahi CA, Yanagimachi R. "Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro". *J Exp Zool*. 1976 May;196(2):189-96.
- Mahony, Mary C. and TanYa Gwathmey. 1999. "Protein Tyrosine Phosphorylation during Hyperactivated Motility of Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*) Spermatozoa1." *Biology of Reproduction* 60(5):1239–43.
- Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):565-73.
- 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.
- Manfrevola F, Ferraro B, Sellitto C, Rocco D, Fasano S, Pierantoni R, Chianese R. CRISP2, CATSPER1 and PATE1 Expression in Human Asthenozoospermic Semen. *Cells*. 2021 Jul 31;10(8):1956.

- Marinero, J. A. (2023). Sperm DNA fragmentation and its interaction with female factors. *Fertil. Steril.* 120, 715–719.
- 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.
- Martin, J. H., Aitken, R. J., Bromfield, E. G. and Nixon, B. (2019). DNA damage and repair in the female germline: contributions to ART. *Hum. Reprod. Update* 25, 180–201.
- Masai T, Delnatte A, Dendievel M, Nonclercq D, Frau A, Simon JF, Arcolia V, Wattiez R, Leroy B, Cuasnicu PS, Lybaert P, Hennebert E. Novel insights into human CRISP2: localization in reproductive tissues and sperm, and molecular characterization. *Biol Reprod.* 2025 Mar 13:ioaf051.
- Massei G, Miller LA. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology.* 2013 Nov;80(8):829-38.
- Matsudaira, Paul. 1990. "Limited N-Terminal Sequence Analysis." *Methods in Enzymology* 182(C):602–13.
- Mehta P, Singh R. Small RNAs: an ideal choice as sperm quality biomarkers. *Front Reprod Health.* 2024 Feb 9;6:1329760.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K. M., Ramsing, N. B. and Remohi, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.
- Miller, Brent J., Elisabeth Georges-Labouesse, Paul Primakoff, and Diana G. Myles. 2000. "Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin A6β1 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.
- Miya V, Kumar C, Breed AA, Idicula-Thomas S, Pathak BR. Mammalian cysteine-rich secretory proteins interact with plasma membrane Ca<sup>2+</sup> exporter PMCA4b. *Andrology.* 2024 Jul;12(5):1096-1110.
- 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.
- Miyazaki, S. (2006). Thirty years of calcium signals at fertilization. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 233–243.
- Mizuki, N. and Kasahara, M. (1992). Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89, 25–32.
- Mulnard J, Huygens R. Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1978 Apr;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.
- 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, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R. and Okabe, M. (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol. Reprod.* 94, 80.
- 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.
- Nagashima JB, Sylvester SR, Nelson JL, Cheong SH, Mukai C, Lambo C, Flanders JA, Meyers-Wallen VN, Songsasen N, Travis AJ. Live Births from Domestic Dog (*Canis familiaris*) Embryos Produced by In Vitro Fertilization. *PLoS One*. 2015 Dec 9;10(12):e0143930.
- 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 FA, Aguila L, Martin-Hidalgo D, Tourzani DA, Luque GM, Ardestani G, Garcia-Vazquez FA, Levin LR, Buck J, Darszon A, Buffone MG, Mager J, Fissore RA, Salicioni AM, Gervasi MG, Visconti PE. Transient Sperm Starvation Improves the Outcome of Assisted Reproductive Technologies. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Nov 5;7:262.
- Naveed M, Shen Z, Bao J. Sperm-borne small non-coding RNAs: potential functions and mechanisms as epigenetic carriers. *Cell Biosci*. 2025 Jan 17;15(1):5.
- Newcombe, N., Clulow, J., Man, S. Y., and Jones, R. C. (2000). pH and Bicarbonate in the Ductuli Efferentes Testis of the Rat. *Int. J. Androl.* 23, 46–50. doi:10.1046/j.1365-2605.2000.00204.x
- Newman, H., Catt, S., Vining, B., Vollenhoven, B. and Horta, F. (2022). DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: a systematic review. *Mol. Hum. Reprod.* 28.
- Nguyen, H., Ribas-Maynou, J., Wu, H., Quon, B., Inouye, T., Walker, B., Langaman, C., Huang, T. T. F. and Ward, W. S. (2023). Low levels of mouse sperm chromatin fragmentation delay embryo development. *Biol. Reprod.* 109, 635–643.
- 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, 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, M. A., Wu, L., Bang, H. J., Jelinsky, S. A., Roberts, K. P., Turner, T. T., Kopf, G. S. and Johnston, D. S. (2006). Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol. Reprod.* 74, 984–91.
- 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'Flaherty, C., 2019. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology* 7 (5), 662–668.
- O'Rand, M. G., J. E. Welch, and S. J. Fisher. 1986. "Sperm Membrane and Zona Pellucida Interactions during
- 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, F. K., Andretta, R. R. and Spaine, D. M. (2020). One day is better than four days of ejaculatory abstinence for sperm function. *Reprod. Fertil.* 1, 1–10.
- Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol.* 2009 Dec;83(1-2):2-7.
- 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.
- Orgebin-Crist, M. C. (1968). Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: delayed fertilization in does inseminated with epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 16, 29–33.
- Orgebin-Crist, M. C. and Jahad, N. (1977). Delayed cleavage of rabbit ova after fertilization by young epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 16, 358–62.
- Overstreet JW, Bedford JM. Embryonic mortality in the rabbit is not increased after fertilization by young epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 1976 Aug;15(1):54-7.
- Overstreet JW, Lin Y, Yudin AI, Meyers SA, Primakoff P, Myles DG, Katz DF, Vandervoort CA. Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod.* 1995 Jan;52(1):105-14.
- 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.
- Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, Barone C, Galileo DS, Strehler EE, Martin-DeLeon PA. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biol Reprod.* 2013 Jul 11;89(1):6.
- 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 Mouse<sup>1</sup>." *Biology of Reproduction* 35(3):608–17.
- Perez-Martinez, Silvina, 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.

- Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J Androl.* 2003 May-Jun;24(3):423-37.
- 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.
- Prins, Gail S. and Mark Lindgren. 2014. *Accessory Sex Glands in the Male*. Vol. 1.
- 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.
- 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.
- Ramathal, C., Reijo Pera, R. A. and Chavez, S. L. (2015). Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, pp. 233–265. Elsevier.
- Rankin, T. L., M. O'Brien, E. Lee, K. Wigglesworth, J. Eppig, and J. Dean. 2001. "Defective Zonae Pellucidae in Zp2-Null Mice Disrupt Folliculogenesis, Fertility and Development." *Development* 128(7):1119–26.
- 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.
- 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.
- 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, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. and Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603–609.
- Roan, Nadia R., Nathallie Sandi-Monroy, Nargis Kohgadai, Shariq M. Usmani, Katherine G. Hamil, Jason Neidleman, Mauricio Montano, Ludger Ständker, Annika Röcker, Marielle Cavois, 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, B. and Hinton, B. T. (2015). The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, pp. 691–771. 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., Cohen, D. J. and Cuasnicú, P. S. (1992). Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev. Biol.* 153, 83–90.
- 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).
- Romarowski A, Fejzo J, Nayyab S, Martin-Hidalgo D, Gervasi MG, Balbach M, Violante S, Salicioni AM, Cross J, Levin LR, Buck J, Visconti PE. Mouse sperm energy restriction and recovery (SER) revealed novel metabolic pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Aug 15;11:1234221.
- 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, D. and Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.* 93, 1027–1036.
- 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
- 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.
- Schäfer-Somi S, Tichy A. Canine post-thaw sperm quality can be predicted by using CASA, and classification and regression tree (CART)-analysis. *Pol J Vet Sci.* 2019 Mar;22(1):51-59
- Schambony, A., Gentzel, M., Wolfes, H., Raida, M., Neumann, U., and Töpfer-Petersen, E. (1998). Equine CRISP-3: Primary Structure and Expression in the Male Genital Tract. *Biochim. Biophys. Acta* 1387, 206–216. doi:10.1016/s0167-4838(98)00122-8
- 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.
- Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol.* 1995;30:21-62.

- Schwidetzky, U., Haendler, B. and Schleuning, W. D. (1995). Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) gene. *Biochem. J.* 309 ( Pt 3), 831–6.
- Shalgi, Ruth and David M. Phillips. 1980. "Mechanics of in Vitro Fertilization in the Hamster." *Biology of Reproduction* 23(2):433–44.
- Shaman, J. A., Prisztoka, R. and Ward, W. S. (2006). Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol. Reprod.* 75, 741–8.
- 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.
- Sheng J, Gadella BM, Ollrichs NK, Kaloyanova DV, Helms JB. The less conserved metal-binding site in human CRISP1 remains sensitive to zinc ions to permit protein oligomerization. *Sci Rep.* 2021 Mar 9;11(1):5498.
- Sheng, J., Ollrichs, N. K., Geerts, W. J., Li, X., Rehman, A. U., Gadella, B. M., Kaloyanova, D. V. and Helms, J. B. (2019). Zinc binding regulates amyloid-like aggregation of GAPR-1. *Biosci. Rep.* 39,.
- Shum W, Zhang BL, Cao AS, Zhou X, Shi SM, Zhang ZY, Gu LY, Shi S. Calcium Homeostasis in the Epididymal Microenvironment: Is Extracellular Calcium a Cofactor for Matrix Gla Protein-Dependent Scavenging Regulated by Vitamins. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 17;10:827940. doi: 10.3389/fcell.2022.827940. Erratum in: *Front Cell Dev Biol.* 2022 Aug 24;10:994291.
- 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.
- Shum W, Zhang BL, Cao AS, Zhou X, Shi SM, Zhang ZY, Gu LY, Shi S. Calcium Homeostasis in the Epididymal Microenvironment: Is Extracellular Calcium a Cofactor for Matrix Gla Protein-Dependent Scavenging Regulated by Vitamins. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 17;10:827940.
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J. and Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum. Reprod.* 29, 2402–2412.
- 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.
- 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, S. 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.
- Suganuma, R., Yanagimachi, R. and Meistrich, M. L. (2005). Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum. Reprod.* 20, 3101–3108.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 414–424.
- 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.
- Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013 Oct;39(10):1431-9.
- Tomar A, Gomez-Velazquez M, Gerlini R, Comas-Armangué G, Makharadze L, Kolbe T, Boersma A, Dahlhoff M, Burgstaller JP, Lassi M, Darr J, Toppari J, Virtanen H, Kühnapfel A, Scholz M, Landgraf K, Kiess W, Vogel M, Gailus-Durner V, Fuchs H, Marschall S, Hrabě de Angelis M, Kotaja N, Körner A, Teperino R. Epigenetic inheritance of diet-induced and sperm-borne mitochondrial RNAs. *Nature.* 2024 Jun;630(8017):720-727.
- 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.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008 May-Jun;14(3):243-58.
- Trigg NA, Conine CC. Epididymal acquired sperm microRNAs modify post-fertilization embryonic gene expression. *Cell Rep.* 2024 Sep 24;43(9):114698.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques.* 2000 Jul;29(1):52, 54.
- Turunen, H. T., Sipila, P., Krutskikh, A., Toivanen, J., Mankonen, H., Hamalainen, V., Bjorkgren, I., Huhtaniemi, I. and Poutanen, M. (2012). Loss of Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) Leads to Deficiency in Sperm-Zona Pellucida Interaction in Mice. *Biol. Reprod.* 86, 1–8.
- Udby, L. 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)." *Journal of Immunological Methods* 263(1–2):43–55.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vallet-Buisan, M., Mecca, R., Jones, C., Coward, K. and Yeste, M. (2023). Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Hum. Reprod. Update* 29, 395–433.
- 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.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995a. "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. 1995b. "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., 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.
- Vitullo AD, Ozil JP. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol.* 1992 May;151(1):128-36.
- Volpert, M., Furic, L., Hu, J., O'Connor, A. E., Rebello, R. J., Keerthikumar, S., Evans, J., Merriner, D. J., Pedersen, J., Risbridger, G. P., et al. (2020). CRISP3 expression drives prostate cancer invasion and progression. *Endocr. Relat. Cancer* 27, 415–430.

- Volpert M, Mangum JE, Jamsai D, D'Sylva R, O'Bryan MK, McIntyre P. Eukaryotic expression, purification and structure/function analysis of native, recombinant CRISP3 from human and mouse. *Sci Rep*. 2014 Feb 27;4:4217.
- Vyklicka L, Lishko PV. Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. *Curr Opin Cell Biol*. 2020 Apr;63:154-161.
- W. S., O., Chen, H. Q. and Chow, P. H. (1988). Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. *Reproduction* 84, 341–344.
- Wakai, T., Mehregan, A. and Fissore, R. A. (2019). Ca<sup>2+</sup> Signaling and Homeostasis in Mammalian Oocytes and Eggs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a035162.
- Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod*. 2009 Sep;81(3):539-44.
- 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 X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003 Sep;80(3):531-5. d
- Wang Y, Yamauchi Y, Wang Z, Zheng H, Yanagimachi R, Ward MA, Yan W. Both Cauda and Caput Epididymal Sperm Are Capable of Supporting Full-Term Development in FVB and CD-1 Mice. *Dev Cell*. 2020 Dec 21;55(6):675-676.
- 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.
- Wdowiak, A., Bakalczuk, S. and Bakalczuk, G. (2015). The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Biol.* 15, 94–100.
- Weigel Muñoz, M., Battistone, A. M., Carvajal, G., Maldera, J. A., Curci, L., Torres, P., Lombardo, D., Pignataro, O. P., Da Ros, V. G. and Cuasnicu, P. S. (2018). Influence of the genetic background on the reproductive phenotype of mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Biol. Reprod*.
- Weigel Muñoz, M., Carvajal, G., Curci, L., Gonzalez, S. N. and Cuasnicu, P. S. (2019). Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology*.
- Weigel Muñoz M, Cohen DJ, Da Ros VG, González SN, Rebagliati Cid A, Sulzyk V, Cuasnicu PS. Physiological and pathological aspects of epididymal sperm maturation. *Mol Aspects Med*. 2024 Dec;100:101321.
- Weigel Muñoz, Mariana , 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.
- Weissgerber, P., Kriebs, U., Tsvilovskyy, V., Olausson, J., Kretz, O., Stoerger, C., et al. (2012). Excision of Trpv6 Gene Leads to Severe Defects in Epididymal Ca<sup>2+</sup> Absorption and Male Fertility Much like Single D541A Pore Mutation. *J. Biol. Chem.* 287, 7930–17941. doi:10.1074/jbc.m111.328286

- Wittayarat M, Kiatsomboon S, Kupthammasan N, Tipkantha W, Yimprasert S, Thongphakdee A, Panyaboriban S. Detection of Protein Biomarkers Relevant to Sperm Characteristics and Fertility in Semen in Three Wild Felidae: The Flat-Headed Cat (*Prionailurus planiceps*), Fishing Cat (*Prionailurus viverrinus*), and Asiatic Golden Cat (*Catopuma temminckii*). *Animals (Basel)*. 2024 Mar 28;14(7):1027.
- Wright GJ, Bianchi E. The challenges involved in elucidating the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals and approaches to overcome them. *Cell Tissue Res*. 2016 Jan;363(1):227-235.
- Xia, Jingsheng and Dejian Ren. 2009. "The BSA-Induced Ca(2+) Influx during Sperm Capacitation Is CATSPER Channel-Dependent." *Reproductive Biology and Endocrinology* 7.
- 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.
- 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.Knobel and J.D.Neill.
- Yanagimachi R. Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biol Reprod*. 2022 Apr 26;106(4):644-675.
- 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.
- Yao X, Liu W, Xie Y, Xi M, Xiao L. Fertility loss: negative effects of environmental toxicants on oogenesis. *Front Physiol*. 2023 Aug 4;14:1219045.
- Yoshida, M. and K. Yoshida. 2011. "Sperm Chemotaxis and Regulation of Flagellar Movement by Ca2+." *Molecular Human Reproduction* 17(8):457–65.
- Yuan, S., Schuster, A., Tang, C., Yu, T., Ortogero, N., Bao, J., Zheng, H. and Yan, W. (2016). Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development* 143, 635–47.
- 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. Vandervoort, 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.
- 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+-, Cl-- , and HCO-3-Dependent and Arylamino benzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation." *Developmental Biology* 173(2):510–20.
- Zhang M, Bromfield EG, Veenendaal T, Klumperman J, Helms JB, Gadella BM. Characterization of different oligomeric forms of CRISP2 in the perinuclear theca versus the fibrous tail structures of boar spermatozoa†. *Biol Reprod*. 2021 Nov 15;105(5):1160-1170.

- Zhang H, Martin-Deleon PA. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl.* 2003 Jan-Feb;24(1):51-8.
- 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.
- Zhang FP, Malinen M, Mehmood A, Lehtiniemi T, Jääskeläinen T, Niskanen EA, Korhonen H, Laiho A, Elo LL, Ohlsson C, Kotaja N, Poutanen M, Sipilä P, Palvimo JJ. Lack of androgen receptor SUMOylation results in male infertility due to epididymal dysfunction. *Nat Commun.* 2019 Feb 15;10(1):777.
- Zhang C, Zhou Y, Xie S, Yin Q, Tang C, Ni Z, Fei J, Zhang Y. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals the synergistic effects of  $\beta$ -defensin family members on sperm maturation in rat epididymis. *FASEB J.* 2018 Mar;32(3):1354-1363.
- Zhou JH, Zhou QZ, Lyu XM, Zhu T, Chen ZJ, Chen MK, Xia H, Wang CY, Qi T, Li X, Liu CD. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod.* 2015 Jan;92(1):28.
- 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.
- Zhuo, Lisheng and Koji Kimata. 2001. *Cumulus Oophorus Extracellular Matrix: Its Construction and Regulation.* Vol. 26.
- Zhou YS, Webb S, Lettice L, Tardif S, Kilanowski F, Tyrrell C, Macpherson H, Semple F, Tennant P, Baker T, Hart A, Devenney P, Perry P, Davey T, Barran P, Barratt CL, Dorin JR. Partial deletion of chromosome 8  $\beta$ -defensin cluster confers sperm dysfunction and infertility in male mice. *PLoS Genet.* 2013 Oct;9(10):e1003826.