



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET)

**“Cascadas de señalización
involucradas en la capacitación del
espermatozoide de mamífero:
participación de quinasas y
fosfatasas”**

Bioquímica María Agustina Battistone

Directora: Dra. Patricia S. Cuasnicú
Directora Adjunta: Dra. Vanina G. Da Ros
Consejera de Estudios: Dra. Leonor Roguin

AÑO 2015

Agradecimientos

A mi directora de Tesis Patricia Cuasnicú por todas sus enseñanzas durante estos años, por transmitirme su pasión por el mundo de las gametas, por la confianza que depositó en mí, por haberme brindado numerosas oportunidades.

A mi directora adjunta de Tesis Vanina Da Ros por escuchar mis inquietudes, por su gran ayuda y por su guía en los experimentos. Por las largas charlas tratando de dilucidar las distintas cascadas que terminaban, en su mayoría, confundiéndonos aún más.

A todo el lab 217/215, los que están: Deb, Marian, Nico, Mati, Guille, Ludmila y Estefi, y a todo los que ya emprendieron otro camino: Juli, Gus, Juan, Gaby, Petu, Mariana R por su gran compañía, por los distintos momentos compartidos: seminarios, filosofías graciosas, mates, dulces y galles, los congresos, las salidas...

Al Dr. Pablo Visconti (Universidad de Massachusetts-Amherst) por involucrarme dentro del mundo de las vías de señalización, por su apoyo y gran ayuda. A todo su grupo, especialmente a Ana, Felipe y Antonio por los experimentos de AMPc y motilidad.

Al Dr. Alberto Darszon y su grupo (Universidad Nacional Autónoma de México), por los experimentos de canales iónicos en el espermatozoide.

Al Dr. Daniel Lombardo y a Pablo Torres (Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires) por el servicio de CASA utilizado para los experimentos de motilidad de los espermatozoides de ratón.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) por haberme otorgado el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

A todos los amigos del IBYME por hacer que disfrute enormemente este trabajo. A Ani, Fati, Tini, y Sebas por los momentos compartidos. A los amigos que me dio *Frontiers in Reproduction* en especial a Judit y Azure.

A Cecilia P y Franco (213) por ayudarme con diferentes cosas a lo largo de la tesis. A Soledad R por los Hámsters, a Marina R por el anti-FAK, Roxana S por el hornito de hibridización y a Alejandra S del INGEBI por las mediciones de PDE. A todos los reproductólogos del instituto por los intercambios de ideas y cosas dulces cada viernes de seminario. A todos los intergrantes de los laboratorios de Buffone, Zwirner y Rabinovich: por ayudarme siempre! A Paula S (ex IBYME) por la ayuda con los reactivos.

Al laboratorio de Fisiología de la facultad, Marcelo, Guada, Mir y Sabri, por hacer florecer mi pasión por la ciencia. También a los que actualmente comparten mates los días de Animales de Laboratorio: Juli y Vani.

A mi consejera Dra. Leonor Roguin por su seguimiento en la realización del trabajo de Tesis Doctoral.

A todo el personal del IBYME, especialmente a Paola, Anabela y Laura por su gran ayuda con los ratones KO. Al IBYME (becarios, investigadores, administración, biblioteca, bioterio, estudiantes, limpieza, recepción, seguridad) por su ayuda y amabilidad.

A mis amigas de la facu por nuestros comienzos como estudiantes. En especial a: Mechi y Fiore por los desayunos llenos de alegría y por contar con ustedes siempre, y a Flor por su energía de siempre. A la profe de inglés Silvia por los mates y las largas charlas sobre la vida.

A toda mi adorada familia completa, abuelos (Pepe y Enrique), abuelas (Alcira y Porota), tíos (Carlitos, Mónica y Carlos), primos (Barbarita y Lucho), por los momentos compartidos en familia y por su alegría arrecifeña.

A la familia adoptiva de la vida: Mary, Osvaldo, Mari, Santi y Ale; a Julian, Vero y Lucia por compartir siempre todo. A los pequeños que me hacen jugar y siempre me sacan una sonrisa: Zoe, Deian y Larita.

A mi familia Riojana por su tranquilidad, amabilidad y su incondicional apoyo (Stefano, Janet, Laura, Raúl, Yaya, Zulema y Marito).

A mis amigos de mi infancia: Sofi, Juani, Marce, Angie y Ro, porque simplemente los adoro y están siempre compartiendo mi vida! También, a mis amigos del cole: Zopy, Gabi y Juanchi por las carcajadas siempre que los veo. A Flor por contar siempre con ella.

A Pil que me enseñó a tener siempre fuerzas y a nunca bajar los brazos, te extraño mucho!

A Ger por acompañarme, por compartir la vida, por soñar juntos, por sus cantos y ocurrencias, por ser mi superhéroe, mi amor.

A mis hermana Flor por su sabiduría, y a Rauli, por su amabilidad. Gracias a los dos por ayudarme y acompañarme!

A mis papás Marta y Pepe, por todo!, por su incondicional apoyo, por dejarme volar, por estar, por trasmitirme infinitas cosas sobre la vida.

los quiero mucho!

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi

“Cascadas de señalización involucradas en la capacitación del espermatozoide de mamífero: participación de quinasas y fosfatasas”

Los espermatozoides de mamífero son capaces de fertilizar a un ovocito sólo luego de sufrir el proceso de “capacitación” que ocurre en el tracto femenino y que tiene como consecuencia un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina (Tyr), la ocurrencia de la reacción acrosomal y el desarrollo de la hiperactividad. El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar los mecanismos moleculares involucrados en las cascadas de señalización conducentes a la capacitación del espermatozoide de mamífero. Los resultados obtenidos indican que la capacitación implica la activación de PKA y la inactivación de serina/treonina fosfatasas a través de Tyr quinasas de la familia de Src, vías que convergen tempranamente a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA. Nuestros resultados también demuestran que la Tyr quinasa PYK2, regulada por calcio, sería la responsable de integrar distintas señales río abajo de PKA, conducentes tanto a la fosforilación en Tyr como al estado funcional del espermatozoide. Considerando que la capacitación requiere la liberación de “factores decapacitantes” entre los cuales se encuentra la proteína epididimaria CRISP1 (Cysteine Rich Secretory Protein 1) identificada por nuestro grupo, estudiamos las vías de señalización por las cuales esta proteína regula la capacitación. Nuestros resultados utilizando CRISP1 purificada y ratones “*knockout*” para dicha proteína desarrollados en el laboratorio, muestran que CRISP1 inhibe los principales canales de calcio presentes en el espermatozoide de mamífero, regulando la capacitación y el desarrollo de la hiperactividad. En conjunto, estos estudios contribuyen al esclarecimiento de los mecanismos moleculares por los cuales los espermatozoides adquieren su capacidad fertilizante y al futuro desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad y tratamiento de la infertilidad humana.

“Signaling cascades involved in mammalian sperm capacitation: participation of kinases and phosphatases”

Mammalian ejaculated sperm become able to fertilize an egg only after they undergo the capacitation process that occurs in the female reproductive tract and leads to an increase in protein tyrosine (Tyr) phosphorylation, the occurrence of the acrosome reaction and the development of hyperactivation. The main aim of this Thesis has been to investigate the molecular mechanisms involved in the different signaling pathways leading to sperm capacitation in mammals. Results revealed the involvement of both PKA activation and serine/threonine phosphatase down-regulation by Src family Tyr kinases in functional sperm capacitation, and provided convincing evidence that early PKA-dependent phosphorylation is the convergent regulatory point between these signaling pathways. Moreover, our observations supported that Tyr kinase PYK2, regulated by calcium, is the responsible of integrating different signaling events between PKA-mediated- and Tyr phosphorylations and, it is required for achieving functional capacitation. Considering that capacitation involves the release of “decapacitating factors” among which is CRISP1 (Cysteine Rich Secretory Protein 1), an epididymal protein identified by our group, we next studied the signaling cascades involved in the regulation of capacitation by CRISP1. Our results, using purified CRISP1 and CRISP1-knockout mice, indicated that this protein inhibits the two principal sperm calcium channels, regulating in this way the capacitation process and hyperactivation. Altogether, our observations contribute to a better understanding of the mechanisms leading to the acquisition of sperm fertilizing ability as well as to the development of new pharmacological tools for fertility regulation and treatment of human infertility.

Índice

Abreviaturas	8
Introducción	10
La gameta femenina	10
La gameta masculina	14
Maduración epididimaria	19
Eyacuación y transporte de los espermatozoides	22
Capacitación	23
Reacción Acrosomal	24
Hiperactivación	27
El proceso de fertilización	29
Mecanismos moleculares del proceso de capacitación	42
La proteína epididimaria CRISP1 y el proceso de capacitación	58
Objetivos	64
Materiales y Métodos	66
Resultados	81
Capítulo 1: Participación de PKA y SFKs en el proceso de capacitación	81
Capítulo 2: Participación de Ca ²⁺ y PYK2 en el proceso de capacitación	106
Capítulo 3: Participación de CRISP1 en el proceso de capacitación	130
Discusión	158
Conclusiones	207
Bibliografía	210

Abreviaturas

α -pPKAs	anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados por PKA
α -pY	anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en tirosina
AMPC	adenosin monofosfato 3'5'cíclico
ATP	adenosin trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
BWW	medio Biggers, Whitten, Whittingham
Ca ²⁺	calcio
CaM	calmodulina
CASA	<i>computer assisted sperm analysis</i>
CatSper	<i>cañon channel of spermatozoa</i>
COC	complejos cúmulus-ovocito
CRISP	<i>Cysteine-Rich Secretory Protein</i>
[Ca ²⁺] _i	concentración intracelular de Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _e	concentración extracelular de Ca ²⁺
dbcAMP	dibutilil AMP cíclico
DMSO	dimetilsulfóxido
FAK	quinasa de adhesión focal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
HOPT	<i>hamster oocyte penetration assay</i>
HT	heterocigota
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IFI	inmunofluorescencia indirecta
KO	<i>knockout</i>
NS	no significativo
mAC	adenilato ciclasa de membrana

OA	ácido okadaico
PFA	paraformaldehído
PKA	proteína quinasa A
PDE	fosfodiesterasa
PMCA4	bombas de Ca^{2+} ATPasa isoforma 4
PTX	pentoxifilina
PYK2	quinasa rica en prolina 2
RA	reacción acrosomal
sAC	adenilato ciclasa soluble
Ser/Thr	serina/threonina
SFKs	quinasas de la familia Src
TRPM8	<i>transient receptor potential M8</i>
Tyr	tirosina
ZP	zona pelúcida
$\ominus \text{Ca}^{2+}$	medio de incubación sin el agregado de CaCl_2

La fertilización es el proceso mediante el cual dos células haploides, el ovocito (gameta femenina) y el espermatozoide (gameta masculina), se unen combinando su material genético para producir un individuo diploide, genéticamente único. Teniendo en cuenta que la fertilización es el resultado de una secuencia precisa y ordenada de eventos, el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso permitiría profundizar nuestros conocimientos no sólo sobre el campo de la reproducción sino también sobre el conocimiento general de diferentes procesos celulares (Florman, 2006).

La gameta femenina

El crecimiento y la maduración de la gameta femenina, el ovocito, se produce en el ovario mediante un proceso biológico altamente especializado y regulado denominado ovogénesis. Dicho proceso comienza con la formación de las células germinales en el embrión, y culmina luego de la pubertad con la liberación de los ovocitos durante la ovulación (Austin, 1972).

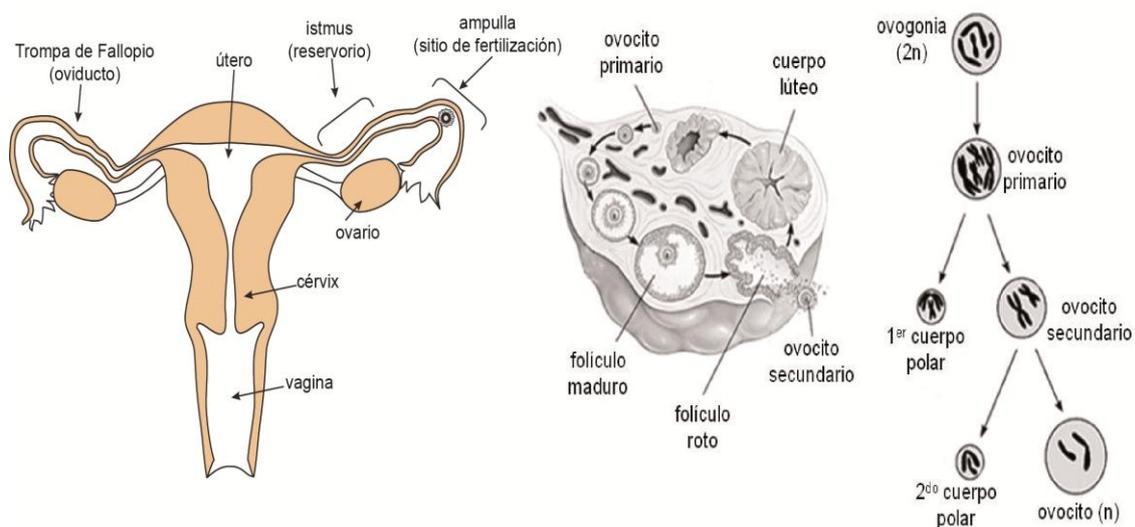


Figura 1: La ovogénesis y el tracto reproductor femenino. A la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor femenino. En el centro, se esquematiza un corte transversal de un ovario resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis. A la derecha, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis femenina.

Los ovarios son estructuras anatómicas pares adosadas a la pared posterior de la cavidad pélvica, compuestos por una zona periférica o corteza donde se encuentran las estructuras que contienen a los ovocitos, y una zona central o médula, formada básicamente por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Los ovarios están en estrecho contacto con el útero a través de los oviductos en roedores y de las trompas de

Fallopio en el humano. La región del oviducto proximal al ovario, denominada *ampulla*, es en donde se produce la fertilización, en tanto la región distal, el *isthmus*, actúa como de reservorio de espermatozoides. El útero es el lugar donde se implanta y desarrolla el embrión. A diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, el útero es una estructura única en primates, y bicornio en la mayoría de los mamíferos (**Figura 1**).

Los ovocitos se originan a partir de un escaso número de células totipotenciales de origen extragonadal, las cuales son re-localizadas a la gónada primitiva durante los primeros estadios de la embriogénesis (Freeman, 2003, Austin, 1972). Una vez diferenciado el ovario, las células germinales primordiales comienzan a desarrollarse para finalmente, en la vida adulta, originar los ovocitos (Wassarman, 1988a). La ovogénesis, esquematizada en la **Figura 1**, comienza con la división de las células germinales por mitosis, las cuales pasan a denominarse ovogonias. Posteriormente, en el desarrollo embrionario, estas células comienzan a sintetizar ADN en preparación para la meiosis, perdiendo su totipotencialidad y denominándose ovocitos primarios. Al nacimiento, las hembras poseen un número finito de ovocitos, los cuales permanecen arrestados en Profase I de la meiosis hasta la pubertad, momento en el cual, se produce el crecimiento de los ovocitos en forma coordinada con células de origen somático, en estructuras celulares llamadas “folículos”. Durante el período periovulatorio, un ovocito reanuda la meiosis estimulada por la acción de hormonas, experimentando la primera división reductiva. Esta división desigual del citoplasma de la gameta femenina provoca que, mientras que una de las células hijas (el ovocito) recibe la mayor parte del citoplasma y es capaz de originar un embrión, la otra (el corpúsculo polar) recibe una cantidad mínima, y está destinada a la degeneración. En cada ciclo menstrual, cierto número de ovocitos (dependiente de la especie) es capaz de alcanzar el estadio en que son ovulados. En el momento de la ovulación, el ovocito secundario, que se encuentra en folículos preovulatorios o de Graaf, junto con el primer cuerpo polar y algunas células de soporte, son expulsados del ovario al oviducto donde son retenidos. En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en el estadio de Metafase II, con el primer corpúsculo polar emitido. Finalmente, la meiosis continúa solamente después de la entrada del espermatozoide al ovocito, resultando en la extrusión del segundo cuerpo polar. Si por el contrario no ocurre la fertilización, el ovocito secundario se degenera sin haber completado la meiosis (**Figura 1**). De esta manera, la meiosis femenina se inicia en la etapa fetal, se prolonga hasta la edad madura de la hembra y, sólo se completa durante el proceso de fertilización.

El ovocito de mamíferos euterianos es una célula esférica, de diámetro variable según la especie (70-120 μM), contenida dentro de una matriz extracelular, la zona pelúcida (ZP). Entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito (oolema), se encuentra el espacio perivitelino conformado por una matriz extracelular sintetizada principalmente por el ovocito (Talbot, 1985). El ovocito se encuentra rodeada de varias capas de células de la granulosa, llamadas células del cúmulus embebidas en una matriz de ácido hialurónico que conforman el *cumulus oophorus*. La capa de células del cúmulus en contacto directo con la ZP se denomina *corona radiata*. Al conjunto del ovocito, la ZP, las células del cúmulus y la matriz extracelular se lo denomina complejo cúmulus-ovocito (COC). En la **Figura 2** se observan microfotografías en las que se señalan las distintas estructuras mencionadas anteriormente.

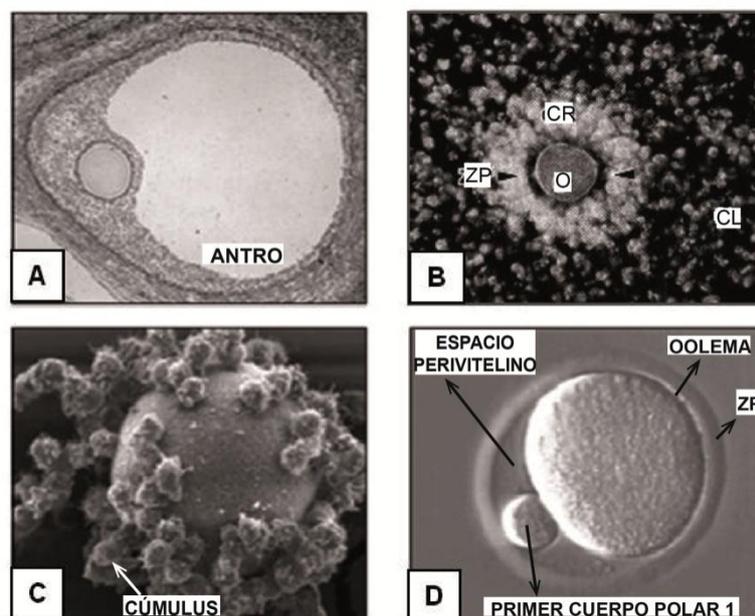


Figura 2: La gameta femenina. A. Microfotografía de un folículo de Graaf donde puede verse el ovocito rodeado de varias capas de células de la granulosa desplazado del centro del folículo por el antro. B. Microfotografía de un complejo cúmulus-ovocito ya ovulado. O: ovocito. ZP: ZP. CR: *corona radiata*. CL: células del cúmulus C. Fotografía de microscopio electrónico de barrido de un complejo cúmulus-ovocito. D. Microfotografía de un ovocito sin células del cúmulus en donde se distinguen el oolema, la ZP, el espacio perivitelino y el primer cuerpo polar.

El ovocito se encuentra conformado por el oolema, cuya característica particular radica en la presencia de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área libre de microvellosidades que coincide con la región que recubre al huso meiótico, y a través de la cual raramente ocurre la fusión del espermatozoide (Johnson et al., 1975). En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de

membrana (Ducibella, 1991), cuya aparición se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito (Ducibella et al., 1994). El papel de los gránulos corticales es importante para el desarrollo de un embrión viable, ya que su liberación luego de la fertilización asegura la entrada de un único espermatozoide dentro del ovocito (Yanagimachi, 1994).

La ZP es una matriz glicoproteína, cuyos componentes, sintetizados por el ovocito (Wassarman, 1988b), se depositan alrededor del mismo durante su crecimiento (Mashiach et al., 1992). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúan en contacto con el ovocito a través de uniones estrechas de tipo “gap”, entre el oolema y extensiones de las células del cúmulus (Austin, 1972), las cuales tendrían importancia en el mantenimiento de las funciones nutricionales y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito. La ZP está compuesta, principalmente, por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias, según la especie (Wassarman, 1988b, Lefievre et al., 2004). Gran parte de la información sobre la naturaleza bioquímica, estructura, y función de la ZP provienen de los laboratorios de los Dres. Paul Wassarman y Jurrien Dean, quienes han utilizado al ratón como modelo para la mayoría de sus estudios (Wassarman, 1988b, Wassarman y Litscher, 2001, Hoodbhoy y Dean, 2004). En esta especie, tres proteínas altamente glicosiladas conforman la ZP: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes.

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

ovocito y embrión de daños físicos, especialmente durante el clivaje tal como evitar que se separen los blastómeros, asegurando la individualidad.

Como se mencionara anteriormente, en el folículo ovárico, las células del cúmulus se encuentran asociadas entre sí por uniones de tipo *gap*. Como respuesta al pico de gonadotrofinas que precede a la ovulación, dichas células depositan abundante matriz extracelular y, en consecuencia, los COCs aumentan en volumen de 20 a 40 veces respecto de su tamaño inicial. Por este motivo, se denomina a este proceso “expansión del cúmulus” (Zhuo y Kimata, 2001). Originalmente, el ácido hialurónico era considerado el componente principal de la matriz del cúmulus (Eppig, 1979). Estudios más recientes han descrito otros componentes de dicha matriz, particularmente glicosaminoglicanos y proteínas, sintetizados por las células de la granulosa, que también serían parte importante del cúmulus (Zhuo y Kimata, 2001). Además de las moléculas antes mencionadas, existen factores extrafoliculares, de origen plasmático, cuyo papel en la composición y la estabilización de la matriz del cúmulus sería importante. En general, los diversos estudios llevados a cabo en diferentes especies de mamíferos han demostrado que las células del cúmulus y la matriz en la que están inmersas tendrían funciones biológicas relevantes durante la foliculogénesis, la ovulación y la fertilización (Tanghe et al., 2002), tales como permitir una eficaz captura del ovocito por parte de las trompas y guiar al espermatozoide hacia el ovocito (Austin, 1982). Además, el cúmulus es importante para prolongar la vida de los ovocitos, remover ciertos componentes del espermatozoide, seleccionar a los espermatozoides más aptos y fijar al ovocito para permitir la penetración de la ZP.

La gameta masculina

El espermatozoide, la gameta masculina, se produce en los testículos como consecuencia de un proceso conocido como espermatogénesis (Austin, 1972). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las células germinales (espermatogonias) durante la vida embrionaria, y requiere de la división meiótica para la producción de gametas haploides (**Figura 3**). Sin embargo, en tanto que las gametas femeninas son grandes, poco numerosas, con una abundante reserva de nutrientes y prácticamente inmóviles, las gametas masculinas son muy pequeñas, numerosas, con pocos nutrientes y muy móviles. La gran diferencia con la hembra radica en que mientras que en la ovogénesis todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario, en el macho existe una población de células germinales capaces de multiplicarse por mitosis durante toda la

vida adulta a partir de la pubertad. De este modo, en la hembra existe un número fijo de gametas al principio de la vida fértil y en el macho la producción de espermatozoides es constante.

Los testículos son órganos pares que consisten en una serie de lóbulos que contienen en su interior los túbulos seminíferos, dentro de los cuales se produce la espermatogénesis, separados por tejido intersticial. Los túbulos se unen entre sí en la *rete testis*, que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo. Este órgano se continúa con el *vas deferens*, el cual, durante la eyaculación, recoge las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y conduce a los espermatozoides hasta la uretra (**Figura 3**).

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

En la espermatogénesis, mientras que una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis, algunas espermatogonias se diferencian en espermaticitos primarios, los cuales entran en meiosis generando espermaticitos secundarios. Éstos entran a una interfase intermeiótica de poca duración para pasar luego a la segunda división meiótica que da origen a las células llamadas espermátides. En una segunda etapa, estas células redondas se diferencian morfológicamente para dar origen a los espermatozoides a través de un proceso denominado espermiogénesis, caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta. Como consecuencia de la pérdida casi completa del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, síntesis y degradación de lípidos, y transporte vesicular. Finalmente, se produce la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por un proceso denominado espermiación (**Figura 3**).

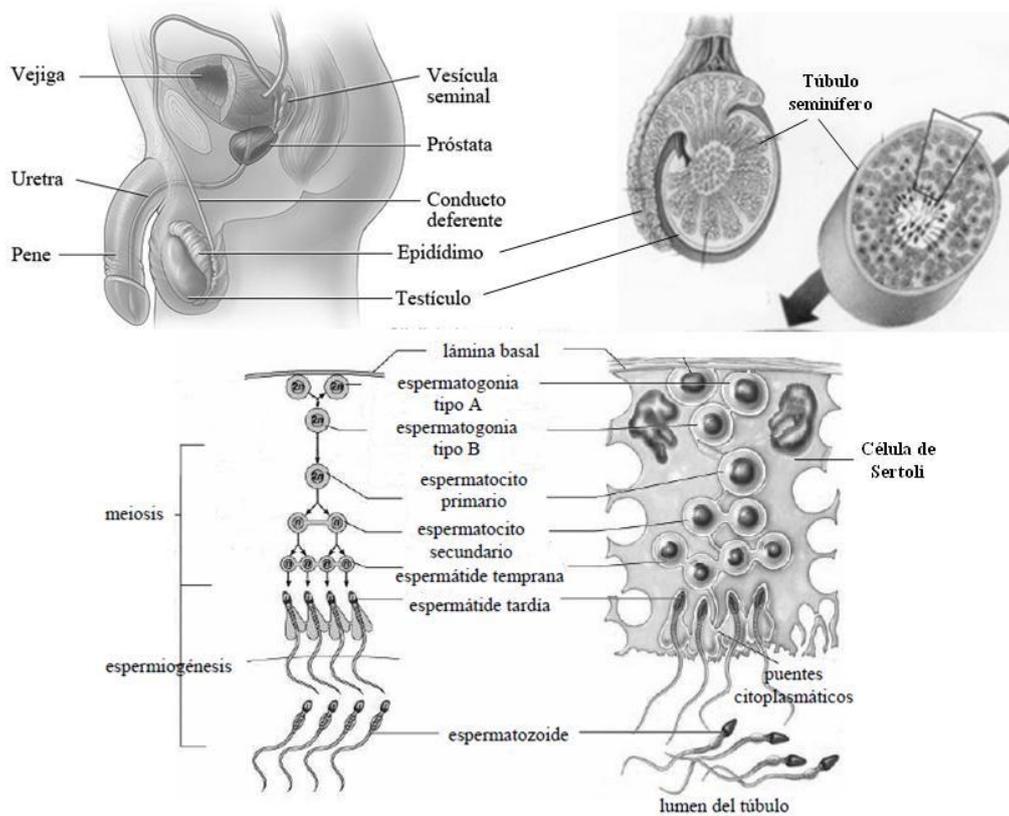


Figura 3: La espermatogénesis y el tracto reproductor masculino. Arriba y a la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor masculino. Arriba y a la derecha, se muestra una representación de un corte transversal de un testículo y de un tubo seminífero. Abajo y a la derecha, se esquematiza los diferentes estadios celulares presentes durante la espermatogénesis en un corte transversal de un tubo seminífero. Abajo y a la izquierda, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis masculina

El espermatozoide es una célula altamente especializada, con capacidad para transportarse hasta el sitio de fertilización en el tracto femenino y fertilizar al ovocito. A pesar de que la forma y el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de los mamíferos son variables, los mismos comparten una estructura general similar. Básicamente, el espermatozoide posee dos componentes morfológicos distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (Eddy, 1994).

La cabeza del espermatozoide contiene dos elementos fundamentales: un núcleo compacto debido a la presencia de cromatina altamente condensada, y el acrosoma, estructura cuyos contenidos son importantes para la fertilización (Eddy, 1994) (**Figura 4A**). El núcleo del espermatozoide es de un tamaño significativamente menor al del resto de los tipos celulares, debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas básicas de bajo peso molecular llamadas protaminas, que permiten un mayor

empaquetamiento de la cromatina que las histonas presentes en las células somáticas. El núcleo se encuentra rodeado por una envoltura nuclear bastante inusual, caracterizada por la cercanía entre las dos que la conforman y la escasez de poros nucleares. Por su parte, el acrosoma es una estructura membranosa que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, originada en el aparato de Golgi. La forma y el tamaño del acrosoma es variable en las diferentes especies, relacionándose generalmente a la forma de la cabeza. Si bien la membrana que rodea al acrosoma es única y continua, se ha definido como “membrana acrosomal interna” a aquella que envuelve a la membrana nuclear externa, y como “membrana acrosomal externa” a la que se encuentra por debajo de la membrana plasmática. El acrosoma a su vez está constituido por dos regiones denominadas capuchón acrosomal y segmento ecuatorial, definidos principalmente por diferencias funcionales entre ellos. En cuanto a la composición del acrosoma, el mismo contiene en su interior varias moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. Sin embargo, estudios de microscopía y extracción diferencial de proteínas han sugerido que esta organela no sería simplemente un reservorio de enzimas solubles, sino que existiría una organización funcional de moléculas dada por la presencia de una matriz intra-acrosomal (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988, Kim y Gerton, 2003). Las dos enzimas mejor caracterizadas del acrosoma son acrosina, una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas, y hialuronidasa, ambas con expresión específica en las células espermatogénicas (Diaz-Perez et al., 1988, Diaz-Perez y Meizel, 1992, Takano H., 1993). Si bien por su estructura y contenidos el acrosoma se ha descrito como un lisosoma especializado, esta organela tendría, además, algunas características de una vesícula de secreción ya que libera sus contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales específicas que se producen durante la interacción del espermatozoide con el ovocito.

En la cabeza del espermatozoide se encuentran también estructuras de citoesqueleto, que se distribuyen en dos regiones: el citoesqueleto sub-acrosomal o *perforatorium*, localizado entre el acrosoma y el núcleo, el cual está compuesto principalmente por material denso, y el citoesqueleto post-acrosomal, que se localiza entre el núcleo y la membrana plasmática de la región post-acrosomal del espermatozoide (Courtens et al., 1976, Bellvé, 1983, Fouquet y Kann, 1994). En la mayoría de los mamíferos, incluidos el hombre y gran parte de los animales domésticos, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada en la que el núcleo y el acrosoma son estructuras simétricas, de forma aplanada en el sentido longitudinal de la célula. En

otras especies, como el hámster y el cobayo, existe una protrusión del acrosoma, perpendicular al plano aplanado de la cabeza. En los roedores, la cabeza es falciforme, con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo.

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (**Figura 4B**) (Eddy, 1994). El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de nueve pares de microtúbulos siguiendo la disposición característica de "9+2". Rodeando al axonema desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo, que envuelven a la cola en forma helicoidal y cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para modular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural.

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

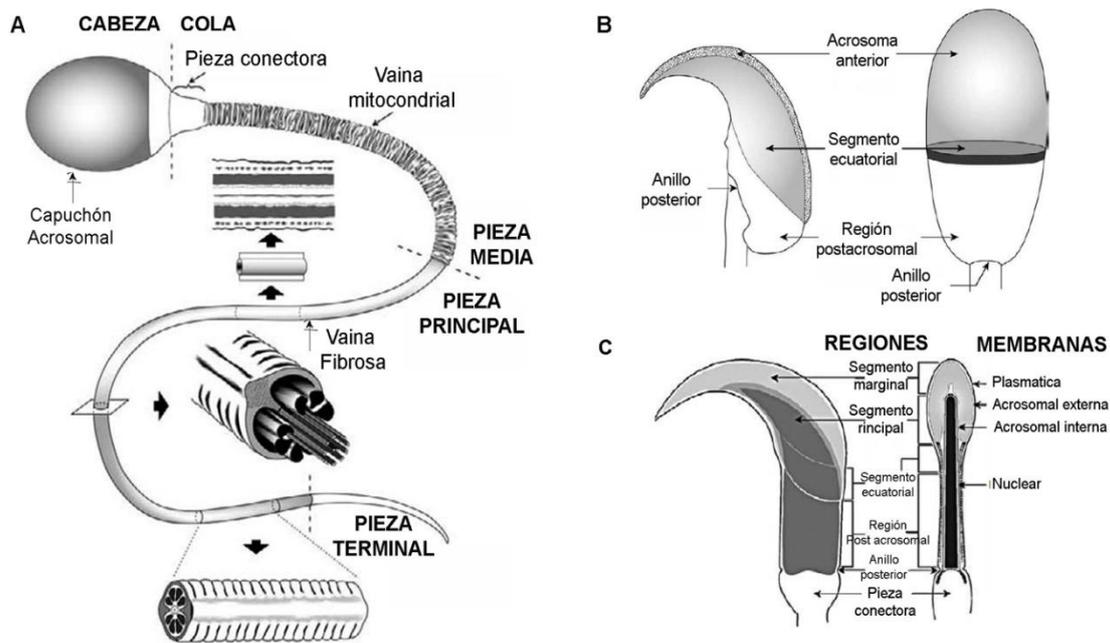


Figura 4: La gameta masculina. **A.** Esquema de un espermatozoide de mamífero en el que se muestran las diferentes estructuras internas de la cola. **B.** Se muestran las estructuras generales de la cabeza de un espermatozoide falciforme (izquierda) y otro con forma espatulada (derecha). **C.** Se muestran las regiones y las membranas de un espermatozoide falciforme.

Maduración epididimaria

Los espermatozoides que salen del testículo adquieren la motilidad progresiva y la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito durante su tránsito por el epidídimo, en un proceso conocido como “maduración” (Bedford et al., 1979, Hinrichsen y Blaquier, 1980, Austin, 1985, Cooper, 1998). El epidídimo es un conducto único con muchas circunvoluciones, que cubre el borde posterior del testículo (**Figura 3**). Convencionalmente, si bien no existen límites anatómicos definidos, el epidídimo se divide en tres regiones principales según su proximidad con el testículo: *caput* o cabeza (región más próxima al testículo), *corpus* o cuerpo (región media) y *cauda* o cola (región distal al testículo) (**Figura 5**). Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante simultáneamente, la gran mayoría obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario (Yanagimachi, 1994).

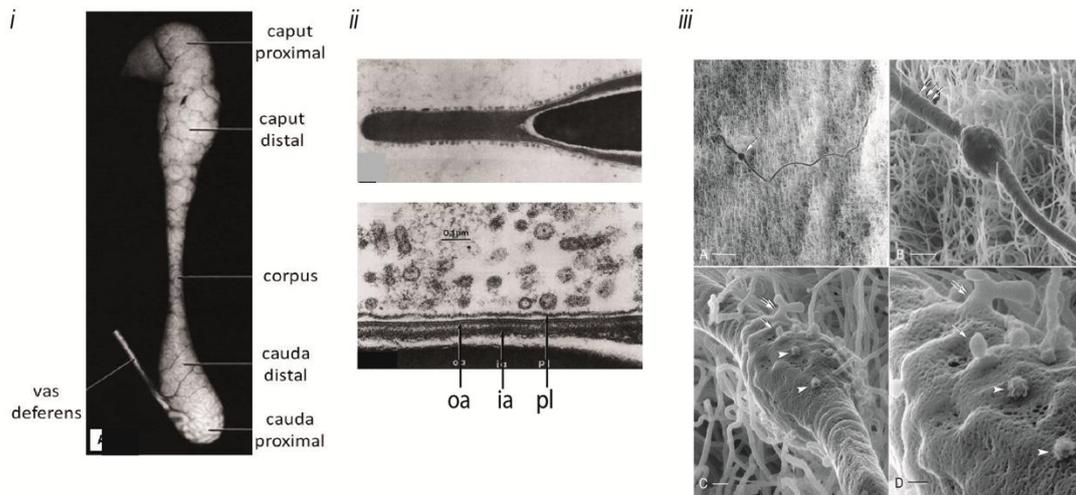


Figura 5: El epidídimo. *i.* Microfotografía de un epidídimo. *ii.* Microscopía electrónica de un corte de epidídimo mostrando la interacción entre un espermatozoide y los epididimosomas. oa: membrana acrosomal externa, ia: membrana acrosomal interna, pl: membrana plasmática. *iii.* A. baja magnificación (5 μm), imágenes *helium ion microscopy* (HIM) mostrando un espermatozoide dentro del *cauda* del epidídimo de ratón, su cabeza está interaccionando con el epitelio. Dicho espermatozoide tiene presente la gota citoplasmática localizada entre la pieza media y principal (flecha). B. magnificación intermedia (1 μm), se puede visualizar los anillos concéntricos de la pieza media (flecha) y vesículas en la superficie de la gota citoplasmática. C y D. Alta magnificación (100 nm y 200 nm) de las imágenes de HIM de la gota citoplasmática que muestra vesículas y algunas depresiones en la superficie. Algunas vesículas tienen superficie rústica (cabeza de flecha), o lisas (flecha) y otras presentan estructuras más complejas (doble flecha).

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

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Blaquier et al., 1972) y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento del consumo de oxígeno, es importante de mencionar que la mayor parte de los cambios ocurren al nivel de la membrana plasmática. Dichos cambios moleculares y bioquímicos incluyen alteraciones en la carga de superficie, en las propiedades de unión de lectinas, en el contenido lipídico, en los carbohidratos de superficie y en la composición proteica (Eddy, 1994) y surgen como consecuencia de

la adquisición de nuevos componentes a la membrana del espermatozoide y de la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la superficie de la gameta. Es generalmente aceptado que todos los cambios producidos durante esta etapa de maduración son tendientes a estabilizar la membrana del espermatozoide.

Mediante la utilización de distintas estrategias experimentales, se han estudiado los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas de origen epididimario como así también su unión o integración a diferentes dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Cuasnicu et al., 2001). De este modo, se ha descrito que la gran mayoría de las nuevas proteínas adquiridas por los espermatozoides son proteínas de superficie que se unen a la membrana de los espermatozoides a través de interacciones electrostáticas (Cooper, 1998). Sin embargo, también existen evidencias que indican que algunas proteínas adquiridas durante la maduración se comportan como proteínas integrales de membrana (Kirchhoff y Hale, 1996, Legare et al., 1999, Cohen et al., 2000a) y muchas de las mismas se encuentran ancladas a la membrana mediante uniones GPI (Legare et al., 1999, Frenette y Sullivan, 2001, Zhang y Martin-Deleon, 2003). Sin embargo, según la vía clásica de secreción de proteínas, una proteína anclada por GPI a la membrana de una célula tiene que transitar por el retículo endoplasmático, luego por el aparato de Golgi y finalmente, por las vesículas secretoras hasta alcanzar la superficie celular. De acuerdo con este mecanismo de secreción, el espermatozoide no podría adquirir proteínas unidas a GPI durante su pasaje por el epidídimo. Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo alternativo por el cual estas proteínas epididimarias se secretarían y se unirían a los espermatozoides. En este sentido, Yanagimachi y colaboradores (1985) describieron, por primera vez, mediante microscopía electrónica de cortes de epidídimos de hámster, la existencia de pequeñas vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides (**Figura 5ii**) (Yanagimachi et al., 1985). Luego de varios años de esta primera observación, el laboratorio del Dr. Sullivan describió la participación de dichas vesículas membranosas en la transferencia de proteínas epididimarias a la superficie de los espermatozoides durante la maduración (Legare et al., 1999, Frenette y Sullivan, 2001, Frenette et al., 2002). Estas vesículas han sido denominadas “epididimosomas”, y han sido descritas de distintos mamíferos, tales como la rata (Fornes et al., 1991), el toro (Frenette y Sullivan, 2001), el ratón (Griffiths et al., 2008), e inclusive el humano (Frenette et al., 2005). En la **Figura 5iii**, se muestran fotografías del interior del epidídimo de ratón obtenidas recientemente utilizando la técnica de microscopía de Helio (HIM), donde los autores observan vesículas interaccionando

con la cola de los espermatozoides en el lumen epididimario (Shum et al., 2014). En cuanto al origen de los epididimosomas, se ha sugerido un mecanismo de secreción apócrina que implicaría la formación de vesículas citoplasmáticas en el polo apical de las células epiteliales secretoras, las cuales se desprenderían de las células y, una vez en el lumen del órgano, se desintegrarían liberando así su contenido (Aumuller et al., 1997, Hermo y Jacks, 2002). Estas vesículas citoplasmáticas contendrían a los epididimosomas en su interior.

Mientras que algunas de las proteínas epididimarias mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicu et al., 2001), otras, que reciben el nombre de “factores decapacitantes”, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia prematura del proceso de capacitación (Fraser, 2010). Entre los cuales se encuentra la proteína epididimaria CRISP1 (“*Cysteine Rich Secretory Protein 1*”) (Cameo y Blaquier, 1976). En la última sección de la Introducción, describiremos distintas funciones y características de CRISP1 descritas mayoritariamente por nuestro laboratorio.

Eyaculación y transporte de los espermatozoides

Los espermatozoides son almacenados en la región del *cauda* epididimario hasta la eyaculación. Durante este proceso se liberan los espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales), las cuales ayudan al transporte de los espermatozoides hasta la uretra, luego de lo cual, se crean señales sensitivas que desencadenan la eyaculación. El eyaculado o semen está formado por un componente celular (espermatozoides) y otro líquido (líquido seminal que proviene de las secreciones de las glándulas accesorias). El líquido seminal es necesario para que los espermatozoides lleguen al interior del tracto reproductor femenino, y los sustratos gelificantes contenidos en este líquido (fibrinógeno, semenogelina) coagulan temporalmente, evitando la expulsión vaginal de los espermatozoides, manteniéndolos cerca del cérvix uterino, y protegiéndolos del pH vaginal. Tras pasar unos minutos, se licúa el semen (por la fibrinolisisina) y de esa manera aumenta la movilidad espermática. El pH del líquido seminal se encuentra entre 7,2 – 7,8 y también ayuda a la motilidad y a mantener la viabilidad de las células. En la mayoría de las especies (humanos, ratón, rata, conejo, entre otras) el sitio de deposición del semen es la vagina, mientras que en otros, la deposición ocurre directamente en el útero. En el momento de la deposición, los espermatozoides son inmóviles, o poseen una motilidad muy reducida. Numerosas evidencias indican que

los movimientos peristálticos del útero favorecen la llegada de los espermatozoides al oviducto tanto en las especies con deposición vaginal como en las que tienen deposición uterina (Suarez, 2006). Por su parte, el semen juega un papel fundamental en la iniciación de estas contracciones. Al respecto, se ha observado que las contracciones uterinas en la rata son significativamente menores cuando se colocan en apareo con machos vasectomizados, sugiriendo que los espermatozoides y/o los componentes del plasma seminal serían capaces de estimular las contracciones (Peitz y Olds-Clarke, 1986). Por otra parte, en el ratón, se ha sugerido que las glándulas sexuales masculinas también podrían jugar algún rol en este proceso ya que la remoción de las vesículas seminales disminuye significativamente la tasa de preñez por disminución de las contracciones uterinas (Crane y Martin, 1991).

Capacitación

Después de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fertilizar al ovocito, pues la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter "potencial" (Yanagimachi, 1994). De esta manera, los espermatozoides eyaculados, deben permanecer en el tracto femenino durante cierto tiempo para poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración y, finalmente, penetrar al ovocito. Es durante el trayecto hacia el sitio de fertilización que los espermatozoides sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que, en su conjunto, se denominan "capacitación" (Austin, 1951, 1952, Chang, 1951). Entre dichos cambios se encuentran la remoción del colesterol de la membrana, la pérdida de los factores de decapacitantes, la redistribución de antígenos de superficie, el ingreso de bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}), el aumento del pH intracelular, la hiperpolarización de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas en tirosina (Tyr), por mecanismos moleculares aún no del todo conocidos (Visconti et al., 2011). Dado que el espermatozoide carece de transcripción y traducción, las modificaciones de las concentraciones de mensajeros intracelulares tales como AMP cíclico (AMPC) y Ca^{2+} , y las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación/defosforilación, podrían ser los mecanismos regulatorios responsables de generar dichos cambios durante la capacitación y modular la fisiología del espermatozoide (Visconti et al., 1995a, Visconti et al., 1995b). Mientras que alguno de estos cambios se inician ni bien el espermatozoide entra en contacto con el tracto, otros ocurren luego de un cierto período de incubación (Visconti, 2009). Si bien el lugar exacto donde se inicia este proceso aún se desconoce, existiendo variaciones según la especie y el sitio de deposición del

eyaculado, la capacitación *in vivo* se considera completa cuando los espermatozoides llegan al oviducto (Yanagimachi, 1994, Bedford, 2004).

A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe atravesar el tracto femenino para capacitarse y adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* si se coloca a los espermatozoides en un medio de incubación definido. Si bien, este medio puede ser variable de una especie a otra, en general debe contar con una composición similar a la del fluido oviductal, e incluir fuentes de energía y carbono tales como piruvato, lactato, y glucosa, un aceptor de colesterol como, la albúmina, e iones tales como Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y HCO_3^- (Visconti et al., 2002). El descubrimiento de las condiciones necesarias para una correcta capacitación *in vitro* fue esencial para el desarrollo de las técnicas de fertilización *in vitro*. La gran relevancia de estas técnicas genera la necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos moleculares del proceso de capacitación para mejorar y garantizar el éxito de las técnicas de fertilización *in vitro*.

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

Teniendo en cuenta que esta Tesis Doctoral está enfocada al estudio de los mecanismos moleculares de la capacitación, en una sección posterior de la Introducción, se desarrollará en profundidad esta temática. A continuación, describiremos los principales procesos desencadenados como consecuencia de la capacitación: la RA, y la hiperactivación.

Reacción Acrosomal

La RA es un evento excitotóxico que permite la liberación regulada del contenido acrosomal del espermatozoide (**Figura 6**) y tiene dos consecuencias que resultan fundamentales para la fertilización. Una de ellas es la exposición de moléculas intra-

acrosomales que permiten al espermatozoide penetrar las envolturas que rodean al ovocito, mientras que la segunda y no menos importante, es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial.

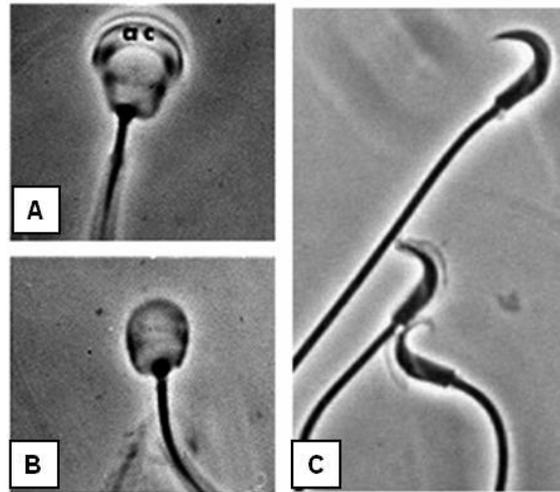


Figura 6: RA. Microfotografía de un espermatozoide de cobayo **(A)** sin reaccionar y **(B)** reaccionado. ac: acrosoma. **(C)** Microfotografía de espermatozoides de hámster. Los dos espermatozoides ubicados en la porción inferior de la foto ya han comenzado la RA. Nótese la forma diferente de la cabeza de los espermatozoides de las dos especies.

La RA consiste en la vesiculización del capuchón acrosomal del espermatozoide, mediante un mecanismo similar al proceso de exocitosis observado en otras células del organismo. El proceso comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del segmento ecuatorial. En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas mixtas que se desprenden en un fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del capuchón acrosomal". Entre las vesículas se crean poros por los que se libera el contenido del acrosoma. Al final de la RA, la membrana acrosomal interna se encuentra expuesta al medio extracelular, y adquiere continuidad con la membrana plasmática del segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994). Se denomina *intacto* a aquel acrosoma que no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, *modificado* a aquel que presenta alteraciones morfológicas tales como hinchamiento o rugosidades, y *reaccionado* a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal (**Figura 7A, B, C y D**).

A nivel molecular, la secuencia de eventos que desencadena la RA involucra a múltiples receptores presentes en la membrana plasmática del espermatozoide

capacitado, los cuales reconocen a su ligando complementario (entre ellos, ZP3 y progesterona) desencadenando la transducción de señales que produce el aumento del Ca^{2+} intracelular y de otros mensajeros secundarios tales como el AMPc. Como consecuencia de ello, se desencadena un aumento del pH intracelular y se dispara la depolimerización de la F-actina, la cual se dispersa y permite el contacto cercano de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios (Buffone et al., 2012).

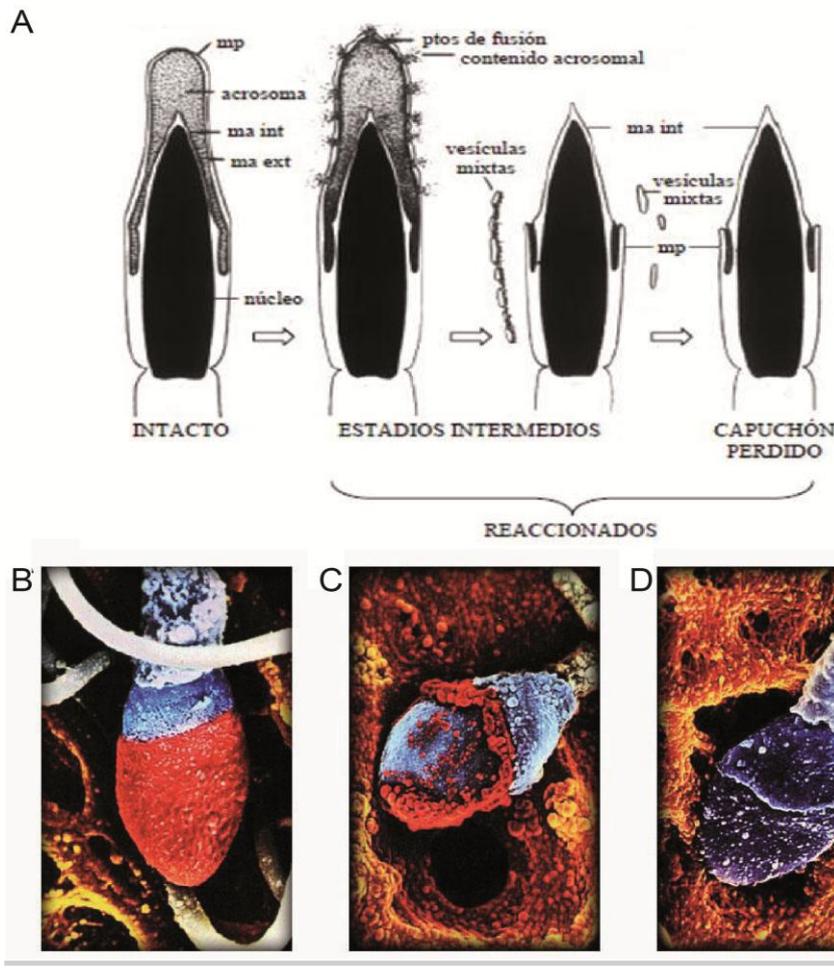


Figura 7: Progresión de la RA. A. Se muestra un diagrama representando las etapas de la RA en la cabeza del espermatozoide de ratón. mp: membrana plasmática, ma int: membrana acrosomal interna, ma ext: membrana acrosomal externa. Fotografía de microscopio electrónico de barrido: (B) sin reaccionar, (C) reaccionado, estadio intermedio (D) reaccionado, sin capuchón acrosomal.

Tradicionalmente, se pensaba que las enzimas contenidas dentro del acrosoma eran las encargadas de digerir tanto a la matriz extracelular de las células del cúmulo como a la ZP durante la RA, y permitir al espermatozoide abrirse camino hasta el ovocito, (Yanagimachi, 1994). Esta hipótesis se vio modificada por evidencias demostrando que, al menos en el ratón, la RA ocurría, principalmente, cuando el

espermatozoide contacta con la ZP (Saling y Storey, 1979, Wassarman et al., 1985), y que los espermatozoides reaccionados eran incapaces de penetrar el cúmulus (Talbot, 1985). Unos años más tarde, se confirmó que sólo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. De acuerdo a este modelo, una vez unidos a la ZP, los espermatozoides sufrirían la RA, produciéndose la liberación de los contenidos del acrosoma, los cuales serían importantes para la penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994). Posteriormente, los Dres. Kim y Gerton (2003) propusieron un modelo denominado “de exocitosis acrosomal”, en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito (Kim y Gerton, 2003). Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma. Según este modelo, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP. A favor de esta teoría, más recientemente, se demostró que la mayoría de los espermatozoides que fertilizan a los ovocitos, comenzarían a reaccionar en el cúmulus o antes de ingresar a esta matriz y no, sobre la ZP (Jin et al., 2011). Esta idea fue apoyada por el hecho de que los espermatozoides perivitelinos, ya reaccionados y sin capuchón acrosomal, son capaces de fertilizar ovocitos con cúmulus y ZP *in vitro* (Inoue et al., 2011).

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

Hiperactivación

Es un patrón de motilidad característico descrito por primera vez en el hámster (Yanagimachi, 1969), que consiste en un movimiento flagelar y observado tanto *in vivo*, en el sitio de la fertilización, como *in vitro*, en todas las especies estudiadas (Yanagimachi, 1994). El movimiento hiperactivado se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución en la linealidad, y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, sumados a movimientos del flagelo similares a latigazos en medios de baja viscosidad (Suarez et al., 1991, Suarez, 1996). El patrón de motilidad durante la hiperactivación es variable en las diferentes especies de

mamíferos estudiadas, en algunas de ellas, se observa a la cabeza de los espermatozoides trazar una figura que se asemeja a un ocho durante el estado hiperactivado (Yanagimachi, 1994) (**Figura 8A y B**).

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

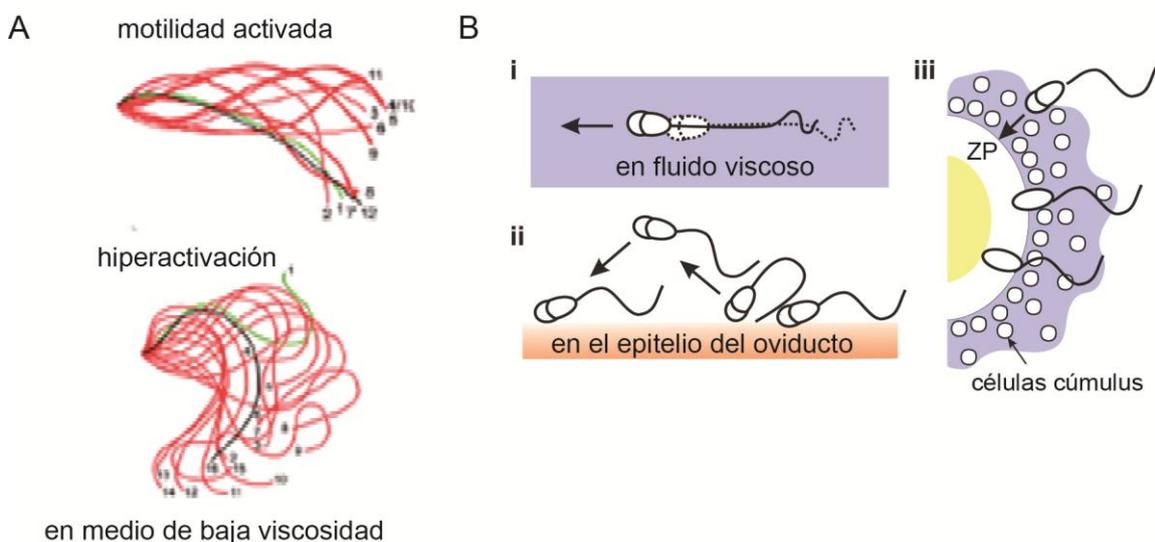


Figura 8: Propiedades y participación fisiológica de la hiperactivación. **A.** Se representan los patrones de movimiento de un espermatozoide activado (arriba) y de uno hiperactivado (abajo) en un medio de baja viscosidad. **B.** La hiperactivación es importante **i.** para avanzar en un medio viscoso como el tracto reproductor femenino, **ii.** para liberarse del epitelio del oviducto y avanzar por la *ampulla* (sitio de fertilización), y **iii.** para facilitar la penetración del cúmulus y la ZP.

Si bien se supone que la hiperactivación podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino en el momento de la fertilización, aún hoy no hay consenso respecto a la identidad de dichos factores. Asimismo, las cascadas de

señales que regulan la hiperactivación tampoco han sido completamente descritas, aunque se sabe que la alcalinización de los espermatozoides, el AMPc y el Ca^{2+} serían fundamentales para desencadenar dicho proceso. Por otra parte, se han descrito varias enzimas y canales que podrían estar involucrados en este proceso a juzgar por el hecho de que los ratones mutantes para dichos factores son incapaces de desencadenar el movimiento de hiperactivación tales como el canal de Ca^{2+} CatSper (cañon channel of spermatozoa) y la enzima glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (Ho et al., 2009, Kota et al., 2010, Buffone et al., 2012). En este sentido, en el espermatozoide humano, se ha postulado que la progesterona, y otros factores como prostaglandinas, estimularían al CatSper a medida que transitan por el tracto femenino (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011).

El proceso de fertilización

Una vez que el espermatozoide se encuentra con el ovocito, se desencadena el proceso de fertilización, el cual, en mamíferos, ocurre generalmente en la *ampulla* del oviducto (**Figura 9A**). En dicho lugar, el ovocito se encuentra rodeado por la ZP y por las células del cúmulus. El espermatozoide capacitado deberá atravesar las diferentes envolturas para contactarse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Dicho proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-cúmulus oophorus y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culmina con la fusión de las membranas (**Figura 9B**). A partir de la cual, comienza la formación del pronúcleo masculino y femenino, la singamia para dar lugar al desarrollo del cigoto, llevando a la formación de un nuevo individuo.

En la mayoría de las especies, el espermatozoide, una vez que atraviesa la unión útero-tubaria, se almacena en el *isthmus* hasta el momento de la ovulación. El epitelio del *isthmus* genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un período de tiempo hasta que se desencadena la ovulación. Cuando esta última ocurre, ciertos factores femeninos estimulan la liberación del espermatozoide del reservorio. Este proceso ayuda a reducir el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fertilización (la *ampulla*). Por otra parte, como se mencionó anteriormente, evidencias recientes indican que los COCs liberan sustancias quimioattractantes que ayudan al espermatozoide a movilizarse hacia la *ampulla* y localizar al ovocito (Ikawa et al., 2011).

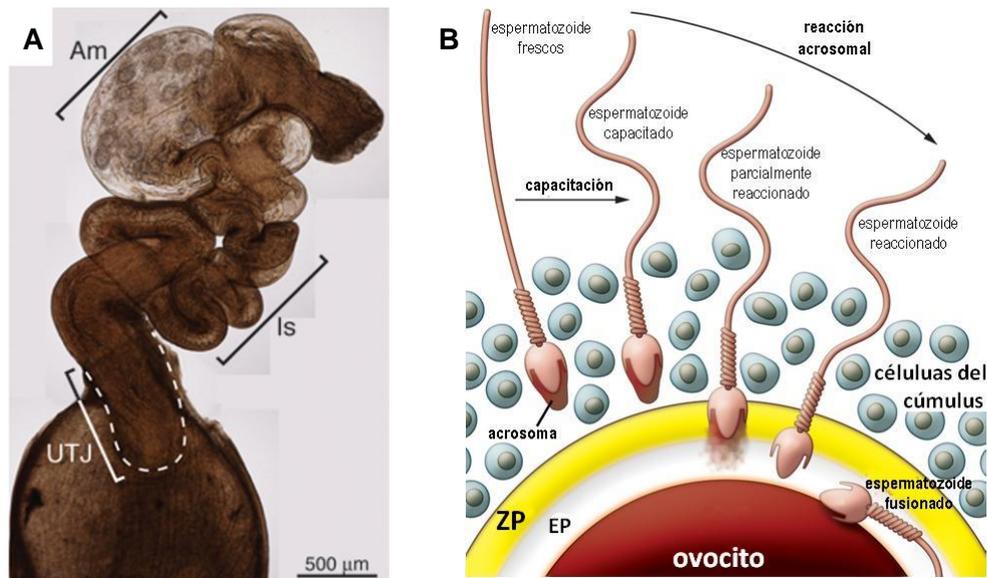


Figura 9: Interacción espermatozoide-ovocito. **A.** Se muestra un oviducto de ratón. Am: *ampulla*. Is: *isthmus*. UTJ: unión útero-tubaria. **B.** Se muestra un esquema representativo de la interacción espermatozoide-ovocito. El espermatozoide sufre el proceso de capacitación a medida que atraviesa el tracto reproductor femenino, lo cual va a permitir que ocurra la RA y la hiperactividad. Cerca del ovocito, el espermatozoide libera el contenido acrosomal, probablemente estimulado por el cumulus y/o por la ZP, y penetra la ZP. Solamente los espermatozoides reaccionados son capaces de fusionarse con el ovocito. EP: espacio perivitelino.

Penetración del *cumulus oophorus*

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

Aún existe controversia respecto a los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la penetración del cúmulus. Algunas evidencias han sugerido que los espermatozoides poseerían hialuronidasa asociada a la superficie de los mismos, y que esta enzima sería la que ayudaría en el pasaje a través de las células del cúmulus (Talbot, 1985). En este sentido, ha sido descrito que SPAM1 (sperm adhesion molecule 1, originalmente denominada PH-20), una proteína testicular, presenta actividad de hialuronidasa en las diferentes especies en las que ha sido detectada (Primakoff et al., 1985, Gmachl et al., 1993, Lin et al., 1994, Cherr et al., 1996). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada en vista de que los ratones KO para SPAM1 son fértiles a pesar de sufrir un retardo en la

dispersión del cúmulus respecto de los animales normales (Baba et al., 2002). En ese trabajo, se reveló la presencia de otra proteína con actividad hialuronidasa denominada HYAL5, presente en membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios de ratón. Los autores postulan la existencia de una redundancia en cuanto a la función de SPAM1 y HYAL5, por la cual HYAL5 estaría compensando la función de SPAM1 en los animales KO antes descritos (Kim et al., 2005). Más aún, la reciente generación de ratones doble KO para SPAM1 y las serinoproteasas TESP5 o ACR (acrosina) sugieren que ambas proteínas actuarían cooperativamente junto a SPAM1 en la penetración del al cúmulus (Zhou et al., 2012). Por otra parte, el modelo de “exocitosis acrosomal” descrito anteriormente (ver sección Reacción acrosomal) postula que, durante el avance de los espermatozoides, se produciría una liberación parcial de enzimas acrosomales, previa a la vesiculización completa del acrosoma, responsable de degradar la matriz y permitir al espermatozoide avanzar entre las células.

Como se mencionara anteriormente, la hiperactividad es fundamental para que los espermatozoides puedan moverse a través de la matriz extracelular del cúmulus y lograr penetrarlo hasta finalmente, llegar al ovocito.

Interacción espermatozoide-ZP

Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP (**Figura 10A y B**) a la cual se une por la interacción entre moléculas presentes tanto en la superficie del espermatozoide como en la ZP.

Actualmente, existe controversia en lo que respecta a la penetración de la ZP. Basándose en evidencias provenientes de estudios en el ratón, se ha propuesto un modelo de adhesión entre el espermatozoide y la ZP que consta de dos etapas (Wassarman, 1988a): 1) “unión primaria”: interacción del espermatozoide intacto con la ZP, más específicamente con carbohidratos de ZP3, desencadenando así la RA, y 2) la “unión secundaria” del espermatozoide reaccionado, a través de ZP2. Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado por otros autores que proponen un nuevo mecanismo de interacción entre el espermatozoide y una estructura supramolecular compuesta por ZP2 y ZP3, en vez de la interacción con una única glicoproteína en particular (Rankin et al., 2003, Hoodbhoy y Dean, 2004). Observaciones más recientes muestran que sólo el estado de la ZP2 sería importante para penetrar la ZP. De esta

manera, una ZP2 clivada impediría el paso del espermatozoide a través de la ZP, mientras que una ZP2 intacta facilitaría el paso (Avella et al., 2013, Avella et al., 2014).

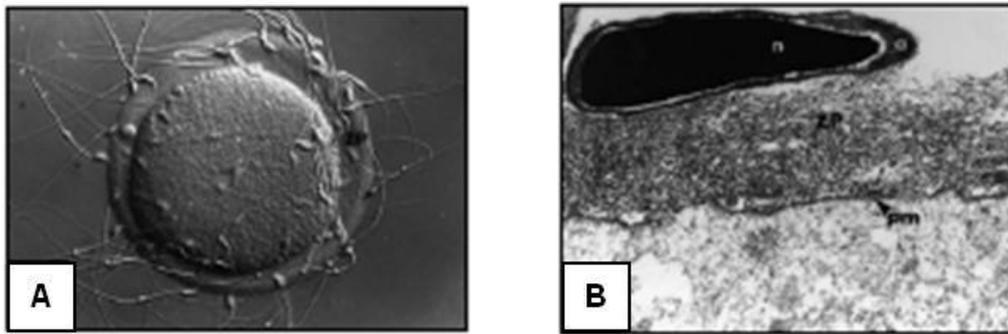


Figura 10: Unión espermatozoide-ovocito en el ratón. A. Microfotografía de espermatozoides unidos a la ZP de un ovocito. **B.** Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de la cabeza de un espermatozoide unido a la ZP de un ovocito. pm: membrana plasmática, ZP: zona pellúcida, n: núcleo, a: acrosoma.

En cuanto a las moléculas del espermatozoide responsables de la unión con la ZP, se han sugerido algunas proteínas tales como SPAM1 (Myles y Primakoff, 1997, Yudin et al., 1999) y proacrosina/acrosina (Lea et al., 1996, Crosby et al., 1998, Furlong et al., 2000). Los machos KO para SPAM1 resultaron fértiles (Baba et al., 2002) probablemente, por redundancia funcional con Hyal 5 (Kim et al., 2005). En el caso de acrosina, estudios con animales KO han replanteado el papel de esta enzima en el proceso de fertilización ya que los machos carentes de esta proteína son fértiles (Baba et al., 1994). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis que la interacción proacrosina/acrosina con ZP2 sería importante para la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, postulando la existencia de otras proteasas que pudieran reemplazar a proacrosina/acrosina en esos animales KO (Howes et al., 2001).

La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP para la cual se han propuesto dos hipótesis (Yanagimachi, 1994). Una de ellas, la hipótesis “enzimática”, sostiene que el pasaje a través de la ZP sería dependiente de la acción de enzimas presentes en el acrosoma. Según esta teoría, la mayoría de dichas enzimas serían liberadas sobre la superficie de la ZP durante la RA, provocando la hidrólisis de la porción de la ZP que rodea al espermatozoide e induciendo así el “ablandamiento” de la misma. Otras enzimas permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de clivar a las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se haya unido, permitiendo así el avance a través de la ZP. La segunda hipótesis, denominada “mecánica”, propone que la ZP permitiría

la exposición del perforatorium, una estructura rígida que cortaría la ZP y que, conjuntamente con la motilidad hiperactivada presente en los espermatozoides, favorecería la penetración de la ZP. Esta hipótesis ha sido respaldada fuertemente por las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos euterianos, incluyendo la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil filoso del perforatorium y la rigidez de la membrana acrosomal interna (Bedford, 2004). Por otra parte, O'Rand y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis que involucraría “ambos mecanismos”. En primer lugar, el espermatozoide se asociaría a la ZP a través de una unión de alta afinidad (O'Rand et al., 1986), se produciría entonces la degradación de las moléculas de la ZP involucradas en esa interacción, dejando libres a las proteínas del espermatozoide, que quedarían disponibles para interactuar con nuevas moléculas de la ZP. En este punto, jugaría un papel importante la motilidad, ya que si el espermatozoide no se moviera en forma progresiva, la probabilidad de encontrar nuevas moléculas para interactuar sería muy baja y la penetración no se produciría. En este sentido, el grupo de Dean y colaboradores propuso que el espermatozoide intacto reaccionaría al atravesar la ZP por un efecto mecánico de los poros de la misma (Baibakov et al., 2007). Sin embargo, actualmente, por los trabajos recientes que apoyan el modelo que postula que la exocitosis acrosomal ocurriría previo o durante la penetración del cúmulus (ver sección RA), esta teoría no tendría tanto consenso (Jin et al., 2011).

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

interacción (Reid et al., 2011). Esta remodelación podría ser facilitada por el montaje de un complejo multimérico de reconocimiento de la ZP formado por proteínas, chaperonas y “rafts” lipídicos. La formación y el montaje de dicha estructura ocurriría sobre la región dorsal en la cabeza del espermatozoide la cual, una vez ensamblada, migraría hacia el tip (Reid et al., 2011).

Fusión del espermatozoide con el ovocito

Una vez que el espermatozoide ha penetrado la ZP, rápidamente atraviesa el espacio perivitelino. El cual es un microambiente, donde se ha descrito la existencia de vesículas membranosas secretadas por el ovocito y que serían capaces de interactuar con el espermatozoide y favorecerían su capacidad (Miyado et al., 2008) (**Figura 11**). A continuación, tiene lugar la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito. Sólo luego de la ocurrencia de esta fusión, un ovocito puede considerarse fertilizado. La fusión del espermatozoide con el ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión, y una segunda de fusión propiamente dicha. Este proceso comienza con la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito y, luego de un breve período que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi y Phillips, 1980). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (**Figura 12**).

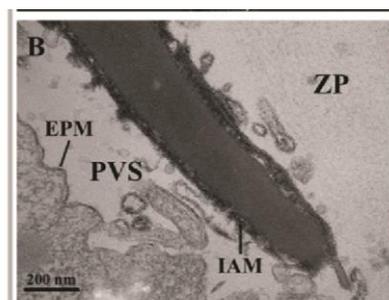


Figura 11: Espacio perivitelino del ovocito. Se muestra una fotografía obtenida con la técnica de microscopía electrónica de transmisión de un espermatozoide en el espacio perivitelino (PVS), muestra una sección longitudinal de la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Se puede observar la membrana acrosomal interna (IAM) expuesta y estructuras vesiculares, provenientes de las microvelocidades del ovocito, alrededor de la IAM. EPM: oolema, ZP: zona pelúcida (escala = 200 nm).

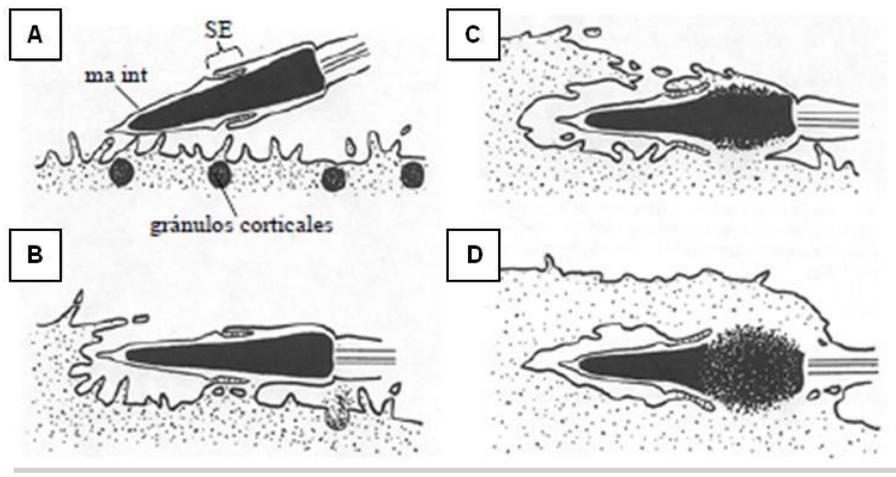


Figura 12: Fusión espermatozoide-ovocito. Se muestra un esquema de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. **A.** inicio de la interacción entre el segmento ecuatorial y el oolema, **B.** inicio de la fusión por el segmento ecuatorial, **C.** la membrana del ovocito junto con citoplasma 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.

No toda la membrana plasmática de las gametas es fusogénica, por lo que los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambas células. El ovocito de roedores se encuentra recubierto de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área que coincide con la región que recubre al huso meiótico (Ebensperger, 1984), y a través de la cual, raramente, ocurre la fusión del espermatozoide (Johnson et al., 1975, Ebensperger, 1984). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y se libera por esta región luego de la fertilización, resultando “peligroso” que el espermatozoide se fusione y se incorpore por allí ya sea por interferir con la correcta liberación del corpúsculo, o bien por ser eliminado durante el proceso de extrusión. Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford, 1978). En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial (SE) es la que primero se fusiona con el ovocito (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988, Arts et al., 1993). La motilidad parecería no ser un requisito absoluto para la ocurrencia de la fusión ya que se ha demostrado que espermatozoides inmóviles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito. Por el contrario, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión ya que, como se mencionó anteriormente, los espermatozoides no reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).

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

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

La asociación entre la integrina $\alpha 6\beta 1$ y la tetraspanina CD9 en la membrana del ovocito de ratón (Chen et al., 1999) y el hecho de que esta tetraspanina haya sido implicada en la fusión de membranas en otros sistemas celulares (Tachibana y Hemler, 1999), sugirió que CD9 también podría cumplir alguna función en el proceso de fusión de gametas. Esta hipótesis fue confirmada por el estudio de animales KO para CD9 (Kaji et al., 2000, Le Naour et al., 2000, Miyado et al., 2000), demostrando que las hembras mutantes son estériles y que sus ovocitos, a pesar de unirse a espermatozoides, son incapaces de fusionarse con los mismos. De acuerdo a estos

resultados, CD9 sería una de las moléculas del ovocito responsable del proceso de fusión entre el espermatozoide y el ovocito. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fertilidad femenina y para la fusión de gametas. Resultados más recientes indicaron que CD9 generaría sitios específicos de adhesión que regularían la fusión espermatozoide-ovocito, acercando y reuniendo a todos los intermediarios de este proceso (Jegou et al., 2011), y que la porción C-terminal de esta molécula estaría involucrada en la formación de dichos complejos y sitios de adhesión (Wang et al., 2011). Además, se ha descrito que la proteína CD9 estaría presente en las vesículas membranosas secretadas por el ovocito y presentes en el espacio perivitelino. La proteína CD9 junto con las vesículas serían capaces de interactuar con el espermatozoide y participarían en la fusión de gametas (Miyado et al., 2008).

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

Respecto a las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión, los estudios se limitan, principalmente, a las proteínas de la familia ADAM, a una proteína descrita denominada "IZUMO" y a la proteína epididimaria CRISP1.

La familia de proteínas denominada ADAM (a disintegrin and a metalloprotease domain) está compuesta por alrededor de 40 miembros (Kim et al., 2006), tres de los cuales han sido postulados como mediadores del proceso de fusión espermatozoide-ovocito: fertilina α /ADAM1 (formado por 2 subunidades: α y β), fertilina β /ADAM2 y ciritestina/ADAM3 (Evans, 1999, Okabe, 2013). A pesar de que el análisis de la fertilidad de ratones KO deficientes para ADAM1a (sólo presente en células

germinales testiculares) ó ADAM2 indicó que los machos son infértiles (Cho et al., 1998, Nishimura et al., 2004) el fenotipo de los ratones fue inesperado y complejo. En ambos casos, la infertilidad *in vivo* se debió a que los espermatozoides presentaban defectos en el transporte a través del oviducto. Por otro lado, ratones KO para ADAM1b resultaron fértiles (Kim et al., 2006). En cuanto a ADAM3, si bien los estudios previos *in vitro* (Evans, 1999) postulaban a esta proteína como mediadora del proceso de fusión, los ratones macho KO exhibieron una capacidad de fusión normal pero resultaron infértiles debido a una unión deficiente entre los espermatozoides y la ZP (Shamsadin et al., 1999, Nishimura et al., 2001) y fallas en la migración de los espermatozoides en el oviducto (Yamaguchi et al., 2006). Por lo tanto, en base a todos los resultados obtenidos, se concluye que, por lo menos en el ratón, el heterodímero constituido por ADAM1b/ADAM2 sería dispensable para el proceso de fertilización a nivel tanto de la migración de los espermatozoides a través del oviducto como de la unión espermatozoide-ZP, descartando muy posiblemente su participación en la fusión espermatozoide-ovocito (Stein et al., 2004). Por otro lado, ADAM1a/ADAM2 sería esencial para la correcta localización de ADAM3 en la superficie del espermatozoide, y ADAM3 sería la molécula requerida para la unión espermatozoide-ZP (Kim et al., 2006). Más aún, se ha reportado que los espermatozoides KO para estas proteínas ADAMs tienen la capacidad de fertilizar ovocitos rodeados de cúmulus al inseminarlos directamente dentro de la *ampulla*, salteando la migración de la unión útero-tubaria, indicando que la etapa de unión a la ZP podría no ser importante en la interacción espermatozoide-ovocito *in vivo* (Okabe, 2013).

En cuanto a la proteína IZUMO, corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide (Inoue et al., 2005). La relevancia de esta proteína para la fertilidad y su rol en el proceso de fusión fueron confirmados mediante el análisis de los animales KO para IZUMO. Los machos mutantes son estériles debido a que tienen comprometida la capacidad fusogénica de sus espermatozoides (Inoue et al., 2005). En este sentido, resultados utilizando ratones KO para Tssk6 (testis-specific serine kinase 6) mostraron que sus espermatozoides eran incapaces de fusionarse con el ovocito debido a que la proteína IZUMO no se redistribuía correctamente (Sosnik et al., 2009). Recientemente, se logró identificar a la proteína JUNO, que actúa como receptor de IZUMO en la membrana del ovocito la cual, como describimos anteriormente, está acoplada a GPI (Bianchi et al., 2014) y sería esencial para la fertilización. Asimismo, la unión IZUMO-JUNO estaría conservada en distintas especies de mamíferos tales como humano y cerdo. La interacción entre IZUMO-JUNO sería de baja afinidad y ocurriría en los

primeros pasos del proceso de fusión (pre-fusión, unos pocos segundos), que iniciaría la formación de un agregado molecular (“*clustering*”) de alta afinidad y robusto entre ambas membranas formado por CD9 e IZUMO. Por lo tanto, la correcta interacción entre las moléculas JUNO-IZUMO estaría fortalecida por la tetrasparina CD9 (Chalbi et al., 2014), la cual fue propuesta previamente como organizadora de los microdominios implicados en la fusión de membranas (Hemler, 2005). Más aún, recientemente, se ha demostrado que la proteína IZUMO de espermatozoides humanos tiene la capacidad de interactuar con la molécula JUNO presente en ovocitos de hámsters, siendo éste el posible mecanismo por el cual los ovocitos de dicha especie pueden ser penetrados y fusionarse con espermatozoides humanos (Bianchi y Wright, 2015).

Finalmente, la participación de la proteína CRISP1 en el proceso de fertilización será desarrollada en profundidad en una sección posterior de la introducción.

En conjunto, existirían hasta el momento, dos modelos que explican el mecanismo de fertilización. El modelo clásico (**Figura 13**, izquierda), en el cual el espermatozoide intacto tendría hialuronidasas (SPAM1 y otras moléculas en la superficie) que le permitirían penetrar la matriz del cúmulus y unirse a la ZP, la cual gatillaría la RA. En el otro modelo (**Figura 13**, derecha), los espermatozoides penetrarían el cúmulus sólo luego de haber sufrido la RA. Hasta el momento, IZUMO y CRISP1 serían las proteínas del espermatozoide requeridas para la fusión con el ovocito, mientras que CD9 y JUNO serían las moléculas del ovocito que estarían regulando este proceso (Okabe, 2013).

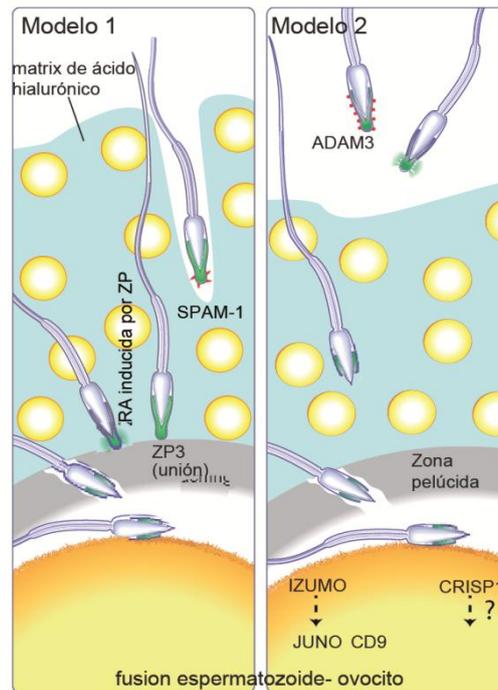


Figura 13: Representación esquemática de los modelos postulados del proceso de fertilización en mamíferos *in vivo*. **Modelo 1:** la RA ocurría, principalmente, cuando el espermatozoide contacta con la ZP. **Modelo 2:** la RA sería un proceso gradual, espontáneo y la mayoría de los espermatozoides que fertilizan a los ovocitos, comenzarían a reaccionar antes de penetrar el cúmulus.

Activación del ovocito

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, y formación de un nuevo individuo. A este reinicio de la actividad del ovocito se lo denomina activación. Unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en el ovocito (Yanagimachi, 1994). Los indicadores más visibles de la activación son la exocitosis de los gránulos corticales y el reinicio de la meiosis.

En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana que contienen mucopolisacáridos y diversas enzimas (Ducibella, 1996). Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales han sido liberados por exocitosis hacia el espacio perivitelino (Ducibella, 1991, Hoodbhoy y Talbot, 1994, Ducibella, 1996). Su función es modificar la ZP, como así también el oolema de forma tal de prevenir la polispermia. En este sentido, más

recientemente, se describió que la proteína ovastacin presente en estos gránulos, estaría involucrada en el clivaje de ZP2, generando en consecuencia, la modificación en la ZP (Burkart et al., 2012).

Luego de la fusión se reinicia la meiosis, con la posterior liberación del segundo corpúsculo polar y transformación del complemento haploide en el pronúcleo femenino. En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica (**Figura 14**).

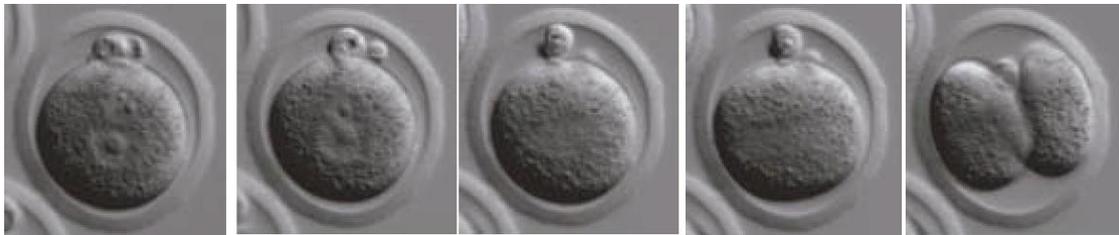


Figura 14: Ovocito fertilizado. Microfotografías de un ovocito de ratón ya fertilizado a lo largo del tiempo. En las primeras fotos se observan los dos pronúcleos en el centro del ovocito conteniendo varios nucléolos cada uno. A continuación, las envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica (última foto). El diámetro del cigoto es aproximadamente 80 μm .

En la **Figura 15** se resumen los eventos más relevantes que ocurren en el tracto reproductor femenino desde la eyaculación hasta la fertilización del ovocito (Aitken y Nixon, 2013).

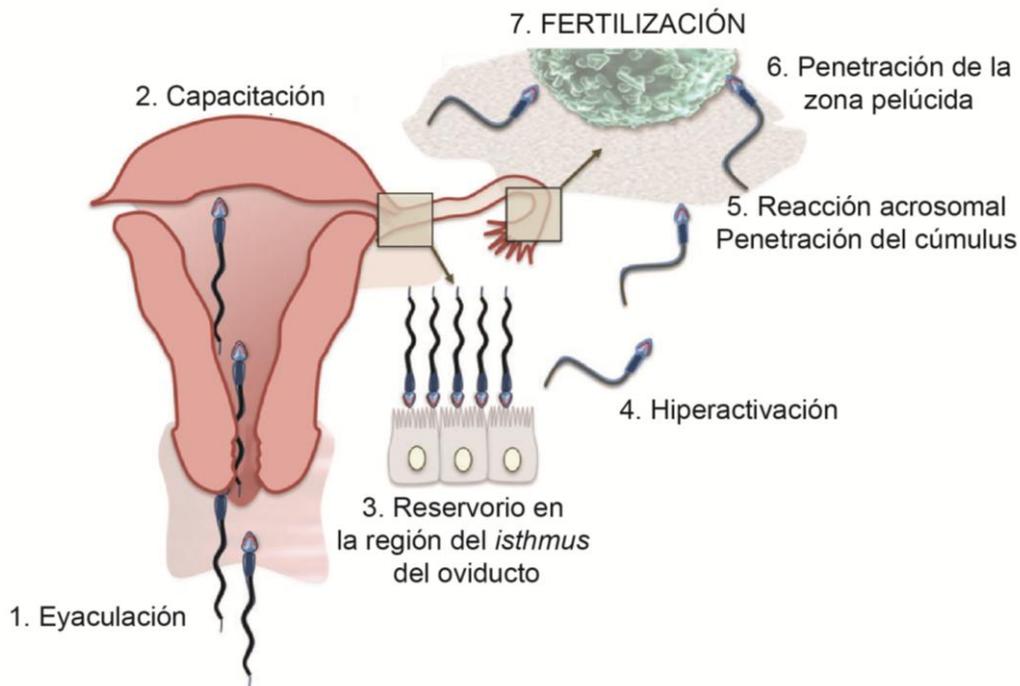


Figura 15: Los distintos eventos en el tracto femenino: 1. Durante la eyacuación, los espermatozoides se liberan en el tracto genital femenino, las células se mueven progresivamente pero no están capacitadas. 2. Los espermatozoides transitan por el útero, iniciando la capacitación. 3. Los espermatozoides continúan con la capacitación hasta su llegada al oviducto, donde se genera un reservorio en la región del *isthmus*. Los espermatozoides se unen al epitelio del oviducto permaneciendo quiescentes hasta la llegada de la señal de la ovulación. 4. La cual genera nuevamente distintos cambios para finalizar el proceso de capacitación y desarrollar la hiperactividad, los espermatozoides se liberan del epitelio y finalmente, migran hacia la *ampulla*, el sitio de la fertilización. 5. Las células sufren la RA y penetran la matriz del cúmulus (6) y la ZP (7). El último paso involucra la FERTILIZACIÓN del ovocito.

Mecanismos moleculares del proceso de capacitación

Como mencionamos anteriormente, la capacitación involucra una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos en los espermatozoides (Visconti, 2009). A continuación describiremos los antecedentes más importantes y relevantes para esta Tesis Doctoral de los distintos eventos asociados a la capacitación.

Colesterol y “rafts”

Uno de los mayores cambios que ocurren durante el proceso de capacitación implica la desestabilización de la membrana plasmática. En diversas especies, se ha demostrado que la membrana de los espermatozoides muestra una distribución asimétrica de lípidos (Muller et al., 1994, Gadella et al., 1999), la cual sería

distorsionada por acción del ion HCO_3^- durante la capacitación (Gadella y Harrison, 2000, Baumber y Meyers, 2006). Se cree que el mayor efecto de la reorganización de los lípidos sería el de facilitar la remoción del colesterol de ciertas dominios de la membrana plasmática (Flesch et al., 2001). Aunque el eflujo de colesterol está involucrado en el proceso de capacitación, se desconoce el mecanismo por el cual modula la fisiología del espermatozoide. La albúmina, presente en el tracto femenino, fue propuesta como uno de los agentes removedores del colesterol (Go y Wolf, 1985, Cross, 1998, Visconti et al., 1999). Sin embargo, posteriormente, se demostró que la albúmina remueve colesterol sólo luego de la reorganización de los lípidos, evento inducido por el HCO_3^- (Flesch et al., 2001). A su vez, el bajo contenido de colesterol tiene efectos importantes sobre los microdominios de la membrana denominados “rafts”, complejos dinámicos compuestos por colesterol y esfingolípidos. Se postula que los “rafts” estarían involucrados en la transducción de señales intracelulares ya que en los mismos se agrupan ciertos tipos de proteínas intrínsecas de membrana (Simons y Toomre, 2000). Evidencias obtenidas en el cerdo muestran que dos marcadores de “rafts” se redistribuyen a la región apical de la membrana del espermatozoide como consecuencia de la acción del HCO_3^- y albúmina presentes en la capacitación (van Gestel et al., 2005).

Como resultado de la pérdida de colesterol, aumenta la fluidez de la membrana, produciendo un incremento de la inestabilidad de dicha membrana que facilita la pérdida de proteínas y, probablemente, al debilitar la unión de proteínas de superficie (Harrison y Gadella, 2005), se podrían explicar algunos fenómenos de redistribución de proteínas que se han asociado con la capacitación (Travis y Kopf, 2002), entre los que puede mencionarse a la proteína fertilina de cobayo (Cowan et al., 2001), la galactosiltransferasa de ratón (Lopez y Shur, 1987), la proteína epididimaria de rata CRISP1 (Rochwerger y Cuasnicu, 1992) y la proteína IZUMO en distintas especies (Sosnik et al., 2009, Sutovsky, 2009). Asimismo, esta desestabilización de la membrana plasmática probablemente debilite la unión de los mencionados factores decapacitantes, proteínas de superficie que están débilmente asociadas al espermatozoide epididimario, las cuales inhiben la capacitación y son liberadas durante el tránsito por el tracto femenino (Oliphant et al., 1985, Fraser et al., 1990, Fraser, 2010). Tanto el aumento de la fluidez de la membrana como la relocalización de proteínas de membrana y la pérdida de proteínas de superficie estarían relacionados a eventos intracelulares que llevan a la adquisición del estado funcional de capacitación.

Ingreso de HCO_3^- y Ca^{2+}

Las células utilizan una porción significativa de sus fuentes de energía para regular el flujo y el gradiente intracelular de iones a través de bombas y transportadores iónicos de membrana, modificando así el potencial eléctrico de la célula y las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros (Visconti et al., 2011). Evidencias en la bibliografía sugieren que el flujo de ciertos iones a través de la membrana del espermatozoide cumple un importante rol tanto en el proceso de capacitación como en la hiperactividad y la RA (Visconti et al., 2002, Darszon et al., 2006). En este sentido, durante el tránsito por el tracto reproductor masculino y femenino, los espermatozoides están expuestos a distintas concentraciones de iones. Mientras que los espermatozoides del *cauda* epididimario se almacenan en un entorno que contiene niveles altos de K^+ y bajos de Na^+ y HCO_3^- , en el tracto genital femenino estas concentraciones de iones cambian radicalmente, y el espermatozoide se encuentra en un medio con concentraciones bajas de K^+ y altas de Na^+ y HCO_3^- (Visconti et al., 2002). Estos cambios en las concentraciones extracelulares de iones producen variaciones en las concentraciones intracelulares de los mismos y de otros iones, tal como es el caso de los niveles de Ca^{2+} . Aunque el papel exacto de estas moléculas continúa en estudio, existen evidencias que muestran que tanto HCO_3^- como Ca^{2+} juegan un rol central en la regulación de la capacitación activando cascadas de señales intracelulares (Visconti et al., 1995a, Visconti et al., 1995b, Visconti et al., 2011).

La entrada de HCO_3^- , a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) y del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), localizados en la pieza principal del espermatozoide, serían los responsables del aumento en el pH intracelular junto con la activación del canal de protón H_v (Zeng et al., 1996) y estarían involucrados en el proceso de capacitación (Demarco et al., 2003, Wang et al., 2003, Quill et al., 2006, Casey et al., 2010). Por otro lado, el Cl^- también sería importante para el ingreso de HCO_3^- ya que, por un lado, se describió la presencia de un canal de Cl^- denominado CFTR (“*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*”) que regularía la actividad de los canales de Na^+ epiteliales ENaC (epithelial Na^+ channel) en los espermatozoides de ratón (Hernandez-Gonzalez et al., 2007), y por otro lado, recientemente, se ha identificado un co-transportador de Na^+ , K^+ y Cl^- , denominado NKCC, que generaría un aumento intracelular de Cl^- , lo cual permitiría la activación de un anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (SLC26) como otro mecanismo para facilitar la entrada del HCO_3^- (Wertheimer et al., 2008) (**Figura 16**).

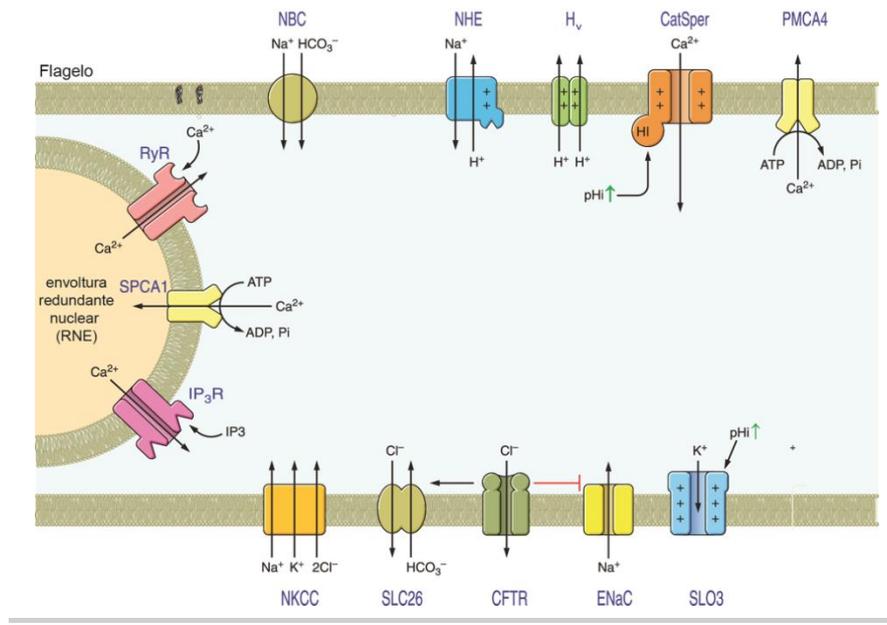


Figura 16. Flujo de iones durante la capacitación y la hiperactividad.

Durante la capacitación, también ocurre un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Ruknudin y Silver, 1990, Baldi et al., 1991). En cuanto al influjo de Ca^{2+} , se han propuesto dos candidatos responsables: los canales operados por voltaje, tales como CaVs y CatSper, a la expulsión de Ca^{2+} de la célula por su parte, estaría modulada por bombas de Ca^{2+} ATPasa (i.e. PMCA) e intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los reservorios intracelulares, presentes en la cabeza (acrosoma) y el cuello (envoltura redundante nuclear) también están propuestos como mediadores del mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Entre los mismos los principales serían el receptor de inositol trifosfato (iP_3) y rianodínico (RyR) y la bomba Ca^{2+} -ATPasa retículo sarco/endoplasmática (SERCA o SPCA4) (Darszon et al., 2011) (**Figura 16**).

Con respecto a CatSper, el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide, se ha demostrado que es esencial para la fertilidad no sólo utilizando modelos de ratones KO sino también analizando pacientes que carecen de este canal debido a mutaciones del gen correspondiente (Hildebrand et al., 2010, Smith et al., 2013). CatSper está compuesto por cuatro subunidades principales (CatSper1–4), más dos subunidades transmembranas auxiliares CatSper B y G (Liu et al., 2007, Wang et al., 2009, Ren, 2010), y se localiza en la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014). Este canal es regulado fuertemente por cambios de pH, alcalinización del medio intracelular y ligandos como progesterona y albúmina pero muy débilmente por voltaje (Kirichok et al., 2006, Ren, 2010). CatSper es fundamental para el desarrollo de la hiperactividad y,

recientemente, se ha demostrado que su actividad regula la capacitación de los espermatozoides de ratón (Chung et al., 2014).

Por otro lado, otro de los canales de Ca^{2+} del espermatozoide es TRPM8 (“*transient receptor potential M8*”). Sus corrientes son sensibles a diferencias de voltaje y a temperaturas menores a 25 °C. Si bien los animales KO para dicho canal son fértiles, sus espermatozoides presentaron deficiencias en la RA, en concordancia con su localización en la cabeza (Martinez-Lopez et al., 2011). Más aún, este canal se encuentra también en el flagelo, postulándose su participación en el desarrollo de la hiperactividad. Teniendo en cuenta que no se ha detectado corriente iónica a través de TRPM8 en espermatozoides epididimarios (Lishko et al., 2012, Zheng et al., 2013) en la actualidad, se cuestiona la relevancia funcional de este canal en el espermatozoide maduro.

La expulsión de Ca^{2+} en el espermatozoide ocurre principalmente a través de PMCA4 (bombas de Ca^{2+} ATPasa isoforma 4). El espermatozoide epididimario presenta en el flagelo dos variantes de “*splicing*”, 4a y 4b (Patel et al., 2013). Los animales KO para esta proteína presentan espermatozoides epididimarios inmóviles con altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, demostrando la importancia de mantener la homeostasis de Ca^{2+} para la fertilidad de los machos (Okunade et al., 2004, Schuh et al., 2004). Considerando que PMCA4 cuenta con la capacidad de expulsar el Ca^{2+} intracelular y que durante la capacitación se observa un aumento de los niveles de dicho catión, es probable que esta proteína participe en la capacitación del espermatozoide, mecanismo que aún no ha sido demostrado.

Hiperpolarización

El potencial de membrana de las células está dado por la permeabilidad de la membrana a los iones presentes en el medio, principalmente los cationes Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y al anión HCO_3^- . Los cambios en la permeabilidad al Cl^- , por su parte, no tendrían un efecto evidente en las variaciones de potencial. En este sentido, evidencias en la bibliografía indican que el potencial de membrana del espermatozoide en reposo es más despolarizado que el de otros tipos celulares (Zeng et al., 1995, Hernandez-Gonzalez et al., 2006) probablemente debido a su mayor permeabilidad al Na^+ por la presencia de los canales de Na^+ epiteliales (ENaC) que estarían normalmente abiertos en el espermatozoide en reposo (Hernandez-Gonzalez et al., 2006). Por otro lado, el proceso de capacitación está acompañado de una

hiperpolarización de la membrana (Zeng et al., 1995), ya que ocurre un aumento de la concentración intracelular de cargas negativas en comparación con el medio extracelular. Si bien aún no es clara la regulación del potencial de membrana del espermatozoide durante la capacitación, existen diversas evidencias que sugieren que la hiperpolarización ocurriría debido a un aumento en la permeabilidad al K^+ . La salida de K^+ a través de canales rectificadores sería responsable, en parte, de la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación (Munoz-Garay et al., 2001, Acevedo et al., 2006). Resultados ya publicados en el modelo del ratón KO para el canal de K^+ Slo3, indicaron que el mismo sería esencial para la ocurrencia de la hiperpolarización (Santi et al., 2010) y, a su vez, regularía la actividad de CatSper (Chavez et al., 2014). Si bien, el papel funcional la hiperpolarización es aún desconocido, se puede especular que, debido a que la capacitación prepara al espermatozoide para sufrir la RA y desarrollar la hiperactivación, podría regular la capacidad de los espermatozoides para generar aumentos de Ca^{2+} transitorios durante estos dos eventos en respuesta a inductores fisiológicos tales como la progesterona.

Fosforilación de proteínas asociadas a la capacitación

Relevancia funcional

El espermatozoide, a diferencia de otros tipos celulares, depende más fuertemente de la fosforilación de proteínas y de otras modificaciones post-traduccionales ya que el mismo es transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar proteínas. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de fosforilación tiene primordial importancia no sólo para el diagnóstico o tratamiento de pacientes infértiles sino también para el desarrollo de reguladores de la fertilidad.

Como se mencionara anteriormente, uno de los eventos moleculares que ocurre durante la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro*, es un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina (Tyr) (Visconti et al., 2002, Visconti, 2009), el cual regularía la actividad de enzimas requeridas para los eventos posteriores a dicho proceso. La localización de las proteínas fosforiladas en Tyr es, en la mayoría de las especies, en las piezas media y principal del flagelo (ratón (Urner et al., 2001), mono (Mahony y Gwathmey, 1999), hámster (Si y Okuno, 1999) y humano (Naz et al., 1991, Carrera et al., 1996, Leclerc et al., 1997). Recientemente, Chung y colaboradores (2014), utilizando un microscopio de fluorescencia de súper-resolución (nano escala), confirmaron que las proteínas fosforiladas en Tyr se localizan dentro de la pieza

principal del flagelo de los espermatozoides de ratón y demostraron, por primera vez, que estas proteínas se encontrarían en íntimo contacto con el axonema (Chung et al., 2014) (**Figura 17**).

La fosforilación en Tyr en el flagelo estaría relacionada con el desarrollo de la hiperactividad del espermatozoide (Mahony y Gwathmey, 1999, Nassar et al., 1999, Si y Okuno, 1999), requerida para la penetración del cúmulus y la ZP. En este sentido, una de las primeras proteínas fosforiladas identificadas en el espermatozoide humano fue la proteína de anclaje de quinasa 4 (*A-Kinase Anchoring Proteins4*, AKAP4) (Carrera et al., 1996), la cual, al interactuar con varias proteínas, participaría de la correcta regulación de la hiperactividad. Además, varias de las proteínas fosforiladas en Tyr tales como aldolasa específica de espermatozoide, glutatión S- transferasa la NADH deshidrogenasa y la subunidad α de la piruvato deshidrogenasa, estarían regulando la glicólisis, esencial para el desarrollo del movimiento vigoroso del flagelo. Asimismo, se reportó que la proteína del citoesqueleto β -tubulina se fosforila en Tyr durante la capacitación, regulando también el movimiento de la cola del espermatozoide (Arcelay et al., 2008).

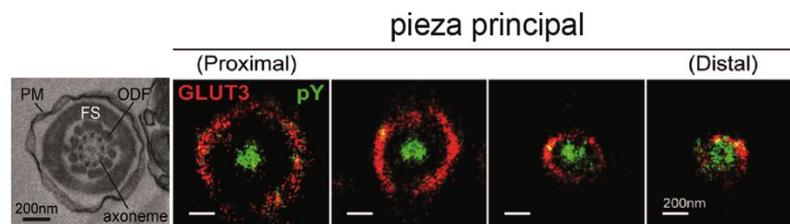


Figura 17. Estructuras del flagelo espermatozoide analizadas por la tecnología 3D STORM. Fotografía del flagelo del espermatozoide obtenida mediante la técnica de microscopía de transmisión de electrones (TEM). Izquierda: imagen de un corte transversal de la pieza media (12000x). FS: vaina fibrosa, ODF: fibras densas externas, PM: membrana plasmática, M: mitocondria. Imágenes de STORM en verde corresponde a la fosforilación en Tyr (pY) y en rojo a GLUT3 de cortes transversales de los ejes y-z de las regiones proximales y distales de la pieza principal del flagelo. Figura basada en (Chung et al., 2014).

Las proteínas fosforiladas en el flagelo también serían necesarias para la fusión de gametas ya que se ha reportado que los espermatozoides de ratón unidos al oolema mantienen la fosforilación en el flagelo (Urner y Sakkas, 2003). Más aún, Naz y colaboradores (1991) demostraron que un anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en Tyr inhibe la unión del espermatozoide humano con la ZP y la penetración de ovocitos de hámsters sin ZP (Naz et al., 1991). Por otro lado, se han descrito proteínas fosforiladas en Tyr en la cabeza del espermatozoide (Urner et al., 2001, Asquith et al., 2004), a las cuales se les atribuyó roles en la RA y en la

interacción del espermatozoide con el ovocito. En conjunto, la fosforilación en Tyr regularía la mayoría de los procesos dependientes de la capacitación modulando, en consecuencia, el proceso de fertilización (Visconti et al., 1995a, Visconti et al., 1995b, Galantino-Homer et al., 1997, Visconti et al., 1999, Osheroff et al., 1999, Kulanand y Shivaji, 2001, Tardif et al., 2001, Pommer et al., 2003, Sidhu et al., 2004).

A pesar de que muchos grupos demostraron el incremento en la fosforilación de proteínas en Tyr asociado a la capacitación espermática de diversas especies (Visconti et al., 1995a, Leclerc et al., 1996, Galantino-Homer et al., 1997, Osheroff et al., 1999, Visconti et al., 1999, Da Ros et al., 2004), todavía es muy limitado el conocimiento de la identidad y la función de una gran cantidad de proteínas que sufren esta modificación post-traducciona durante la capacitación. Resultados recientes de proteómica de proteínas fosforiladas en Tyr purificadas de espermatozoides de ratón revelaron 62 motivos diferentes de fosforilación en Tyr. Dentro las proteínas fosforiladas identificadas con función conocida, se encontraron las de estructura flagelar (27%), las involucradas en vías de señalización (21%), las que participan en el metabolismo (13%), y las que se localizan en la cabeza (9%) y en la mitocondria (4%) (Figura 18). Además, dicho análisis reveló que los espermatozoides no capacitados presentan niveles bajos de fosforilación en Tyr y proteínas fosforiladas localizadas en su mayoría en la cabeza (Chung et al., 2014).

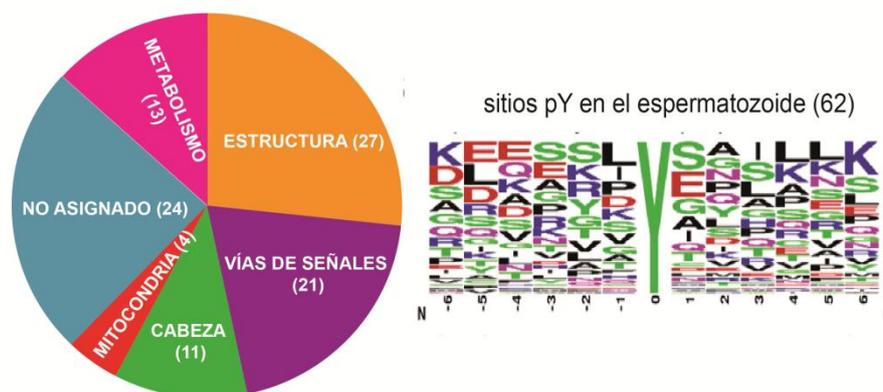


Figura 18: Porcentaje de abundancia de proteínas identificadas en el análisis de fosfo-proteómica de espermatozoides capacitados de ratón (izquierda). Frecuencia de aminoácidos en la cercanía del sitio de fosforilación en Tyr de los 62 motivos identificados en el espermatozoide capacitado de ratón, utilizando el software (WebLogo).

Cascadas de señalización involucradas en la capacitación

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato del adenosin trifosfato (ATP) a los grupos hidroxilo de los aminoácidos Ser, Thr o Tyr de diversas proteínas. Según el aminoácido al cual transfieren el grupo fosfato, estas enzimas se clasifican en: Ser/Thr quinasas o Tyr quinasas (Visconti et al., 2011).

i. Cascada de señalización AMPc/PKA

Numerosos estudios en diferentes especies han mostrado que la entrada de HCO_3^- durante la capacitación es necesaria para la activación de la proteína adenilato ciclasa soluble (sAC) llevando a un aumento en los niveles de AMPc y la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA). De este modo, PKA fosforila diversas proteínas en residuos Ser y Thr para, finalmente, activar una cascada de señalización conducente al aumento de la fosforilación de proteínas en residuos Tyr en el espermatozoide (Visconti, 2009).

En las células de mamíferos, se han identificado diez tipos de AC, nueve de las cuales están asociadas a la membrana (mACs) y a la proteína G (Hanoune y Defer, 2001, Sunahara y Taussig, 2002, Wertheimer et al., 2013), mientras que la restante AC no se asocia a la proteína G (se la denomina soluble o sAC) y se encuentra presente en el flagelo del espermatozoide, activándose por HCO_3^- y Ca^{2+} (Buck et al., 1999, Chen et al., 2000, Hess et al., 2005, Kamenetsky et al., 2006). Los animales KO para la sAC son infértiles ya que sus espermatozoides no exhiben fosforilación en Tyr asociada a la capacitación y tienen alteraciones en la motilidad espermática (Esposito et al., 2004, Hess et al., 2005, Xie et al., 2006). Sin embargo, el espermatozoide también presenta mACs en la cabeza (la isoforma 2, 3 y 8) (Baxendale y Fraser, 2003), postulándose la participación de las mismas en la RA (Wertheimer et al., 2013). En este sentido, los espermatozoides provenientes de ratones KO para la AC3 no mostraron defectos en la fosforilación en Tyr pero presentaron alteraciones en la RA inducida y en la capacidad fertilizante *in vitro* (Livera et al., 2005).

La concentración de AMPc es el resultado del balance entre la síntesis a través de la acción de ACs y la degradación de este compuesto por las fosfodiesterasas (PDEs), generando 5'AMP. Se han descrito un total de seis enzimas PDEs (1, 4, 6, 8, 10 y 11) tanto en el flagelo como en la cabeza de los espermatozoides, las cuales difieren en su estructura, preferencia de sustrato y respuesta a los inhibidores (Soderling y

Beavo, 2000, Baxendale y Fraser, 2003). Varios reportes proponen a las PDEs como moléculas fundamentales del proceso de capacitación ya que mantendrían los niveles de AMPc, siendo importantes no sólo para la fosforilación en Tyr sino también para los eventos posteriores tales como la hiperactividad y la RA (Lefievre et al., 2002, Baxendale y Fraser, 2003).

En cuanto a PKA, constituye un mediador central en la señalización intracelular dada su capacidad de regular varios eventos del proceso de capacitación. En el estado inactivo, PKA existe como un complejo tetramérico formado por dos subunidades regulatorias, que presentan alta afinidad por el AMPc, y dos subunidades catalíticas unidas de forma no covalente. El mecanismo de activación de PKA involucra la unión de dos moléculas de AMPc a los sitios en cada subunidad regulatorias, generando un cambio conformacional y la disociación del dímero de regulatorias con los dos monómeros de catalítica. Las subunidades catalítica, que en dicho estado son catalíticamente activas, fosforilan a sus sustratos específicos en residuos de Ser y Thr (Alberts, 2002) (**Figura 19**).

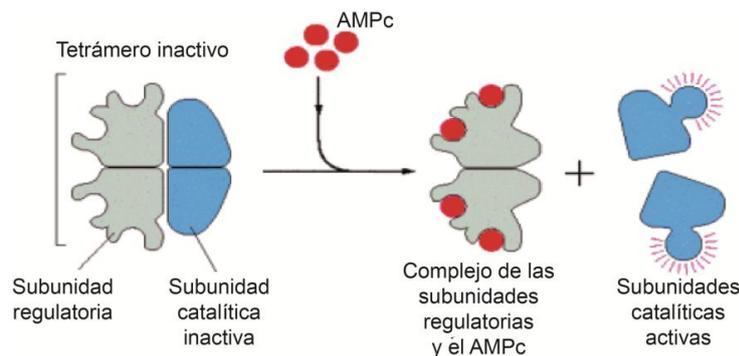


Figura 19: Mecanismo de regulación de PKA. PKA es un tetrámero compuesto por dos unidades reguladoras y dos catalíticas. En su estado inactivo el tetrámero permanece unido hasta que la asociación de 4 moléculas de AMPc desencadena la disociación del mismo, liberando las subunidades catalíticas que son las encargadas de continuar con la transducción de la señal. Adaptado de Molecular Biology of the Cell, Alberts B. 2002

Se han caracterizado varias isoformas de subunidades catalítica ($C\alpha$, $C\beta$, $C\alpha 2$ o $C\gamma$) que se expresan diferencialmente en distintos tejidos y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA (Taylor et al., 2012). El espermatozoide presenta una variante de *splicing* específica de testículo de la subunidad catalítica $C\alpha 2$ (Desseyne et al., 2000), cuya ausencia produce animales infértiles por defectos tanto en la fosforilación de proteínas en Tyr asociada a la capacitación como también en la hiperactividad (Nolan et al., 2004), tal como el fenotipo de los animales carentes de sAC (Esposito et al., 2004, Hess et al., 2005, Xie et al., 2006). Por otro lado, las

subunidades regulatorias se dividen en RI α , RII α y RI β que son de expresión ubicua (Smith y Scott, 2006, Jarnaess y Tasken, 2007) y RII β que se expresa en el testículo y está presente en el espermatozoide (Jarnaess y Tasken, 2007). Los animales provenientes de animales KO para esta subunidad son fértiles y sus espermatozoides no muestran defectos en el proceso de capacitación, indicando que las otras variantes de esta subunidad pueden reemplazar esta función. De forma particular, las isoformas RII pueden asociarse con proteínas de anclaje llamadas AKAPs que permiten localizar a PKA en diferentes compartimentos subcelulares para fosforilar distintos sustratos según el estímulo (Muratori et al., 2011), contribuyendo de esta forma no sólo a aumentar la especificidad y versatilidad de la transducción de señales, sino también a acotar espacio-temporalmente la actividad de PKA (Jarnaess y Tasken, 2007). En la vía AMPc/PKA asociada a la capacitación, la proteína AKAP4 es la que participaría en la correcta ubicación tanto de PKA como de sus sustratos (Fulcher et al., 1995, Carrera et al., 1996, Vijayaraghavan et al., 1999). A su vez, existen otras Ser/Thr quinasas en el espermatozoide tales como por ejemplo: PKC (Lax et al., 1997, Rotman et al., 2010), Erk1/2 (Luconi et al., 1998, de Lamirande y Gagnon, 2002), GSK3 (Aquila et al., 2005), CaMKIV (Marin-Briggiler et al., 2003) y la quinasa caseína II, que es miembro de la familia de Ser quinasas específicas de testículo (Li et al., 2011). Sin embargo, no se conocen los mecanismos en los que las mismas participan en el proceso de capacitación.

Si bien es claro que la activación de PKA es importante para el proceso de capacitación, aún resta dilucidar los mecanismos moleculares que llevan a PKA a estimular la fosforilación en Tyr. En este sentido, dado que PKA fosforila en Ser/Thr, no podría directamente modificar los niveles de fosforilación en Tyr, habiéndose propuesto algunos modelos que podrían estar involucrados: (a) PKA estimula directamente a una Tyr quinasa, (b) PKA inhibe una Tyr fosfatasa y, por último, (c) PKA fosforila un gran número de proteínas en Ser/Thr que generarían que algunos de esos sustratos estén involucrados en la fosforilación de proteínas en Tyr (Visconti et al., 2002).

ii. Cascada de señalización de SFKs y Ser/Thr fosfatasas

En los últimos años, se ha tratado de identificar las Tyr quinasas responsables de los cambios observados en la fosforilación en Tyr que acompañan al proceso de capacitación. Varios grupos han demostrado la presencia de Tyr quinasas de la familia (SFKs) en el espermatozoide humano y de ratón (Src, Lyn, Fyn, Yes y Lck) (Baker et

al., 2006, Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008, Varano et al., 2008). En dichos trabajos se observó que los inhibidores de SFKs bloquean la fosforilación en Tyr asociada a la capacitación, consistente con la hipótesis que establece que Src juega un importante rol sobre la fosforilación en Tyr. Sin embargo, los espermatozoides provenientes de animales KO para Src presentan un incremento normal en la fosforilación en Tyr asociada a la capacitación, sugiriendo que esta Tyr quinasa no sería esencial o podría ser reemplazada por otra SFKs (Krapf et al., 2010). Además, considerando que los inhibidores de SFKs bloquean no sólo la fosforilación en Tyr sino también la fosforilación de los sustratos de PKA en el espermatozoide de ratón, se ha propuesto que SFKs no estarían directamente involucradas en la regulación de la fosforilación de Tyr sino que estarían modulando negativamente la actividad inhibitoria de Ser/Thr fosfatasas sobre dicha fosforilación (Krapf et al., 2010). Estos dos modelos son controversiales ya que mientras uno plantea que SFKs estarían involucradas directamente en la regulación de los niveles de fosforilación en Tyr, el otro postula que dichas quinasas modularían indirectamente, a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas. En base a ello, sería de sumo interés dilucidar cuál de los dos mecanismos lleva al aumento de fosforilación en Tyr para una mayor comprensión de las cascadas de señalización que permiten el desarrollo del proceso de capacitación.

La quinasa Src puede adoptar dos conformaciones muy relacionadas con su actividad enzimática (Tatosyan y Mizenina, 2000). La primera de ellas, denominada *conformación abierta*, constituye un requisito necesario para que la quinasa se active ya que en ella, los diferentes dominios están accesibles, permitiendo interacciones entre la quinasa y diferentes proteínas a través de sus dominios SH2 y SH3 (“*Src homology domain*” número 2 y 3), implicados en interacciones proteína-proteína, a través de residuos fosforilados en Tyr. En la otra conformación, la denominada *cerrada*, la proteína es inactiva y sufre una serie de interacciones intramoleculares que mantienen su centro activo y sus dominios de interacción (SH2 y SH3) inaccesibles. Existen además, dos residuos clave de Src: el residuo Tyr-418 (u otro dependiendo de la quinasa de dicha familia), el cual es el sitio de auto-fosforilación y es esencial para la actividad de la enzima (Superti-Furga, 1995, Brown y Cooper, 1996, Mendieta y Gago, 2004), y el residuo Tyr-529 el cual es fosforilado por la quinasa Csk (Tyr quinasa del dominio C-terminal de Src) y desfosforilado por fosfatasas (Harder et al., 1998). Esta fosforilación es responsable de la inactivación de Src, ya que el residuo fosforilado interactúa con el dominio SH2 de la propia quinasa haciendo que la quinasa adopte la conformación cerrada e inactiva (Mendieta y Gago, 2004) (**Figura 20**).

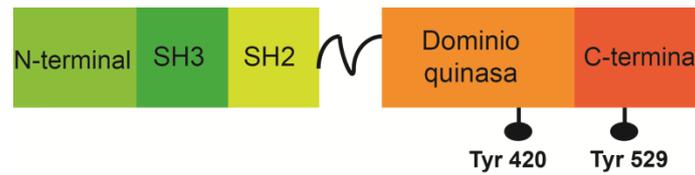


Figura 20: Mecanismo de regulación de Src. Esquema de los dominios que forman la quinasa Src.

Una de las principales características de la fosforilación de proteínas es que puede revertirse por acción de las enzimas fosfatasas. En las células, existe un balance dinámico entre la fosforilación y desfosforilación de proteínas por la acción concertada de quinasas y fosfatasas. Una alteración en este equilibrio, probablemente, genere un impacto importante en la transducción de señales. Las proteínas fosfatasas pueden ser clasificadas en dos grupos, dependiendo del residuo fosforilado sobre el que actúan: Ser/Thr fosfatasas (Mumby y Walter, 1993) y Tyr fosfatasas (Soulsby y Bennett, 2009). A continuación, se describen los aspectos más relevantes referidos al primer grupo de fosfatasas ya que es de interés para esta Tesis.

Las Ser/Thr fosfatasas se caracterizan por presentar un número acotado de subunidades catalíticas que, en su mayoría, funcionan en complejos heterooligoméricos con una gran diversidad de subunidades regulatorias. Esta característica le otorga a estas enzimas especificidad de sustrato y de localización subcelular (Barford, 1996, Cohen, 2002). Las isoformas PP1, PP2A y PP2B son las responsables de casi toda la actividad de Ser/Thr fosfatasa *in vivo* de las células de mamífero, incluyendo al espermatozoide (Virshup y Shenolikar, 2009, Fardilha et al., 2011b).

En células somáticas, PP1 presenta 3 isoformas: PP1 α , PP1 β y PP1 γ . Sin embargo, en el testículo solamente se describieron dos de ellas: α y γ . Esta última presenta dos variantes de *splicing*: PP1 γ 1, que es ubicua, y PP1 γ 2, que se expresa exclusivamente en el testículo y es la única de estas isoforma descrita, hasta el momento, en el espermatozoide (Smith et al., 1996). Se ha descrito la presencia de PP1 γ 2 en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Huang et al., 2002) como así también, en la pieza media del flagelo cumpliendo, posiblemente, un rol en el desarrollo de la motilidad progresiva durante la maduración epididimaria y de la hiperactividad durante la capacitación (Smith et al., 1996, Huang et al., 2002, Mishra et al., 2003). Más aún, los animales KO para esta fosfatasa son infértiles ya que no presentan una correcta espermatogénesis (Varmuza et al., 1999). Por su parte, PP2A también está presente en los espermatozoides de varias especies, incluyendo el

humano (Tash y Means, 1988), fue postulada como una de las moléculas moduladoras de la hiperactividad de los espermatozoides de hámster (Si y Okuno, 1999). Más aún, recientemente, se ha reportado que los animales deficientes de la subunidad catalítica PP2A en testículo son infértiles por alteraciones en la espermatogénesis (Pan et al., 2015). Por último, se ha observado la presencia en el espermatozoide de la fosfatasa PP2B, también conocida como calcineurina, que es dependiente de calmodulina (CaM) y Ca^{2+} y está asociada a los procesos de hiperactividad y RA (Tash et al., 1988). En conjunto, si bien se ha relacionado la actividad de Ser/Thr fosfatasas con diversos eventos funcionales que ocurren en el espermatozoide, aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales dichas fosfatasas podrían regular el aumento en fosforilación en Tyr que ocurre durante la capacitación.

iii. Cascada de señalización dependiente de Ca^{2+}

Como se mencionó anteriormente, durante la capacitación, ocurre un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ruknudin y Silver, 1990, Baldi et al., 1991), que modificaría la actividad de un complejo grupo de moléculas en el espermatozoide (Jimenez-Gonzalez et al., 2006, Publicover et al., 2007). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los efectores moleculares que decodifican la señal intracelular de aumento de Ca^{2+} . La principal molécula que sensa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es CaM, una pequeña proteína ubicua que sirve como receptor intracelular de Ca^{2+} (Means et al., 1982), se localiza en el acrosoma y en la pieza principal flagelar, específicamente dentro de la vaina fibrosa (Schlingmann et al., 2007, Chung et al., 2014), y se encuentra implicada en múltiples eventos que incluyen la capacitación, la motilidad y la RA (Jones et al., 1980, Si y Olds-Clarke, 2000, Bendahmane et al., 2001). En el espermatozoide, CaM regula algunas proteínas tales como la Ser/Thr quinasa dependiente de CaM (CaMK), la quinasa Yes (miembro de la familia SFKs), la PDE1 (dependiente de CaM) y la PP2B (Wasco y Orr, 1984, Tash et al., 1988, Carrera et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003). Es interesante destacar que si bien otras proteínas tales como sAC están reguladas por Ca^{2+} , dicha modulación es independiente de CaM (Jaiswal y Conti, 2003, Litvin et al., 2003), sugiriendo que el Ca^{2+} participa en la capacitación a través de múltiples cascadas. En este sentido, un trabajo reciente en espermatozoides de ratón, propone la existencia de regulaciones negativas y positivas de Ca^{2+} intracelular sobre las cascadas de transducción de señales a nivel de la sAC y la producción del AMPc. Por un lado, al estimular a CaM, el Ca^{2+} aumentaría la actividad de PDEs dependientes de CaM y, por ende, la degradación del AMPc (regulación negativa). Por el otro lado, el Ca^{2+} también estimularía a sAC, generando aumento de AMPc (modulación positiva)

(Navarrette et al., 2015). Asimismo, el Ca^{2+} junto con CaM también estimularía a PP2B, generando desfosforilación de sustratos fosforilados de PKA (Navarrette et al., 2015). A diferencia de lo que ocurre en el espermatozoide de ratón (Visconti et al., 1995b, Navarrette et al., 2015) y de bovino (Tardif et al., 2003), los espermatozoides humanos incubados en medio capacitante sin el agregado de Ca^{2+} presentan niveles altos de fosforilación de proteínas en Tyr (Luconi et al., 1996, Carrera et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003, Baker et al., 2004), indicando la complejidad de la vía de señalización que involucra al Ca^{2+} en dicho proceso.

Teniendo en cuenta la poca información disponible acerca de las distintas cascadas de señalización asociadas al proceso de capacitación (representadas en la **Figura 21**), pensamos que sería de gran interés profundizar sobre los mecanismos de regulación y de “*cross-talk*” que existen entre los diferentes componentes que intervienen en estas vías intracelulares.

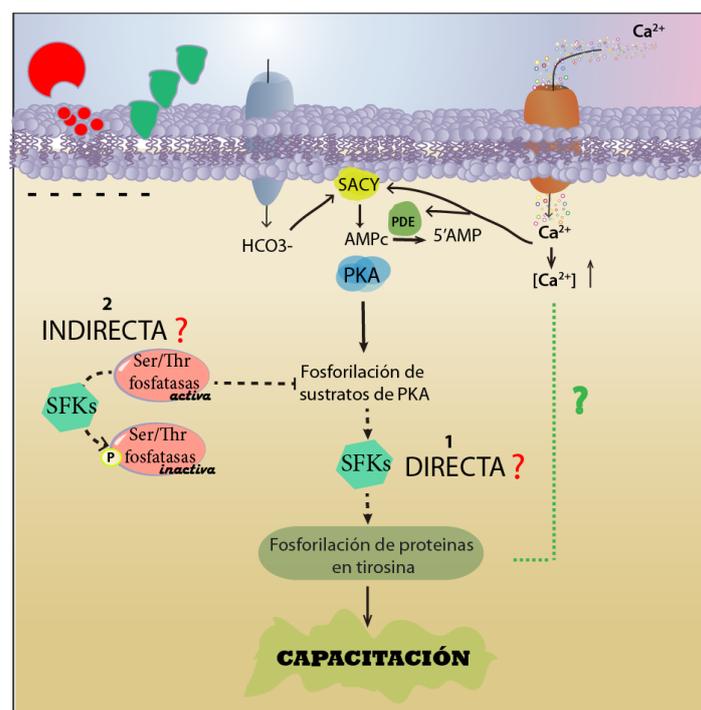


Figura 21: Eventos moleculares del proceso de capacitación. Las líneas de puntos negras representan las cascadas de señalización propuestas en las que participarían SFKs. La línea de puntos verdes representa la posible regulación de Ca^{2+} sobre la fosforilación en Tyr.

En otros sistemas celulares, se ha descrito que la Tyr quinasa rica en prolina 2 (PYK2), miembro de la familia de Tyr quinasa de adhesión focal (FAK), es otra Tyr quinasa regulada por Ca^{2+} . PYK2 también es conocida como quinasa de adhesión celular β (CAK β), Tyr quinasa relacionada a la adhesión focal (RAFTK), Tyr quinasa

dependiente de Ca^{2+} (CADTK) o FAK2 (Lev et al., 1995) (en la presente Tesis Doctoral la denominamos PYK2). La información sobre los miembros de esta familia de quinasas (FAK y PYK2) en el espermatozoide es muy escasa, habiéndose reportado sólo la presencia de PYK2 en el espermatozoide de ratón (Chieffi et al., 2003).

Teniendo en cuenta la información obtenida de otras células, PYK2 presenta un dominio FERM (4.1/ezrin/radixin/moesin) en el N-terminal, un dominio central de quinasa, y un dominio involucrado en la adhesión focal en el C-terminal (Kohno et al., 2008). Se ha reportado que PYK2, y no FAK, sería sensible a diferencias en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Yu et al., 1996). Sin embargo, la actividad de esta enzima puede ser modificada positiva o negativamente por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en una misma célula dependiendo del estímulo (Lysechko et al., 2010). En linfocitos T citotóxicos, se demostró que PYK2 aumenta su actividad en condiciones donde se secuestra el Ca^{2+} extracelular o cuando se inhibe a CaM, en cambio, en situaciones donde ocurren aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como por ejemplo por la presencia de ionomicina, se observaron incrementos en la actividad de esta quinasa (Lysechko et al., 2010). Asimismo, se ha reportado que la actividad catalítica de PYK2 se regula por diversas fosforilaciones, la molécula presenta 4 posibles sitios de fosforilación en residuos Tyr: Tyr-402, Tyr-579, Tyr-580 y Tyr-881 (Gil-Henn et al., 2007). La Tyr-402 es el sitio de auto/trans fosforilación, y una vez fosforilado, PYK2 incrementa su actividad (Avraham et al., 2000) (**Figura 22**). Las características de esta familia de Tyr quinasas, su regulación y su participación en el proceso de capacitación espermática serán estudiados en detalle en el Capítulo 2.

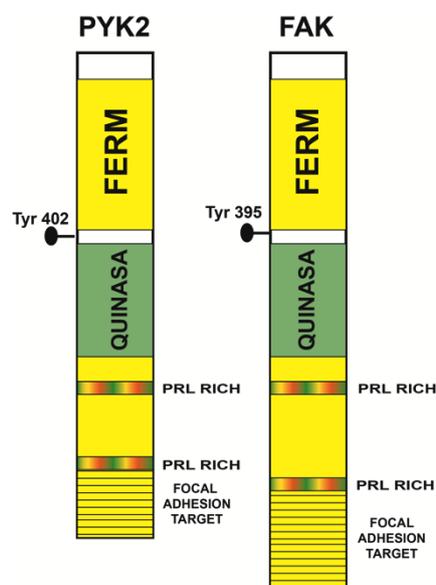


Figura 22: Esquema de los dominios que forman parte de PYK2 y FAK. Se muestran los sitios de auto/trans-fosforilación. Dominio FERM, quinasa, rico en Prolina y *Focal Adhesion target*

La proteína epididimaria CRISP1 (Cysteine-Rich Secretory Proteins 1) y el proceso de capacitación

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

Las proteínas CRISP son proteínas secretorias ricas en cisteínas que se caracterizan por tener 16 cisteínas conservadas, 10 de las cuales se encuentran en el dominio C-terminal de la molécula (Gibbs et al., 2008). Estudios de cristalografía indican que todos los miembros de la familia presentan una estructura general caracterizada por la presencia de dos dominios definidos: el N-terminal, llamado Pathogenesis Related 1 (PR-1) o dominio CAP, de aproximadamente 21 kDa y el C-terminal, que recibe el nombre de Cysteine Rich Domain (CRD) o dominio CRISP, de aproximadamente 6 kDa (Guo et al., 2005b, Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2008). El CRD, a su vez, está compuesto por dos regiones denominadas Hinge e ICR (regulador de canales iónicos). De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento, se ha sugerido que cada uno de estos dominios tendría funciones biológicas independientes. Mientras se ha encontrado que el dominio CRD de varias proteínas CRISP presenta la capacidad de regular distintos canales (Guo et al., 2005b, Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2008), resultados de nuestro laboratorio indican que el dominio N-terminal contendría el sitio por el cual CRISP1 se une a la membrana plasmática del ovocito y participa en fusión (Ellerman et al., 2006) (**Figura 23**).

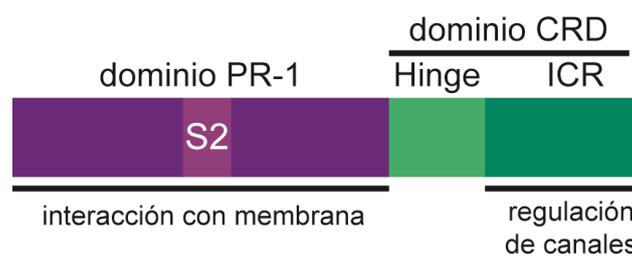


Figura 23: Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas de la familia CRISP y su relación con las funciones propuestas.

En mamíferos, se han caracterizado cuatro miembros de la familia CRISP: CRISP1 de expresión mayormente epididimaria, CRISP2, sintetizada casi exclusivamente en el testículo (Hardy et al., 1988, Kasahara et al., 1989), CRISP3, con una distribución más amplia que incluye órganos reproductivos y no reproductivos (Haendler et al., 1993, Kjeldsen et al., 1996, Udby et al., 2005), y CRISP4, expresada casi exclusivamente en

el epidídimo (Jalkanen et al., 2005, Nolan et al., 2006). Existen además proteínas muy parecidas a las CRISP, en especies evolutivamente más distantes, exhibiendo similitud en el extremo N-terminal o que tienen el dominio C-terminal incompleto o totalmente ausente. Entre ellas, se encuentran las Ag5 (Antigen 5), proteínas muy abundantes e inmunogénicas de los venenos de insectos, y las PR-1 (Pathogenesis-Related-1), altamente expresadas en respuesta a la invasión de patógenos en plantas (Fernandez et al., 1997, Henriksen et al., 2001). En mamíferos, también se describieron proteínas con homología en el dominio N-terminal pertenecientes a la familia GLIPR1 (glioma PR-1) y a la familia GAPR1 (Golgi-associated PR-1) (Gibbs et al., 2008). En su conjunto, todas las proteínas mencionadas componen la denominada superfamilia de proteínas CAP (CRISP/Ag5/PR-1). Si bien existen numerosos miembros de esta superfamilia expresados en diversos sistemas y organismos, muy pocos han sido estudiados en relación a su función biológica. En este sentido, nuestro laboratorio ha llevado a cabo numerosos estudios para determinar la función de las proteínas CRISP1, CRISP2 y CRISP3 durante el proceso de fertilización en distintas especies ((Cohen et al., 2008, Cohen et al., 2011, Muñoz et al., 2012) y Tesis Doctoral Mariana Weigel Muñoz).

Como se mencionó anteriormente, la proteína CRISP1, es una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo de rata. Se sintetiza en forma andrógeno-dependiente (Kohane et al., 1983) y se asocia tanto a la cabeza como al flagelo de los espermatozoides a medida que los mismos transitan por el epidídimo (Kohane et al., 1980a, Kohane et al., 1980b). Existen dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se une en forma débil, y una fracción minoritaria que se asocia con alta afinidad (Cohen et al., 2000a). Resultados de nuestro grupo permitieron esclarecer los mecanismos por los cuales las dos poblaciones de CRISP1 se asociarían a la membrana del espermatozoide durante la maduración epididimaria. En el *caput* epididimario, la proteína CRISP1 se uniría fuertemente a los espermatozoides por la transferencia de la misma desde unas vesículas presentes en el fluido epididimario, los epididimosomas (Maldera et al, en preparación). A medida que transitan por el epidídimo, los espermatozoides se expondrían a concentraciones cada vez mayores de CRISP1, la cual se asociaría débilmente a la gameta por un mecanismo que involucra la formación de complejos entre la proteína y el zinc (Maldera et al., 2011). De esta manera, el espermatozoide maduro presentaría ambas poblaciones de CRISP1 en su superficie.

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

Si bien gran parte de CRISP1 se libera durante la capacitación, estudios de microscopía electrónica detectaron la permanencia de la misma en espermatozoides reaccionados (Cameo y Blaquier, 1976). Posteriormente, se observó que, luego de la capacitación tanto *in vitro* como *in vivo*, la proteína CRISP1 migraba de la región dorsal de la cabeza del espermatozoide hacia el segmento ecuatorial (Rochwerger y Cuasnicu, 1992) (**Figura 24A**). Considerando que sólo las proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación y/o RA pueden estar involucradas en la interacción con el ovocito, en nuestro laboratorio se realizaron diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP1 en la interacción de gametas. La exposición de espermatozoides de rata a anticuerpos anti-CRISP1 previo a la inseminación intrauterina produjo una disminución significativa en los porcentajes de ovocitos fertilizados (Cuasnicu et al., 1984). Estudios posteriores demostraron que la presencia de CRISP1 purificada durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Más aún, se detectaron sitios de unión para CRISP1 en la membrana del ovocito (Rochwerger y Cuasnicu, 1992).

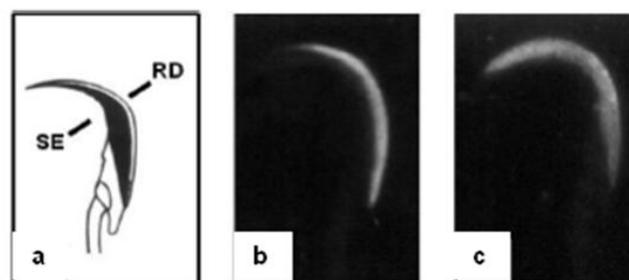


Figura 24: Localización de CRISP1 sobre el espermatozoide. Esquema de la cabeza de un espermatozoide de rata en donde se distinguen la región dorsal (RD) y el segmento ecuatorial (SE) (a). Microfotografía de la cabeza de un espermatozoide de rata con marca fluorescente para CRISP1 en la región dorsal (b) y el segmento ecuatorial (c).

Estudios posteriores utilizando la proteína CRISP1 nativa deglicosilada, la proteína recombinante expresada en un sistema procariótico y una serie de fragmentos recombinantes, indicaron no sólo que los carbohidratos no serían esenciales para el rol de la proteína en fusión (Ellerman et al., 2002) sino también que la región comprendida entre los aminoácidos 114-158 del dominio PR-1 mantendría la actividad biológica de la proteína completa. Un hallazgo muy interesante fue el hecho de que esta secuencia de 45 aminoácidos contuviera los dos motivos característicos de la familia CRISP, denominados *Signature 1* y *Signature 2*. Los resultados demostraron que CRISP1 se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos altamente conservada de la familia CRISP, correspondiente al *Signature 2* (Ellerman et al., 2006).

Por otra parte, la proteína CRISP1 de rata presenta alta homología con la proteína AEG/CRISP1 de ratón (70%) (Mizuki et al., 1992, Haendler et al., 1993) y con una proteína humana denominada ARP o hCRISP1 (Hayashi et al., 1996, Kratzschmar et al., 1996). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que ambas proteínas se encuentran presentes en la superficie de los respectivos espermatozoides y también participan en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en ambas especies (Cohen et al., 2000b, Cohen et al., 2001).

Más allá de la participación de CRISP1 en la etapa de fusión de gametas, estudios posteriores realizados tanto en rata como en ratón, demostraron que la co-incubación de espermatozoides y ovocitos rodeados de ZP en presencia ya sea de anti-CRISP1 o de proteína CRISP1 nativa, producía una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Busso et al., 2007). Ensayos posteriores en los cuales se evaluó el efecto de anti-CRISP1 y CRISP1 en el número de espermatozoides unidos por ovocito, indicaron que la proteína participaría en el paso inicial de unión del espermatozoide a la ZP. Resultados recientes de nuestro laboratorio utilizando el anticuerpo anti-hCRISP1 y las proteínas recombinantes de la ZP humana, demostraron que hCRISP1 también participaría en la etapa de interacción del espermatozoide con la ZP (Maldera et al., 2014), posiblemente a través de su asociación con ZP3 humana. En conjunto, estas observaciones indicaron que CRISP1 cumpliría una doble función en la interacción de gametas participando tanto en la etapa de fusión como de la interacción espermatozoide-ZP (Busso et al., 2007, Cohen et al., 2011, Maldera et al., 2014).

Además de su participación en el proceso de fertilización, CRISP1 resultó relevante para la fertilidad a juzgar por experimentos indicando que la inmunización activa de ratas hembras y machos con CRISP1 era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Perez Martinez et al., 1995). Estudios posteriores indicaron que dicho efecto ocurriría a través de un mecanismo específico que involucra la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, su asociación a los espermatozoides, y la posterior inhibición de su capacidad fertilizante sin provocar efectos patológicos (Ellerman et al., 1998). Estos resultados, confirmaron la relevancia de CRISP1 para la fertilidad de un individuo como así también el potencial uso de esta proteína para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad.

Con el fin de investigar más profundamente la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, en el laboratorio se generó una línea de ratones KO para dicha proteína que constituyeron los primeros animales KO producidos para una proteína de la familia CRISP. El fenotipo de los animales carentes de CRISP1 mostró que los mismos eran normales en cuanto a su viabilidad y crecimiento y no presentaban diferencias en su fertilidad respecto a los animales control.

En relación a la capacidad fertilizante, se observó que los espermatozoides KO para CRISP1 fueron capaces de fertilizar *in vitro* un porcentaje de ovocitos similar al de los espermatozoides control cuando los ovocitos se encontraban rodeados de células de cúmulus. Sin embargo, al remover estas células, los espermatozoides KO mostraron una capacidad fertilizante significativamente menor que los controles, sin acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, apoyando la participación de CRISP1 en la interacción espermatozoide-ZP. Más aún, en concordancia con el rol propuesto para la proteína en la etapa de fusión de gametas, los ensayos de fertilización *in vitro* utilizando ovocitos sin ZP mostraron una disminución significativa en la capacidad fusogénica de los espermatozoides mutantes (Da Ros et al., 2008).

Es interesante mencionar que, en contraposición a los estudios que sugieren que la proteína epididimaria de rata CRISP1 podría actuar como un factor decapacitante (Kohane et al., 1980a, Cohen et al., 2000a, Roberts et al., 2003), los espermatozoides provenientes de ratones KO para CRISP1 mostraron niveles normales de RA inducida por progesterona y menores niveles de fosforilación en Tyr que los espermatozoides control (Da Ros et al., 2008). Estos hallazgos indicarían que CRISP1 desempeñaría un papel regulador en la capacitación de los espermatozoides de ratón.

Como se describió anteriormente, es sabido que las proteínas CRISP tienen la capacidad de regular el flujo de iones a través de canales iónicos. La primera evidencia de esta función se basó en el estudio de las CRISPs presentes en venenos de reptiles, las cuales son toxinas capaces de regular una amplia variedad de canales iónicos. Entre ellos, se encuentra helotermína, proteína identificada en la glándula salival de la lagartija *H. Horrendum* (Mochca-Morales et al., 1990) capaz de bloquear canales rianodínicos de Ca^{2+} (RyR) en células de músculo esquelético y cardíaco (Morrissette et al., 1995). Esta toxina modula, además, canales de Ca^{2+} y de K^{+} voltaje dependientes (Nobile et al., 1994, Nobile et al., 1996). Dentro de las CRISPs identificadas en venenos de serpientes, se encuentran las toxinas tigrina y ablomina con actividad sobre canales de K^{+} (Yamazaki y Morita, 2004). También se encontraron proteínas CRISPs con actividad sobre canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNG) tales como PsTx y pseudocina (Yamazaki et al., 2002). Dentro de las proteínas CRISPs de mamíferos, hasta el momento, las proteínas CRISP2 y CRISP4 tendrían la capacidad de regular negativamente la actividad de los canales de Ca^{2+} RyR y TRPM8, respectivamente (Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2011). Estas observaciones, junto a la alterada fosforilación de proteínas en Tyr del espermatozoide KO, sugieren que CRISP1 podría actuar ya sea inhibiendo los canales iónicos en el espermatozoide, manteniéndolos en un estado quiescente en el macho, o bien como activando dichos canales luego de su disociación de la gameta en el tracto femenino, permitiendo el desencadenamiento de la cascada de señales que llevan a la capacitación.

En base a lo expuesto, el objetivo general de esta Tesis de Doctorado fue aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en las cascadas de señalización que conducen a la capacitación del espermatozoide de mamífero y, de este modo, profundizar los conocimientos del proceso de interacción entre el espermatozoide y el ovocito. Para ello, en la presente Tesis se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Dado que el espermatozoide es transcripcional y traduccionalmente inactivo, el mismo depende fuertemente de segundos mensajeros intracelulares como así también de modificaciones post-traduccionales para su funcionamiento, tales como el aumento de la fosforilación de múltiples proteínas en Tyr durante la capacitación. El control de dicha fosforilación involucra una cascada de transducción de señales mediada por un aumento de AMPc intracelular y por la proteína PKA. Si bien se describió esta regulación en el espermatozoide de rata y humano, aún se desconoce la activación temporal de los eventos moleculares involucrados y su correlación con el estado funcional de capacitación. Por otro lado, estudios recientes indicaron la presencia de Tyr quinasas de la familia Src (SFks) en el espermatozoide, habiéndoselos postulado como intermediarios en la vía de señalización de PKA. Por lo tanto, considerando que la identificación de las proteínas que se encuentran tanto río arriba como río abajo de PKA son claves para dilucidar las cascadas de señalización que operan durante el proceso de capacitación, **el primer objetivo de esta Tesis consistió en estudiar la correlación temporal entre los distintos eventos de señalización, como así también, evaluar la participación de una novedosa cascada que involucra a SFks durante el proceso de capacitación del espermatozoide.**

La capacitación espermática se correlaciona no sólo con un aumento de los niveles de fosforilación en Tyr sino, además, con un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Sin embargo, se sabe aún poco acerca de los efectores moleculares que decodificarían la señal intracelular de aumento de Ca^{2+} . De forma interesante, la disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) en el medio capacitante genera en los espermatozoides humanos, altos niveles de fosforilación en Tyr, indicando la complejidad de la cascada de señalización dependiente del Ca^{2+} involucrada en la capacitación. Por otro lado, en estos últimos años, se ha puesto mucho esfuerzo en identificar la/s quinasa/s responsable/s de la fosforilación en Tyr. Teniendo en cuenta que en el espermatozoide de ratón se describió la presencia de la Tyr quinasa rica en Prolina 2 (PYK2) miembro de la familia de quinasas de Adhesión Focal (FAK), y que resultados en otros modelos celulares mostraron que PYK2 es

regulada por Ca^{2+} , la misma resulta un candidato atractivo para el análisis de su relevancia en la fosforilación y en la capacitación como así también para el estudio del “*cross-talk*” entre las vías de transducción de señales mediadas por AMPc y por Ca^{2+} . Por esta razón, **el segundo objetivo de esta Tesis consistió en explorar los mecanismos moleculares involucrados en la decodificación de las señales dependientes de Ca^{2+} durante la capacitación del espermatozoide y dilucidar la posible participación de PYK2 en esta cascada de señalización.**

Como se mencionara a lo largo de esta Tesis, el proceso de capacitación involucra la liberación de diversas proteínas asociadas a la superficie del espermatozoide denominadas “factores decapacitantes”, entre las cuales se encuentra la proteína epididimaria CRISP1, cuya presencia durante la capacitación del espermatozoide de rata inhibe la fosforilación en Tyr. En contraposición a estas observaciones, resultados de nuestro grupo utilizando ratones KO para CRISP1 indican que los espermatozoides de estos animales poseen menores niveles de fosforilación en Tyr que los espermatozoides control, sugiriendo que la proteína CRISP1 desempeñaría un papel regulador en la capacitación de los espermatozoides de roedor. En base a ello, **el tercer objetivo de esta Tesis consistió en estudiar las distintas vías de señalización reguladas por CRISP1 durante la capacitación del espermatozoide.**

Animales

Para los ensayos descritos en esta Tesis, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras prepúberes de 26 a 29 días de edad), hámsters de la cepa Golden Syrian (hembras de 30 a 45 días de edad) y ratones de la línea KO para CRISP1 (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras de entre 45 y 90 días). Cabe aclarar que los ratones KO para CRISP1 fueron generados en nuestro laboratorio y presentan un “*background*” híbrido C57BL/6N x 129/SvEv. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), con alimento y agua *ad libitum*, y bajo ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, con excepción de los hámsters, que fueron mantenidos bajo ciclos 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad. 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, Bethesda, MA, Estados Unidos).

Inhibidores o drogas específicas

Para los ensayos descritos en este trabajo se utilizaron diversos reactivos farmacológicos que se detallan a continuación: KH7 (inhibidor a la sAC), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y pentoxifilina (inhibidores de las PDEs), N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sal de sodio (dbcAMP, análogo del AMPc), H89 (inhibidor de PKA), SU6656 y SKI606 (inhibidor de SFKs), ácido okadaico (OA, inhibidor de PP1 γ 2 y PP2A), Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N' tetraacetic acid (EGTA, quelante de Ca²⁺), ionóforo de Ca²⁺ (A23187) e Ionomicina (transportador de Ca²⁺), W7 y W5 (inhibidores de calmodulina), Ciclosporina-A (Cs-A, inhibidor de PP2B), caloxin 1b1 (inhibidor de PMCA4), carbonoxolone (CBX, inhibidor de panexina), progesterona (inductor de la RA), PF431396 (inhibidor de PYK2 y FAK) y mentol (inductor de canales de Ca²⁺).

Anticuerpos

Para los ensayos descritos en esta Tesis se utilizaron diversos anticuerpos que se detallan a continuación: **anti- β -tubulina** (1/5000, clone D66, Sigma), **anti-fosfotirosina** (α -pY, 1/4000 clone 4G10, Upstate Biotechnology), **anti-sustratos fosforilados por PKA** (α -pPKAs, 1/1000, clone 100G7E, Cell Signaling, detecta proteínas fosforiladas por PKA), **anti-fosfo PYK2** (α -pPYK2, 1/1000, 3291s, Cell Signaling, detecta la Tyr-402) y **anti-fosfo PP2A** (1/1000, clone 4B10, Milipore, detectar la Tyr-307). **Anti-Src** (1/1000, clone 32G6, Cell Signaling), **anti-PP2A**

subunidad C (1/500, BD, Biosciences), **anti-PP1 γ 2** (1/1000, Abcam), **anti-PYK2** (1/5000, clone: 3292s, Cell Signaling), **anti-FAK** (1/500, C-20, Santa Cruz Biotechnology), **anti-IZUMO** (1/40) y **anti-CRISP1** (1/1000, Abcam). Asimismo, se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios: el anti-Ig G normal de conejo acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories) y el anti-Ig G normal de ratón acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories), anti-Ig G de conejo acoplado a FITC (1/100, Sigma) y el anti-IgG normal de cabra acoplado a peroxidasa (1/4000, Santa Cruz). También, utilizamos IgG de ratón (1/100, Sigma).

Proteína CRISP1 nativa

La proteína CRISP1 utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descrito por Garberi y colaboradores (1979, 1982) con pequeñas modificaciones (Garberi et al., 1979, Garberi et al., 1982). Brevemente, la purificación incluyó la precipitación del citosol epididimario de ratas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) y un paso final de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Sigma). Cuando la preparación obtenida fue sometida a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectaron las bandas correspondientes a CRISP1. En los experimentos donde se utilizó proteína desnaturalizada, una alícuota de CRISP1 purificada fue incubada a 75°C durante 10 min.

Separación electroforética de las proteínas

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 1,5 mm de espesor al 7,5%-15% según el caso, preparados siguiendo la técnica descrita de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% glicerol, 2% SDS, 70 mM β -mercaptoetanol y azul de bromofenol) y hervidas durante 8 min. La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente.

Transferencia a nitrocelulosa

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin y colaboradores (1979) (Towbin et al., 1979). La transferencia fue realizada en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, a 4°C, a voltaje constante durante toda la noche (35 V). Previo al Western blot, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las

membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1% en ácido acético 5% y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua desionizada.

Western blot

Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de Western blot, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada 2% en PBS 0,1% Tween 20 (PBS-Tween), seguida de una incubación con anticuerpo primario en PBS-Tween a la correspondiente dilución. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y las membranas fueron incubadas con anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories) y diluido 1/4000 en PBS-Tween. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente. Con el fin de eliminar el Tween 20, se realizó 1 lavado adicional con PBS. Para detectar los sustratos fosforilados de PKA (pPKAs) y fosfo-PYK2 (pPYK2) se utilizó TBS 0,1% Tween 20 como solución en vez del PBS-Tween. Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación por un período de 1 h a temperatura ambiente o 18 hs a 4°C. Por último, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial “ECL plus o prime” (GE Healthcare) y G:BOXGENI (Syngene, Synoptics) según las instrucciones del fabricante. Para efectuar el “*stripping*” de las membranas, las mismas fueron incubadas durante 15–30 min a 50°C en un buffer conteniendo 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5% Tris pH 6.7. La cuantificación de las bandas obtenidas en distintos experimentos fue realizada mediante densitometría utilizando el programa Image J.

Obtención de espermatozoides

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

Humano: Los espermatozoides humanos provinieron de eyaculados de donantes adultos (21-35 años) cuyas características seminales iniciales concordaban con el criterio de normalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). En todos los casos, se solicitó un período de 48 hs de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado.

Capacitación de espermatozoides

Rata: Los espermatozoides de rata fueron recuperados en medio “*Rat Fertilization Medium*” RFM (Kraicer, 1978) suplementado con 0,4% BSA. Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides móviles, se utilizó un sistema de selección en el cual los espermatozoides obtenidos por punción de los túbulos del *cauda* fueron colocados en el fondo de un tubo cónico Falcon, cubiertos con 1,0 ml de RFM (sin HCO₃Na), y luego incubados por un período de 15 min a 37°C para permitir que las células con mayor motilidad asciendan hacia la superficie libre (“*swim up*”). A continuación, alícuotas de las capas superiores del “*swim up*” fueron agregadas a cada pocillo de capacitación: 400 µl de RFM (completo) cubiertos por 300 µl de aceite de parafina por hoyo, siendo la concentración final en cada pocillo de 0,5-1,0 x 10⁶ espermatozoides/ml. Los espermatozoides fueron incubados por un período de 4 - 5 hs a 37°C y 5% CO₂. Para los estudios de la relevancia de SFKs y Ser/Thr fosfatasa para la capacitación, los espermatozoides fueron incubados con los inhibidores en medio RFM sin HCO₃Na por 10 min a 37 °C, después del “*swim up*” y previo a la incubación bajo condiciones capacitantes.

Ratón: La obtención y capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser y Drury, 1975), suplementado con 0,3% BSA (en los experimentos que se realizaron en ausencia de HCO₃Na, se utilizó el medio Whitten con similar composición que el anterior pero con el agregado de 10 mM de HEPES) (Wertheimer et al., 2008). Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides móviles, se utilizó un sistema de selección en el cual los *caudas* epididimarios cortados en 3 puntos fueron colocados en una gota de 300 µl del medio de incubación en una cápsula bajo aceite, y luego incubados por un período de 10 min a 37°C y 5% CO₂ para permitir la dispersión de las células con mayor motilidad (“*swim out*”). La capacitación fue llevada a cabo en gotas de 300 µl de medio bajo aceite a una concentración final de 0,1-1,0 x 10⁷ espermatozoides/ml, y las células fueron incubadas por un período de 90-120 min a 37°C y 5% CO₂ en una estufa con gaseo automático.

Humano: Luego de la licuefacción, el semen fue colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW, sin HCO₃Na, conteniendo 3,5% de albúmina sérica humana) (Biggers, 1971) e incubado durante 1 h a 37°C y 5% CO₂ en una estufa con gaseo automático. Los espermatozoides móviles recuperados de la superficie del medio luego de 1 h (“*swim up*”) fueron diluidos en BWW (completo, conteniendo 25 mM de HCO₃Na) a una

concentración final de $0,5-1,0 \times 10^7$ células/ml e incubados a diferentes tiempos de incubación (1 min – 18 hs) a 37°C , en una atmósfera de 5% CO_2 . Para algunos experimentos, los espermatozoides fueron incubados con BWW en presencia de distintas concentraciones de HCO_3Na o CaCl_2 . Para los estudios de la relevancia de SFKs y Ser/Thr fosfatasa para la capacitación, los espermatozoides fueron incubados con los inhibidores en medio BWW sin HCO_3Na por 10 min a 37°C , después del “swim up” y previo a la incubación bajo condiciones capacitantes.

Evaluación de la viabilidad de los espermatozoides

Con el fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides de rata, humano y ratón, alícuotas de 10 μl de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C . A continuación, se agregó un volumen de 0,5% 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 utilizando un aumento de 40 x. En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación.

Determinación de los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y de proteínas en residuos Tyr

Luego de la obtención y capacitación de espermatozoides de las distintas especies tal como se describiera anteriormente, se evaluó la ocurrencia de la fosforilación de los sustratos de PKA (α -pPKAs) y de proteínas en residuos Tyr (α -pY) mediante Western blot, Inmunofluorescencia (IFI) o Citometría de flujo.

- **Western blot:** alícuotas de espermatozoides provenientes de las distintas condiciones fueron lavadas 2 veces con PBS y los espermatozoides re-suspendidos en buffer de siembra con SDS (10 μl / 1×10^6 células). Luego de 10 min de incubación, las muestras fueron hervidas por 5 min y centrifugadas a 4000 g por 8 min y los sobrenadantes recuperados y hervidos en presencia de 70 mM β -mercaptoetanol durante 5 min. Los extractos proteicos fueron luego sometidos a una separación electroforética en geles de poliacrilamida al 7,5% con SDS y, finalmente, transferidos a nitrocelulosa. Para estos ensayos, fueron utilizados α -pPKAs (diluido 1/1000) o α -pY (diluido 1/4000) como anticuerpos primarios siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

- **IFI:** alícuotas de espermatozoides (1×10^6) provenientes de las distintas condiciones fueron lavadas 1 vez con PBS (1 centrifugación a 2500 g durante 5 min), fijadas por el agregado de un volumen de PFA 2% durante 10 min y lavadas 1 vez por

centrifugación con PBS. Para la permeabilización de los espermatozoides, los mismos fueron incubados con solución de permeabilización FACSTM (BD Biosciences) por 10 min. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario (α -pPKAs, 1:40) durante 1 h y, luego de 3 lavados con PBS, incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a FITC, 1:100, y diluido en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Terminada la incubación, las muestras fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS, extendidas en portas, secadas al aire y montadas con glicerol 90%. Los preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot).

- **Citometría de flujo:** alícuotas de espermatozoides (1×10^6) provenientes de las distintas condiciones fueron lavadas 1 vez con PBS (1 centrifugación a 2500 g durante 5 min), incubadas con solución de permeabilización FACSTM (BD Biosciences) por 10 min y luego, con el anticuerpo primario α -pY (1/100 en buffer de citometría: PBS y 1% suero fetal bovino (SFB). A continuación, las muestras fueron lavadas e incubadas con el anti-IgG de ratón acoplado a FITC (1/100 en buffer citometría) por 30 min a temperatura ambiente, y terminada la incubación, fijadas por el agregado de un volumen de paraformaldehído (PFA) 2% durante 10 min, y finalmente guardadas a 4°C hasta su análisis, utilizando el equipo de Citometría de flujo FACSCanto II.

Medición de los niveles de AMPc intracelulares

Alícuotas de espermatozoides fueron centrifugadas para remover el medio y lavadas con PBS, y finalmente, resuspendidas en buffer de lisis (40 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 mM IBMX, EDTA, inhibidor de proteasas y 1% Triton X-100) y hervidas por 10 min. A continuación, se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad (5 min a 8000 g) y el sobrenadante fue utilizado para determinar la concentración de AMPc mediante la técnica de medición *in vitro* de la actividad de PKA (Galantino-Homer et al., 1997, Wertheimer et al., 2013). Brevemente, se analizó la cantidad de ^{32}P incorporado al sustrato específico de esta quinasa Kemptide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, Sigma) en presencia de los sobrenadantes provenientes de lisados de espermatozoides. La radiactividad fue medida en un contador β de centelleo (Packard Instruments). La concentración de AMPc fue calculada en base a una curva de concentración de AMPc (concentración de dbcAMP versus la actividad de PKA) realizada para cada experimento.

Determinación del contenido de ATP

El contenido de ATP fue analizado utilizando un kit comercial (ATP bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma) siguiendo el protocolo recomendado por la compañía. Los espermatozoides (2×10^6) fueron incubados bajo diferentes condiciones por 1 h, verificándose la viabilidad de cada una de las muestras por la técnica de eosina. Las muestras que presentaban más de un 90 % de viabilidad fueron lisadas con el buffer Somatic Cell ATP Releasing Reagent. La luminiscencia de cada muestra fue determinada por triplicado en cada experimento independiente empleando el luminómetro Turner Biosystems 20/20ⁿ (Promega, WI). Finalmente, la concentración de ATP de cada muestra (ng ATP / 2×10^6 células) se determinó utilizando la curva de calibración con estándares de ATP incluidos en el kit (concentración de ATP vs actividad luminiscente).

Actividad de fosfatasas

La actividad de las fosfatasas fue analizada utilizando un kit comercial colorimétrico que emplea al sustrato cromogénico para-nitrofenil fosfato (pNPP), mediante el cual se mide el contenido de p-nitrofenol siguiendo el protocolo recomendado por la compañía (BioAssay Systems). Los espermatozoides (2×10^6) fueron incubados en presencia o ausencia de Ca^{2+} durante diferentes períodos de tiempo, verificándose la viabilidad de cada una de las muestras por la técnica de eosina. Las muestras que presentaban más de un 90 % de viabilidad fueron las utilizadas. En cada experimento, la absorbancia de las muestras y la curva de calibración (concentración de p-nitrofenol vs absorbancia) fueron determinadas por triplicado. La actividad enzimática de cada muestra se expresó como Unidades Arbitrarias (UA/min)/ 2×10^6 células.

Actividad fosfodiesterasa (PDEs)

Los espermatozoides de ratón (4×10^6) fueron incubados en medio durante 10 min al cabo de lo cual las células fueron lavadas y lisadas con la solución Tris-HCl 50 mM pH: 8, Triton X-100 1%, β -mercaptoetanol 14 mM e inhibidor de proteasas (PMSF). Las suspensiones fueron centrifugadas a 13400 g durante 10 min separando la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pellet). La actividad de PDEs de AMPc fue determinada según el método de Thompson y Appleman (Thompson et al., 1974) con la modificación introducida por Londesborough (Londesborough, 1976). La reacción fue realizada durante 10 min a 30 °C en un buffer que contenía: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 mM, MgCl_2 5 mM. y 200 μM de AMPc ($[^3\text{H}]$ -AMPc). La misma fue detenida por calentamiento a 100 °C durante 1 min. Luego, se agregó veneno de

serpiente (King cobra) 2 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 8, durante 30 min y luego, una solución de EDTA 50 mM y Adenosina 5 mM. A continuación, se purificó el AMPc con una suspensión que contenía 33% de resina de intercambio iónico AG1-X4 (200-400 mesh) (Bio-Rad Laboratories) y 30% de etanol en agua. La radiactividad fue medida en un contador β de centelleo (Packard Instruments). Los resultados fueron expresados como actividad enzimática (pmol/min) por 1 millón de células.

Extracción de proteínas

Las suspensiones de espermatozoides humanos (1×10^7) fueron lavadas 3 veces por centrifugación y re-suspendidas en solución de extracción (en mM: Tris-HCl 50 pH 7.5, EDTA, EGTA, NaCl 150, $MgCl_2$ 1 y glicerol 10% (v/v), Triton X-100 1% (v/v)), durante 4 hs a 4°C con agitación. Terminado el tratamiento, las suspensiones fueron centrifugadas a 13400 g por 10 min, separando la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pellet). Estas fracciones fueron preparadas siguiendo la técnica descrita para SDS-PAGE y Western blot. Teniendo en cuenta que PYK2 fue insoluble en el buffer detallado anteriormente, los espermatozoides fueron lisados con un buffer que contenía los mismos componentes que la solución de extracción pero en el cual se reemplazó el Triton X-100 por Igepal 1% (v/v) y se adicionó SDS 0.1% (p/v). Al finalizar la incubación, las muestras fueron hervidas por 5 min, procediéndose de igual forma que lo descripto anteriormente.

Inmunoprecipitación

Las proteínas solubilizadas como se describiera anteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo anti-PYK2 (2 μ g) durante 18 hs a 4°C con agitación constante. Luego, las muestras fueron incubadas con 20 μ l de la proteína A-Agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 hs a 4°C con agitación constante y las proteínas unidas al complejo agarosa-anticuerpo fueron recuperadas por centrifugación a 13400 g por 10 min. Estos complejos fueron lavados 3 veces con el buffer de extracción y hervidos a 100 °C por 5 min en presencia del buffer de siembra. Las muestras fueron preparadas para su separación electroforética y posterior análisis mediante la técnica de Western blot.

Electrofisiología

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon (Universidad Nacional Autónoma de México, México), experto a nivel internacional en el estudio de canales iónicos en el espermatozoide. Los espermatozoides fueron obtenidos de testículo de ratones por separación mecánica de los túbulos seminíferos

(Martinez-Lopez et al., 2009) y suspendidos en solución de disociación (HS) (en mM: 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 20 HEPES, 5 glucosa, 10 ácido láctico y 1 ácido pirúvico (pH 7.4)). Los espermatozoides epididimarios fueron obtenidos según se describió anteriormente en esta sección.

La técnica de electrofisiología “*patch-clamp*” fue realizada en la gota citoplasmática de espermatozoides testiculares y epididimarios. Las corrientes generadas en la célula entera fueron grabadas a temperatura ambiente (22°C) (Kirichok y Lishko, 2011, Martinez-Lopez et al., 2011, Ren y Xia, 2010) utilizando Axopatch 200 y 200B como amplificadores (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para el protocolo de pulsos, la captura de datos y sus análisis fue utilizado pCLAMP 9 software (Molecular Devices, Palo Alto, CA), Origin 7.5 (Microcal Software, Northampton MA) y Sigma Plot 10 (SYSTAT Software, Foster City). Las corrientes fueron grabadas entre 20-100 kHz y se filtraron entre 5-10 kHz (internal 4-pole Bessel filter) utilizando una computadora conectada a DigiData (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Los experimentos de corrientes totales fueron realizados con una solución externa (en mM: 118 Na-MetSO₄, 8 NaCl, 2.5 CaCl₂, 2 KSO₄, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH ajustado a 7,4 con NaOH)), y una solución interna (en mM: 122 K-MetSO₄, 8 KCl, 20 KF, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado a 7.3 con KOH)). Teniendo en cuenta que el canal TRPM8 tiene alta selectividad a Cs⁺ (Voets et al., 2007), el mismo fue utilizado como principal catión para registrar corrientes a través de dicho canal. En este caso, la solución externa contenía en mM: 144 Cs-MetSO₄, 6 CsCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES-Cs, pH 7.35 ajustado con CsOH, y la solución interna en mM: 130 Cs-MetSO₄, 8 CsCl, 0.9 CaCl₂, 12 EDTA-Cs, 10 HEPES-Cs, pH 7.3 ajustado con CsOH. La osmolaridad de cada solución se ajustó con dextrosa. Las corrientes fueron grabadas aplicando sobre los espermatozoides un protocolo de voltajes escalonado entre -100 mV a +100 mV cada 20 mV de incremento, con un potencial de reposo de 0 mV. Para evaluar la corriente monovalente de CatSper, la pipeta contenía una solución sin cationes divalentes (DVF) en mM: 135 CsMeSO₄, 5 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 5 Na₂ATP y 0.5 Na₂GTP (pH=7.3 con CsOH), y la solución externa contenía en mM: 140 CsMeSO₄, 20 HEPES, 1 EDTA (pH 7.4 con CsOH).

Medición de Ca²⁺ intracelular

- **microscopía en tiempo real:** los experimentos de medición de Ca²⁺ intracelular utilizando microscopía también fueron realizados en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon (Universidad Nacional Autónoma de México, México). Para ello, los espermatozoides móviles del *cauda* epididimario fueron recuperados por la técnica de

“swim up” en el medio de incubación sin BSA ni NaHO_3 a 37°C durante 10 min, incubados con $2\ \mu\text{M}$ Fluo-3 AM y 0.05% ácido plurónico por 30 min, y sostenidos de la cabeza sobre cubreobjetos con laminina (1mg/ml), para permitir que el flagelo se mueva continuamente. Las muestras fueron montadas en una cámara (Hard Apparatus, Holliston, MA, USA) y puestos en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300 microscope (Nikkon Inc). Las imágenes fueron grabadas cada 500 msec usando iQ software (Andor Bioimaging).

- **Citometría de flujo:** alícuotas de espermatozoides fueron incubados en medio capacitante en presencia y ausencia de Ca^{2+} a 37°C durante 60 min. Luego, los mismos fueron expuestos $2\ \mu\text{M}$ Fluo-4 AM por 30 min, a los controles positivos se les agregó $10\ \mu\text{M}$ de ionóforo de Ca^{2+} . Al finalizar el tiempo de incubación, los espermatozoides fueron lavados 1 vez (a $2500\ \text{g}$ durante 5 min) e incubados con $1\ \mu\text{M}$ Ioduro de propidio por 10 min (permite distinguir células vivas de muertas). A continuación, las muestras fueron analizadas utilizando el equipo de Citometría de flujo FACSCanto II y el programa FlowJo.

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Rata: Alícuotas de $10\ \mu\text{l}$ de las distintas suspensiones de espermatozoides fueron colocadas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C , y la motilidad evaluada subjetivamente por observación al microscopio óptico utilizando un aumento de 400 x.

Ratón: Alícuotas de $10\ \mu\text{l}$ de las distintas suspensiones de espermatozoides fueron colocadas sobre cámaras específicas de $20\ \mu\text{m}$ de espesor mantenidas a 37°C (Leja Slide, Spectrum Technologies) y examinadas utilizando el sistema Integrated Semen Analysis System v.1.2 (Proiser R+D) (Mortimer, 1998). Se analizaron por lo menos 200 células por muestra distribuidas en 20 campos distintos y grabadas 30 imágenes cada 60 Hzs para cada medición. Los parámetros analizados fueron los siguientes: VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), LIN (%), ALH (μm), STR (%) y BCF (Hz). Los espermatozoides fueron considerados con motilidad progresiva cuando presentaban $\text{STR} > 50\%$, y con motilidad hiperactivada cuando mostraban $\text{VCL} \geq 245$, $\text{LIN} < 38,5\%$ y $\text{ALH} \geq 4,7$. Estos “*cutoffs*” fueron obtenidos para nuestras condiciones experimentales basados en recomendaciones reportadas previamente (Bray et al., 2005).

Humano: Alícuotas de $10\ \mu\text{l}$ de las distintas suspensiones de espermatozoides fueron colocadas en cámaras especiales de $20\ \mu\text{m}$ de espesor mantenidas a 37°C (Leja Slide, Spectrum Technologies) y examinadas utilizando CEROS “*computer-assisted sperm analysis*” (CASA) system (Hamilton Thorne, Inc.) (Mortimer, 1998). Se

analizaron por lo menos 200 células por muestra distribuidas en 20 campos distintos y fueron grabadas 30 imágenes cada 60 Hzs para cada medición. Se evaluaron los siguientes parámetros: 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, μm), rectilineidad (straightness, STR, %, VSL/VAP) y frecuencia de batido de la cabeza (beat cross frequency, BCF, Hz). Los espermatozoides fueron considerados con motilidad progresiva cuando presentaban VAP > 25 y STR >80%, y con motilidad hiperactivada cuando mostraron VCL \geq 100, LIN < 60% y ALH \geq 5 (Mortimer y Mortimer, 1990).

Evaluación de la reacción acrosomal (RA)

La inducción de la RA se realizó según la especie como se describe a continuación:

Rata: La RA fue inducida por exposición de los espermatozoides a 15 μM de progesterona (Sigma-Aldrich), resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO) media hora después del final del período de capacitación.

Ratón: La RA fue inducida por exposición de los espermatozoides a 25 μM progesterona, 15 min antes del final del período de capacitación.

Humano: La RA fue inducida por exposición de los espermatozoides a diferentes concentraciones de progesterona (1 – 100 μM), media hora antes del final del período de capacitación.

Preparación de las muestras para la RA.

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

Ratón: Los espermatozoides fueron recuperados del medio capacitante y fijados en un volumen de PFA 8% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con acetato de amonio 0,1 M pH: 9, por centrifugación, y extendidos sobre portaobjetos, los cuales 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 % Coomassie Brilliant Blue en 50% metanol y 10% ácido acético. Al cabo de esa incubación, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y examinados inmediatamente bajo el microscopio óptico. Los espermatozoides fueron clasificados de forma similar a lo realizado con las células de rata.

Humano: Los espermatozoides fueron recuperados del medio capacitante, fijados en 2% PFA en PBS, y extendidos sobre portaobjetos. La evaluación de la RA se realizó mediante la tinción del contenido acrosomal con la lectina fluorescente *Pisum sativum agglutinin* conjugada a FITC (PSA-FITC) (Sigma) según fuera descrito anteriormente (Cross et al., 1986). Para la permeabilización de los espermatozoides, los extendidos fueron sumergidos en metanol a -20°C durante 5 min. Los extendidos fueron luego incubados con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PSA-FITC por 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad, lavados con PBS, montados en 90% glicerol y observados bajo un microscopio de epifluorescencia. Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una marca brillante en la región acrosomal completa, y como reaccionados cuando la fluorescencia estaba restringida al segmento ecuatorial (SE) o bien ausente.

Relocalización de la proteína IZUMO mediante IFI

Los espermatozoides de rata fueron fijados por el agregado de un volumen de PFA 4% durante 10 min, lavados 3 veces por centrifugación con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA (PBS-BSA4) y, finalmente, extendidos sobre portaobjetos. Para la permeabilización de los espermatozoides, los extendidos fueron sumergidos en metanol a -20°C durante 5 min. Las muestras fueron bloqueadas con SCAN 5% en PBS por un período de 30 min a 37°C , luego incubadas con el anticuerpo primario (anti-IZUMO, 1/40) diluido en SCAN 1% durante toda la noche a 4°C , y lavadas 3 veces con PBS, y luego incubadas con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplado a FITC, 1:100) diluido en PBS por 30 min a 37°C . Terminada la incubación, las muestras fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS, montadas con glicerol 90%, selladas con esmalte y examinadas bajo microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot).

Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos

Las hembras de rata, ratón y hámster de las edades descritas al comienzo de esta sección fueron superovuladas con una inyección de gonadotrofina coriónica equina (PMSG) (Syntex), seguida, a las 48 - 72 hs, por una inyección de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Sigma). Las dosis de cada hormona fueron diferentes para cada especie, siendo la cantidad de eCG y hGC 20 UI y 25 UI para la rata, 5 UI y 5 UI para el ratón y 25 UI y 25 UI para el hámster. Las hembras fueron sacrificadas a las 12-15 hs luego de la inyección de hCG, y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente en el medio correspondiente. Los medios utilizados para la obtención de los ovocitos correspondieron a aquellos utilizados para la capacitación de los espermatozoides: RFM (Kraicer, 1978) para los ovocitos de rata, medio Fraser y Drury para los de ratón (Fraser y Drury, 1975) y medio BWW (Biggers, 1971) para los de hámster. Los COCs (complejos cúmulus-ovocitos) fueron obtenidos mediante punción de la *ampulla* y tratados con hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) a temperatura ambiente, para la disociación de las células del cúmulus. Las ZP fueron removidas por tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH 2,5) durante 20 segs. Luego de cada tratamiento, los ovocitos fueron rápidamente lavados en el medio correspondiente, y utilizados en los diferentes ensayos.

Ensayos de Fertilización in vitro

- Ensayo de penetración de ovocitos sin ZP

Rata: Ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados (concentración final en la gota de fertilización: $0,5 - 1 \times 10^4/\text{ml}$) durante 2-3 hs a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂. Al cabo de dicho período, los ovocitos fueron lavados, montados y observados individualmente al microscopio óptico (Nikon), determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados en cada tratamiento. Los ovocitos fueron considerados fertilizados si presentaban cabezas descondensadas o pronúcleos, y cola del espermatozoide en el citoplasma.

Ratón: Ovocitos de ratón sin ZP fueron inseminados con espermatozoides de ratón capacitados (concentración final en la gota de fertilización: $0,5 - 1 \times 10^4/\text{ml}$), y las gametas fueron co-incubadas durante 1 h en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Al concluir la co-incubación, los ovocitos fueron lavados y fijados con PFA 2% durante 10 min a temperatura ambiente y teñidos con Hoescht 33342 (1 mg/ml) durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos fueron lavados y observados en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia y luz de

mercurio, determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los ovocitos fueron clasificados de forma similar a lo realizado con las células de rata.

Humano: Teniendo en cuenta que por razones éticas no se utilizan ovocitos humanos en ensayos de fertilización con fines de investigación, analizamos la capacidad fertilizante de los espermatozoides mediante ensayos de penetración de ovocitos de hámster (HOPT: *hamster oocyte penetration test*). El HOPT fue realizado según se describe en el Manual de Laboratorio para la evaluación de semen humano (OMS, 2010). Alícuotas de 100 μ l de BWW conteniendo $2-3 \times 10^5$ espermatozoides móviles fueron co-incubados con 10-15 ovocitos de hámster sin ZP durante 2-3 h. Al cabo de dicho período, los ovocitos fueron lavados por aspiración para remover los espermatozoides no unidos o débilmente unidos, fijados en glutaraldehído 2,5 % y montados en portaobjetos. Para la observación de los ovocitos, los mismos fueron teñidos con una solución de 1% acetocarmin, con el fin de colorear el núcleo de los espermatozoides. Los ovocitos fueron clasificados de forma similar a lo realizado con las células de rata.

- Ensayos de fertilización con ovocitos con ZP o con COCs

Ovocitos de ratón con ZP o con cúmulus fueron inseminados con espermatozoides de ratón capacitados (concentración final en la gota de fertilización: $0,5 - 2 \times 10^5$ /ml), y las gametas co-incubadas durante 3 hs en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, los ovocitos fueron lavados, teñidos con Hoescht 33342 (1 mg/ml) durante 10 min a temperatura ambiente, y observados bajo microscopio de epifluorescencia (similar al usado en el punto anterior), determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los ovocitos fueron considerados fertilizados si presentaban cabezas descondensadas o pronúcleos, y la cola del espermatozoide en el citoplasma.

Ensayo de penetración de cúmulus in vitro

Ratón: Los COCs de ratón fueron inseminados con espermatozoides de ratón (concentración final en la gota de co-incubación de gametas: 0.3×10^5 células/ml), previamente teñidos con Hoescht 33342 (1 μ g/ml concentración final). Se realizó el protocolo detallado anteriormente.

Humano: Considerando que por razones éticas no se utilizan ovocitos humanos en ensayos de fertilización con fines de investigación, analizamos la capacidad del espermatozoide humano de penetrar una matriz viscosa utilizando cúmulus de ratón. Para ello, los COCs (10- 15) de ratón fueron inseminados con 1×10^4 espermatozoides humanos, previamente teñidos con Hoescht 33342 (3 μ g/ml concentración final,

durante 10 min a temperatura ambiente y lavados 1 vez con el medio de incubación correspondiente). Las gametas fueron co-incubadas durante 15 min en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, los COCs fueron fijados con PFA 2%, lavados con PBS y observados bajo microscopio de epifluorescencia (similar al usado en el punto anterior, óptica x250), determinándose el número total de espermatozoides dentro del cúmulus.

Genotipificación de los animales de la colonia KO para CRISP1

Extracción de ADN genómico: Para tal fin, se cortaron pedazos de orejas de los animales, los cuales fueron tratados utilizando el kit comercial “Wizard® SV Genomic DNA purification” (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): El genotipo de los animales fue determinado por la técnica de PCR. La reacción fue realizada en el buffer conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada “*primer*” específico y 1 U de la polimerasa termoestable Pfu (Promega, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 20 µl (pH 8,5). En dicha reacción se incluyeron un “*primer*” que aparee con los 2 alelos, un “*primer*” que aparee con el alelo mutado, y uno complementario al alelo salvaje. De este modo, se obtuvo una banda de 894 pb para el alelo salvaje y otra de 611 pb para el alelo mutado. Las secuencias de los “*primers*” utilizados fueron: forward: 5’AGACAAAGAGACCACCAACAGATT 3’ y reverse: 5’AGTACAGCAGCCAAGAAGAACAG 3’ y reverse específico para el alelo mutado: 5’CTACCCGCTTCCATTGCTC 3’. Las condiciones de amplificación fueron 32 ciclos de 2 min a 94°C, 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 2 min a 72°C, 7 min a 72°C.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± SEM para cada serie de experimentos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa “GraphPad Prism” versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). Los porcentajes (ovocitos fertilizados, viabilidad, motilidad, RA y los patrones de marca fluorescente de los espermatozoides) fueron analizados por el test de Chi cuadrado (χ^2). Los porcentajes de RA de los espermatozoides humanos incubados durante distintos períodos de tiempos fueron analizados por un test de ANOVA de dos vías. Los datos del resto de los experimentos fueron analizados mediante el test de t- Student. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de $p < 0,05$.

CAPÍTULO 1

Participación de PKA y SFKs en el proceso de capacitación

Como se mencionara en la Introducción de esta Tesis, durante el tránsito por el tracto genital femenino, los espermatozoides sufren una serie de cambios fisiológicos que, en su conjunto, se denominan capacitación (Yanagimachi, 1994). Este proceso, que también ocurre en medios definidos *in vitro*, es el resultado de una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos en el espermatozoide entre los que se encuentran: el eflujo de colesterol, el ingreso de HCO_3^- y Ca^{2+} , la redistribución de antígenos de superficie y la fosforilación de proteínas en Tyr, por mecanismos moleculares aún no del todo conocidos (Visconti, 2009). Estas modificaciones permiten, fundamentalmente, que el espermatozoide pueda sufrir la RA, y desarrollar el fenómeno de hiperactivación (Yanagimachi, 1994, Visconti et al., 2002). Teniendo en cuenta que el espermatozoide carece de transcripción y traducción, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas tales como la fosforilación/defosforilación podrían constituir los mecanismos regulatorios responsables de generar dichos cambios durante la capacitación. El fenómeno de fosforilación en Tyr que ocurre durante la capacitación espermática depende de la actividad de proteínas Tyr quinasa y de proteínas Tyr fosfatasas (Visconti, 2009). En este sentido, se demostró la presencia de SFKs en el espermatozoide de ratón y humano (Baker et al., 2006, Lawson et al., 2008, Varano et al., 2008), habiéndoselas postulado como intermediarios en la vía de señalización de PKA. Por lo tanto, dado que la identificación de las proteínas que se encuentran tanto río arriba como río abajo de PKA son claves para dilucidar las cascadas de señalización que operan durante el proceso de capacitación, el primer objetivo de la Tesis consistió en evaluar la participación de PKA y SFKs durante la capacitación.

Considerando que no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares que involucran a PKA en la capacitación del espermatozoide de rata, en primer lugar, realizamos una serie de experimentos con el objetivo de estudiar más profundamente la cinética de activación de las vías asociadas al aumento en la fosforilación de proteínas en Tyr dependiente de PKA (Visconti et al., 1995b). Al respecto, evidencias de nuestro laboratorio obtenidas en espermatozoides de rata, indican que durante la capacitación y en presencia de HCO_3^- , ocurre un aumento en los niveles de AMPc y en la fosforilación en Tyr dependientes de PKA (Da Ros et al., 2004). Para la realización de los distintos experimentos de esta sección de la Tesis, los espermatozoides fueron

recuperados del *cauda* epididimario de rata, seleccionándose las células con mayor motilidad, a través de la técnica de “swim up”. El primer estudio consistió en el análisis de la activación de PKA en función del tiempo de capacitación. Para ello, realizamos incubaciones a distintos tiempos (entre 1 min y 4 hs), evaluándose al final de cada incubación, la fosforilación de los sustratos de PKA, por la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente el motivo consenso que fosforila PKA (Arg-Arg-X-pSer/pThr). Mientras que los espermatozoides incubados en medio no capacitante, es decir en ausencia de HCO_3^- , presentaron niveles bajos de fosforilación de los sustratos de PKA, las células que fueron incubadas en condiciones capacitantes, mostraron niveles altos de esta fosforilación al minuto de estar en contacto con el medio capacitante (**Figura 1**, panel superior).

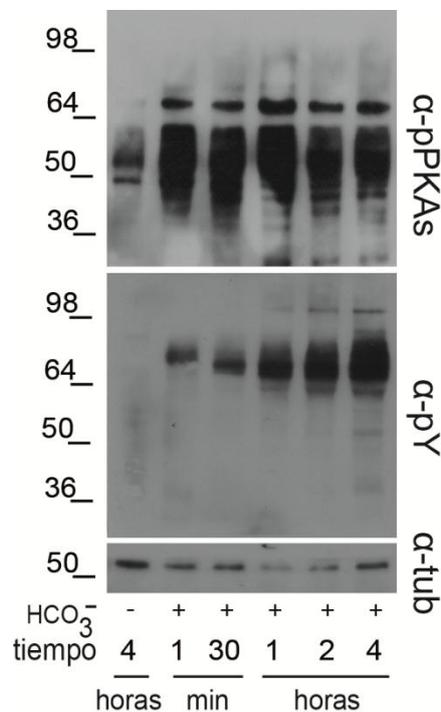


Figura 1: Actividad de PKA en función del tiempo en el espermatozoide de rata. Espermatozoides epididimarios de rata fueron incubados en presencia o ausencia de HCO_3^- durante diferentes períodos de tiempos (1 min a 4 hs). Las alícuotas fueron removidas a diferentes intervalos y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados por PKA (α -pPKAs, panel superior) o un anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en residuos Tyr (α -pY, panel inferior). β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 6 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

A continuación, y teniendo en cuenta que la fosforilación de proteínas en residuos Tyr es un evento río abajo de la activación de PKA, estudiamos la correlación temporal entre estos dos eventos. Para ello, los mismos extractos proteicos preparados para los estudios de la actividad de PKA, fueron analizados por la técnica de Western blot

utilizando un anticuerpo que reconoce a diversas proteínas fosforiladas en Tyr (anti-pY). Como muestra la **Figura 1** (panel inferior), y como fuera descrito por nuestro laboratorio (Da Ros et al., 2004), mientras que en ausencia de HCO_3^- no se observó aumento de los niveles de fosforilación, los espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes mostraron un incremento en los niveles de fosforilación en Tyr en función del tiempo, llegando a un máximo luego de 4 hs de incubación.

Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa en la capacitación del espermatozoide de rata

A continuación, estudiamos la relevancia de SFKs en el proceso de capacitación del espermatozoide de rata. El primer paso consistió en estudiar la presencia de una de estas quinasas, Src, descrita previamente en el espermatozoide de ratón (Baker et al., 2006). Mediante ensayos de Western blot, utilizando como control positivo la línea celular T47D, observamos que esta quinasa también se encuentra presente en los espermatozoides de rata tanto en capacitados como no capacitados (**Figura 2A**). Con el fin de estudiar la relevancia de SFKs en la capacitación del espermatozoide de rata, analizamos la fosforilación de los sustratos de PKA y de los residuos en Tyr mediante la técnica Western blot en espermatozoides incubados por 4 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de los inhibidores específicos de estas quinasas: SU6656 o SKI606 (Bain et al., 2007, Bantscheff et al., 2007). Los resultados mostraron que ambas fosforilaciones correlacionan negativamente con las concentraciones de los inhibidores (**Figura 2B y C**), sin afectar la viabilidad espermática (control: $64,6 \pm 3,5$ %, $50 \mu\text{M}$ SKI606: $69,4 \pm 4,9$ %, $50 \mu\text{M}$ SU6656: $66,4 \pm 5,1$ %, NS, n=4). El análisis de los resultados reveló que la máxima concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los dos compuestos fue aproximadamente $50 \mu\text{M}$. Como control, utilizamos al inhibidor de PKA (H89, $50 \mu\text{M}$), observando que tal como fuera reportado por nuestro laboratorio (Da Ros et al., 2004), los espermatozoides capacitados en presencia de este inhibidor exhiben un bloqueo en ambas fosforilaciones.

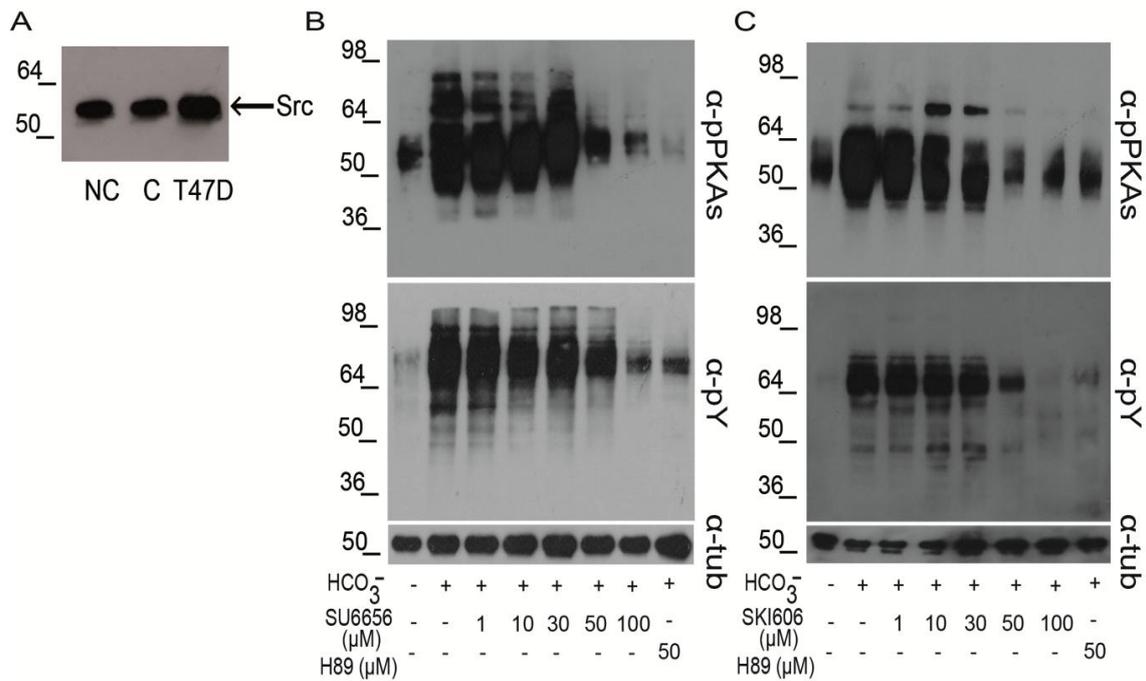


Figura 2: Efecto de los inhibidores de SFKs sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y de los residuos en Tyr. **A.** Extractos proteicos de espermatozoides de rata incubados en medio en ausencia (no capacitados, NC) o presencia de HCO₃⁻ (capcitados, C). Como control positivo se utilizó la línea celular T47D. Los extractos fueron analizados por Western blot utilizando α -Src. **B y C.** Los espermatozoides fueron incubados durante 4 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de diferentes concentraciones de SU6656 (1-100 μ M, **B**), SKI606 (1-100 μ M, **C**) o H89 (50 μ M). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos α -pPKAs (panel superior) o α -pY (panel inferior). β -tubulina fue utilizada como control de carga proteica Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para investigar si la participación de SFKs durante la capacitación del espermatozoide de rata ocurría a través de la regulación negativa de Ser/Thr fosfatasa como fuera descrito con anterioridad para el espermatozoide murino (Krapf et al., 2010), analizamos los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides capacitados en presencia de SU6656 (50 μ M) o SKI606 (50 μ M) junto con concentraciones crecientes de ácido okadaico (OA), el cual es un inhibidor específico de Ser/Thr fosfatasa (Ishihara et al., 1989). La **Figura 3A y B** muestra que concentraciones bajas de OA (0,1 nM) revirtieron completamente la inhibición observada anteriormente por SU6656 y SKI606 sobre ambas fosforilaciones. Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos la expresión de PP2A, una Ser/Thr fosfatasa con alta sensibilidad a OA, ya que se inactiva con bajas concentraciones de este inhibidor. Los ensayos de Western blot mostraron la presencia de PP2A en el espermatozoide no capacitado y capacitado de rata (**Figura 3C**). Además, utilizando la misma técnica, encontramos la presencia de otra Ser/Thr fosfatasa sensible a OA, PP1 γ 2 (**Figura 3D**), la cual se diferencia de PP2A por ser mucho menos sensible al

inhibidor (Ishihara et al., 1989).

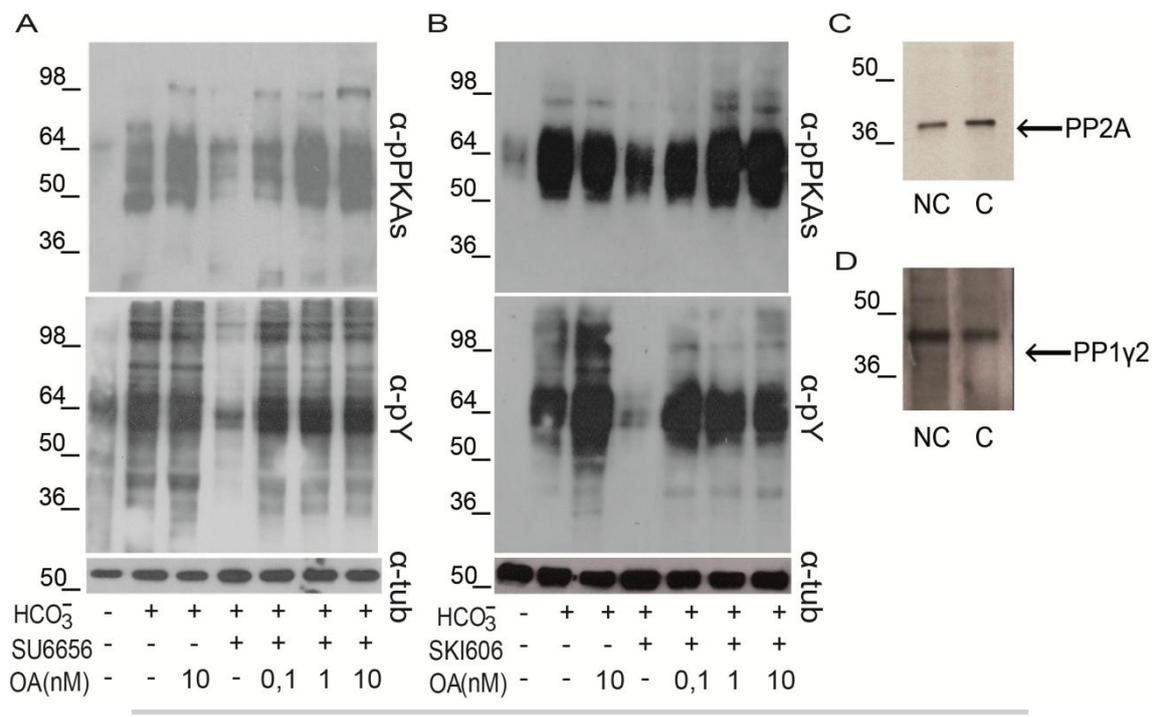


Figura 3: Efecto de los inhibidores de SFKs o Ser/Thr fosfatasa sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides de rata fueron incubados por 4 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de 50 μ M de SU6656 (A) o 50 μ M de SKI606 (B) y diferentes concentraciones de ácido okadaico (OA, 0,1-10 nM). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue utilizada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. C. Los extractos proteicos de espermatozoides incubados en ausencia (no capacitados, NC) o presencia de HCO₃⁻ (capacitados, C) fueron analizados por Western blot utilizando α -PP2A o α -PP1 γ 2 como anticuerpos primarios.

En conjunto, estos resultados sugieren que SFKs y Ser/Thr fosfatasa estarían involucradas en las cascadas de señalización que ocurren durante la capacitación de los espermatozoides de rata. Teniendo en cuenta los efectos observados a bajas concentraciones de OA, es probable que PP2A sea la fosfatasa involucrada en esta vía.

Con el objetivo de identificar el punto convergente entre las vías AMPc/PKA y SFKs/fosfatasa, los espermatozoides fueron incubados bajo diversas condiciones en las cuales una de las dos vías fue inhibida y la otra estimulada, analizándose luego los niveles de ambas fosforilaciones. Los resultados revelaron que cuando la vía AMPc/PKA se encuentra inhibida por la ausencia de HCO₃⁻ en el medio (Figura 4 A, segunda calle) o por la presencia de H89 (Figura 4B, ante-última calle), se bloquea la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr a pesar de la estimulación de la vía

SFKs/fosfatasa por la presencia de OA. De forma similar, la inactivación de la cascada SFKs/fosfatasa por SKI606 disminuyó ambas fosforilaciones a pesar de que la vía AMPc/PKA se encontraba estimulada por la presencia de un inhibidor de las PDEs (pentoxiflina, PTX) y un análogo permeable al AMPc (dbcAMP) (**Figura 4A**, última calle).

Estos resultados indicaron que sería necesaria la activación de ambas cascadas para aumentar los niveles de fosforilación en Tyr durante la capacitación del espermatozoide de rata, y que el punto de entrecruzamiento entre estas dos vías estaría localizado a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA.

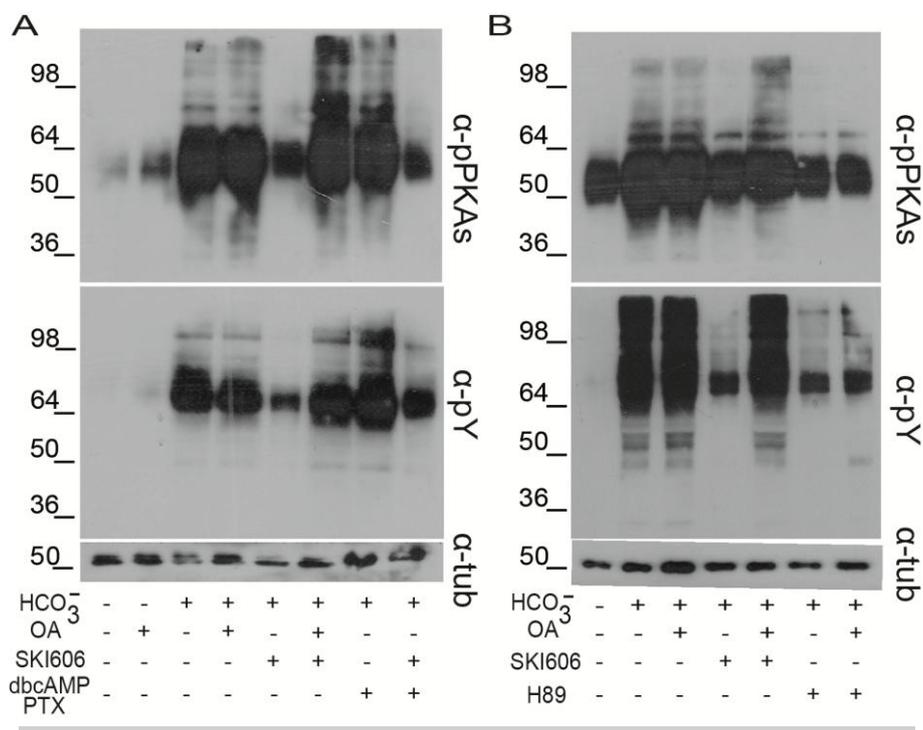


Figura 4: Interacciones entre las dos vías de señalización. **A.** Espermatozoides de rata fueron incubados por 4 hs en ausencia o presencia de HCO₃⁻ (25 mM), OA (10 nM) y/o SKI606 (30 μM). **B.** Espermatozoides de rata fueron incubados por 4 hs en presencia o ausencia de SKI606 (30 μM), OA (100 nM), dbcAMP/PTX (5 mM/0,2 mM) y/o H89 (30 μM). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. β-tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para evaluar la relevancia de SFKs y Ser/Thr fosfatasa para la funcionalidad espermática, los espermatozoides fueron capacitados durante 4 hs en presencia de SU6656 o SKI606 y/o OA, analizándose luego diferentes parámetros tales como la motilidad, la RA y la capacidad fusogénica de los espermatozoides. En primer lugar, evaluamos en forma subjetiva, la motilidad de los espermatozoides incubados bajo los

distintos tratamientos, utilizando el microscopio óptico. Los resultados de la **Figura 5** muestran que la presencia de SU6656 o SKI606 durante 4 hs produjo una clara disminución en la motilidad total, mientras que la exposición de las células a SU6656 o SKI606 junto con OA impidió dicha inhibición.

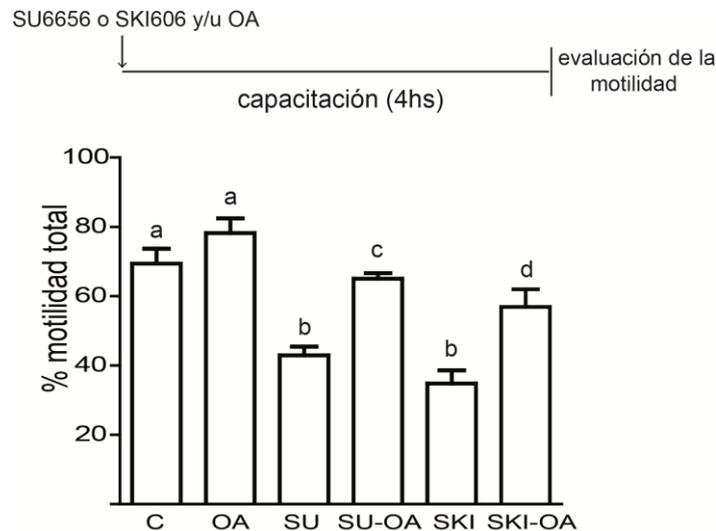


Figura 5: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la motilidad espermática. Espermatozoides de rata fueron capacitados por 4 hs en ausencia (C) o presencia de OA (10 nM), SU6656 (50 μ M), SKI606 (50 μ M) o cada uno de los inhibidores de SFKs junto con OA (SU-OA, SKI-OA). El porcentaje de espermatozoides móviles fue evaluado al microscopio óptico. Los resultados representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0.05$.

Dado que otro evento que ocurre como consecuencia del proceso de capacitación es la relocalización de la proteína IZUMO de la región dorsal al segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Sosnik et al., 2009), evaluamos dicha relocalización mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en espermatozoides incubados bajo los distintos tratamientos. En este caso, observamos que un mayor número de espermatozoides presentaron a IZUMO en la zona dorsal en presencia de los inhibidores de SFKs, y que el agregado de OA promovió la relocalización aún en presencia de SU6656 o SKI606 (**Figura 6**).

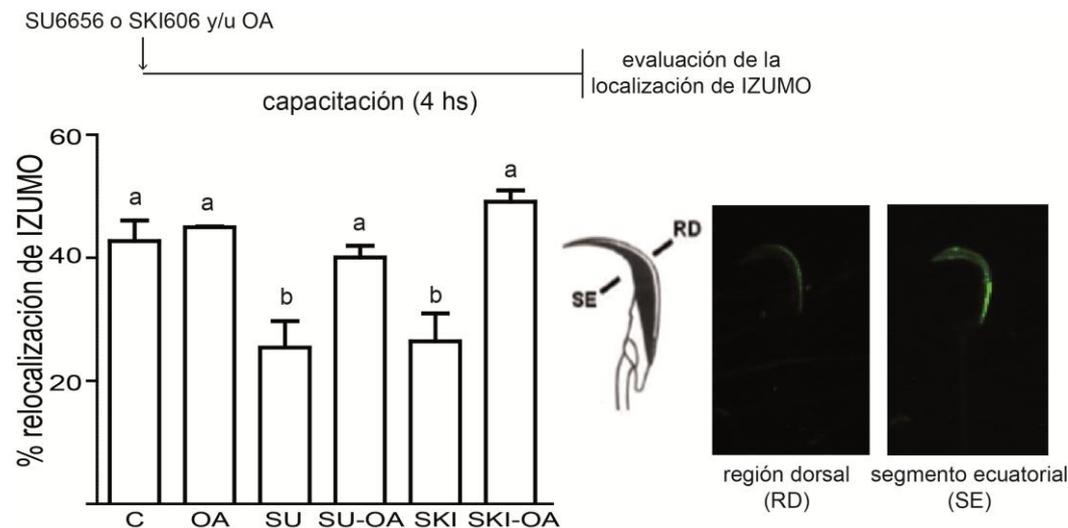


Figura 6: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la relocalización de IZUMO.

Espermatozoides de rata fueron capacitados por 4 hs en ausencia (C) o presencia de OA (10 nM), SU6656 (50 μ M), SKI606 (50 μ M) o cada uno de los inhibidores de SFKs junto con OA (SU-OA, SKI-OA). La localización de IZUMO fue evaluada por IFI. Los resultados representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

Luego, analizamos los niveles de RA de los espermatozoides capacitados en presencia de los distintos inhibidores por 4 hs. Al igual que la motilidad y la relocalización de IZUMO, los inhibidores de SFKs disminuyeron los porcentajes de la RA espontánea, es decir, la producida sólo como consecuencia de la capacitación, mientras que la presencia de OA revirtió dicha inhibición (**Figura 7**).

Teniendo en cuenta que en el experimento anterior el efecto de los inhibidores de SFKs podría deberse a una modulación de la capacitación y/o la RA, evaluamos la participación de estas quinasas específicamente sobre la RA tanto espontánea como inducida por progesterona. Para ello, los espermatozoides fueron capacitados durante 4 hs en ausencia de los inhibidores y, al finalizar esta incubación, se los expuso por 30 min a 15 μ M de progesterona en presencia de los inhibidores: SU6656 y SKI606. Los resultados mostraron que los espermatozoides incubados con los inhibidores presentaron bajos porcentajes de RA inducida por la progesterona, mientras no se modificaron los porcentajes de RA espontánea (**Figura 8**).

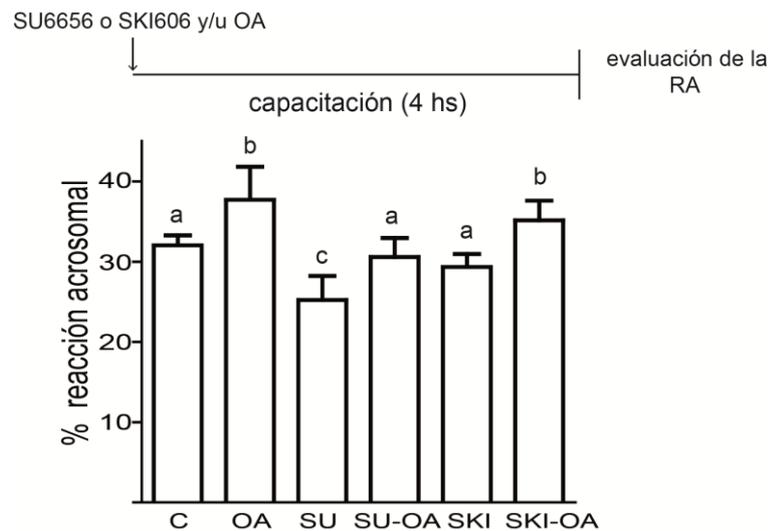


Figura 7: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la RA. Espermatozoides de rata fueron capacitados por 4 hs en ausencia (C) o presencia de OA (10 nM), SU6656 (50 μ M), SKI606 (50 μ M) o cada uno de los inhibidores de SFKs junto con OA (SU-OA, SKI-OA). El porcentaje de espermatozoides reaccionados fue evaluado mediante la técnica de Coomassie Blue. Los resultados representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

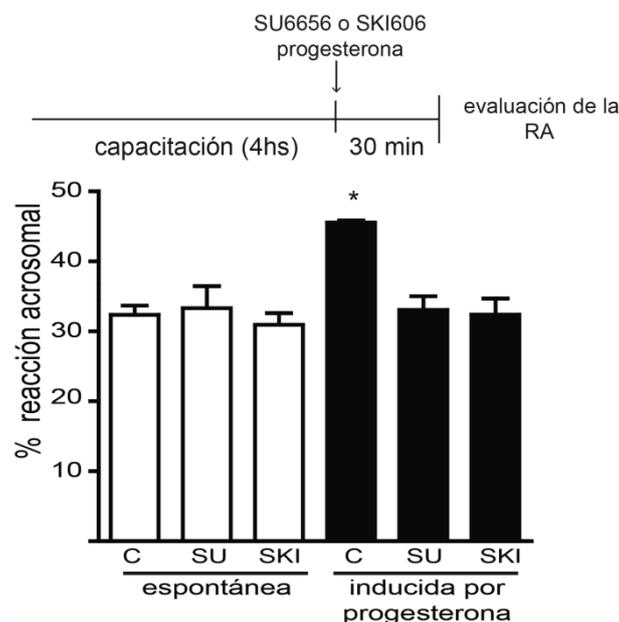


Figura 8: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para RA inducida por progesterona. Espermatozoides de rata fueron capacitados por 4 hs en ausencia de los inhibidores, luego, expuestas a 15 μ M de progesterona en ausencia (C) o presencia de SU6656 (50 μ M) o SKI606 (50 μ M). El porcentaje de espermatozoides reaccionados fue evaluado mediante la técnica de Coomassie Blue. Los resultados representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, * vs C de la RA espontánea, $p < 0,05$.

Finalmente, evaluamos el efecto de la vía SFKs/fosfatasa sobre la capacidad de los

espermatozoides de fertilizar ovocitos de rata sin ZP. Los espermatozoides incubados en presencia de SU6656 (**Figura 9A**) o SKI606 (**Figura 9B**) durante la capacitación mostraron una disminución en los porcentajes de fertilización, la cual no fue observada al ser expuestos a SU6656 o SKI606 junto con OA (**Figura 9A, B**). Cuando los compuestos SU6656 o SKI606 fueron agregados solamente en el momento de la co-incubación con los ovocitos (3 hs), se observaron porcentajes normales de penetración mientras que el agregado de OA en el mismo período de incubación produjo una disminución del porcentaje de fertilización (**Figura 9C**).

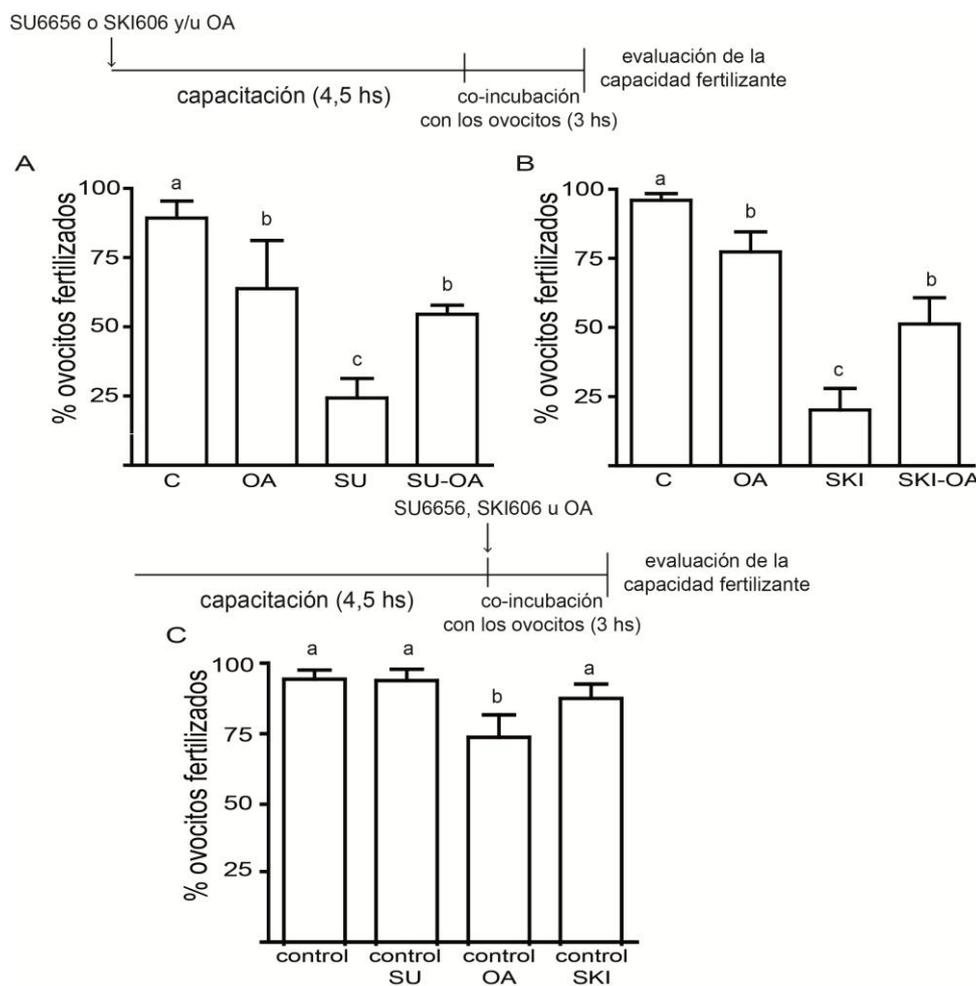


Figura 9: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la capacidad fertilizante. **A y B** Espermatozoides de rata fueron incubados bajo condiciones capacitantes, en ausencia (C) o presencia de 10 nM OA (OA), 50 μ M SU6656 (SU), 50 μ M SKI606 (SKI) o cada uno de los inhibidores de SFKs junto a OA (SU-OA, SKI-OA) y posteriormente, co-incubados con ovocitos sin ZP durante 3 hs, evaluándose el porcentaje de ovocitos fertilizados. **C**. Como control, los espermatozoides fueron incubados en ausencia de los inhibidores durante 4,5 hs, agregándose a continuación, 10 nM OA (OA), 50 μ M SU6656 (SU) o 50 μ M SKI606 (SKI) durante el período de incubación con los ovocitos. Los resultados representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados obtenidos en el modelo de rata confirmaron la participación de SFKs, a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas, tanto en la fosforilación en Tyr como en la regulación de distintos parámetros de funcionalidad espermática inducidos luego del proceso de capacitación.

Habiéndose confirmado la participación de la vía de SFKs en la capacitación de los espermatozoides de roedores, el próximo paso consistió en extender estos estudios al modelo humano.

Correlación temporal de la vía de señalización de PKA

Con el fin de estudiar la participación de las vías de señalización involucradas en el proceso de capacitación del espermatozoide humano, en primer lugar, analizamos la vía asociada al aumento de fosforilación en Tyr dependiente de AMPc y PKA, en relación al estado funcional de capacitación del espermatozoide. Para estos estudios se utilizaron muestras de semen de donantes sanos en edad reproductiva, seleccionándose los espermatozoides más móviles mediante la técnica de “swim up”. Luego de ello, los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes y no capacitantes durante un amplio rango de tiempos (1 min -18 hs).

Para estudiar la actividad de PKA, evaluamos la fosforilación de los sustratos de esta enzima por la técnica de Western blot, utilizando el anticuerpo α -pPKAs mencionado anteriormente. Mientras que los espermatozoides incubados en medio no capacitante (ausencia de HCO_3^-) no presentaron fosforilación de los sustratos de PKA en ninguno de los tiempos ensayados (**Figura 10**, panel superior izquierdo), las células incubadas en condiciones capacitantes (presencia de HCO_3^-) mostraron niveles altos de esta fosforilación al minuto de estar en contacto con el medio capacitante (**Figura 10**, panel superior derecho). Las bandas reactivas correspondientes a los sustratos fosforilados presentaron pesos moleculares menores a 100 kDa.

Teniendo en cuenta que la fosforilación de proteínas en Tyr es un evento río abajo de la activación de PKA, a continuación, estudiamos la correlación temporal de estos dos eventos. Los mismos extractos proteicos preparados para los estudios de la actividad de PKA, fueron analizados por Western blot utilizando el anticuerpo que reconoce a las proteínas fosforiladas en Tyr (anti-pY). Como muestra la **Figura 10** (paneles inferiores), mientras que la ausencia de HCO_3^- en el medio no permitió el aumento de los niveles de fosforilación en ninguno de los tiempos evaluados (panel izquierdo),

los espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes presentaron niveles altos de fosforilación luego de 1 h, los cuales se incrementaron en función del tiempo, llegando a un máximo luego de 6 hs de incubación (panel derecho).

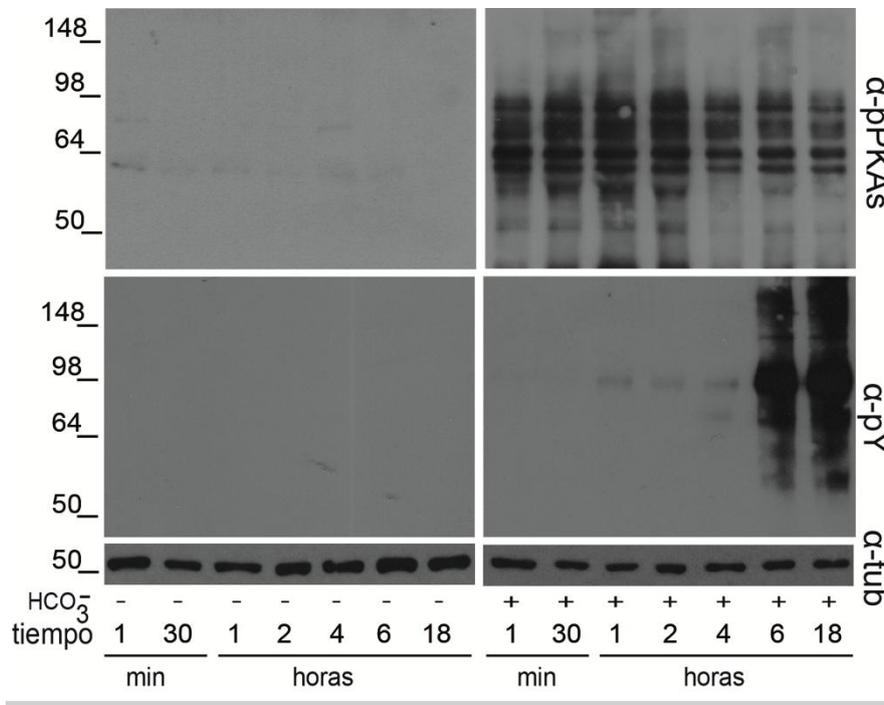


Figura 10: Actividad de PKA en función del tiempo de incubación. Espermatozoides eyaculados humanos fueron incubados en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) de HCO₃⁻ durante diferentes períodos de tiempos (1 min a 18 hs) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 8 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

La fosforilación de los sustratos de PKA durante la capacitación fue específica de PKA ya que, al exponer a los espermatozoides a un análogo permeable del AMPc (dbcAMP) y a un inhibidor de PDEs (3-isobutil-1-metilxantina, IBMX), se produjo un incremento de dicha fosforilación en ausencia de HCO₃⁻, la cual fue inhibida por la exposición con H89 (**Figura 11**, panel superior). Por su parte, la fosforilación en Tyr que ocurre durante la capacitación fue inducida por el agregado de dbcAMP e IBMX e inhibida por la exposición a H89 (**Figura 11**, panel inferior).

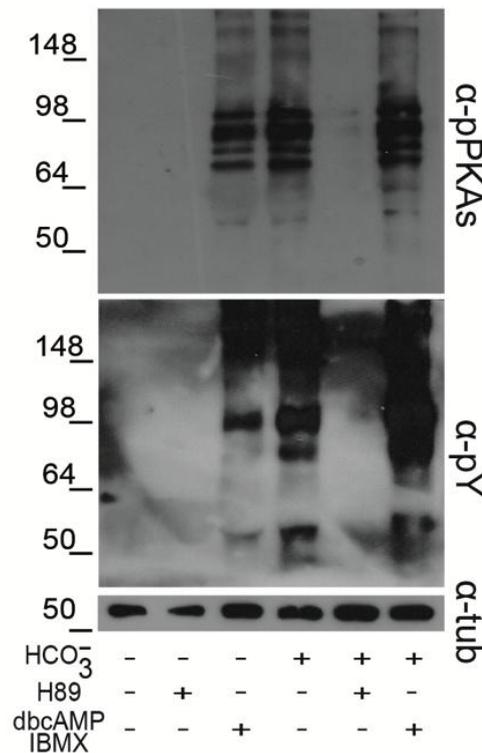


Figura 11: Activación de PKA. Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs en ausencia o presencia de HCO₃⁻ (25 mM), H89 (30 μM) o dbcAMP/IBMX (5 mM/0.2 mM). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. β-tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

A continuación, evaluamos la localización de los sustratos fosforilados por PKA a diferentes tiempos de incubación (1 min a 18 hs) como así también el porcentaje de células con marcación, a través de las técnicas de IFI y Citometría de flujo, respectivamente, utilizando en ambos casos el anticuerpo anti-pPKAs mencionado anteriormente. Los resultados revelaron que la mayoría de los espermatozoides (82 ± 6 %) incubados bajo condiciones capacitantes exhibían marca fluorescente en el flagelo luego de sólo 1 min (**Figura 12, a; b**), sin observarse modificaciones a tiempos más largos (1 h: 78 ± 12 %, 18 hs: 80 ± 7 %). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia fue baja tanto en espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes (**Figura 12, c; d**) como capacitantes pero en presencia de H89 (**Figura 12, i; j**). En estos dos últimos casos se observaron menores porcentajes de células marcadas (54 ± 13 % y 46 ± 6 %) que en el control (82 ± 6 %). La marca fue negativa en aquellos controles en los que la IFI se realizó con IgG purificada de conejo como primer anticuerpo (**Figura 12, e; f**). De manera similar a lo analizado por Western blot, los espermatozoides incubados en ausencia de HCO₃⁻ pero expuestos a dbcAMP e IBMX presentaron marca fluorescente en el flagelo (**Figura 12, g; h**).

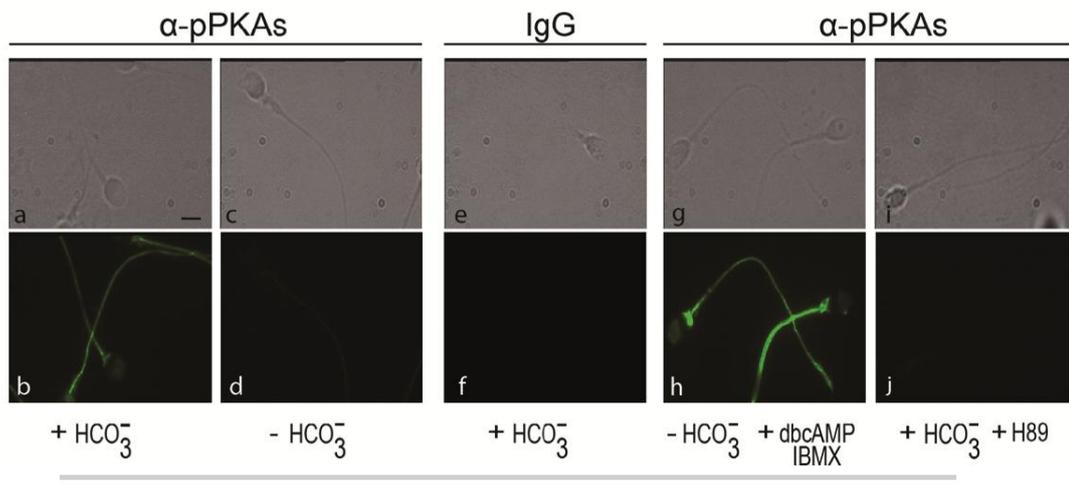


Figura 12: Localización de los sustratos fosforilados por PKA. Espermatozoides humanos fueron incubados por 1 min en presencia (a, b, e, f) o ausencia (c, d) de HCO_3^- , en ausencia HCO_3^- pero conteniendo dbcAMP e IBMX (g, h), o en medio completo en presencia de H89 (i, j). Los espermatozoides fueron fijados y sometidos a IFI utilizando α -pPKAs (a-d, g-j) o IgG purificada como anticuerpos primarios (e, f). Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. La barra corresponde a 5 μm .

Como otra aproximación al estudio de la actividad de PKA, evaluamos los niveles de AMPc durante la capacitación del espermatozoide humano. Para ello, realizamos la técnica de radioactividad enzimática de PKA sobre espermatozoides incubados bajo condiciones no capacitantes o capacitantes durante distintos tiempos (1 min a 18 hs). Mientras que los espermatozoides incubados bajo condiciones no capacitantes mostraron niveles bajos (no detectables) de AMPc a todos los tiempos evaluados, aquellos incubados en un medio con HCO_3^- presentaron niveles altos del mensajero intracelular al minuto de incubación, los cuales disminuyeron rápidamente dentro de la primera hora de incubación y se mantuvieron bajos por el resto del período de capacitación (**Figura 13**).

Con el objetivo de evaluar si el incremento observado en los niveles de AMPc era causado por la activación de la sAC, los espermatozoides fueron expuestos a un inhibidor de esta enzima (KH7) durante la capacitación, evaluándose luego los niveles de AMPc y de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Bajo estas condiciones, las células presentaron niveles de AMPc menores que el control (con HCO_3^- : $1,61 \pm 0,21$ vs KH7: $0,41 \pm 0,10$ pmol por 1×10^6 células, $p < 0,05$) y niveles bajos de fosforilación de los sustratos de PKA luego de 1 min (**Figura 14A**). Asimismo, se observó una disminución en la fosforilación en Tyr luego de incubar a los espermatozoides durante 18 hs en presencia de KH7 (**Figura 14B**).

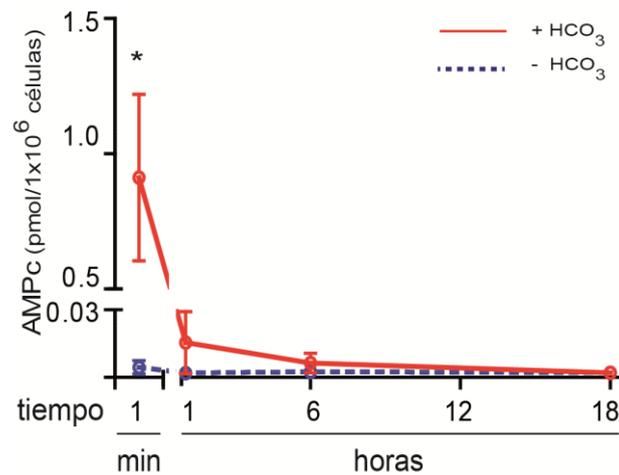


Figura 13: Determinación de los niveles de AMPc intracelular. Espermatozoides humanos fueron incubados por diferentes tiempos en ausencia o presencia de HCO₃⁻, determinándose el contenido de AMPc por ensayos de radioactividad enzimática de PKA. Los datos representan el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. **p*<0,05

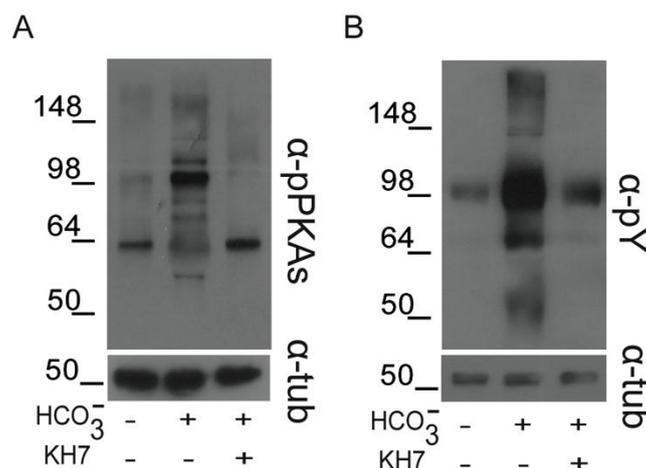


Figura 14: Efecto del inhibidor de sAC sobre los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de KH7 (75 μM) durante 1 min (A) o 18 hs (B). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs (A) o α-pY (B). β-tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para estudiar la correlación entre la vía de señalización ya descrita AMPc/PKA y el estado funcional de los espermatozoides humanos, estudiamos la habilidad de estas células de desarrollar la hiperactividad, la RA espontánea e inducida por progesterona y la capacidad de fertilizar al ovocito.

En primer lugar, evaluamos la motilidad de las células incubadas bajo condiciones no capacitantes y capacitantes por 18 hs, utilizando el sistema CASA (“computer assisted

sperm analysis”) que permite el análisis objetivo de la motilidad. La ausencia de HCO_3^- en el medio de incubación produjo una clara disminución en la mayoría de los parámetros de motilidad evaluados (VAP, VCL, VSL, LIN, STR y BCF) y en la motilidad progresiva (**Tabla I**), mientras que la motilidad total no se modificó respecto a la condición control.

	motilidad total	motilidad progresiva	VAP	VCL	VSL	ALH	LIN	STR	BCF
NC	95,3 ± 5,6	56,5 ± 1,2	28,5 ± 5,0	57,0 ± 6,9	19,0 ± 5,0	3,6 ± 0,5	21,3 ± 4,4	61,5 ± 5,7	28,4 ± 0,5
C	96,3 ± 7,8	61,1 ± 1,8*	55,0 ± 1,8*	83,0 ± 3,7*	48,3 ± 1,4*	4,5 ± 0,1	54,3 ± 1,3*	85,0 ± 1,7*	35,4 ± 2,8*

Tabla I: Relevancia de la vía AMPc/PKA para la motilidad espermática.

Espermatozoides fueron incubados en ausencia (NC) o en presencia (C) de HCO_3^- por 18 hs. Los valores representan el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. * vs NC, $p < 0,05$. Motilidad total (%), motilidad progresiva (%), VAP: velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm), LIN: linealidad (%), STR: rectilineidad (%) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz).

Teniendo en cuenta que para inducir la RA se ha propuesto el empleo de diferentes concentraciones de progesterona bajo diversas condiciones de capacitación (Bedu-Addo et al., 2005, Sagare-Patil et al., 2012, Varano et al., 2008), en primer lugar, evaluamos el porcentaje de RA en función de la concentración de progesterona en nuestras condiciones experimentales, utilizando la técnica de tinción con PSA-FITC y posterior análisis bajo el microscopio de epifluorescencia. Los resultados indicaron que 25 μM de progesterona fue la concentración mínima requerida para inducir la RA luego de 18 hs de incubación y que, a concentraciones mayores, se observaron similares niveles de RA (**Figura 15A**). En base a ello, el siguiente paso consistió en evaluar la cinética de la RA inducida por progesterona utilizando dicha concentración. Los ensayos mostraron un aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en función del tiempo de incubación, el cual fue significativamente mayor al control a partir de las 6 hs (**Figura 15B**). Por su parte, la RA espontánea también aumentó en función del tiempo de incubación llegando a niveles significativamente mayores luego de 6 hs bajo condiciones capacitantes, si bien los niveles alcanzados fueron menores que los correspondientes a la RA inducida por progesterona. Como era de esperar, en ausencia de HCO_3^- , se observaron niveles basales de RA tanto espontánea como inducida a lo largo de toda la incubación (**Figura 15B**).

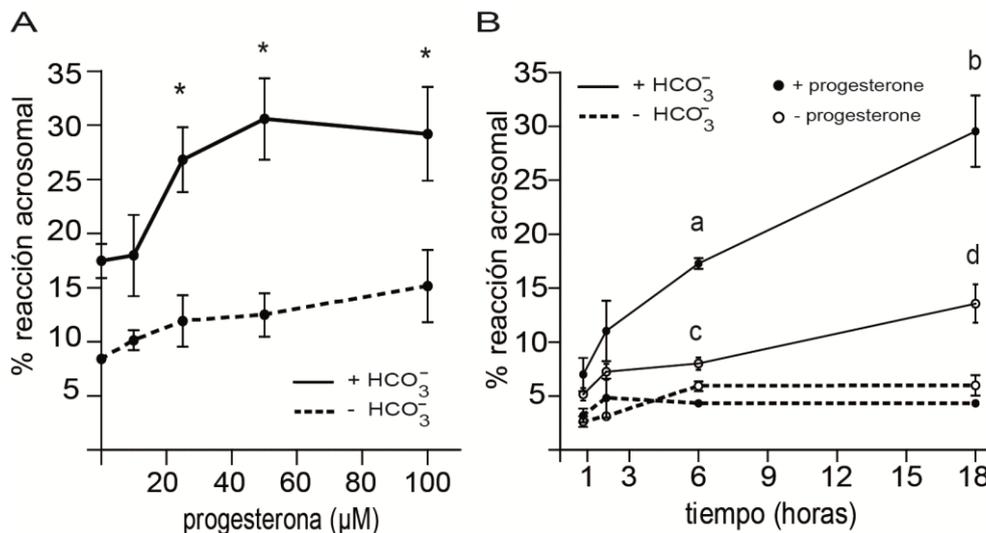


Figura 15: Evaluación de la RA durante la capacitación. A. Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs ausencia (líneas punteadas) o en presencia (líneas sólidas) de HCO_3^- , expuestos a diferentes concentraciones de progesterona (1-100 μM) durante los últimos 30 min de la incubación y sometidos a tinción con PSA-FITC para evaluar el porcentaje de RA. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. $*p < 0,01$. **B.** Espermatozoides humanos fueron incubados durante diferentes tiempos (1-18 hs) en ausencia (líneas punteadas) o presencia (líneas sólidas) de HCO_3^- , expuestos a progesterona (25 μM) (círculos llenos) o vehículo (0,05 % v/v en DMSO) (círculos abiertos) durante los últimos 30 min de incubación y sometidos a la tinción con PSA-FITC para evaluar el porcentaje de RA. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. a, b, d vs todos los tiempos evaluados, $p < 0,05$, c vs todos los tiempos evaluados excepto 2 hs, $p < 0,05$.

A continuación, evaluamos el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide durante la capacitación. Para ello, teniendo en cuenta que por razones éticas no se pueden utilizar ovocitos humanos en ensayos de fertilización con fines de investigación, utilizamos el test de HOPT (“*hamster oocyte penetration assay*”) el cual evalúa la capacidad del espermatozoide humano de penetrar ovocitos de hámster sin ZP (OMS, 2010). Los espermatozoides humanos fueron incubados bajo condiciones capacitantes por diferentes períodos de tiempo, y luego co-incubados por 2,5 hs adicionales con ovocitos de hámster sin ZP los cuales fueron finalmente observados para determinar el porcentaje de penetración. Como control, los espermatozoides fueron incubados en medio BWW en ausencia de HCO_3^- . Los resultados mostraron que mientras los espermatozoides incubados por 1 h fueron capaces de penetrar un número bajo de ovocitos (21,8 \pm 5,0 % vs control: 6,9 \pm 0,2 %), aquellos incubados durante 6 hs o 18 hs mostraron niveles de fertilización significativamente mayores que los controles (60,2 \pm 3,9 %, 90,3 \pm 1,7 % vs 6,9 \pm 0,2 %) (Figura 16).

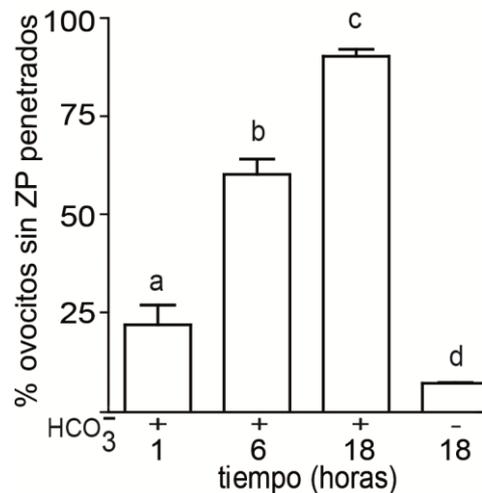


Figura 16: Evaluación de la capacidad fertilizante durante la capacitación. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de HCO₃⁻ durante diferentes períodos de tiempos (1, 6 or 18 h), co-incubados con ovocitos de hámsters sin ZP en medio capacitante durante 2,5 hs, luego teñidos con 1% acetocarmin y finalmente observados para determinar el porcentaje de ovocitos penetrados. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Las letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados indican que, mientras el aumento de AMPc y de la fosforilación de los sustratos de PKA ocurren muy rápidamente (1 min), los espermatozoides requieren por lo menos 6 hs bajo condiciones capacitantes para alcanzar el estado funcional que le permite fertilizar al ovocito.

Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa en la capacitación del espermatozoide humano

A continuación, estudiamos la relevancia de SFKs en el proceso de capacitación del espermatozoide humano. Para ello, los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes en ausencia o presencia del inhibidor específico de estas quinasas: SKI606 (Bantscheff et al., 2007) durante 18 hs, período adecuado para tener un alto porcentaje de espermatozoides con capacidad fertilizante. Al finalizar, analizamos la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr mediante Western blot. Los resultados mostraron que ambas fosforilaciones correlacionaron negativamente con la concentración del inhibidor SKI606 (**Figura 17**), sin afectar la viabilidad espermática (control: $84,6 \pm 3,5$ %, 30 μ M SKI606: $79,4 \pm 4,9$ % control, NS, n= 4). La IC₅₀ de dicho inhibidor sobre los espermatozoides humanos fue aproximadamente 10 μ M.

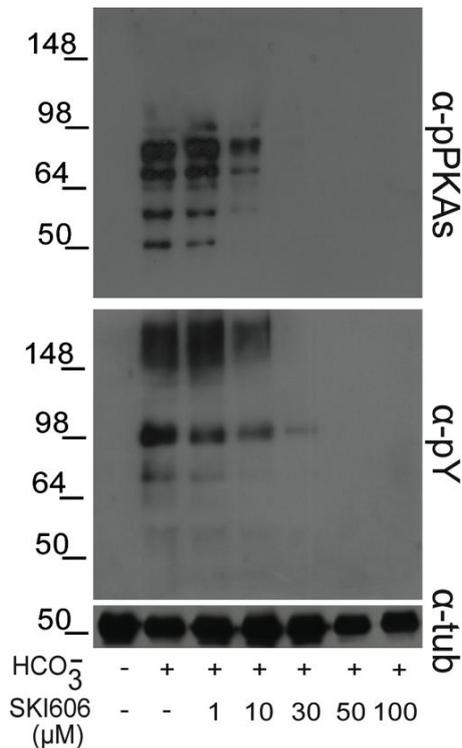


Figura 17: Efecto del inhibidor de SFKs sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de diferentes concentraciones de SKI606 (1-100 μM). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. β-tubulina fue utilizada como control de carga proteína. Se realizaron al menos 7 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para investigar si la participación de SFKs sobre la fosforilación en Tyr ocurría por inactivación de Ser/Thr fosfatasa tal como fuera descrito con anterioridad para el espermatozoide de roedor (ratón: (Krapf et al., 2010), rata: esta Tesis), analizamos los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en presencia de 30 μM de SKI606 junto con concentraciones crecientes de OA. Los resultados de la **Figura 18** mostraron que el OA revirtió completamente la inhibición observada anteriormente por SKI606 sobre ambas fosforilaciones. Más aún, se evidenció que se necesitan altas concentraciones de OA (100 nM) para lograr dichos efectos. Estos resultados sugieren que las fosfatasa involucradas en esta vía tendrían baja sensibilidad a OA, tal como PP1γ2

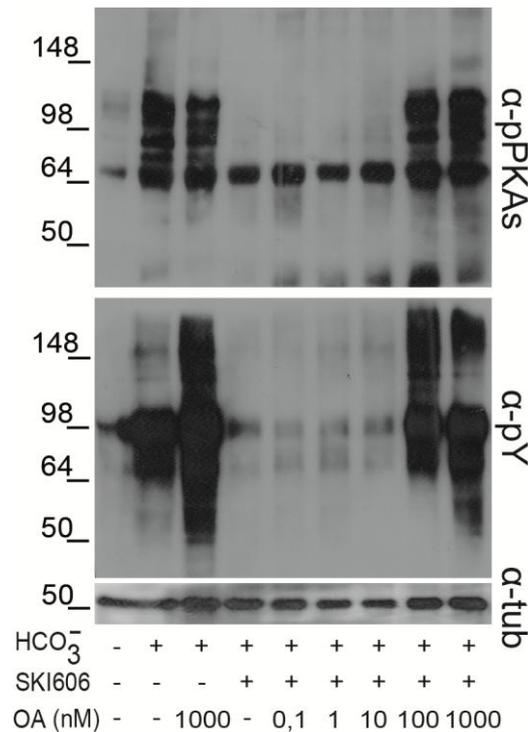


Figura 18: Efecto de los inhibidores de SFKs o Ser/Thr fosfatasa sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de SKI606 (30 μ M) y diferentes concentraciones de OA (0.1-1000 nM). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue utilizada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Con el objetivo de identificar el punto de entrecruzamiento o convergencia entre las vías AMPc/PKA y SFKs/fosfatasa durante la capacitación del espermatozoide humano, las células fueron incubadas bajo condiciones en las cuales una de las dos vías era inhibida y la otra estimulada, analizándose luego los niveles de ambas fosforilaciones. Los resultados revelaron que cuando la vía AMPc/PKA estaba inhibida por la ausencia de HCO₃⁻ (**Figura 19A**) o bien por la presencia de H89 (**Figura 19B**), la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr se encontraba disminuida a pesar de la estimulación de la vía SFKs/fosfatasa por la presencia de OA. De manera similar, la inactivación de la cascada SFKs/fosfatasa por SKI606 bloqueó ambas fosforilaciones a pesar de que la vía AMPc/PKA estuviera estimulada por la presencia de IBMX y dbcAMP (**Figura 19B**).

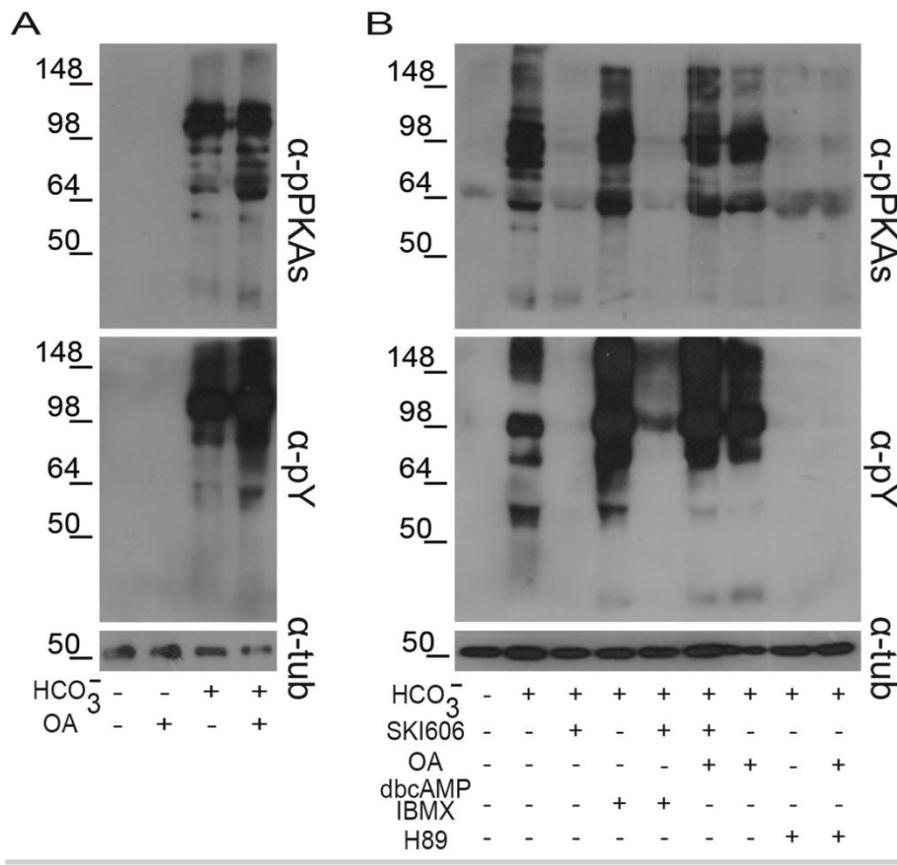


Figura 19: “Cross-talk” entre las dos vías de señalización. A. Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs en ausencia o presencia de HCO₃⁻ (25 mM) u OA (100 nM). **B.** Espermatozoides humanos fueron incubados por 18 hs en presencia o ausencia de SKI606 (30 μ M), OA (100 nM), dbcAMP/IBMX (5 mM/0,2 mM) y/o H89 (30 μ M). Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empleando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue utilizada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Estos resultados indicaron que se necesitaría la activación de ambas cascadas para inducir los niveles de fosforilación en Tyr durante la capacitación del espermatozoide humano, y que el punto de entrecruzamiento entre las vías estaría localizado a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA.

Posteriormente, evaluamos la relevancia de la vía de la SFKs/fosfatasa para la funcionalidad espermática. Para ello, los espermatozoides fueron capacitados por 18 hs en presencia de SKI606 y/u OA, analizándose luego diferentes parámetros tales como la motilidad, la RA y la capacidad de penetrar ovocitos de hámster sin ZP (Esquemas del panel superior de las **Tabla II, Figuras 20 y 21**). En primer lugar, evaluamos la motilidad de las células expuestas a los distintos tratamientos, utilizando el sistema CASA. Observamos que la presencia de SKI606 produjo una clara disminución en todos los parámetros de motilidad evaluados (VAP, VCL, VSL, ALH,

LIN, STR y BCF) y en los porcentajes de motilidad progresiva respecto al control (**Tabla II**), alcanzando niveles similares a los de espermatozoides incubados en medio no capacitante (ver **Tabla I**). La exposición de las células a SKI606 junto con OA impidió la inhibición observada en los espermatozoides incubados solamente con SKI606 (**Tabla II**). La motilidad total no se modificó bajo las distintas condiciones ensayadas.

SKI606 y/u OA
↓
capacitación (18 hs) | evaluación de la motilidad

	motilidad total	motilidad progresiva	VAP	VCL	VSL	ALH	LIN	STR	BCF
C	95,0 ± 5,8	63,9 ± 2,2	55,0 ± 1,8	83,0 ± 3,7	48,3 ± 1,4	4,5 ± 0,1	54,3 ± 1,3	85,0 ± 1,7	25,0 ± 1,0
OA	94,2 ± 8,2	64,0 ± 2,3	40,2 ± 6,0	66,3 ± 5,7	34,1 ± 5,7	4,7 ± 0,8	46,5 ± 4,9	77,8 ± 3,1	25,1 ± 1,9
SKI	87 ± 10,1	36,3 ± 3,1*	23,7 ± 2,2*	50,0 ± 2,6*	14,5 ± 2,1*	3,8 ± 0,1*	28,5 ± 2,9*	59,3 ± 2,4*	39,3 ± 2,1*
SKI OA	90,1 ± 9,5	58,3 ± 2,7	40,1 ± 4,7	65,9 ± 5,2	34,2 ± 5,0	3,9 ± 0,3	47,8 ± 4,3	78,3 ± 3,3	26,3 ± 1,2

Tabla II. Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la motilidad espermática.

Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia (C) o en presencia de 30 μM de SKI606 y/o 100 nM de OA (SKI, OA o SKI-OA) por 18 hs. Los valores representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C, $p < 0,05$. Motilidad total (%), motilidad progresiva (%), VAP: Velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm), LIN: linealidad (%), STR: rectilineidad (%) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz).

Si bien, no detectaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides reaccionados espontáneamente entre los distintos tratamientos los espermatozoides expuestos a SKI606 presentaron una disminución en la capacidad de inducir la RA en presencia de progesterona (25 μM) en comparación con los controles. Esta inhibición no se evidenció cuando las células fueron expuestas a SKI606 junto con el OA, al igual que lo observado para la motilidad (**Figura 20**).

Finalmente, analizamos el efecto de los distintos tratamientos sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides utilizando el test de HOPT. Los resultados revelaron que la presencia de SKI606 durante la capacitación produjo una inhibición en la capacidad fertilizante, la cual fue revertida por exposición de los espermatozoides a SKI606 junto con OA (**Figura 21**). Por su parte, el agregado de los compuestos sólo durante la co-incubación con el ovocito (2,5 hs), produjo porcentajes

normales de penetración.

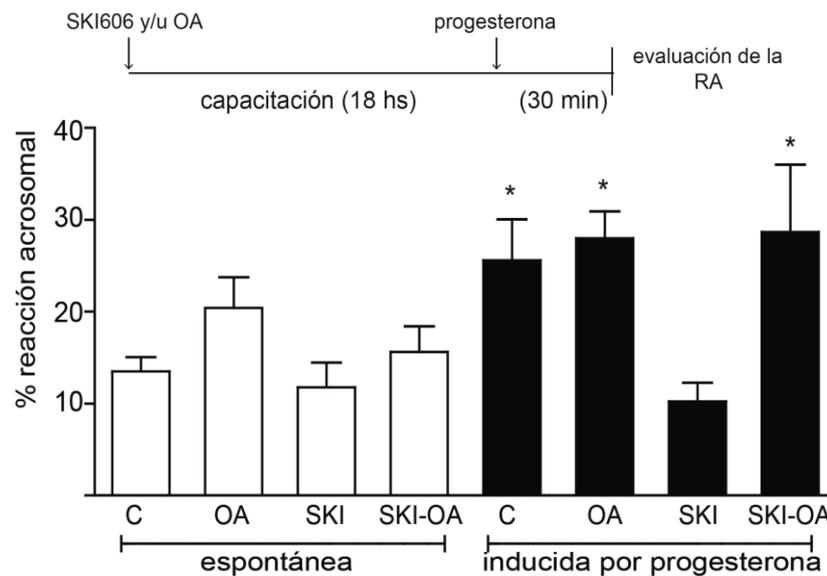


Figura 20: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la RA. Espermatozoides humanos fueron capacitados por 18 hs en ausencia (C) o presencia de OA (100nM), SKI606 (30 μ M), o los dos inhibidores juntos (SKI-OA). La RA espontánea e inducida por progesterona (25 μ M) fue evaluada usando la técnica de FITC-PSA. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C de la RA espontánea, $p < 0,05$ vs. No se observan diferencias significativas en la RA espontánea entre los distintos tratamientos.

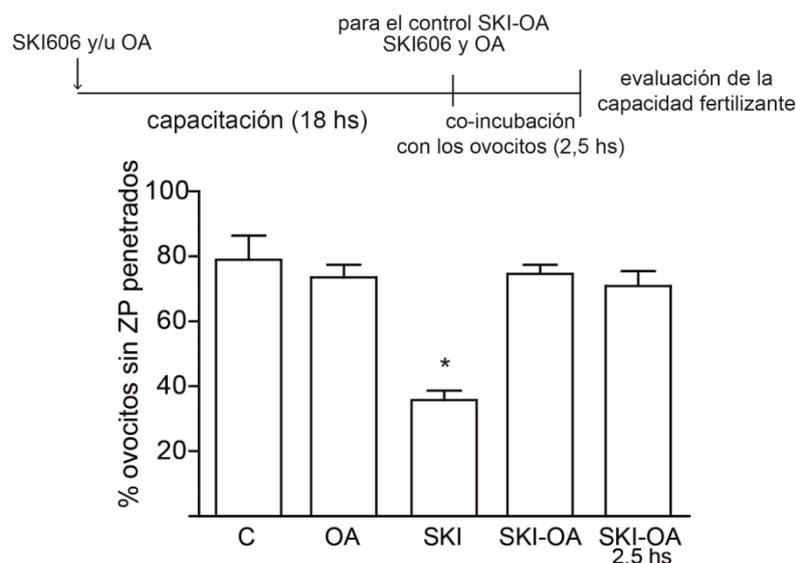


Figura 21: Relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la capacidad fertilizante. Espermatozoides humanos fueron incubados en medio control (C) o en presencia de SKI606 (30 μ M), OA (100 nM), o ambos inhibidores juntos (SKI-OA) por 18 hs luego, co-incubados con ovocitos de hámsters sin ZP en medio capacitante durante 2,5 hs y finalmente observados para determinar el porcentaje de ovocitos penetrados. Como control, los espermatozoides fueron capacitados en medio libres de los moduladores enzimáticos y luego co-incubados con los ovocitos en medio capacitante en presencia de ambos inhibidores por 2,5 hs (SKI-OA/2,5 hs). Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C, $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta que en los experimentos de HOPT, las alícuotas de espermatozoides que fueron transferidas a la gota de co-incubación de gametas, arrastraban SKI606, en concentraciones menores a las utilizadas durante la capacitación, evaluamos el estado de fosforilación en Tyr de los espermatozoides presentes en las gotas de co-incubación. Para ello, reproducimos técnicamente el procedimiento de los experimentos de HOPT pero analizando los niveles de fosforilación en Tyr mediante Western blot. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia de 30 μ M SKI606 por 18 hs y luego diluidos al 30% en medio capacitante (9 μ M) e incubados por 2,5 hs adicionales, tiempo correspondiente al período de co-incubación de las gametas. Bajo estas condiciones, observamos que se mantuvo la inhibición sobre la fosforilación en Tyr producida con 30 μ M de SKI606 (**Figura 22**). Con el fin de evaluar los niveles de fosforilación en Tyr de los espermatozoides presentes en la gota control (SKI-OA 2,5 hs), los espermatozoides fueron capacitados sin los inhibidores y luego transferidos a una gota que contenía 9 μ M SKI606 por 2,5 hs adicionales. Al cabo de este período, observamos niveles normales de fosforilación en Tyr. La **Figura 22** también muestra dos controles en los cuales los espermatozoides fueron incubados en ausencia o presencia de 30 μ M SKI606 durante todo la incubación (18 hs más 2,5 hs), observándose inducción e inhibición, respectivamente, de la fosforilación de Tyr. Estos resultados demostraron que los niveles bajos de SKI606 durante la co-incubación de las gametas no modificarían el estado de fosforilación inducido por la capacitación.

En conjunto, estas observaciones indican la participación de SFKs durante la capacitación del espermatozoide humano, a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas, apoyando así la existencia de dos vías conducentes a la fosforilación en Tyr: una dependiente de la activación de PKA, y otra mediada por la inactivación de Ser/Thr fosfatasas, que convergen a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA. Asimismo, estos estudios demuestran la relevancia funcional de estas vías para el proceso de capacitación del espermatozoide humano.

CAPÍTULO 2

Participación de Ca^{2+} y PYK2 en el proceso de capacitación

Efecto de la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) sobre la fosforilación de proteínas

La capacitación espermática se correlaciona no sólo con un aumento de los niveles de fosforilación en Tyr sino, además, con un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Sin embargo, se sabe aún poco acerca de los efectores moleculares que decodificarían la señal intracelular de aumento de Ca^{2+} . En este sentido, la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en el medio capacitante genera en los espermatozoides humanos altos niveles de fosforilación en Tyr, indicando la complejidad de la cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} involucrada en la capacitación. Por lo tanto, en el segundo objetivo de esta Tesis, exploramos los mecanismos moleculares involucrados en la decodificación de las señales dependientes de Ca^{2+} durante la capacitación del espermatozoide humano.

Para estudiar la participación de Ca^{2+} durante el proceso de capacitación del espermatozoide humano, evaluamos la ocurrencia de eventos intracelulares asociados a este proceso en espermatozoides humanos incubados bajo diferentes condiciones experimentales que incluyeron distintos períodos de incubación, diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_e$ y la presencia de inhibidores y/o estimuladores. Luego de los diversos tratamientos, analizamos la fosforilación de los sustratos de PKA y de residuos Tyr por Western blot.

Como primer paso, los espermatozoides eyaculados humanos recuperados luego del “swim up”, se incubaron durante 6 hs en medio capacitante conteniendo diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Los espermatozoides incubados en medio de capacitación BWW completo ($[\text{Ca}^{2+}]_e$ 1,7 mM), presentaron una inducción de la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr, mientras que aquellos incubados en BWW carentes de HCO_3^- mostraron un bloqueo en ambas fosforilaciones (**Figura 1A**, resultados mostrados en el Capítulo 1). Por otra parte, mientras se observaron patrones similares de fosforilación de los sustratos de PKA a todas las $[\text{Ca}^{2+}]_e$ testeadas (**Figura 1A**), los niveles de fosforilación en Tyr se incrementaron en función de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Resultados similares se obtuvieron cuando los espermatozoides fueron incubados en medio BWW sin el agregado de Ca^{2+} (medio de incubación con Ca^{2+} nominal cero, que será

nombrado de aquí en más como ΘCa^{2+}) y en presencia de EGTA, quelante de Ca^{2+} (Figura 1B).

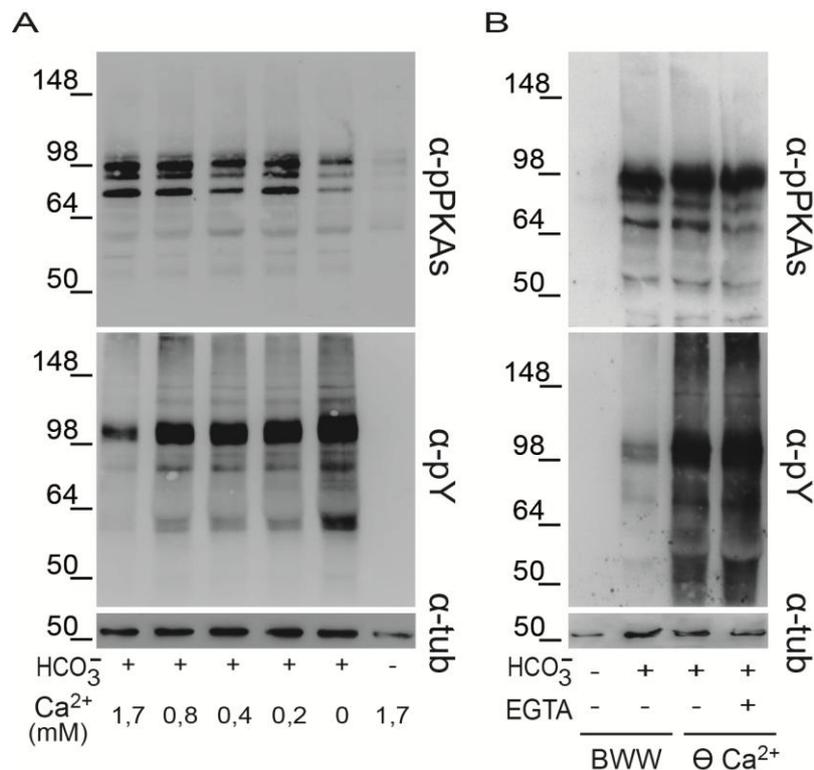


Figura 1: Efecto de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en BWW conteniendo distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (0 - 1,7 mM) (A) o en BWW completo, en ausencia de Ca^{2+} extracelular (ΘCa^{2+}) y en presencia de 1 mM de EGTA (B) durante 6 hs. Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

A continuación, los espermatozoides fueron incubados en ΘCa^{2+} conteniendo diferentes concentraciones de HCO_3^- . Los resultados mostraron niveles similares de fosforilación de los sustratos de PKA bajo las distintas condiciones ensayadas, y un aumento en la fosforilación en Tyr en función de la concentración de HCO_3^- respecto a los controles incubados en BWW (Figura 2).

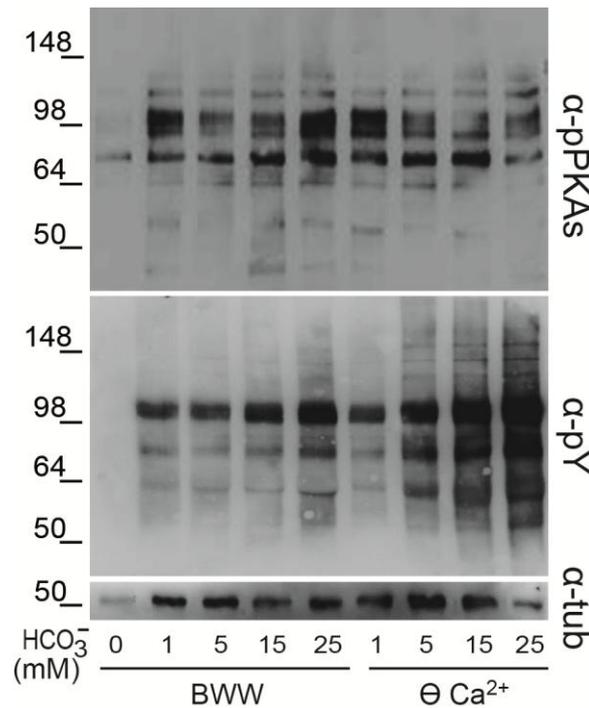


Figura 2: Efecto de la concentración de HCO_3^- sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de HCO_3^- (0 - 25 mM) y/o de 1,7 mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ durante 6 hs. Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Finalmente, analizamos el efecto de la falta de Ca^{2+} extracelular a lo largo de diferentes períodos de incubación (1 min, 1 h, 6 h o 18 h) sobre ambas fosforilaciones. Si bien no se observaron modificaciones apreciables en la fosforilación de los sustratos de PKA entre espermatozoides incubados en BWW o en ΘCa^{2+} , la fosforilación en Tyr fue detectada más tempranamente en ΘCa^{2+} que en el medio control (**Figura 3**).

En conjunto, estos resultados indican que la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ modularía los niveles de fosforilación en Tyr sin generar modificaciones sustanciales en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA.

Dado que no se observaron diferencias en los niveles de fosforilación entre 6 y 18 hs de incubación en medio capacitante, a continuación, los experimentos se realizaron incubando a los espermatozoides por un período de 6 hs.

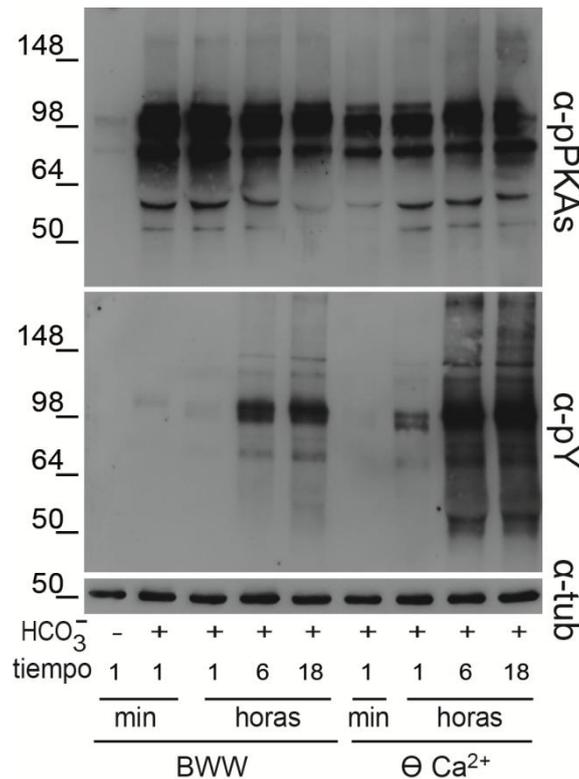


Figura 3: Actividad de PKA en función del tiempo en ausencia de Ca²⁺. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) durante diferentes períodos de tiempo (1 min a 18 hs). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. β-tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Considerando que el incremento observado en la fosforilación en Tyr en ausencia de Ca²⁺ extracelular podía ocurrir independientemente de PKA o bien estar mediado por un mecanismo río abajo de la activación de dicha enzima, evaluamos estas dos posibilidades incubando a los espermatozoides en medio control o Θ Ca²⁺ e inhibiendo la fosforilación de los sustratos de PKA mediante dos estrategias diferentes. En la primera, PKA fue directamente bloqueada por la exposición de los espermatozoides al inhibidor específico H89. Bajo estas condiciones, los resultados mostraron que H89 (30 μM) inhibió ambos niveles de fosforilaciones independientemente del medio de incubación empleado (**Figure 4A**). Teniendo en cuenta que, tal como se ha descrito en el Capítulo 1, SFKs también regulan los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA (Krapf et al., 2010, Battistone et al., 2013), en una segunda estrategia, los espermatozoides fueron incubados en Θ Ca²⁺ o BWW en presencia de SKI606, inhibidor de SFKs. En este caso, observamos resultados similares a los obtenidos con H89 dado que el SKI606 (30 μM) inhibió la fosforilación de los sustratos de PKA como así también en Tyr en ambos medios de incubación (**Figure 4B**).

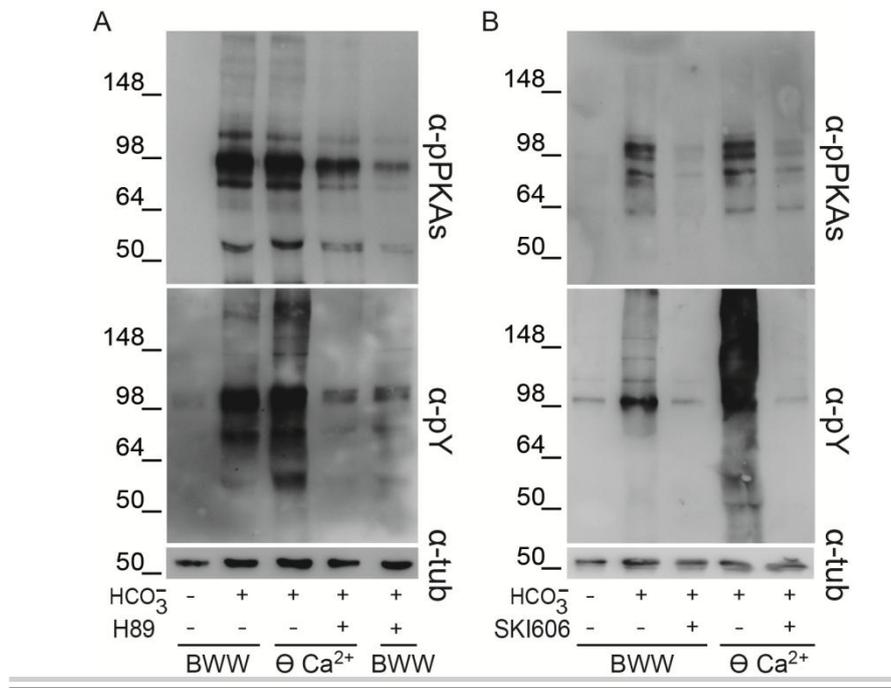


Figura 4: Efecto de los inhibidores de PKA o SFKs sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en Θ Ca²⁺. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) durante 6 hs, en ausencia o presencia de H89 (30 μ M, **A**) o SKI606 (30 μ M, **B**). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Estos resultados indican que si bien los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA no se modifican por incubación de los espermatozoides en Θ Ca²⁺, el incremento en los niveles de fosforilación en Tyr observado en dicho medio requeriría la activación de PKA y, por lo tanto, ocurriría río abajo de PKA.

Evidencias previas sugieren que los espermatozoides humanos incubados en medio capacitante sin el agregado de Ca²⁺ presentan un aumento en la concentración temprana de ATP (Baker et al., 2004, Torres-Flores et al., 2011). Con el fin de confirmar este fenómeno y poder explicar así el aumento en la fosforilación en Tyr observada en Θ Ca²⁺, determinamos el contenido de ATP de espermatozoides incubados por 1 h en medio completo o Θ Ca²⁺. Los resultados mostraron que la ausencia de Ca²⁺ generó un incremento significativo de los niveles de ATP comparado con el control ($3,37 \pm 0,10$ vs $2,06 \pm 0,24$ ng por 2×10^6 células, $n = 4$, $p < 0,005$) (**Figura 5**), sugiriendo que el Ca²⁺ podría afectar la fosforilación en Tyr al modular la disponibilidad de ATP en el interior celular, permitiendo así aumentar la actividad de diversas quinasas.

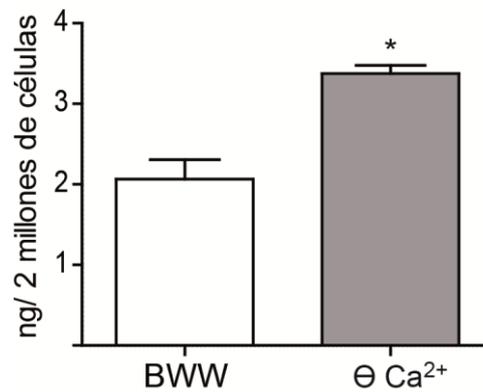


Figura 5: Niveles de ATP en espermatozoides incubados en medio capacitante y Θ Ca²⁺. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) durante 1 h. Luego, las alícuotas fueron removidas y el contenido de ATP analizado utilizando un kit comercial basado en luminiscencia. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares dependientes de Ca²⁺ involucrados en las vías de señalización que conducen a la fosforilación en Tyr, evaluamos la participación de algunos efectores ubicados río abajo de Ca²⁺ sobre ambas fosforilaciones tales como calmodulina (CaM) y Ser/Thr fosfatasa PP2B, una de las moléculas reguladas por CaM. En primer lugar, los espermatozoides fueron incubados en medio BWW en presencia de W7, un antagonista de CaM, utilizando W5 como control ya que es un compuesto con características químicas similares al anterior pero con menor actividad. Bajo estas condiciones, mientras no observamos cambios en la fosforilación de los sustratos de PKA, los niveles de fosforilación en Tyr correlacionaron positivamente con las concentraciones del inhibidor (**Figura 6**).

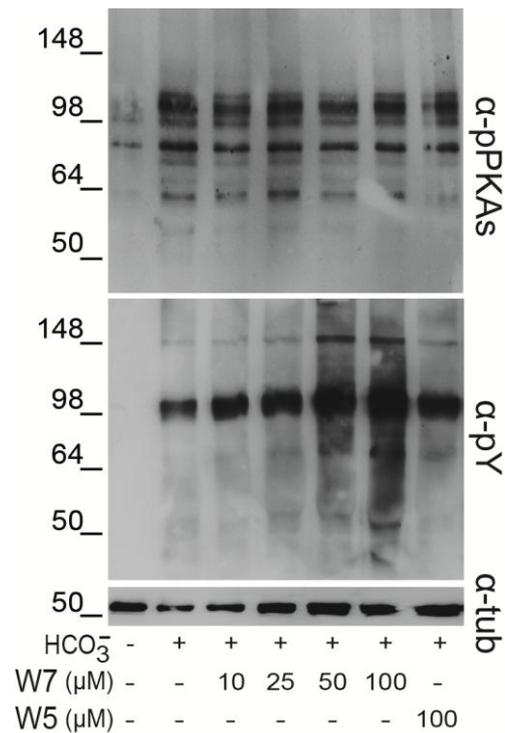


Figura 6: Efecto del inhibidor de CaM sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de distintas concentraciones de W7 (0-100 μ M) o W5 (100 μ M) durante 6 hs y las proteínas fosforiladas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 7 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

A continuación, los espermatozoides fueron incubados en medio BWW en presencia del inhibidor de PP2B, Ciclosporina-A (CsA). Los resultados revelaron que si bien los sustratos fosforilados por PKA no se encontraban modificados, los niveles de fosforilación en Tyr mostraron un incremento en función de la concentración del inhibidor (**Figura 7**). En conjunto, estas observaciones sugieren que CaM y PP2B estarían involucradas en la cascada de señalización dependiente de Ca²⁺ durante la capacitación del espermatozoide humano.

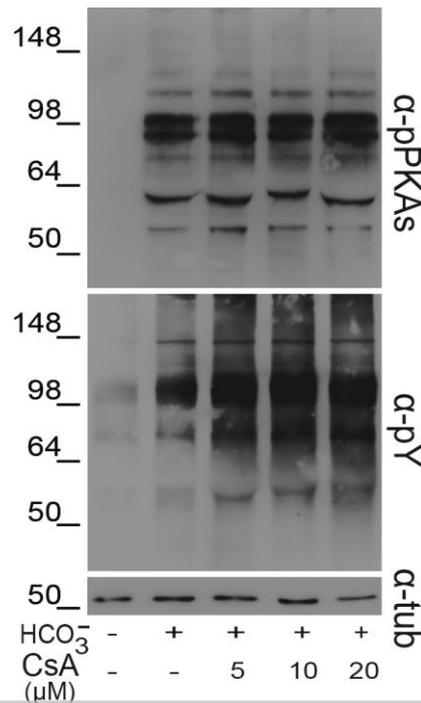


Figura 7: Efecto del inhibidor de PP2B sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de distintas concentraciones de CsA (0 - 20 μM) durante 6 hs y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. β-tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 6 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Resultados similares a los correspondientes a la **Figura 6 y 7** se observaron cuando los espermatozoides fueron incubados en \ominus Ca²⁺, inactivándose farmacológicamente a CaM o a PP2B. La presencia de W7 o CsA no produjo cambios en la fosforilación de los sustratos de PKA pero generó incrementos en los niveles de la fosforilación en Tyr, sugiriendo que los mecanismos moleculares que llevarían a dicha fosforilación en \ominus Ca²⁺ serían similares a los involucrados en el medio BWW (**Figura 8**).

Los resultados obtenidos sugirieron que los espermatozoides en \ominus Ca²⁺ presentarían una actividad menor de fosfatasa, por lo cual, determinamos dicha actividad en espermatozoides incubados en medio BWW o \ominus Ca²⁺ durante distintos períodos de tiempo (1, 2, 4 y 6 hs), utilizando un kit colorimétrico comercial. Los ensayos mostrados en la **Figura 9** revelaron que la actividad de fosfatasa de las células no varió significativamente en ninguna de las condiciones ensayadas.

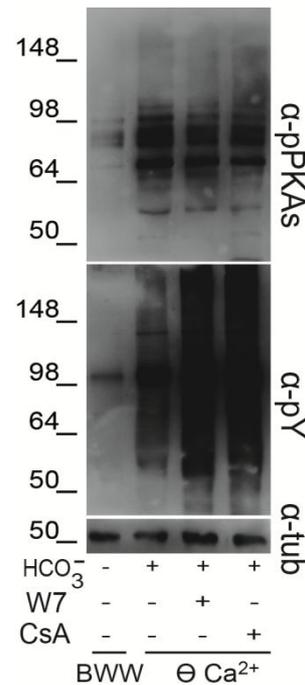


Figura 8: Efecto de los inhibidores de CaM o PP2B sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en Θ Ca²⁺. Espermatozoides humanos fueron incubados en Θ Ca²⁺ en ausencia o presencia de W7 (50 μ M) o Cs-A (20 μ M) durante 6 hs. Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

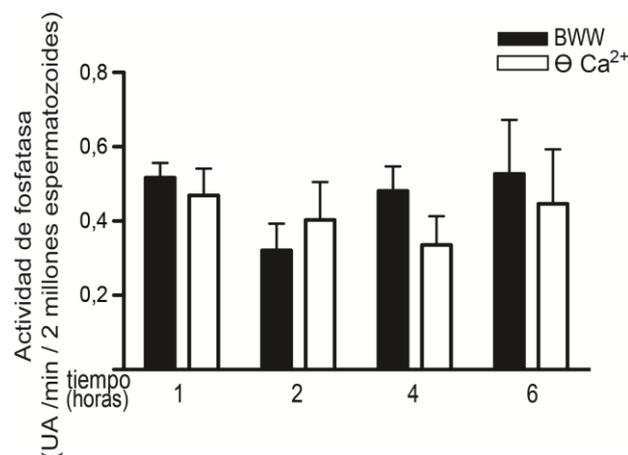


Figura 9: Actividad de fosfatasa. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) durante distintos períodos de tiempo (1, 2, 4 y 6 hs). Al finalizar las incubaciones, se analizó la actividad fosfatasa utilizando un kit comercial basado en colorimetría. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes, NS.

Participación de PYK2 en la fosforilación de proteínas durante la capacitación

Teniendo en cuenta que el Ca^{2+} modula la fosforilación en Tyr sin afectar los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA, y que los efectores moleculares que decodifican la señal de Ca^{2+} son aún poco conocidos, estudiamos Tyr quinasas reguladas por Ca^{2+} que podrían estar involucradas en la inducción de la fosforilación. Un candidato posible era PYK2, miembro de la familia FAK, que es una Tyr quinasa descrita en el espermatozoide de ratón (Chieffi et al., 2003). Por estudios en otras células, se sabe que la actividad de PYK2 puede ser modificada positiva o negativamente por las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ según el tipo celular (Lysechko et al., 2010). Dado que la información obtenida sobre esta familia de quinasas en el espermatozoide era muy escasa, investigamos si las proteínas de la familia FAK estaban involucradas en el aumento de los niveles de fosforilación observados en el espermatozoide humano.

En primer lugar, estudiamos la presencia de los dos miembros de la familia FAK en el espermatozoide humano: FAK y PYK2, utilizando la técnica de Western blot con anticuerpos que reconocen específicamente a cada una de las proteínas. Los resultados revelaron que en el espermatozoide humano sólo se encuentra presente la quinasa PYK2 (**Figura 10**).

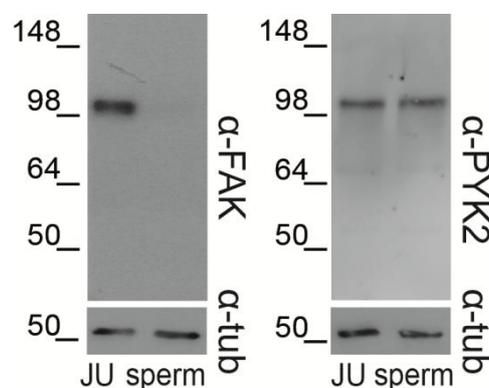


Figura 10: Presencia de los miembros de la familia FAK. Extractos de células Jurkat (control positivo) y de espermatozoides humanos analizados por Western blot utilizando los anticuerpos α -FAK o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Habiendo detectado a PYK2 en el espermatozoide humano, a continuación estudiamos la relevancia de esta quinasa sobre las fosforilaciones inducidas en Θ Ca^{2+} . Para ello, los espermatozoides fueron incubados en dicho medio en presencia del inhibidor descrito para la familia FAK: PF431396 (0 a 30 μM) (Buckbinder et al.,

2007, Han et al., 2009). Se observó que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA aumentaban a partir de 3 μM de PF431396 mientras que los niveles de fosforilación en Tyr disminuían hasta alcanzar aquellos correspondientes al control (condición capacitante, en presencia de HCO_3^- y Ca^{2+}) (**Figura 11**).

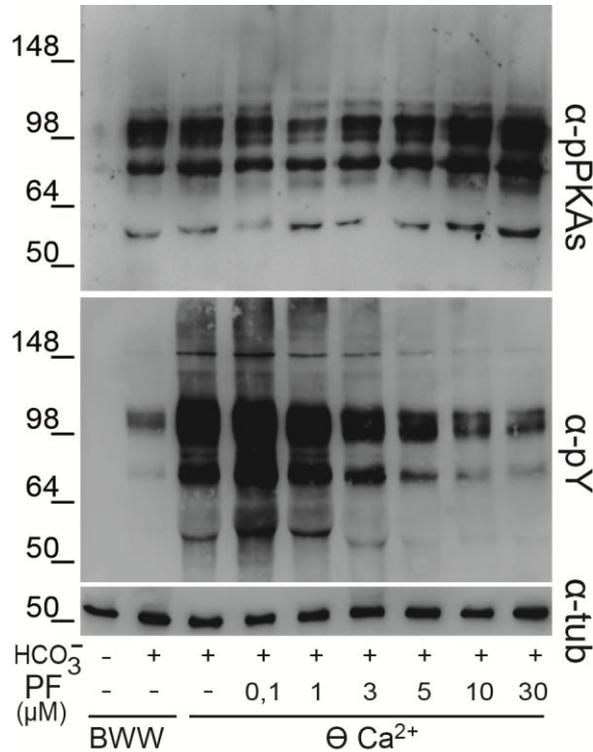


Figura 11: Efecto del inhibidor de PYK2 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en ΘCa^{2+} . Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de PF431396 (0,1-30 μM) durante 6 hs en ΘCa^{2+} y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para confirmar que PF431396 estaba inhibiendo a la proteína PYK2, evaluamos el estado de activación de dicha quinasa analizando los niveles de trans/autofosforilación en el residuo Tyr-402 (Avraham et al., 2000). Los resultados de Western blot utilizando un anticuerpo comercial que reconoce a la proteína total PYK2 y otro que reconoce el sitio fosforilado Tyr-402 de PYK2, mostraron que el PF431396 disminuyó los niveles de fosfo-PYK2, mientras que los niveles de PYK2 se mantuvieron constantes (**Figura 12**). Asimismo, fosfo-PYK2 presentó mayor intensidad en ΘCa^{2+} que en el medio BWW completo (**Figura 12**). En conjunto, estos resultados apoyan a PYK2 como la quinasa responsable de la cascada de fosforilación observada en ΘCa^{2+} en el espermatozoide humano.

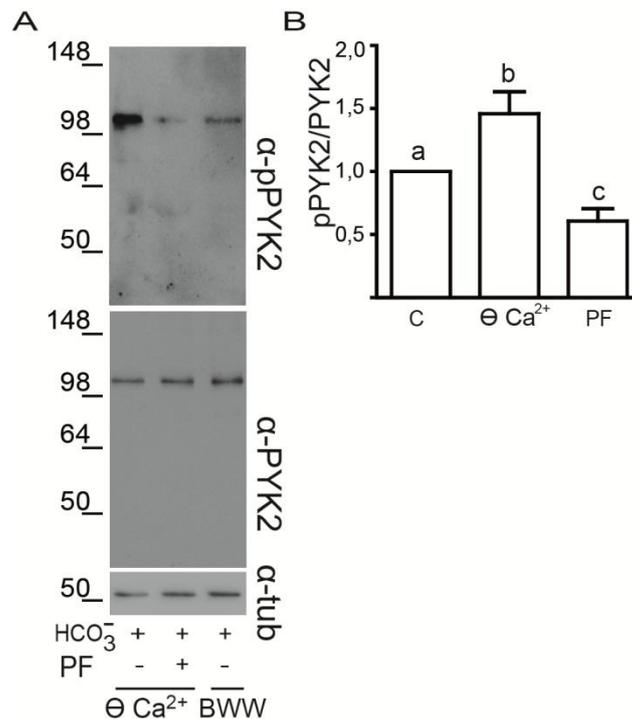


Figura 12: Activación de PYK2 en Θ Ca²⁺. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) y con el inhibidor de la familia FAK (PF431396, 30 μ M) durante 6 hs y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPYK2 (panel superior) o α -PYK2 (panel inferior). β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **B.** Relación entre las intensidades de las bandas de pPYK2 y PYK2 en las distintas condiciones, relativizadas al control (medio capacitado, con HCO₃⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

Dado que CaM es un sensor de Ca²⁺ intracelular, estudiamos si dicha proteína estaba involucrada en el aumento de los niveles de fosfo-PYK2 en Θ Ca²⁺. Para ello, evaluamos los niveles de dicha fosforilación en espermatozoides humanos capacitados en presencia de W7. En concordancia con los resultados mostrando que la presencia de W7 incrementa los niveles de fosforilación en Tyr, se detectaron niveles mayores de fosfo-PYK2 en presencia que en ausencia del inhibidor (**Figura 13A**). El agregado del análogo menos activo, W5, no produjo cambios en los niveles de dicha fosforilación. En contraposición, los espermatozoides capacitados en presencia de CsA presentaron niveles de fosfo-PYK2 similares a los de las células capacitadas en ausencia del inhibidor de PP2B (**Figura 13B**).

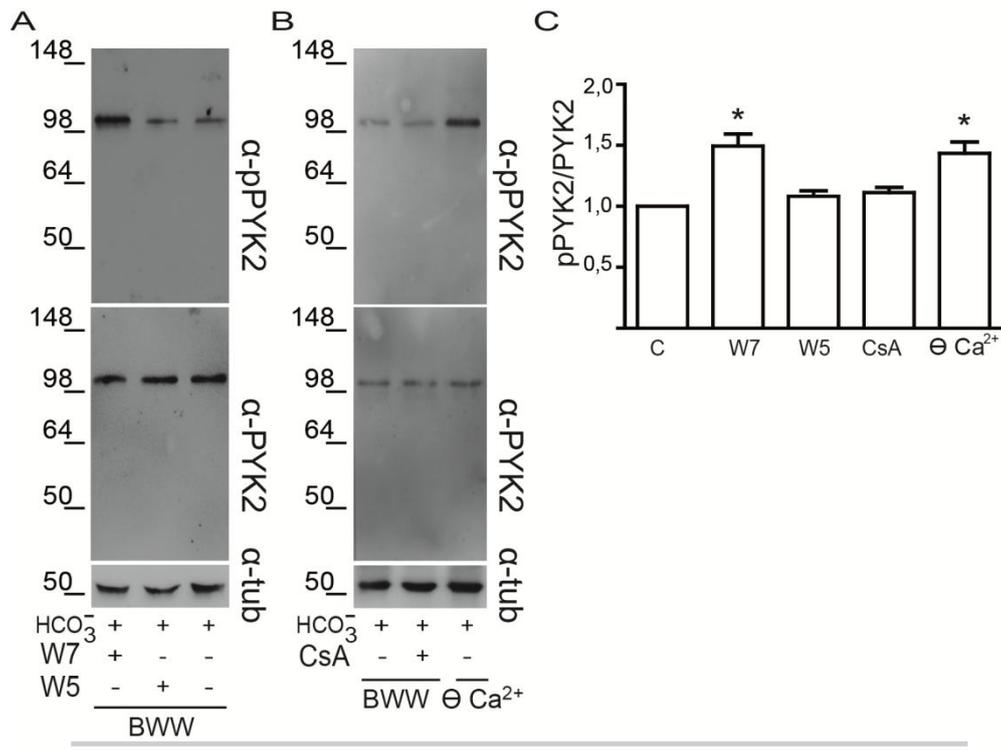


Figura 13: Efecto de los inhibidores de CaM o PP2B sobre la activación de PYK2. **A.** Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia (BWW) o presencia del inhibidor de CaM (W7, 50 μ M) o su análogo de menor actividad (W5, 50 μ M) durante 6 hs. **B.** Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW), ausencia de Ca²⁺ extracelular (Θ Ca²⁺) o con el inhibidor de la PP2B (CsA, 10 μ M) durante 6 hs. Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 7 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **C.** Relación entre las intensidades de las bandas de pPYK2 y PYK2 en las distintas condiciones, relativizadas al control (con HCO₃⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 7 experimentos independientes. * vs C, $p < 0,05$.

Estas observaciones sugieren que CaM estaría modulando negativamente a PYK2 por un mecanismo aún desconocido que no involucraría a PP2B. Otra posible explicación, podría ser que la activación de PYK2 en Θ Ca²⁺ se deba a una mayor disponibilidad de ATP en el interior celular producida por la incubación de los espermatozoides en este medio. Para investigar esta última alternativa, se analizó el contenido de ATP en espermatozoides incubados con PF431396 por 1 h. Bajo estas condiciones, los resultados mostraron niveles mayores de ATP respecto al control ($3,7 \pm 0,2$ vs $2,1 \pm 0,2$ ng cada 2×10^6 células, $n = 4$, $p < 0,005$), sugiriendo que PYK2, al estar inhibida, no utilizaría el ATP para fosforilar, aumentando la disponibilidad del mismo.

Dado que PYK2 parecería ser la responsable del aumento en la fosforilación de Tyr en Θ Ca²⁺, exploramos si también estaba involucrada en el aumento de la fosforilación en

Tyr que ocurre durante la capacitación del espermatozoide humano. En primer lugar, evaluamos la activación de PYK2 durante diferentes tiempos de incubación en el medio capacitante, y la comparamos con la cinética de aumento en Θ Ca^{2+} . Los resultados revelaron que si bien fosfo-PYK2 no fue detectada en espermatozoides eyaculados frescos, sus niveles incrementaron con el tiempo de capacitación, mientras que los correspondientes a PYK2 total se mantuvieron constantes (**Figura 14**). Nuevamente, observamos niveles mayores de fosfo-PYK2 en Θ Ca^{2+} que en el medio control.

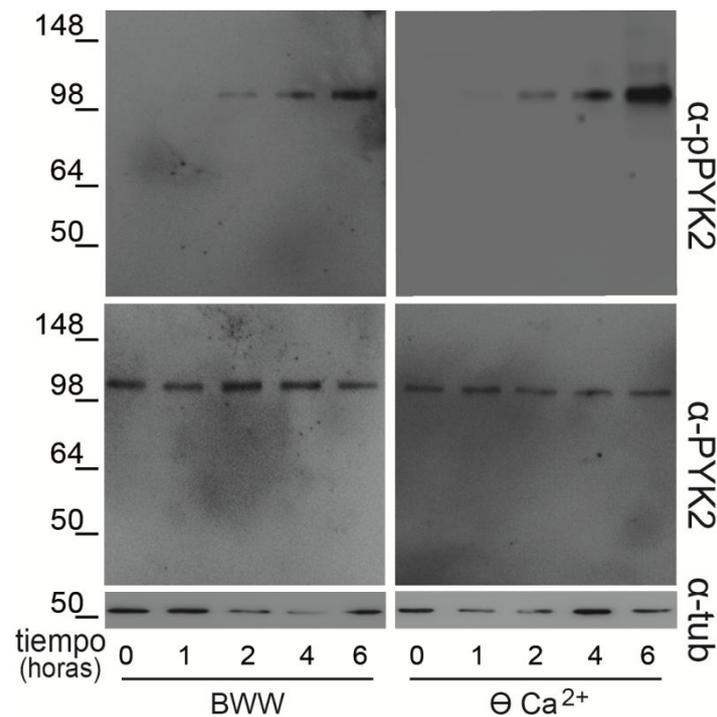


Figura 14: Cinética de activación de PYK2. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (BWW) o ausencia de Ca^{2+} extracelular (Θ Ca^{2+}) durante diferentes períodos de tiempo (0, 1, 2, 4 y 6 hs) y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Para confirmar que la banda detectada con el anticuerpo anti-fosfo-PYK2 correspondía a PYK2, se realizaron inmunoprecipitaciones sobre extractos de espermatozoides utilizando el anticuerpo anti-PYK2, con la idea de analizar, posteriormente, por Western blot el perfil de bandas correspondiente empleando el anticuerpo anti-fosfo-PYK2. Para ello, primeramente estudiamos la solubilidad de la proteína en diferentes buffers de lisis. Cuando los extractos fueron preparados con Triton X-100, las bandas correspondientes a PYK2 y fosfo-PYK2 fueron detectadas en la fracción insoluble y no en la soluble, lo cual no permitía la posterior inmunoprecipitación (**Figura 15A**). En base a ello, las proteínas fueron extraídas empleando condiciones más drásticas

(0,1% de SDS más 1% Igepal y calor) que permitieron solubilizar a PYK2 y detectar la banda correspondiente en la fracción soluble (**Figura 15B**). A continuación, esta fracción fue sometida a inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-PYK2, observándose que mientras PYK2 fue inmunoprecipitada tanto en los espermatozoides no capacitados como capacitados, fosfo-PYK2 solamente fue detectada en los inmunoprecipitados provenientes de células capacitadas (**Figura 15C**). Cabe aclarar que se observó una banda ancha cercana a 50 kDa, zona correspondiente a las IgGs (ver paneles derechos de la **Figura 15C**). Los resultados de las inmunoprecipitaciones indicaron que PYK2 se activaría durante la capacitación del espermatozoide humano.

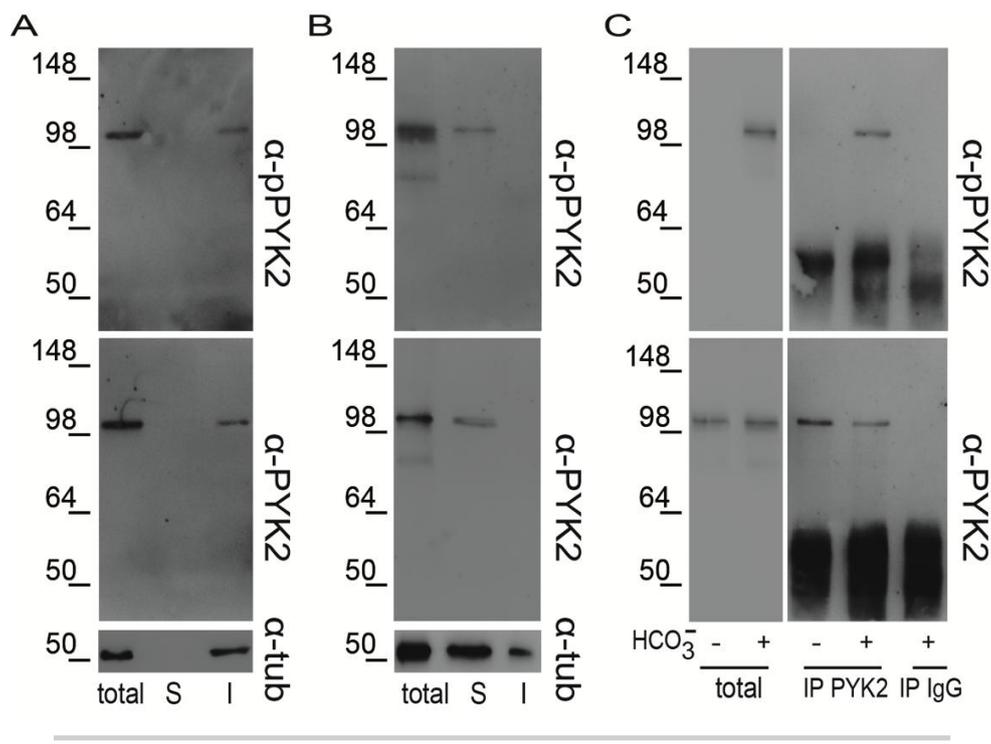


Figura 15: Activación de PYK2 durante la capacitación. Proteínas de espermatozoides humanos capacitados fueron extraídas utilizando un buffer con 1% Triton X-100 (**A**) o condiciones más fuertes (0,1% SDS y 1% Igepal y 5 min a 100°C) (**B**). Luego, las muestras fueron centrifugadas obteniéndose la fracción insoluble (I) y soluble (S). **C.** Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia o ausencia de HCO_3^- durante 6 hs, las proteínas extraídas de manera similar al punto **B**. La fracción soluble fue sometida a inmunoprecipitación utilizando al anticuerpo α -PYK2. Las proteínas fueron recuperadas y analizadas por Western blot empleando los anticuerpos α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue utilizada como control de carga proteica.

Por su parte, la exposición de espermatozoides capacitados tanto a PF431396 (10 μM) (**Figura 16A**) como a un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM) (**Figura 16B**) produjo una disminución de la actividad de PYK2 respecto a los controles.

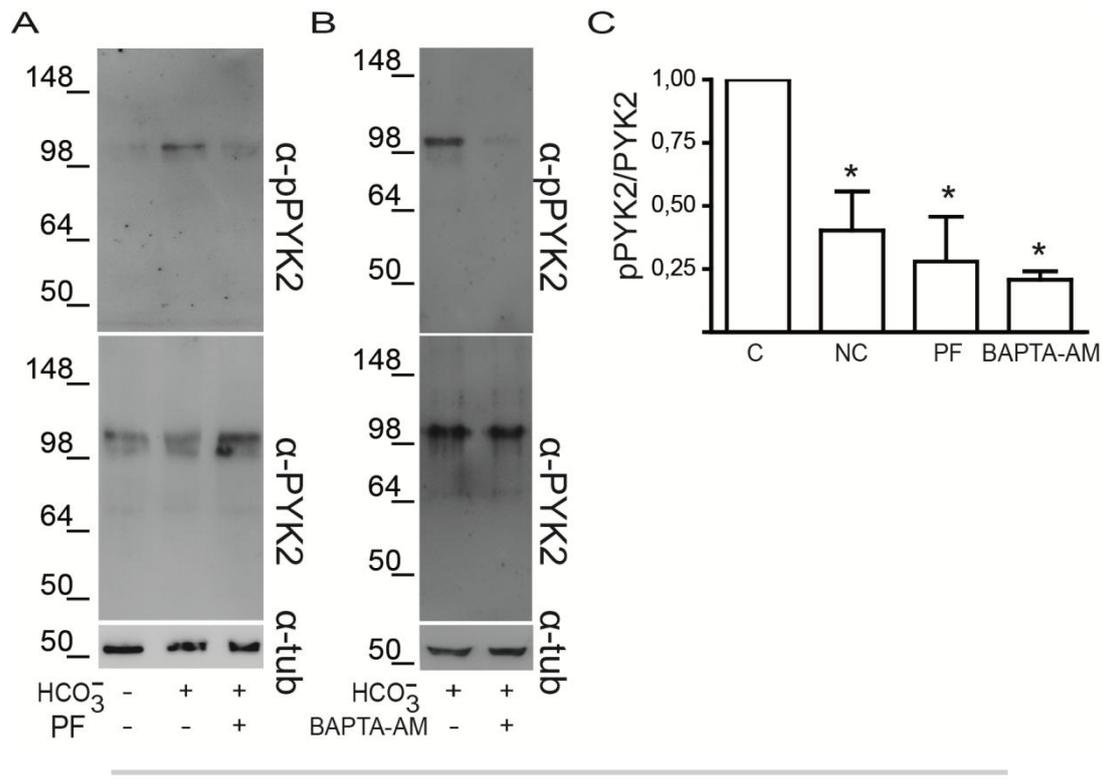


Figura 16: Efecto del PF431396 y BAPTA-AM sobre la activación de PYK2. Espermatozoides humanos fueron incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante en ausencia (C) o presencia de PF431396 (10 μ M, **A**) o BAPTA-AM (50 μ M, **B**) durante 6 hs. Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **C.** Relación entre las intensidades de las bandas de pPYK2 y PYK2 en las distintas condiciones, relativizadas al control (con HCO₃⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C $p < 0,05$.

Para estudiar la participación de PYK2 en la fosforilación de proteínas durante la capacitación, los espermatozoides humanos fueron incubados en un medio capacitante en ausencia o presencia de distintas concentraciones de PF431396 durante 6 hs, analizando luego las fosforilaciones de los sustratos de PKA y en Tyr. Los resultados mostraron que mientras la fosforilación dependiente de PKA se incrementó levemente en función de la concentración del inhibidor (**Figura 17**), los niveles de fosforilación en Tyr se redujeron, apoyando la participación de PYK2 río abajo de la activación de PKA.

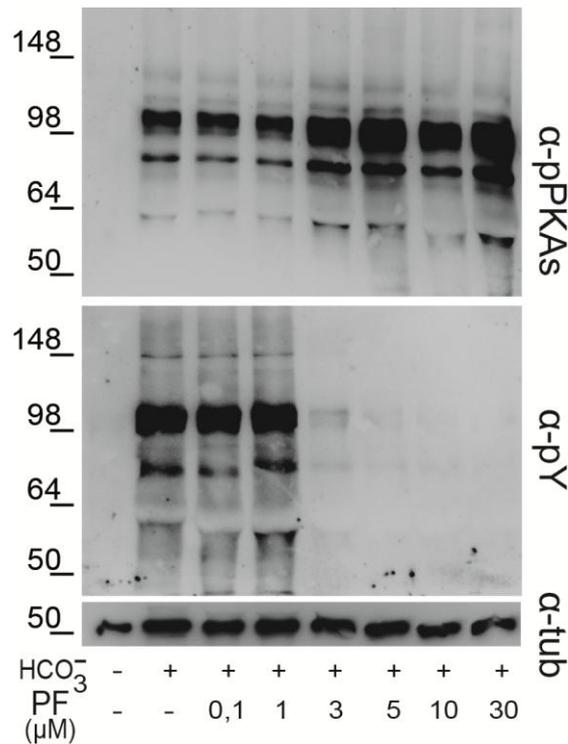


Figura 17: Efecto del inhibidor de PYK2 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de PF431396 (0.1-30 μM) durante 6 hs y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Estas observaciones indican que PYK2 estaría modulando el incremento en la fosforilación en Tyr por debajo de los sustratos de PKA o por una vía paralela a la activación de PKA. Para discriminar entre estas dos posibilidades, los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones de inactivación de PYK2 y estimulación de las vías que modulan los sustratos fosforilados por PKA. En primer lugar, se estimuló la vía clásica de PKA al exponer a los espermatozoides a dbcAMP e IBMX (5 mM/0,2 mM), bloqueando a PYK2 con PF431396. Bajo estas condiciones, los resultados revelaron que mientras no se generaron modificaciones en la estimulación de los sustratos fosforilados por PKA, se produjo una reducción de la fosforilación en Tyr inducida por dbcAMP e IBMX (**Figura 18A**). Por otro lado, estudios previos de esta Tesis (Battistone et al., 2013) muestran que SKI606, inhibidor específico de SFKs, bloquea ambas fosforilaciones, efecto que es revertido por el agregado de OA, inhibidor de Ser/Thr fosfatasa (Krapf et al., 2010, Battistone et al., 2013). Estas observaciones sugieren que el efecto de SKI606 sería río arriba de las Ser/Thr fosfatasa y, por lo tanto, modularía los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA. En base a ello, a continuación analizamos el efecto, sobre ambas fosforilaciones,

de estimular la vía SFKs/fosfatasa con OA (100 nM) y bloquear nuevamente a PYK2 con PF431396 (10 μ M). Los resultados revelaron que si bien los niveles de la fosforilación de los sustratos fosforilados de PKA no se modificaron, los correspondientes a la fosforilación en Tyr presentaron una clara disminución (**Figura 18B**).

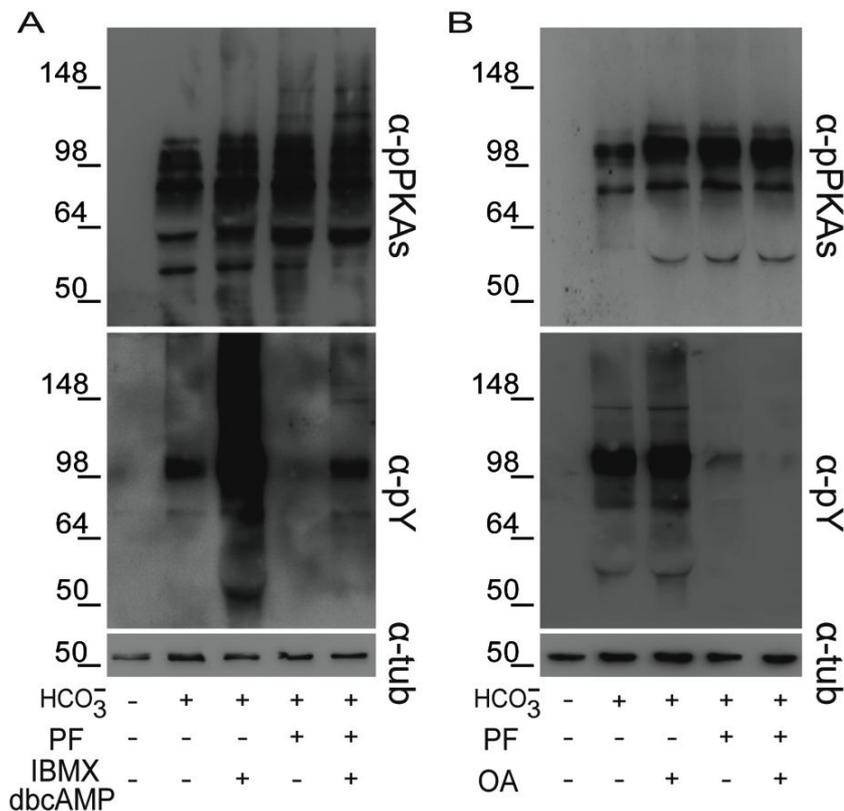


Figura 18: Interacción entre PYK2 y las vías de señalización asociadas a la capacitación. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia de PF431396 (10 μ M), dbcAMP (5 mM), IBMX (200 μ M) y/u OA (100 nM) durante 6 hs y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Los resultados hasta aquí descriptos indican que la quinasa PYK2 sería una de las responsables del aumento de la fosforilación en Tyr que ocurre durante la capacitación, encontrándose ubicada por debajo de los sustratos fosforilados de PKA en la cascada de señalización que se gatilla en el proceso de capacitación.

A continuación, evaluamos la activación de PYK2 cuando PKA o SFKs se encontraban inactivadas farmacológicamente. Primeramente, analizamos los niveles de fosfo-PYK2 en presencia del inhibidor de PKA, H89, observando una reducción en los niveles de fosfo-PYK2 (**Figura 19**).

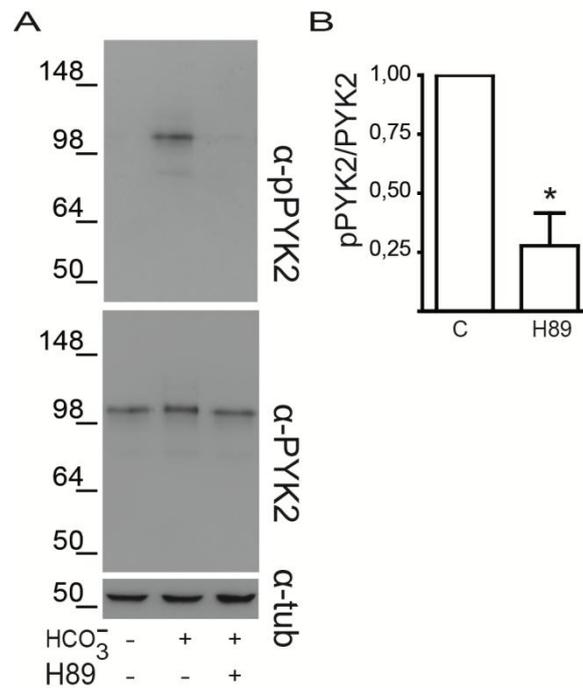


Figura 19: Efecto del inhibidor de PKA sobre la activación de PYK2. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de H89 (30 μ M) durante 6 hs y las proteínas analizadas por Western blot utilizando α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **B.** Relación entre las intensidades de las bandas de pPYK2 y PYK2 en las distintas condiciones, relativizadas al control (con HCO₃⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Resultados similares fueron obtenidos cuando los espermatozoides fueron capacitados en presencia de SKI606, observándose que la inhibición de SFKs durante la capacitación produjo una disminución en la fosforilación de PYK2 (**Figura 20**).

En conjunto, estos resultados indican que la activación de PYK2 dependería de PKA y SFKs, apoyando la idea de que PYK2 se encontraría entre los sustratos fosforilados por PKA y la fosforilación en Tyr.

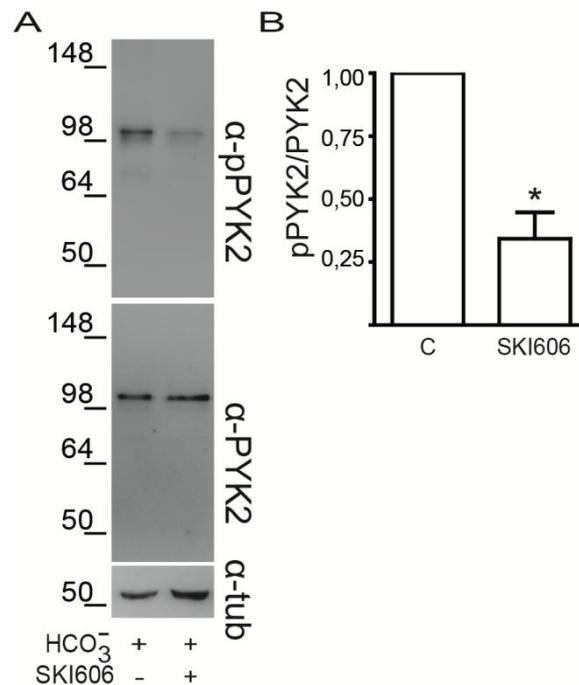


Figura 20: Efecto del inhibidor de SFKs sobre la activación de PYK2. Espermatozoides humanos fueron incubados en ausencia o presencia de SKI606 (30 μ M) durante 6 hs y las proteínas analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPYK2 o α -PYK2. β -tubulina fue empleada como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **B.** Relación entre las intensidades de las bandas de pPYK2 y PYK2 en las distintas condiciones, relativizadas al control (con HCO₃⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Relevancia de PYK2 para la funcionalidad espermática

Habiendo establecido la presencia y activación de PYK2 durante la capacitación del espermatozoide humano, investigamos la relevancia funcional de dicha proteína analizando el efecto de su modulación sobre dos eventos asociados a la capacitación tales como la hiperactividad y la RA. En primer lugar, evaluamos la motilidad espermática de forma objetiva al utilizar el sistema computarizado CASA. Los resultados mostraron que mientras 10 μ M de PF431396 afectó la mayoría de los parámetros cinéticos de la motilidad tales como VAP, VCL, VSL y ALH, la exposición a 30 μ M de PF431396 redujo significativamente todos los parámetros examinados, de forma similar a lo observado en Θ Ca²⁺ (**Tabla I**). Cabe mencionar que los espermatozoides incubados bajo las distintas condiciones presentaron porcentajes similares de motilidad total (**Figura 21A**). Como consecuencia del análisis de los parámetros cinéticos, calculamos el porcentaje de motilidad progresiva y de hiperactividad. Tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos, los espermatozoides fueron considerados progresivos cuando presentaban VAP > 25 y

STR>80%, y clasificados como hiperactivos cuando mostraban VCL \geq 100, LIN<60% y ALH \geq 5 (Mortimer y Mortimer, 1990, Mortimer, 1998). Las células tratadas con PF431396 (10 o 30 μ M) o incubadas en \ominus Ca $^{2+}$ mostraron disminución tanto en el porcentaje de motilidad progresiva (**Figura 21B**) como en el de la hiperactividad (**Figura 21C**) en comparación con el control.

	VAP	VCL	VSL	ALH	LIN	STR	BCF
C	53,8 \pm 2,4	85,2 \pm 2,3	47,2 \pm 2,5	4,1 \pm 0,1	52,6 \pm 1,8	82,8 \pm 1,2	26,9 \pm 0,8
\ominus Ca $^{2+}$	24,5 \pm 1,3*	53,2 \pm 6,1*	15,0 \pm 1,0*	2,9 \pm 0,1*	29,2 \pm 1,6*	58,9 \pm 0,6*	34,9 \pm 2,5*
PF 10	34,5 \pm 3,4*	59,2 \pm 2,6*	28,1 \pm 2,8*	3,1 \pm 0,1*	43,3 \pm 3,9	73,9 \pm 3,5	32,6 \pm 1,4
PF 30	29,0 \pm 2,5*	54,9 \pm 2,9*	21,3 \pm 2,5*	3,2 \pm 0,1*	35,6 \pm 1,8*	66,8 \pm 1,7*	33,5 \pm 0,3*

Tabla I: Relevancia de PYK2 para la motilidad espermática Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (C) o ausencia de Ca $^{2+}$ (\ominus Ca $^{2+}$) y en presencia de 10 μ M (PF10) o 30 μ M (PF30) de PF431396 por 18 hs. Los valores representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C, p <0,05. VAP: Velocidad promedio de la trayectoria (μ m/s), VCL: velocidad curvilínea (μ m/s), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria (μ m/s), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μ m), LIN: linealidad (%), STR: rectilineidad (%) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz).

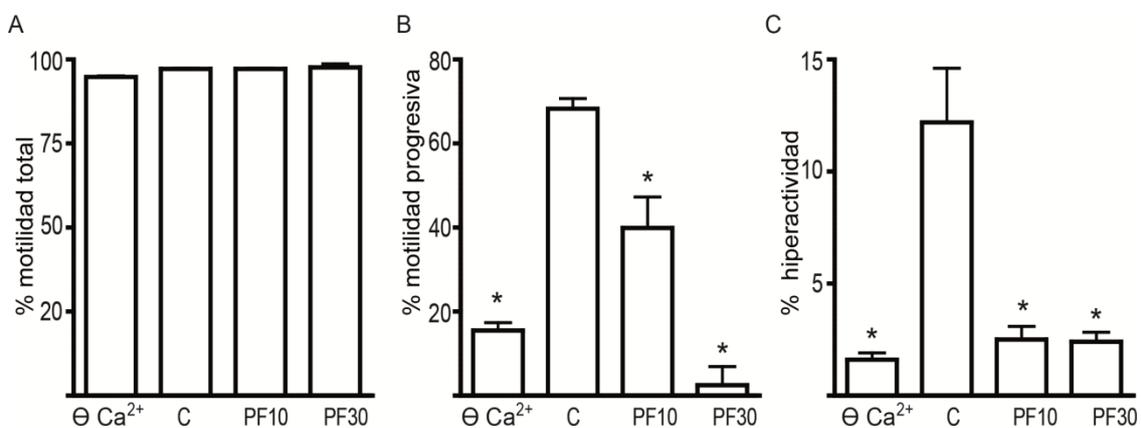


Figura 21: Relevancia de PYK2 para la motilidad espermática. Espermatozoides humanos fueron incubados en presencia (C) o ausencia de Ca $^{2+}$ (\ominus Ca $^{2+}$) y en presencia de 10 μ M (PF10) o 30 μ M (PF30) de PF431396 por 18 hs. Los porcentajes de motilidad total, motilidad progresiva e hiperactividad fueron calculados según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Los valores representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. * vs C, p <0,05.

A continuación, estudiamos el efecto de PF431396 sobre la ocurrencia de la RA utilizando la técnica de tinción con PSA-FITC y posterior análisis en el microscopio de

epifluorescencia. El agregado de PF431396 (10 o 30 μM) durante la capacitación inhibió significativamente la RA estimulada por progesterona (25 μM) sin modificar los niveles de RA espontánea (**Figura 22**). Por su parte, los espermatozoides incubados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ presentaron niveles menores de RA tanto espontánea como inducida por progesterona respecto al control. La viabilidad espermática al final de la capacitación no se vio modificada por la presencia de 30 μM de PF431396, descartando posibles efectos tóxicos producidos por el inhibidor (inhibidor $92,0 \pm 2,9 \%$, vs control $93,4 \pm 5,4 \%$, $n = 4$, NS).

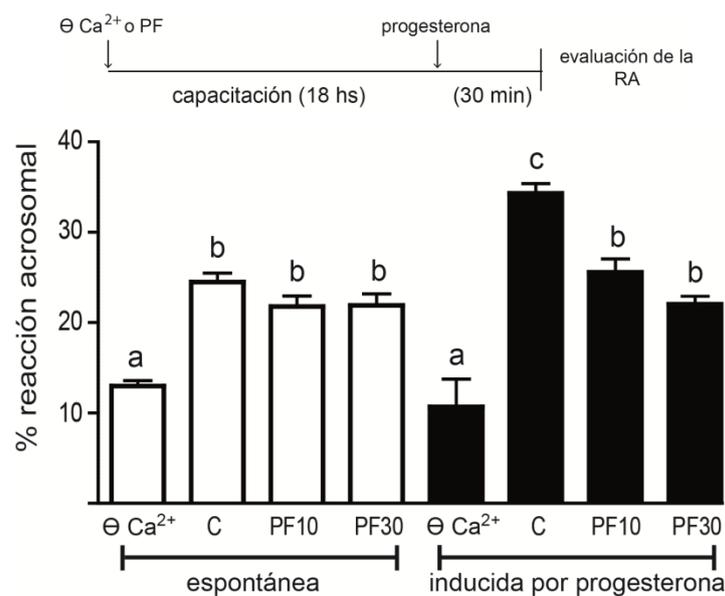


Figura 22: Relevancia de PYK2 para la RA. Espermatozoides humanos fueron capacitados por 18 hs en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ o en BWB en ausencia (C) o presencia de PYK2 (10-30 μM). La RA espontánea e inducida por progesterona (25 μM) fue evaluada utilizando la técnica de PSA-FITC. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Las letras distintas significan diferencias significativas entre ellas, $p < 0,05$.

Para evaluar si los efectos inhibitorios sobre la RA y la motilidad tenían algún impacto sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide, estudiamos dicha capacidad en espermatozoides incubados bajo las distintas condiciones experimentales antes ensayadas. Teniendo en cuenta que, por razones éticas, no se utilizan ovocitos humanos en ensayos de fertilización con fines de investigación, analizamos la capacidad fertilizante de los espermatozoides mediante dos diferentes ensayos heterólogos. En primer lugar, pusimos a punto una técnica que evalúa la capacidad del espermatozoide humano de penetrar la matriz viscosa del cúmulus de ratón. Para ello, los espermatozoides fueron incubados bajo diferentes condiciones por 18 hs, teñidos con Hoechst 33342 y, finalmente, co-incubados con los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) durante 15 min, evaluándose el número de espermatozoides presentes dentro

del cúmulus por microscopía de epifluorescencia. Los resultados revelaron que los espermatozoides no capacitados ($\ominus \text{Ca}^{2+}$ o BWW sin HCO_3^-) presentaron una baja capacidad de penetración del cúmulus respecto a los espermatozoides capacitados (**Figura 23**), validando el empleo de este ensayo para la evaluación del estado funcional de los espermatozoides humanos capacitados. Asimismo, observamos que el PF431396 (10 o 30 μM) produjo una clara reducción en la habilidad de los espermatozoides de penetrar la matriz del cúmulus comparado con el control (**Figura 23**). Es importante mencionar que la presencia del inhibidor (30 μM) solamente en los 15 min de co-incubación de las gametas, no produjo diferencias respecto al control.

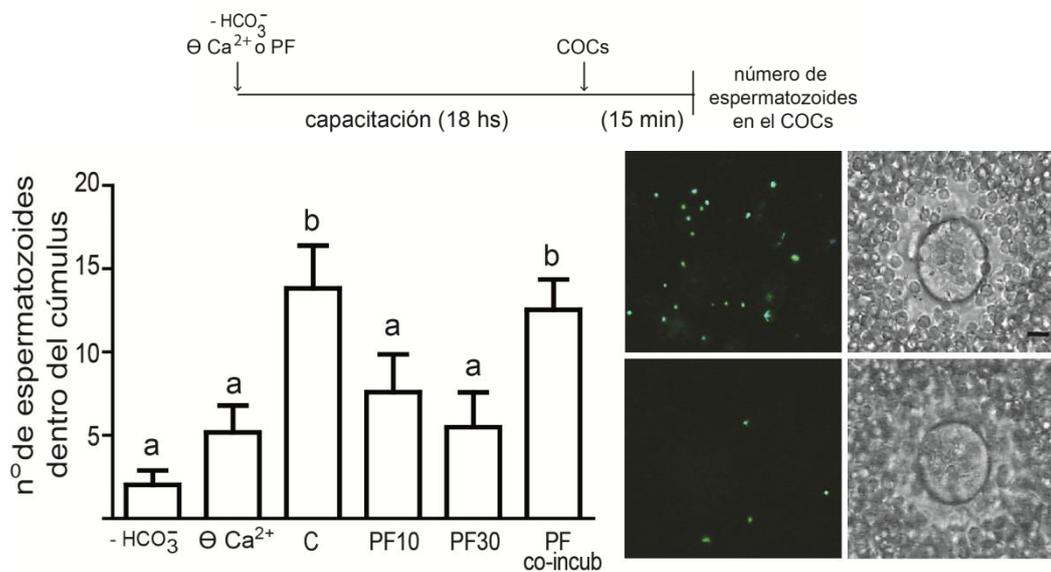


Figura 23: Relevancia de PYK2 para la capacidad fertilizante. Espermatozoides humanos fueron incubados bajo condiciones no capacitantes ($\ominus \text{Ca}^{2+}$ o HCO_3^-), capacitantes (C) o en presencia de PF431396 (10-30 μM) por 18 hs, luego de la cual, co-incubados con cúmulus intactos de ratón en medio capacitante durante 15 min. Se calculó el número de espermatozoides dentro de los cúmulus utilizando microscopio de epifluorescencia. Como control, los espermatozoides fueron capacitados en ausencia del inhibidor y luego co-incubados con los COCs intactos en medio capacitante en presencia de 30 μM de PF431396 por 15 min (PF co-incub). Los datos representan el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$. Las imágenes del panel derecho corresponde a fotos de fluorescencia (izquierda) y fase (derecha) del un cúmulus con espermatozoides incubados en ausencia (panel superior) o presencia (panel inferior) de PF431396 (30 μM). La barra corresponde a 25 μm .

Como segunda estrategia para el análisis del estado funcional del espermatozoide humano, evaluamos la capacidad del mismo de penetrar ovocitos de hámster sin ZP (test de HOPT, OMS, 2010). En este caso, los espermatozoides fueron incubados en ausencia o presencia de PF431396 por 18 hs, luego co-incubados con ovocitos de hámster sin ZP por 2,5 hs y el porcentaje de ovocitos fertilizados calculado para las distintas condiciones ensayadas. De forma interesante, observamos que mientras la

presencia de PF431396 (10 μM) durante la capacitación (**Figura 24**) no produjo cambios en el porcentaje de ovocitos fertilizados, la exposición a PF431396 30 μM afectó significativamente la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Teniendo en cuenta que el agregado del inhibidor durante la capacitación implica el arrastre de un tercio del mismo a la gota de co-incubación de las gametas (PF 2,5 hs), realizamos una estrategia experimental para controlar el efecto del inhibidor sobre esta última etapa. Cuando PF431396 (10 μM) estuvo presente sólo durante la co-incubación de las gametas, no observamos inhibición en la capacidad fertilizante de los espermatozoides (**Figura 24**) indicando que el menor porcentaje de fertilización se debería al efecto del inhibidor durante la etapa específica de capacitación. Asimismo, los espermatozoides incubados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ durante la capacitación exhibieron una disminución significativa en la capacidad de penetrar ovocitos de hámster comparado con el control (**Figura 24**).

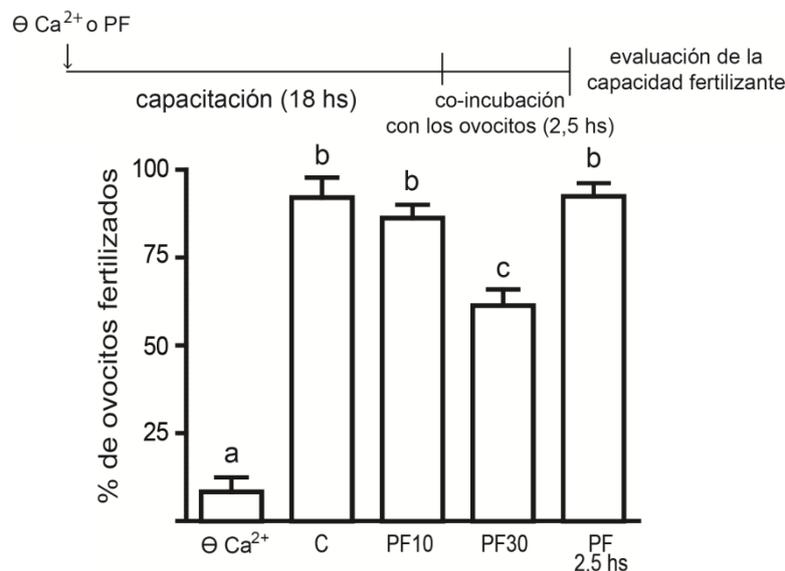


Figura 24: Relevancia de PYK2 para la capacidad fertilizante. Espermatozoides humanos fueron incubados bajo condiciones no capacitantes ($\ominus \text{Ca}^{2+}$), capacitantes (C) o en presencia de: PF431396 (10 - 30 μM) por 18 hs y luego, co-incubados con ovocitos de hámsters sin ZP durante 2,5 hs. Como control, los espermatozoides fueron capacitados en medio capacitante y luego co-incubados con los ovocitos en presencia de PF431396 (10 μM) por 2,5 hs (PF/2,5 hs). Se evaluó el porcentaje de ovocitos fertilizados utilizando la tinción de acetocarmin 1%. Los datos representan el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las letras distintas significan diferencias significativas entre ellas, $p < 0,05$.

En conjunto, estos resultados indican la participación de PYK2 en la expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide durante el proceso de capacitación.

CAPÍTULO 3

Participación de CRISP1 en el proceso de capacitación

Como se mencionara a lo largo de esta Tesis, la liberación de los factores decapacitantes es fundamental para que se desarrolle el proceso de capacitación (Yanagimachi, 1994). En este sentido, se ha propuesto que la proteína epididimaria CRISP1, identificada por nuestro laboratorio (Cameo y Blaquier, 1976), actuaría como uno de dichos factores ya que se libera del espermatozoide de rata durante la capacitación y su presencia durante la capacitación inhibe la fosforilación en Tyr (Roberts et al., 2003). Por otro lado, resultados de nuestro grupo utilizando ratones “knockout” (KO) para el gen de *Crisp1* (*Crisp1*^{-/-}) muestran que si bien los animales son fértiles, sus espermatozoides poseen una menor capacidad fertilizante y niveles menores de fosforilación en Tyr que los espermatozoides heterocigotas (HT, también llamados control) para CRISP1 (*Crisp1*^{+/-}) (Da Ros et al., 2008), apoyando la idea de que CRISP1 desempeñaría un papel regulador en la capacitación de los espermatozoides de roedor. En base a estas observaciones, el tercer objetivo de esta Tesis consistió en estudiar las distintas vías de señalización reguladas por CRISP1 durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Para ello, utilizamos dos estrategias experimentales complementarias. Por un lado, evaluamos los efectos de inhibir la liberación de CRISP1 de los espermatozoides de ratón durante la capacitación utilizando a la proteína purificada del epidídimo y, por otro, estudiamos las consecuencias producidas por la ausencia de CRISP1 durante la capacitación de los espermatozoides provenientes de animales KO para esta proteína.

Como primer paso evaluamos si CRISP1 se disocia de los espermatozoides de ratón durante la capacitación, tal como se observa en los espermatozoides de rata. Para ello, analizamos, por Western blot, la presencia de CRISP1 en los espermatozoides antes y después de 90 min de incubación en medio capacitante. Como se muestra en la **Figura 1**, mientras la mayor parte de CRISP1 se remueve del espermatozoide HT durante la capacitación, una parte menor permanece unida a la gameta. Los resultados totalmente negativos obtenidos al utilizar espermatozoides KO para CRISP1 confirmaron que las bandas observadas en el espermatozoide HT corresponden a CRISP1.

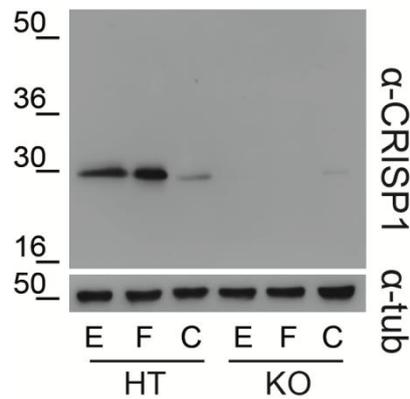


Figura 1: Comportamiento de CRISP1 durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Extractos proteicos de epidídimo (control positivo, E) y espermatozoides frescos (F) o capacitados (C) por 90 min provenientes de animales HT y KO fueron analizados por Western blot empleando anti-CRISP1 (α -CRISP1) como primer anticuerpo. Se utilizó β -tubulina como control de carga proteica. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Estos resultados apoyan la idea de que CRISP1 se asociaría a la superficie del espermatozoide de ratón con dos afinidades diferentes, dando lugar a dos poblaciones de CRISP1 en la gameta: una débilmente unida y removible en parte durante la capacitación, y otra fuertemente asociada que permanecería aún luego de este proceso.

CRISP1 como regulador del proceso de capacitación

A continuación, evaluamos la participación de CRISP1 en el proceso de capacitación de espermatozoides de ratón utilizando a la proteína purificada de epidídimo en el medio de incubación. La idea de estos experimentos era que la presencia de un exceso de CRISP1 impediría la liberación de la proteína al medio por desplazamiento del equilibrio. En este punto es importante aclarar que si bien la proteína CRISP1 utilizada para estos experimentos fue obtenida de epidídimos de rata, la misma no sólo es muy similar a CRISP1 murina (80%), sino que también es capaz de unirse al ovocito de ratón e inhibir la fusión de gametas en esta especie (Busso et al., 2007). Dado que la disociación de los factores decapacitantes es importante para la ocurrencia del proceso de capacitación (Fraser, 2010), evaluamos, en primer lugar, el efecto del agregado de CRISP1 nativa sobre los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Los resultados indicaron que la presencia de la proteína durante la capacitación no modificó ninguna de las dos fosforilaciones (**Figura 2**). Cabe aclarar que la banda inmunorreactiva que aparece tanto en espermatozoides no capacitados como capacitados (indicada por una flecha en la **Figura 2**, panel inferior)

corresponde a una proteína de 116/95 kDa con actividad hexoquinasa que, en el ratón, se encuentra constitutivamente fosforilada (Kalab et al., 1994) y es utilizada como control de carga proteica en esta especie.

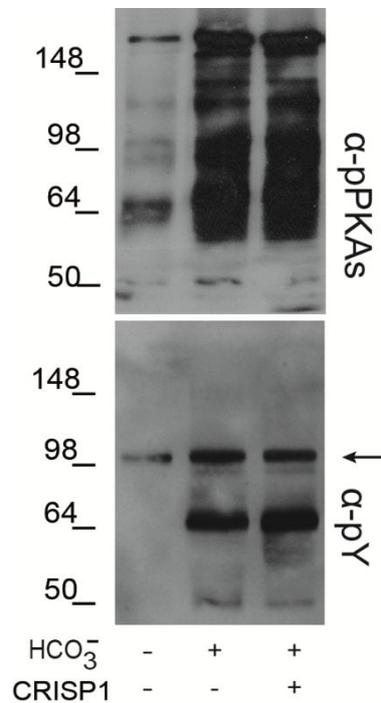


Figura 2: Efecto del agregado de CRISP1 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides de ratón. Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de CRISP1 (10 μ M). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Dado que no se observaron cambios en los niveles de ambas fosforilaciones, a continuación evaluamos el efecto de CRISP1 sobre otro evento que se desarrolla como consecuencia de la capacitación, tal como lo es la hiperactivación. Para ello, analizamos mediante el sistema computarizado de CASA, diferentes parámetros cinéticos asociados a la hiperactividad, en espermatozoides de ratón capacitados por 90 min e incubados en presencia de CRISP1 durante 15 min adicionales. Tal como se explica en la sección de Materiales y Métodos, los espermatozoides fueron considerados como “progresivos” cuando presentaban STR>50% y como “hiperactivos” cuando mostraban VCL \geq 245, LIN<38,5% y ALH \geq 4,7 (Bray et al., 2005). La exposición a CRISP1 produjo una reducción significativa de varios de los parámetros cinéticos asociados a hiperactividad (VAP, VCL, VSL, ALH y BCF, ver Tabla I).

	VCL	ALH	LIN	BCF	VSL	STR	VAP
control	226,9 ± 11,2	4,8 ± 0,3	27,5 ± 0,5	12,7 ± 0,3	59,4 ± 2,8	50,4 ± 1,0	117,5 ± 3,7
CRISP1	198,3 ± 9,8***	4,1 ± 0,2**	27,2 ± 0,6	12,1 ± 0,3	50,8 ± 3,1**	47,2 ± 2,1	109,5 ± 4,1*

Tabla 1: Efecto del agregado de CRISP1 sobre la motilidad espermática. Se muestran los parámetros cinéticos de motilidad analizados por CASA de espermatozoides incubados durante 90 min y luego expuestos por 15 min a medio capacitante en ausencia (control) o presencia de CRISP1 (10 μ M). Los datos representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$. VCL: Velocidad curvilínea (μ m/s), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μ m), LIN: linealidad (%), BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria (μ m/s), STR: rectilineidad (%) y VAP: velocidad promedio de la trayectoria (μ m/s).

El análisis de los parámetros obtenidos permitió calcular los porcentajes de motilidad total y progresiva e hiperactividad. Si bien las células expuestas a CRISP1 (10 μ M) no mostraron diferencias en los porcentajes de motilidad total y progresiva (**Figura 3A-B**), las mismas exhibieron una disminución significativa en el porcentaje de hiperactividad (**Figura 3C**) en comparación con el control, indicando que la presencia de CRISP1 ejercería un efecto negativo sobre dicho patrón de movimiento vigoroso.

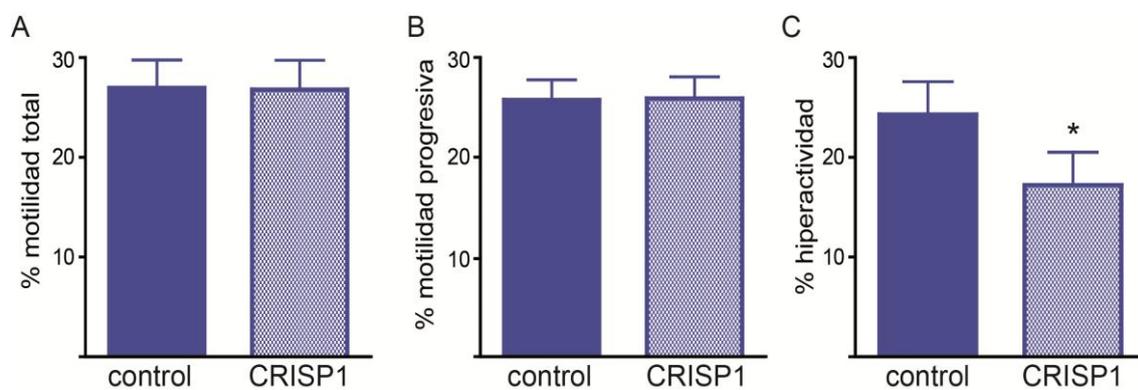


Figura 3: Efecto del agregado de CRISP1 sobre la motilidad espermática. Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en condiciones capacitantes y luego por 15 min adicionales en medio capacitante en ausencia (control) o presencia de CRISP1 (10 μ M). Los porcentajes de motilidad total (A), motilidad progresiva (B) e hiperactividad (C) fueron calculados según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta que la hiperactividad es necesaria para la penetración de las diferentes envolturas que rodean al ovocito, evaluamos si los efectos inhibitorios sobre la motilidad producían algún impacto sobre la capacidad de los espermatozoides de

penetrar dichas envolturas. Para ello, los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante durante 90 min, teñidos con Hoechst 33342, y luego co-incubados con COCs de ratón en ausencia o presencia de CRISP1 (10 μ M). Luego de 15 min, el número espermatozoides fluorescentes dentro de cada COC fue cuantificado bajo el microscopio de epifluorescencia. Los resultados revelaron que la presencia de CRISP1 disminuyó la capacidad de los espermatozoides de penetrar la matriz del cúmulus (**Figura 4**), en concordancia con el efecto observado sobre la hiperactividad.

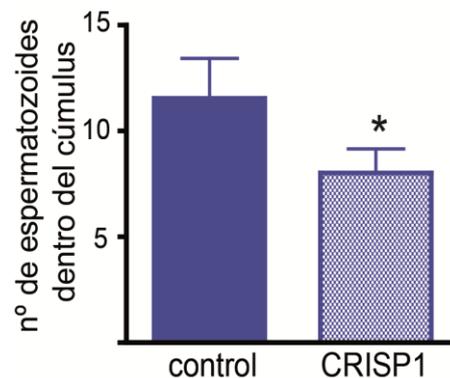


Figura 4: Efecto del agregado de CRISP1 sobre la capacidad de los espermatozoides de penetrar el cúmulus. Espermatozoides de ratón fueron capacitados durante 90 min, luego teñidos con Hoechst 33342 y co-incubados con COCs intactos de ratón en medio capacitante en ausencia (control) o presencia de CRISP1 (10 μ M) durante 15 min. Se calculó el número de espermatozoides dentro de los cúmulus por microscopia de epifluorescencia. Los datos representan el promedio \pm SEM de 7 experimentos independientes.* $p < 0,05$.

En conjunto, nuestros resultados indican que si bien los espermatozoides expuestos a CRISP1 presentan niveles normales de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr, muestran una reducción en la hiperactividad y en su capacidad de penetrar el cúmulus.

CRISP1 como regulador de canales iónicos

Teniendo en cuenta estas últimas observaciones y las numerosas evidencias mostrando la capacidad de las proteínas CRISP de regular canales iónicos (Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2008, Gibbs et al., 2011), nos planteamos la posibilidad de que CRISP1 module el flujo iónico a través de la membrana del espermatozoide. Con el fin de investigar esta hipótesis, iniciamos una colaboración con el Dr. Alberto Darszon (Universidad Nacional Autónoma de México, México), experto a nivel internacional en el estudio de canales iónicos en el espermatozoide. En primer lugar, se estudió la actividad de CRISP1 sobre corrientes totales iónicas evocadas en las células en

solución fisiológica. Para ello, los espermatozoides testiculares fueron aislados y sometidos a “*patch-clamp*” a través de la gota citoplasmática, detectando el flujo iónico en la célula entera. La **Figura 5A** (panel izquierdo) es una representación esquemática de las corrientes evocadas bajo estas condiciones, aplicando pulsos de voltajes (20 mV) desde valores de potencial de 0 mV y estudiando un rango de potencial de -100 a +100 mV. El agregado de 10 μM de CRISP1 a los espermatozoides atenuó las corrientes tanto hacia adentro (sector inferior) como hacia afuera (sector superior) del interior celular (**Figura 5A** panel derecho). De manera específica, entre +25 y +100 mV, CRISP1 redujo la conductancia llegando a una máxima inhibición del $22 \pm 3,5\%$ en +100 mV mientras que a -100 mV la inhibición fue del $37,5 \pm 2\%$ ($n=4$). La **Figura 5B** ilustra las curvas de intensidad de la corriente en función del voltaje (*I-V*) obtenidas en los experimentos mostrados en la **Figura 5A**, observándose mayor inhibición de CRISP1 a potenciales más negativos. No se detectó inhibición en los experimentos control en los cuales se usó la proteína calentada y desnaturada (**Figura 5C**), indicando la especificidad de la inhibición observada.

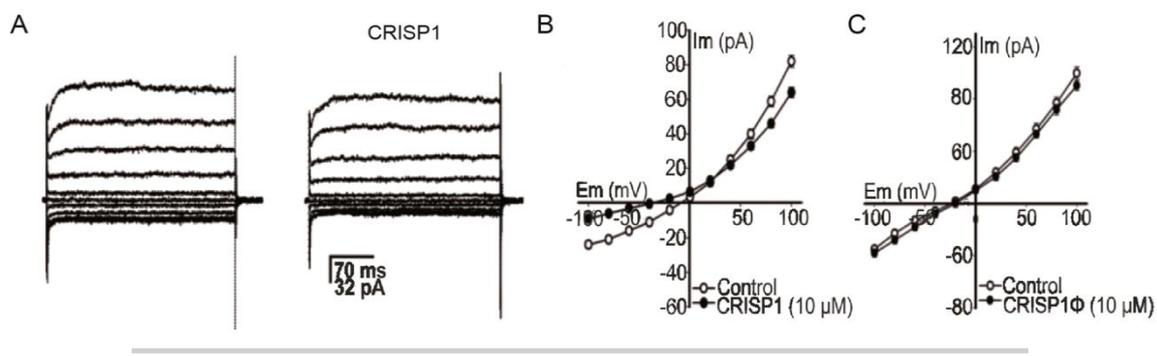


Figura 5: Efecto de CRISP1 sobre las corrientes iónicas en el espermatozoide.

A. Representación esquemática de la corriente iónica de un espermatozoide testicular por “*patch-clamp*” a través de la gota citoplasmática, detectando el flujo iónico en la célula entera. Las corrientes control en célula entera (izquierda) y después de la adición de 10 μM CRISP1 (derecha). **B.** Promedio de las curvas *I-V* de los experimentos del punto A. **C.** Promedio de las curvas *I-V* de las corrientes catiónicas en presencia de 10 μM de CRISP1 desnaturada por calentamiento (Φ CRISP1, círculos sólidos) comparado con el control (control, círculos abiertos). Las corrientes fueron medidas empleando el protocolo de voltajes igual a **A**. Los resultados se representan como promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes.

Habiendo observado que la presencia de CRISP1 modificó las corrientes totales del espermatozoide, y considerando que CRISP4 regula al canal de Ca^{2+} TRPM8 (*transient receptor potential M8*) del espermatozoide testicular de ratón (Gibbs et al., 2011), decidimos evaluar el efecto del agregado de CRISP1 sobre el funcionamiento de este canal. Para ello, se registraron las corrientes catiónicas mediante la técnica de “*patch-clamp*”, utilizando al Cs^+ como principal transportador ya que el mismo es

ampliamente utilizado en los estudios sobre los canales TRP. La **Figura 6A** (panel izquierdo) muestra las corrientes de un espermatozoide testicular activadas por cambios de voltaje en condiciones normales. La **Figura 6B** ilustra las curvas de intensidad de la corriente en función del voltaje (*I-V*) obtenidas en los experimentos mostrados en la **Figura 6A**, observándose mayor inhibición de CRISP1 a potenciales más negativos. Asimismo, CRISP1 redujo la conductancia $37,5 \pm 2 \%$ a -100 mV y $18,5 \pm 5 \%$ a $+100 \text{ mV}$ ($n=3$). Por otra parte, se observó que el mentol ($300 \mu\text{M}$), un clásico agonista de TRPM8 (Malkia et al., 2007), generó un aumento en la corriente ($165 \pm 15\%$ a $+130 \text{ mV}$, $n=3$) (**Figura 6C**, panel izquierdo y medio), las cuales también fueron parcialmente inhibidas por $10 \mu\text{M}$ de CRISP1 ($32,2 \pm 14 \%$ a -100 mV y $24,6 \pm 11 \%$ a $+100 \text{ mV}$, $n=3$) (**Figura 6C**, panel derecho). Los efectos del mentol y del componente sensible a CRISP1 pueden observarse en las curvas *I-V* (**Figura 6D**). Estas observaciones fueron consistentes con la presencia de canales TRPM8 sensibles a CRISP1 en los espermatozoides testiculares de ratón.

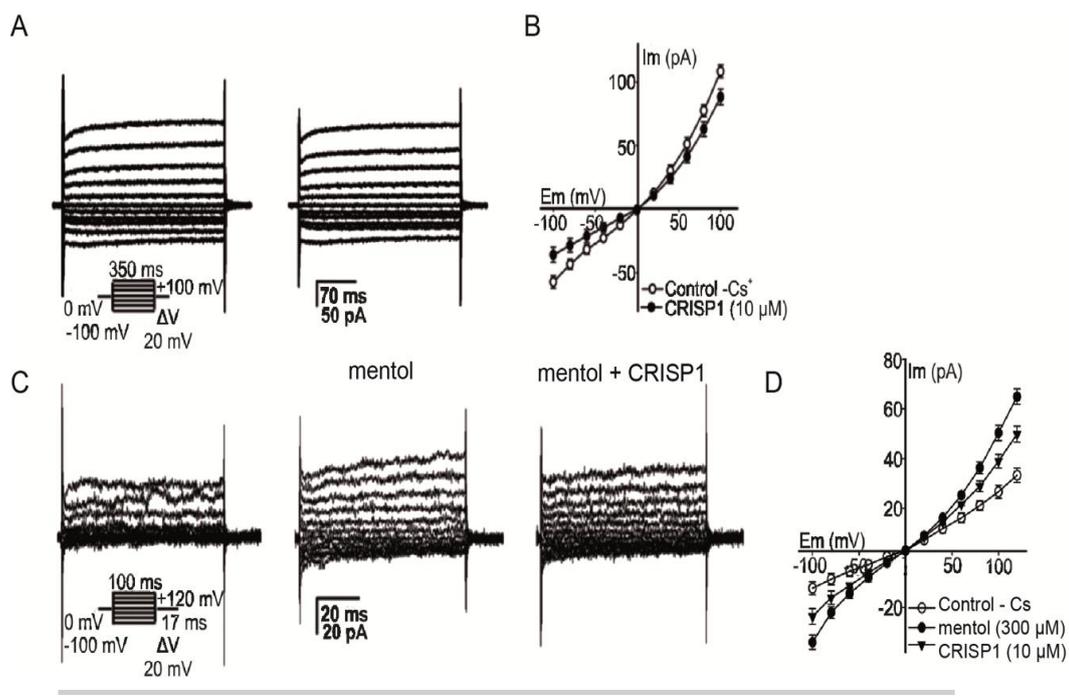


Figura 6: Efecto de CRISP1 sobre corrientes iónicas a través del canal TRPM8.

A. Representación esquemática de la corriente iónicas de un espermatozoide testicular por “*patch-clamp*” a través de la gota citoplasmática detectando el flujo iónico en la célula entera. Las corrientes control de Cs^+ en célula entera (izquierda) y luego de la adición de $10 \mu\text{M}$ CRISP1 (derecha) en los espermatozoides. **B.** Curvas *I-V* representando el promedio de los experimentos de **A**. **C.** Las corrientes control de Cs^+ fueron registradas como en **A** y se estimularon con $300 \mu\text{M}$ mentol (panel izquierdo y medio) en ausencia o presencia de $10 \mu\text{M}$ CRISP1 (panel derecho). **D.** Curvas *I-V* representando el promedio de los experimentos de **C**. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos. En algunos casos, el SEM de las barras es más pequeño que los símbolos.

A continuación, dado que las corrientes de TRPM8 fueron detectadas sólo en espermatozoides testiculares (De Blas et al., 2009, Lishko et al., 2012, Martínez-Lopez et al., 2011, Zheng et al., 2013) y que los espermatozoides que se exponen a CRISP1 son epididimarios, se abrió la posibilidad de que CRISP1 regulara otro canal de Ca^{2+} . Como mencionáramos anteriormente, CatSper es el principal canal de Ca^{2+} en el espermatozoide (Kirichok et al., 2006, Lishko y Kirichok, 2010), siendo esencial para la fertilidad (Ren et al., 2001, Smith et al., 2013). Para ello, evaluamos las corrientes de este canal por “*patch-clamp*” en espermatozoides epididimarios usando Cs^+ como el principal ión conductor en ausencia de cationes divalentes (DVF) ya que, bajo estas condiciones, sólo se registran las corrientes a través de CatSper. Los resultados mostraron que CRISP1 inhibió las corrientes a través de este canal, mientras que la proteína inactivada no generó ningún cambio (50 ± 5 vs 3 ± 2 %, $n=5$) (**Figura 7**), indicando la sensibilidad de CatSper a CRISP1 en el espermatozoide de ratón.

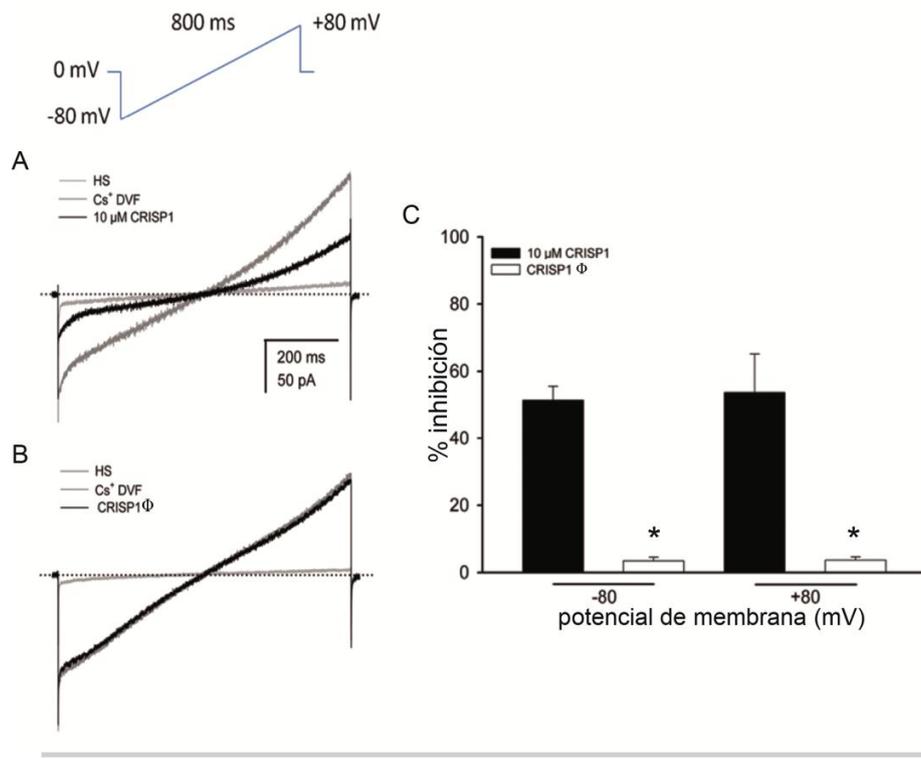


Figura 7: Efecto de CRISP1 sobre las corrientes iónicas a través del canal CatSper. Representación esquemática de las corrientes en la célula entera generadas en rampa de voltaje desde potencial de 0 mV (mirar protocolo en el panel de arriba) en solución fisiológica, en medio con Cs^+ y en ausencia de cationes divalentes (Cs^+ DVF), en ausencia o presencia de CRISP1 10 μM (**A**) o de CRISP1 10 μM desnaturalizada por calor (CRISP1 Φ) (**B**). **C.** Porcentaje de inhibición de CRISP1 y CRISP1 Φ tanto a voltajes negativos como positivos. Los resultados representan la media \pm SEM de 5 espermatozoides diferentes. * $p < 0,05$.

Dado que CatSper es un canal de Ca^{2+} , su inhibición por la presencia de CRISP1 debería disminuir el ingreso de este catión a la célula y, en consecuencia, bajar los niveles de Ca^{2+} intracelular. Para evaluar esta posibilidad, medimos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de espermatozoides epididimarios en presencia de la proteína. En concordancia con los resultados anteriores, CRISP1 inhibió el aumento en los niveles de Ca^{2+} generado por la presencia de mentol ($53 \pm 4,3\%$ ($n=3$)) (**Figura 8**).

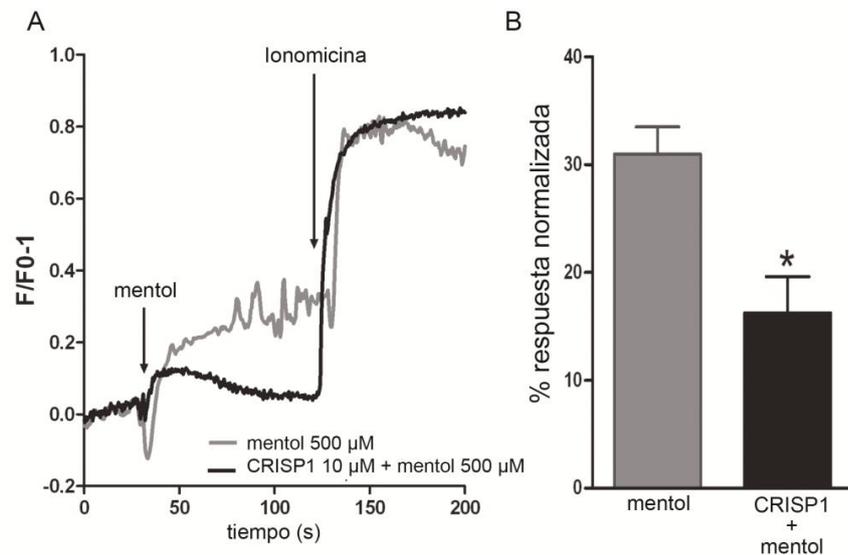


Figura 8: Efecto de CRISP1 sobre el incremento de la concentración de Ca^{2+} inducido por mentol. Espermatozoides epididimarios de ratón fueron cargados con una sonda fluorescente indicadora de Ca^{2+} Fluo-3 AM, y la intensidad de fluorescencia fue medida antes y después del agregado de mentol (500 μM). **A.** Las trazas muestran los cambios de fluorescencia inducidos por mentol en ausencia y presencia de 10 μM CRISP1. **B.** Incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por mentol comparado con el aumento generado por 10 μM de lonomicina (100 %) en ausencia o presencia de CRISP1. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

En conjunto, nuestros resultados indican que CRISP1 modula los canales TRPM8 y CatSper, sugiriendo que las alteraciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generadas podrían ser las responsables de los efectos de CRISP1 sobre la hiperactividad descritos anteriormente.

PMCA4 como regulador de la capacitación

A continuación, estudiamos la participación de otra molécula esencial para la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el espermatozoide, tal como lo es la bomba de Ca^{2+} -ATPasa 4 (PMCA4), la cual es responsable de expulsar a este catión del interior celular. Los resultados de la **Figura 9** muestran que el inhibidor específico de PMCA4, caloxin 1b1

(Pande et al., 2006), no modificó los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en los espermatozoides.

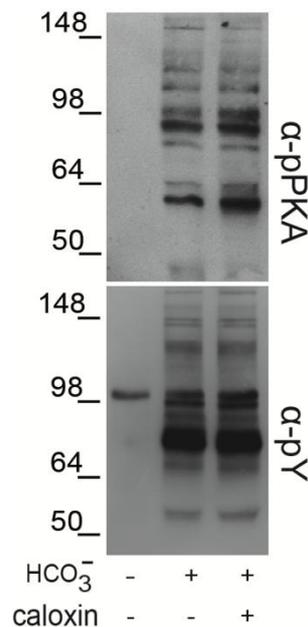


Figura 9: Influencia de PMCA4 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de caloxin 1b1 (100 μM). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY.

Asimismo, estudiamos la participación de PMCA4 en otros eventos asociados a la capacitación. Para ello, los espermatozoides epididimarios de ratón fueron capacitados en presencia del inhibidor caloxin 1b1, evaluándose la hiperactividad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides. En primer lugar, estudiamos la motilidad de los espermatozoides incubados en presencia de caloxin 1b1 por CASA. Los resultados de la **Tabla II** muestran que la inhibición de PMCA4 modificó dos parámetros relacionados a la hiperactividad (LIN y BCF) respecto al control.

Cuando se analizaron los porcentajes de motilidad total y progresiva e hiperactividad, se observó que si bien la presencia de caloxin 1b1 no genera importantes cambios en ninguno de los tres parámetros, se puede detectar una tendencia a menores porcentajes de hiperactividad en los espermatozoides expuestos a caloxin 1b1 (**Figura 25**).

	VCL	ALH	LIN	BCF	VSL	STR	VAP
control	226,9 ± 4,1	4,8 ± 0,1	23,0 ± 0,8	11,2 ± 0,4	52,6 ± 1,4	41,8 ± 0,02	124,4 ± 3,1
caloxin	224,4 ± 7,0	4,6 ± 0,1	24,5 ± 1,0*	10,3 ± 0,4*	54,8 ± 2,4	41,4 ± 0,1	124,3 ± 3,5

Tabla II: Influencia de PMCA4 sobre la motilidad espermática. Se evaluaron por CASA distintos parámetros cinéticos de motilidad en espermatozoides incubados durante 90 min en ausencia (control) o presencia de caloxin 1b1 (100 μ M). Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$. VCL: velocidad curvilínea (μ m/s), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μ m), LIN: linealidad (%), BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria (μ m/s), STR: rectilineidad (%) y VAP: velocidad promedio de la trayectoria (μ m/s).

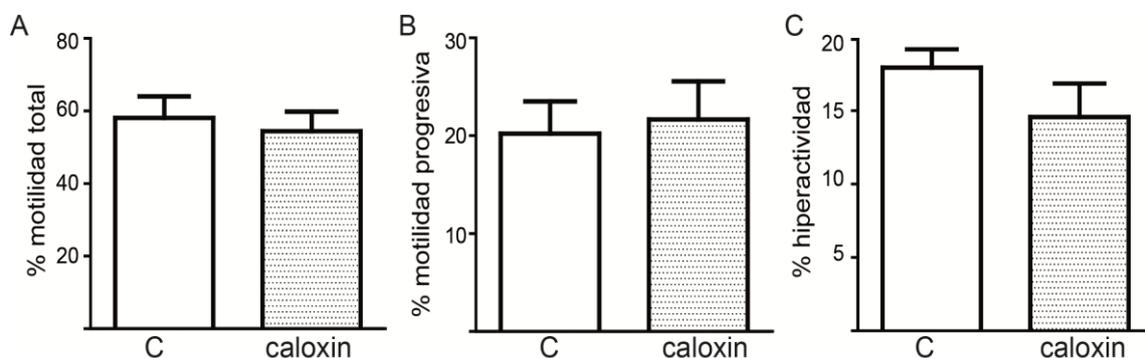


Figura 10: Influencia de PMCA4 sobre la motilidad espermática. Espermatozoides de ratón fueron incubados en ausencia (C) o presencia de 100 μ M caloxin 1b1 durante 90 min. El porcentaje de motilidad total (A), progresiva (B) e hiperactividad (C) se calculó según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

A continuación, analizamos la influencia de PMCA4 sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides utilizando distintos esquemas experimentales destinados a evaluar diferentes etapas del proceso. En primer lugar, ovocitos desprovistos tanto de las células del cúmulus como de la ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de caloxin 1b1, inhibidor de PMCA4. Los resultados mostrados en la **Figura 11A** revelaron que la presencia del inhibidor no afectó la capacidad de los espermatozoides de penetrar los ovocitos en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas. Con el fin de analizar el efecto de caloxin 1b1 sobre la capacidad de los espermatozoides de interactuar con la ZP, ovocitos desprovistos de las células del cúmulus y rodeados de la ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados en ausencia y presencia de caloxin 1b1. Los resultados indicaron que los espermatozoides expuestos al inhibidor durante la capacitación y la co-incubación de las gametas presentaron una capacidad fertilizante

significativamente menor a la de los controles (**Figura 11B**), efecto que no fue evidenciado cuando caloxin 1b1 se agregó sólo en el período de co-incubación de las gametas. Finalmente, evaluamos la capacidad de los espermatozoides de penetrar los ovocitos intactos (COCs). Bajo estas condiciones, la exposición a caloxin 1b1 durante la capacitación pero no así durante el periodo de co- incubación de las gametas, inhibió fuertemente la capacidad fertilizante del espermatozoide (**Figura 11C**). Más aún, la presencia de caloxin 1b1 durante la capacitación produjo una pequeña disminución en el número de espermatozoides detectados dentro de la matriz del cúmulus (**Figura 11D**).

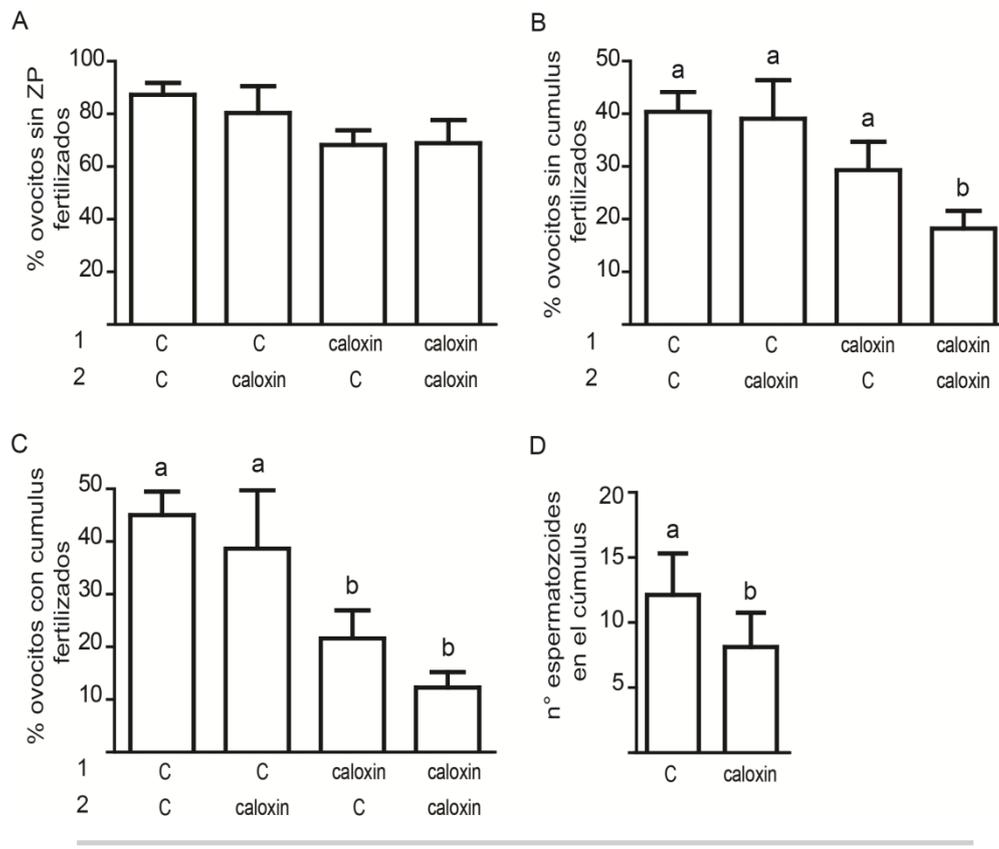


Figura 11: Influencia de PMCA4 sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. **A, B** y **C**. Espermatozoides de ratón fueron incubados bajo condiciones capacitantes en ausencia (C) o en presencia de caloxin 1b1 (100 μ M) durante 90 min (1). Los espermatozoides fueron co-incubados con ovocitos de ratón sin ZP durante 1 h (**A**), con ovocitos de ratón con ZP durante 3 hs (**B**) o con COCs durante 3 hs (**C**) en ausencia (C) o presencia de caloxin 1b1 (100 μ M) (2). En todos los casos, se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados utilizando la tinción de Hoechst 33342. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. **D**. Los espermatozoides fueron capacitados en ausencia o presencia de caloxin 1b1 (100 μ M) durante 90 min, teñidos con Hoechst 33342 y co-incubados con COCs en medio capacitante, determinándose luego de 15 min, el número de espermatozoides dentro de los cúmulus por microscopia de epifluorescencia. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente distintas. $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados obtenidos mostraron que el agregado de caloxin 1b1 durante la capacitación afectó la capacidad de los espermatozoides de fertilizar ovocitos con ZP y con cúmulus, probablemente por producir alteraciones en la motilidad espermática, confirmando que la regulación del Ca^{2+} intracelular es crucial para la expresión de la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante el proceso de capacitación. Estas observaciones junto con las obtenidas anteriormente con CRISP1 sugieren que la modulación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sería fundamental durante la capacitación para garantizar el éxito del proceso de fertilización.

Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre el proceso de capacitación

En paralelo a estos estudios, investigamos la influencia de CRISP1 sobre las vías de señalización involucradas en el proceso de capacitación utilizando una estrategia complementaria en la cual evaluamos el efecto de la ausencia de ambas poblaciones de CRISP1 sobre distintos eventos de la capacitación. Para ello, empleamos espermatozoides carentes de CRISP1 provenientes de los animales *Crisp1*^{-/-}. Teniendo en cuenta estudios previos del laboratorio mostrando que estos animales eran fértiles pese a que sus espermatozoides exhibían una disminución en la fosforilación en Tyr (Da Ros et al., 2008), el siguiente paso consistió en evaluar los niveles de fosforilación en Tyr de cada célula en particular por Citometría de flujo. El objetivo de estos estudios fue dilucidar si la mayoría de los espermatozoides KO presentaban niveles bajos de fosforilación o si existían poblaciones con distintas intensidades de fosforilación. Para ello, los espermatozoides HT y KO fueron incubados bajo condiciones no capacitantes (sin HCO_3^-) o capacitantes (con HCO_3^-) durante 90 min, fijados e incubados con el anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en Tyr como primer anticuerpo, seguido de un segundo anticuerpo acoplado a FITC. La intensidad de fluorescencia fue medida utilizando la técnica de Citometría de flujo. Los resultados mostrados en la **Figura 12** revelaron que la mayoría de los espermatozoides KO presentaron niveles menores de fosforilación en Tyr en comparación con los espermatozoides HT. Más aún, no se evidenciaron distintas poblaciones con diferentes niveles de fosforilación en los espermatozoides KO.

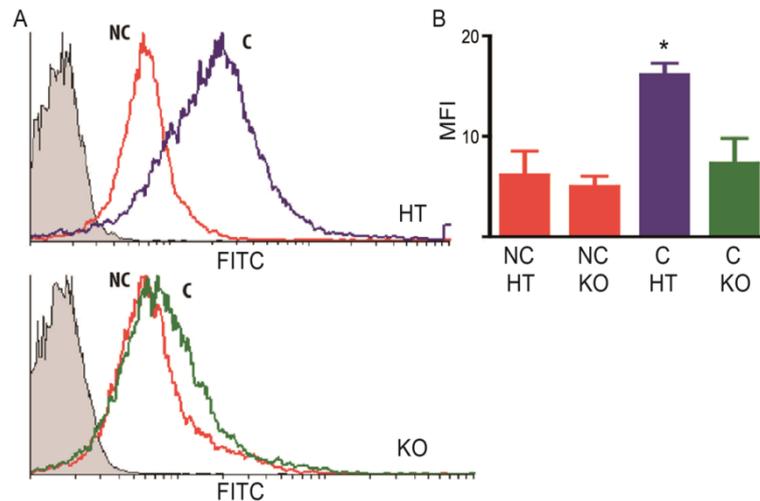


Figura 12: Fosforilación de proteínas en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. **A.** Espermatozoides epididimarios HT o KO no capacitados (NC) o capacitados (C) durante 90 min fueron fijados y sometidos a marcación utilizando el anticuerpo α -pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. **B.** Intensidad de fluorescencia media (MFI) de los 3 experimentos \pm SEM. * vs NC HT, $p < 0,05$.

En base a estas diferencias en los niveles de fosforilación en Tyr entre los espermatozoides provenientes de animales HT y KO, el siguiente paso consistió en investigar los mecanismos moleculares por los cuales la falta de CRISP1 afectaba la fosforilación de proteínas en Tyr durante la capacitación. Para ello, se examinaron diferentes eventos de transducción de señales asociados a la capacitación en los animales KO. En primer lugar, se evaluaron los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA en los espermatozoides HT y KO mediante Western blot utilizando el anticuerpo anti-sustratos fosforilados por PKA. Los resultados (**Figura 13**, panel superior) revelaron un aumento en la fosforilación en los espermatozoides HT a medida que transcurre el proceso de capacitación, mostrando un patrón máximo de proteínas fosforiladas a la hora de incubación. Por su parte, los espermatozoides KO mostraron niveles menores de fosforilación respecto a los controles, a todos los tiempos de capacitación estudiados (0, 1, 1,5 y 2 hs). Asimismo, en el panel inferior de la **Figura 13** se muestran los niveles de fosforilación en Tyr de los mismos espermatozoides utilizados para el experimento anterior, donde pueden observarse las diferencias entre HT y KO en este patrón de fosforilación.

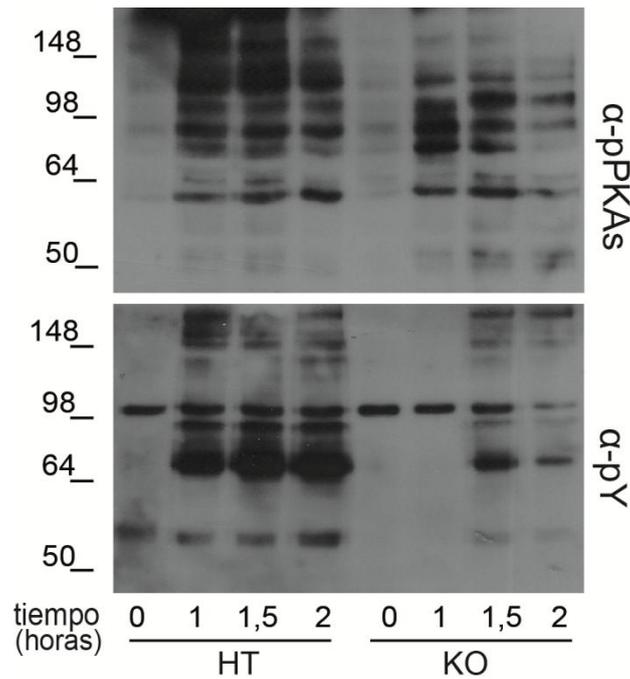


Figura 13: Fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr durante la capacitación de espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados en condiciones capacitantes durante diferentes períodos de tiempos (0 - 2 hs) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Considerando que la disminución en el nivel de fosforilación observada en la capacitación de los espermatozoides KO podría deberse a una deficiencia en la vía de señalización dependiente de AMPc/PKA, el siguiente paso consistió en modular esta vía y estudiar cómo la misma impacta sobre los niveles de fosforilación. En base a ello, nos planteamos si los espermatozoides KO podían requerir más concentración de HCO_3^- en el medio de incubación para lograr inducir niveles normales de fosforilación durante la capacitación. Los resultados mostraron que concentraciones mayores de este ión lograron incrementar ambas fosforilaciones en el espermatozoide KO, pero aún así, dichas fosforilaciones no alcanzaron los niveles presentados por las células HT (**Figura 14**).

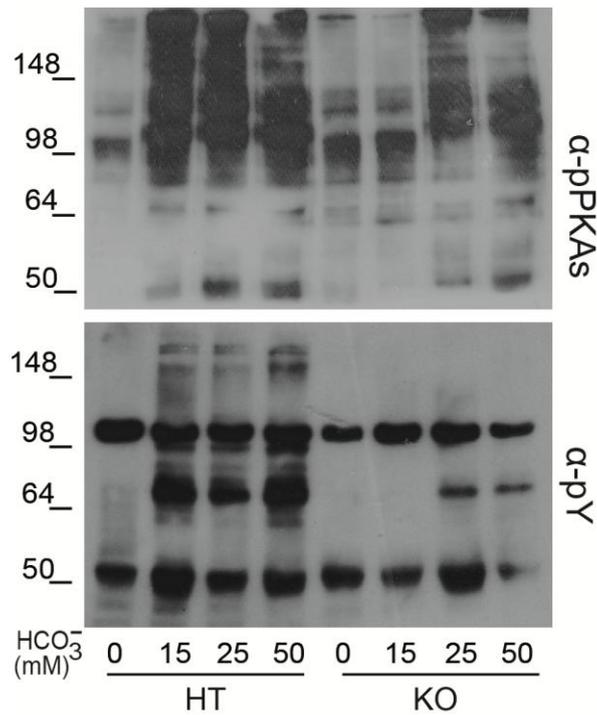


Figura 14: Influencia del HCO_3^- sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de HCO_3^- (0 - 50 mM) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Dado que los espermatozoides KO exhiben una clara disminución en los niveles de AMPc intracelular (Tesis Doctoral Julieta Maldera), se estudió si el efecto de la falta de CRISP1 en la fosforilación podía ser revertido por el agregado de AMPc. Para analizar esta posibilidad, los espermatozoides KO fueron incubados en condiciones capacitantes en presencia de un análogo permeable del AMPc (dbcAMP) junto a un inhibidor de PDEs (IBMX), los cuales incrementan los niveles intracelulares del AMPc, evaluándose posteriormente, la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr mediante Western blot. Los resultados mostrados en la **Figura 15** revelaron que la presencia de dbcAMP e IBMX estimuló no sólo la fosforilación de los sustratos de PKA sino también en Tyr en los espermatozoides KO, llegando a niveles similares a los del control. Estas observaciones sugieren un defecto en la acumulación o producción de AMPc en los espermatozoides deficientes en CRISP1 que generaría alteraciones en la vía AMPc/PKA.

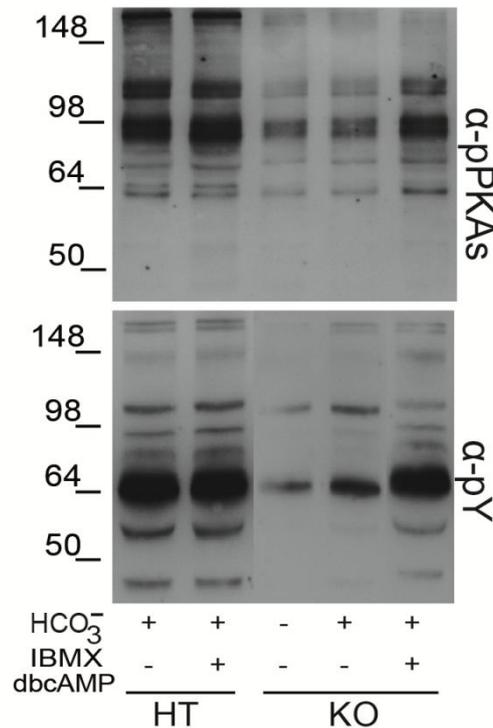


Figura 15: Influencia del AMPc sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr de espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de dbcAMP/IBMX (3 mM/0,2 mM) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Teniendo en cuenta estos resultados, medimos la actividad enzimática de las PDEs en los espermatozoides de ambos genotipos. Los resultados revelaron un aumento no significativo en la actividad de PDE en los espermatozoides KO con respecto a los HT. Estas observaciones sugieren que la falta de CRISP1 no estaría alterando en gran medida la actividad enzimática de las PDEs en los primeros 10 min de incubación (**Figura 16**).

Posteriormente, con el fin de evaluar si los niveles bajos de la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr presentes en el espermatozoide KO dependían de PKA, los espermatozoides KO y HT fueron expuestos al inhibidor de esta enzima, H89 (30 μ M). La **Figura 17** muestra que este compuesto disminuye los niveles de fosforilación de los espermatozoides de ambos genotipos, sugiriendo que las fosforilaciones presentes en los espermatozoides KO y HT dependerían de la actividad de PKA.

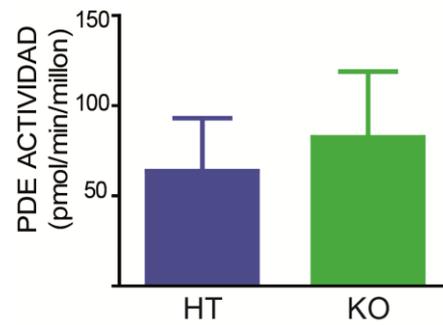


Figura 16: Actividad de PDE en los espermatozoides KO para CRISP1. Se analizó la actividad de PDE utilizando una técnica radioenzimática sobre extractos proteicos de espermatozoides HT o KO incubados durante 10 min en medio no capacitante (sin HCO_3^-) en el sobrenadante generado posterior a la lisis celular. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. NS.

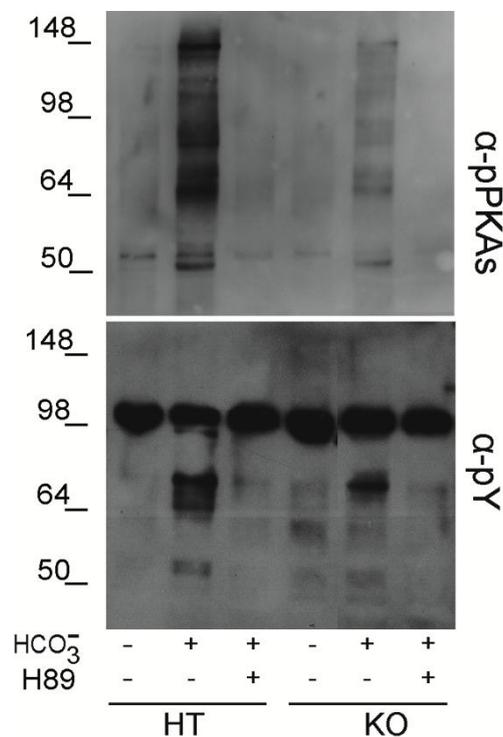


Figura 17: Influencia de PKA sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de H89 (30 μM) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Por otro lado, resultados recientes en ratón (Krapf et al., 2010) como así también los presentados en esta Tesis (Capítulo 1, Battistone et al., 2013) proponen un modelo en el cual la fosforilación de los sustratos de PKA y la consecuente fosforilación en Tyr estarían reguladas por dos caminos convergentes: uno que requeriría la activación de la vía AMPc/PKA, y otro que involucraría la inactivación de Ser/Thr fosfatasa mediado por SFKs. Por esta razón, investigamos la participación de la vía Ser/Thr fosfatasa en

la disminución de las fosforilaciones observadas en los espermatozoides KO para CRISP1. Para ello, comenzamos con el estudio de la actividad de la Ser/Thr fosfatasa PP2A ya que en el espermatozoide de ratón esta quinasa ha sido descrita como uno de los componentes de esta segunda vía (Krapf et al., 2010). Además, se ha demostrado en otros sistemas, que SFKs pueden fosforilar a PP2A en una Tyr, generando la inactivación de la misma (Hu et al., 2009). En base a ello, evaluamos el estado de fosforilación de esta fosfatasa en el espermatozoide KO utilizando diferentes anticuerpos que reconocen la forma fosforilada en Tyr o la total de PP2A. Los resultados de la **Figura 18** muestran niveles menores de fosforilación de PP2A en los espermatozoides capacitados carentes de CRISP1 respecto a los controles, sugiriendo que los espermatozoides KO presentan mayor actividad de PP2A que los espermatozoides HT.

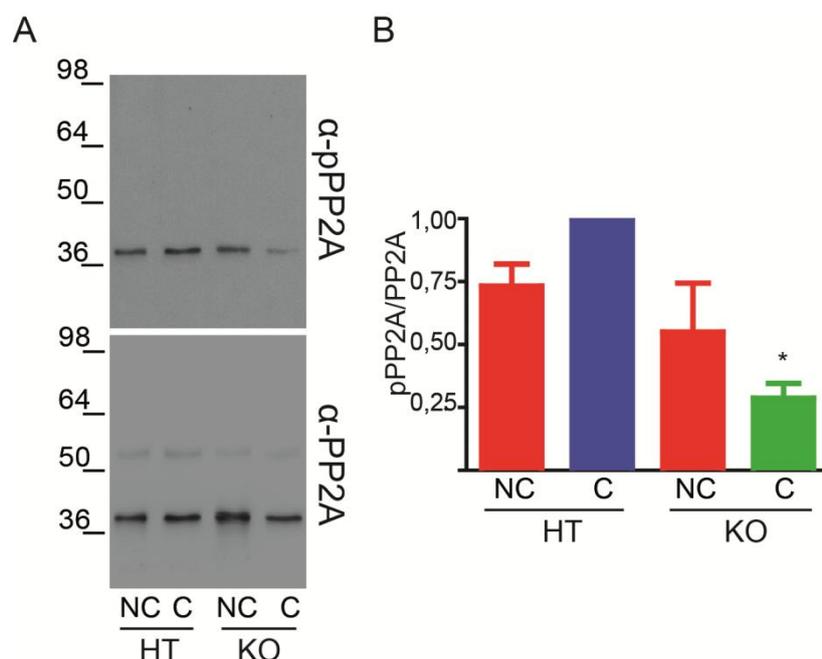


Figura 18: Actividad de PP2A en los espermatozoides KO para CRISP1. A. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en medio no capacitante (NC) o capacitante (C) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando anti-fosforilación de PP2A (α -pPP2A) o anti-PP2A (α -PP2A). Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. B. Relación entre las intensidades de las bandas de pPP2A y PP2A en las cuatro condiciones. Los datos representan el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. C HT vs C KO * $p < 0,05$.

A continuación, evaluamos el efecto de modular la actividad de las fosfatasas en Ser/Thr sobre los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Para ello, los espermatozoides HT o KO fueron expuestos a distintas concentraciones de OA, inhibidor específico de dichas fosfatasas observándose que, a diferencia de lo que

ocurre en los espermatozoides HT, altas concentraciones de este inhibidor no lograron aumentar los niveles de ninguna de las fosforilaciones en los espermatozoides KO (**Figura 19**).

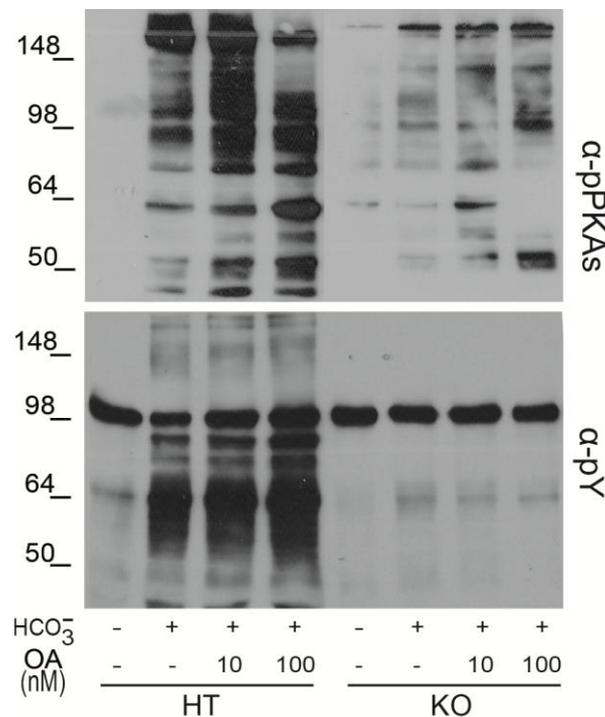


Figura 19: Influencia de las fosfatasa sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en presencia de OA (10-100 nM), y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Dado que esta segunda vía involucra no sólo a Ser/Thr fosfatasa sino también SFKs, los espermatozoides KO fueron expuestos a distintos moduladores de la vía. Observamos que la exposición a SKI606 generó inhibición de los bajos niveles que presenta el espermatozoide KO de manera similar a los espermatozoides HT. Como se ha reportado anteriormente (Krapf et al., 2010), en la **Figura 20** se observa que los espermatozoides control incubados en presencia de OA presentaron reversión en la inhibición producida por el SKI606. Sin embargo, en los espermatozoides KO, la presencia de OA (100 nM) no produjo dicha reversión (**Figura 20**), sugiriendo la existencia de una deficiencia que impediría la correcta activación de la vía SFKs/fosfatasa.

Los últimos experimentos indican que los espermatozoides KO para CRISP1 tendrían mayor actividad de la PP2A que los controles. Sin embargo, la inactivación de las fosfatasa no sería suficiente para inducir los niveles de fosforilación en los

espermatozoides carentes de CRISP1 ni tampoco para revertir la inhibición producida por SKI606 en dichas células.

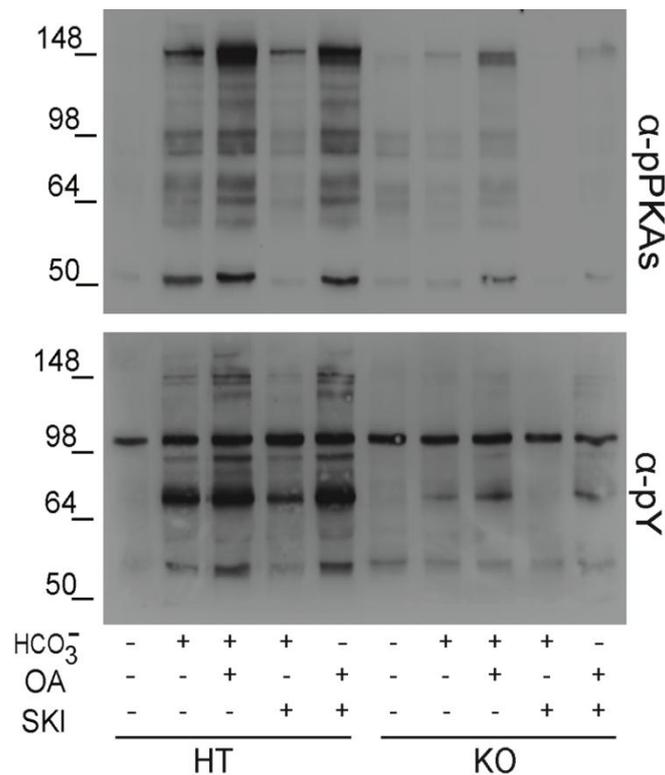


Figura 20: Influencia de la vía SFKs/fosfatasas sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de SKI606 (30 μ M), OA (100 nM) o ambos inhibidores juntos (SKI OA). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 4 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la actividad de PKA sería fundamental para la glicólisis y la producción de ATP en los espermatozoides (Nolan et al., 2004, Hereng et al., 2014), es posible que la disminución en los niveles AMPc en los espermatozoides KO para CRISP1 generara una menor estimulación de la actividad de PKA, menor glicólisis y alteraciones en la concentración de ATP. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, los espermatozoides HT y KO fueron expuestos a carbonoxolone (CBX), el cual bloquea la salida de ATP del interior celular, generando la acumulación del mismo. Los resultados mostraron que la presencia de CBX produjo un aumento no sólo en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA sino también de los residuos en Tyr en el espermatozoide KO sin producirse modificaciones en los espermatozoides HT (**Figura 21**).

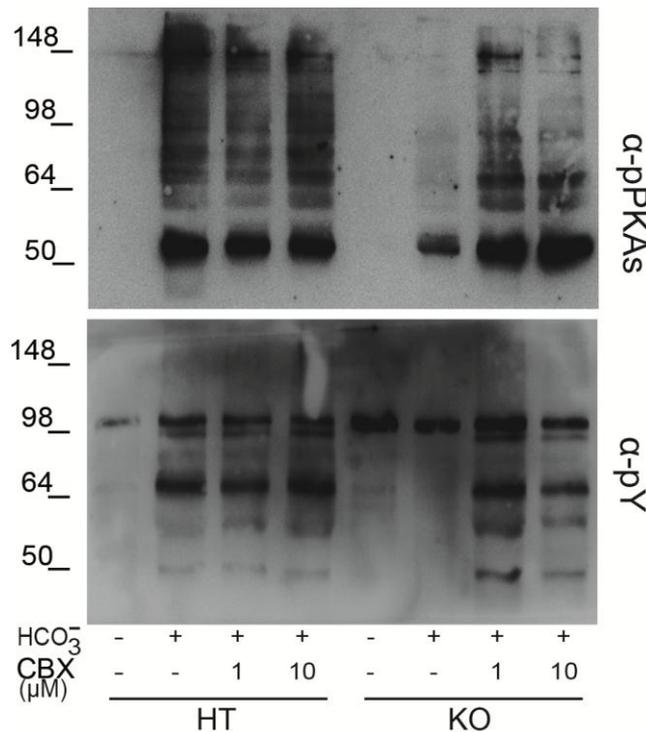


Figura 21: Influencia del ATP sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de CBX (1-10 μM) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α-pPKAs o α-pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

En conjunto, los resultados hasta aquí descriptos indican que los menores niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr observados en los espermatozoides KO podrían deberse a niveles bajos de AMPc intracelular, el cual generaría modificaciones en la vía de señalización que involucra a este segundo mensajero. El hecho de que la exposición a dbcAMP/IBMX o CBX revierta el fenotipo observado en los espermatozoides KO, sugiere que la deficiencia sería río arriba del AMPc. Dado que numerosas evidencias apoyan la existencia de un “cross-talk” entre las señales dependientes de AMPc y Ca²⁺ en el espermatozoide (Wiesner et al., 1998, Wennemuth et al., 2003b, Brenker et al., 2012), el siguiente paso fue analizar la vía dependiente de Ca²⁺ en los espermatozoides KO para CRISP1. Para ello, los espermatozoides HT y KO fueron incubados en el medio capacitante pero sin el agregado de Ca²⁺ (Θ Ca²⁺), observándose que los espermatozoides control incubados bajo estas condiciones presentaban niveles menores de ambas fosforilaciones. Aunque este resultado fue diferente a lo encontrado en el espermatozoide humano (Capítulo 2, Battistone et al., 2014), está en concordancia con lo ya observado en ratón “wild type” (Visconti et al., 1995b, Chung et al., 2014, Navarrete et al., 2015). Asimismo, los espermatozoides KO mantuvieron niveles bajos de fosforilaciones en Θ

Ca^{2+} (**Figura 22**). Para continuar con el análisis de esta vía, se expuso a los espermatozoides de los dos genotipos a $\ominus \text{Ca}^{2+}$ en presencia de EGTA, generando concentraciones del catión prácticamente casi nulas en el medio capacitante. Similar a lo ya reportado en ratones “*wild type*” (Chung et al., 2014, Navarrete et al., 2015), este tratamiento produjo un aumento de los niveles de ambas fosforilaciones en espermatozoides HT, alcanzando valores similares al del espermatozoide capacitado. Por su parte, los espermatozoides KO incubados bajo las mismas condiciones, no mostraron modificaciones en los niveles de fosforilaciones, sugiriendo que esta vía se encontraría afectada en los espermatozoides deficientes en CRISP1 (**Figura 22**).

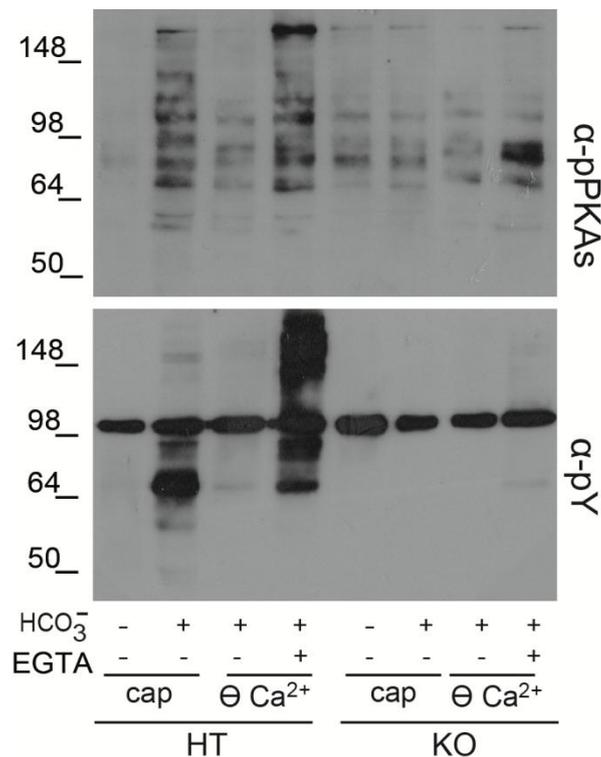


Figura 22: Influencia del Ca^{2+} extracelular sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en medio capacitante (cap) o sin el agregado de Ca^{2+} ($\ominus \text{Ca}^{2+}$) en ausencia o presencia de EGTA (2 mM). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Como otra aproximación al estudio de la cascada regulada por Ca^{2+} , estudiamos el efecto de inactivar la Ser/Thr fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , PP2B, sobre las fosforilaciones de los sustratos de PKA y en Tyr. Para ello, los espermatozoides HT y KO fueron incubados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ en presencia de Ciclosporina-A (CsA), inhibidor de PP2B. Los resultados (**Figura 23**) mostraron que mientras la presencia de CsA incrementó los niveles de ambas fosforilaciones en los espermatozoides control incubados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ (en concordancia a lo ya reportado en ratones “*wild type*”

(Navarrete et al., 2015)), se observaron bajos niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y reversión parcial de la fosforilación en Tyr en los espermatozoides KO para CRISP1, sugiriendo la existencia de una alteración en los mecanismos que censan o responden a las modificaciones intracelulares de Ca^{2+} en los espermatozoides carentes de esta proteína

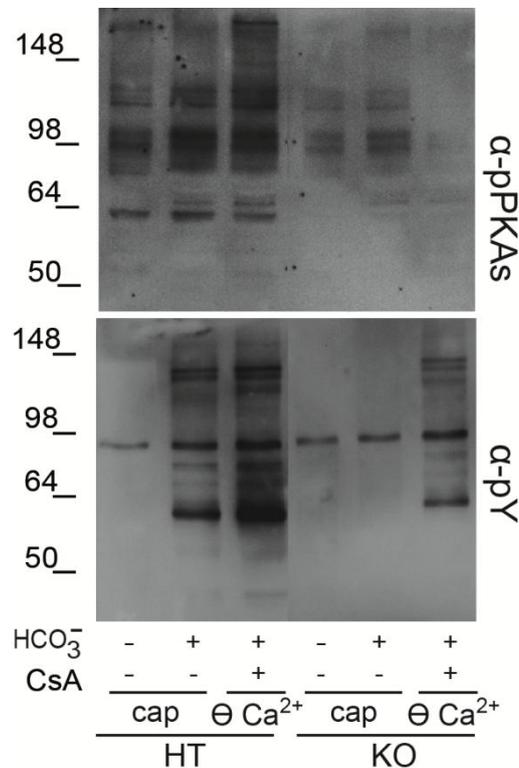


Figura 23: Influencia de PP2B sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en medio capacitante (cap) o sin el agregado de Ca^{2+} ($\ominus \text{Ca}^{2+}$) en ausencia o presencia de CsA (10 μM). Las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes, mostrándose uno representativo.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides KO para CRISP1 presentaban bajos niveles de fosforilación, posiblemente por desregulaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estudiamos el efecto de inhibir a PMCA4, responsable de expulsar a este catión de la célula, sobre los niveles de fosforilación en los espermatozoides KO para CRISP1. Los resultados de la **Figura 24** muestran que el inhibidor específico de PMCA4 no revirtió los niveles bajos de fosforilaciones de las células KO ni modificó las fosforilaciones en los espermatozoides HT (similar a lo observado anteriormente en ratones “wild type”).

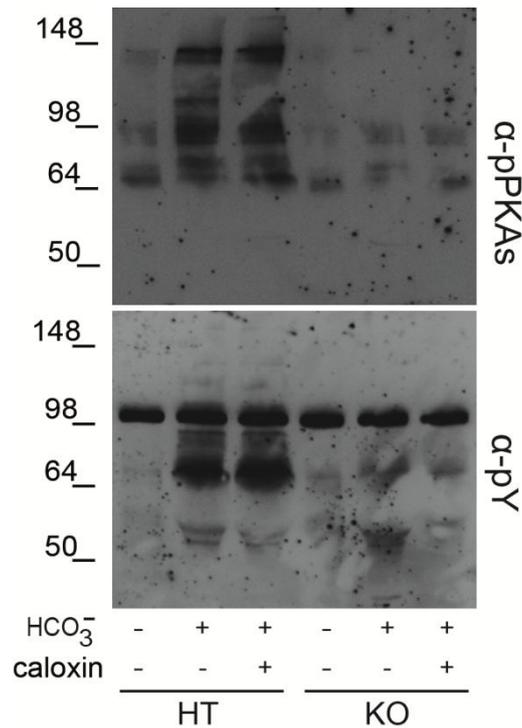


Figura 24: Efecto del inhibidor de PMCA4 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT o KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de caloxin 1b1 (100 μ M) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY.

Con el objetivo de revertir el fenotipo observado en los espermatozoides KO, evaluamos el efecto del agregado de CRISP1 sobre los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en dichas células. Los resultados indicaron que el agregado de la proteína durante la capacitación, no logró modificar los niveles de fosforilación en los espermatozoides KO para CRISP1 (**Figura 25**).

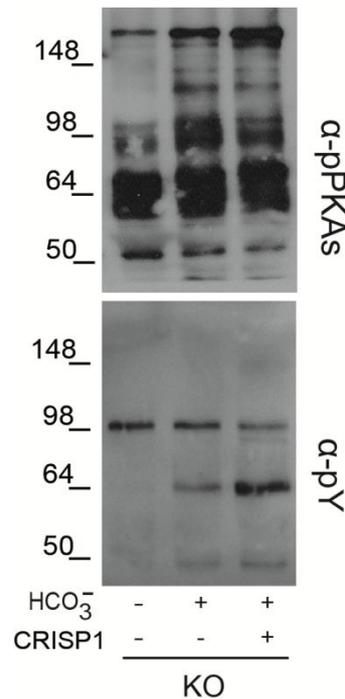


Figura 25: Efecto del agregado de CRISP1 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr en espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides KO fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de CRISP1 (10 μ M) y las proteínas fueron analizadas por Western blot utilizando los anticuerpos α -pPKAs o α -pY. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. Aclaración: los controles HT de este experimento son los mostrados en la Figura 2.

Los resultados hasta aquí descriptos sugieren que los niveles menores de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr observados en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} podrían deberse a mayores $[Ca^{2+}]_i$. Con el fin de evaluar esta posibilidad, analizamos el contenido de Ca^{2+} presente en espermatozoides KO utilizando la técnica de Citometría de flujo empleando la sonda permeable sensible a Ca^{2+} : FLUO 4-AM. Tal como se muestra en la **Figura 26**, los espermatozoides KO exhibieron una tendencia no sólo a mayores porcentajes de células viables que incrementan los niveles de Ca^{2+} (**Figura 26A**) sino también a mayor intensidad de fluorescencia media respecto de los controles (**Figura 26B, C y D**).

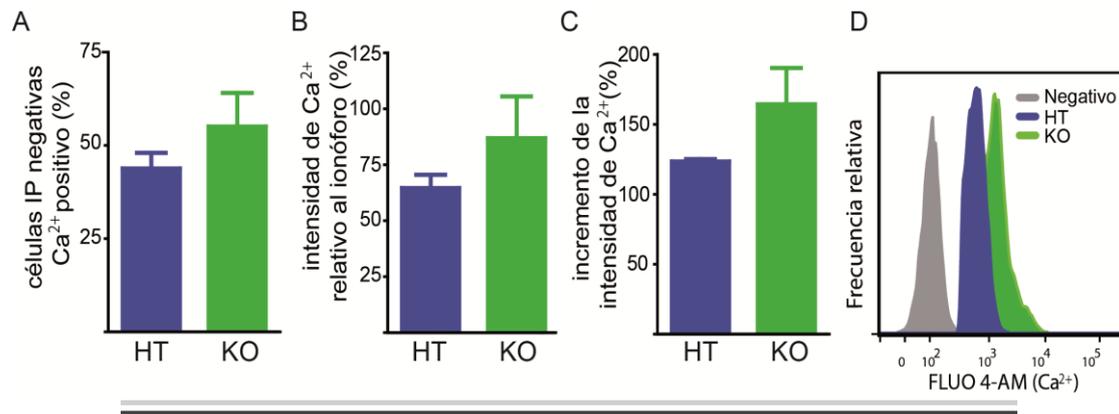


Figura 26: Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre la concentración de Ca²⁺. Espermatozoides capacitados HT y KO fueron cargados con una sonda fluorescente indicadora de Ca²⁺ Fluo-4 AM, y la intensidad de fluorescencia fue medida después de 30 min. **A.** Porcentaje de células viables (ioduro de propidio, IP, negativas) y positivas para la sonda. **B.** Niveles de Ca²⁺ intracelular comparado con el aumento generado por 10 μ M de ionóforo en los espermatozoides HT (100 %). **C.** Incremento de Ca²⁺ intracelular en comparación con los niveles basales presentados sin Ca²⁺ (100%). Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. NS. **D.** Histograma representativo de la intensidad de fluorescencia media.

Finalmente, teniendo en cuenta que el Ca²⁺ es fundamental para la motilidad espermática, evaluamos diferentes parámetros de motilidad mediante el sistema computarizado de CASA en espermatozoides KO y HT ya sea frescos (F) o incubados en medio capacitante (C) durante 90 min. Mientras que en el caso de los espermatozoides frescos, las células KO presentaron una disminución en dos de los parámetros (ALH y VSL) en comparación con los controles, en los espermatozoides capacitados (C), las células KO presentaron una bajada en cuatro parámetros cinéticos (VCL, ALH, VSL y VAP) respecto al grupo HT. Asimismo, la comparación entre espermatozoides frescos y capacitados mostró diferencias significativas en varios de los parámetros (VSL, STR y VAP) para los espermatozoides HT y sólo en un parámetro (VSL) para las células KO. Estos resultados indican que la falta de CRISP1 modifica la motilidad espermática tanto en los espermatozoides frescos como capacitados (**Tabla III**).

A continuación, analizamos los porcentajes de motilidad total y progresiva e hiperactividad en los espermatozoides capacitados de los dos genotipos. Las células HT y KO para CRISP1 mostraron porcentajes similares de motilidad total y progresiva (**Figura 27A-B**), mientras que los espermatozoides capacitados KO presentaron niveles menores de hiperactividad en comparación con las células control (**Figura 27C**), Estos resultados indican que la falta de CRISP1 durante la capacitación podría modular el desarrollo de la hiperactividad.

	VCL	ALH	LIN	BCF	VSL	STR	VAP
F HT	267,9 ± 7,5	5,5 ± 0,5	28,9 ± 0,7	12,3 ± 0,2	73,8 ± 1,2	52,8 ± 1,6	142,6 ± 3,9
F KO	227,5 ± 13,1	4,6 ± 0,1 [#]	30,1 ± 1,2	12,6 ± 0,6	65,1 ± 3 [#]	50,6 ± 1,9	133,3 ± 9,0
C HT	231,4 ± 14,9	4,9 ± 0,3	26,3 ± 1,3	12,5 ± 0,4	58,2 ± 2,7 ^{&}	48,7 ± 1,5 ^{&}	125,9 ± 5,6 ^{&}
C KO	199,1 ± 13,1*	4,0 ± 0,3*	26,3 ± 1,7	12,9 ± 0,3	50,5 ± 1,6* [†]	46,6 ± 2,1	108,4 ± 5,9*

Tabla III: Motilidad espermática de los espermatozoides KO para CRISP1. Se analizaron por CASA distintos parámetros cinéticos en espermatozoides HT y KO frescos (F) o incubados en medio capacitante durante 90 min (C). Los datos representan el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$: para C HT vs C KO, [#] $p < 0,05$: para F HT vs F KO, [&] $p < 0,05$: para F HT vs C HT y [†] $p < 0,05$: para F KO vs C KO. VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm), LIN: linealidad (%), BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), STR: rectilineidad (%) y VAP: velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$).

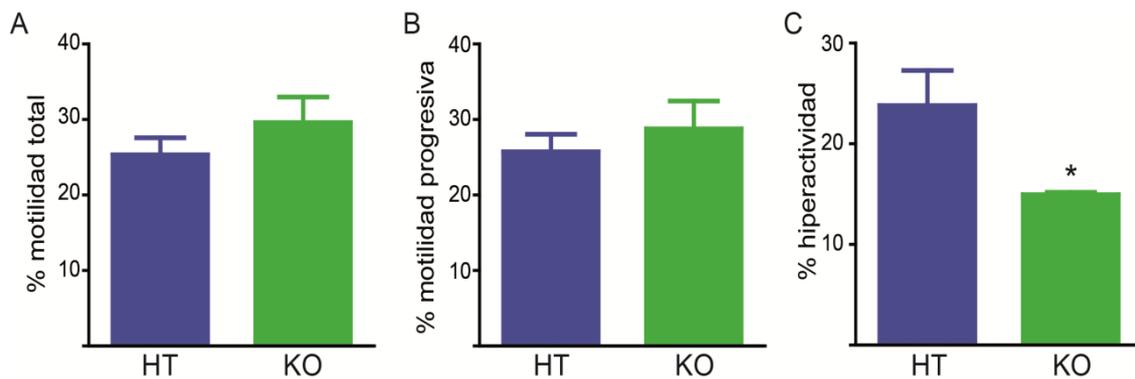


Figura 27: Motilidad espermática de los espermatozoides KO para CRISP1. Espermatozoides HT y KO fueron capacitados y los porcentajes de motilidad total (A), progresiva (B) e hiperactividad (C) fueron calculados según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Los datos representan el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$

En resumen, los estudios presentados sugieren que la falta de CRISP1 provocaría una disminución en la fosforilación en Tyr durante la capacitación, debido a un defecto en diferentes vías de señalización intracelular moduladas por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual generaría alteraciones en el desarrollo de la hiperactividad.

CAPÍTULO 1

Con el fin de alcanzar una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de capacitación, en el presente capítulo investigamos distintas vías de señalización que juegan un rol relevante durante la capacitación del espermatozoide.

Considerando que hasta el momento, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la capacitación del espermatozoide de rata, estudiamos las cascadas de transducción de señales durante la capacitación del espermatozoide de esta especie. En primer lugar, examinamos la cinética de activación de PKA a través del análisis de la fosforilación de los sustratos de PKA durante diferentes tiempos de incubación en un medio capacitante que permite el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide (Rochwerger et al., 1992). El patrón de bandas detectadas correspondió a proteínas fosforiladas específicamente por PKA tal como lo indica su aumento o disminución en respuesta a moduladores de PKA. Los resultados de Western blot revelaron un incremento inmediato (1 min) de la fosforilación inducida por PKA en presencia de HCO_3^- que permaneció constante a lo largo de todos los tiempos evaluados. En contraposición a los niveles constantes de esta fosforilación observados en nuestros estudios, Zhang y colaboradores (2012) reportaron un incremento en esta fosforilación en función del tiempo de capacitación en el espermatozoide de rata (Zhang et al., 2012). Esta discrepancia podría deberse a los diferentes medios de incubación empleados (RFM en nuestro caso y BWW en el trabajo mencionado). Consistente con nuestras observaciones, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que los niveles de AMPc se incrementan a los pocos minutos en medio capacitante llegando a un máximo a los 30 min (Tesis doctoral Vanina Da Ros).

A diferencia de la detección rápida de la fosforilación de los sustratos de PKA, la fosforilación en Tyr aumentó gradualmente en función del tiempo, llegando a niveles máximos a las 4 hs de incubación, tal como fuera descrito anteriormente por nuestro laboratorio (Da Ros et al., 2004). El hecho de que se requieran 4 hs de capacitación para obtener el patrón máximo de proteínas fosforiladas concuerda con que la capacidad fusogénica del espermatozoide de rata se evidencia a partir de dicho período de incubación (Rochwerger et al., 1992). En conjunto, estas estudios indican que, a pesar de los eventos muy tempranos que tienen lugar durante la capacitación tales como la producción de AMPc y la fosforilación dependiente de PKA, los

espermatozoides de rata necesitarían experimentar la activación de otras vías de señalización con el fin de alcanzar un estado funcional de capacitación.

En la actualidad, se trata de dilucidar los mecanismos moleculares que ocurren entre la fosforilación en Ser/Thr dependiente de PKA y la subsecuente fosforilación en Tyr. En este sentido, en el espermatozoide murino y humano, se ha postulado que Src, una quinasa de las SFKs, sería uno de los intermediarios claves entre ambos niveles de fosforilación ya que la presencia de bloqueantes de dicha familia genera efectos inhibitorios sobre la fosforilación en Tyr (Baker et al., 2006, Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008, Varano et al., 2008). En este sentido, se ha postulado que Src sería la quinasa que directamente regularía los niveles de fosforilación en Tyr, iniciándose su actividad al ser fosforilada en Ser por PKA durante la capacitación de los espermatozoides de estas dos especies (Baker et al., 2006, Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008). Sin embargo, existen controversias sobre este mecanismo ya que mientras dos grupos proponen que existiría una interacción directa entre PKA y Src durante la capacitación del espermatozoide humano (Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008), otro grupo demostró que estas dos quinasas no se encontrarían interactuando durante dicho proceso (Varano et al., 2008). A continuación, evaluamos su participación en las vías de señalización de la capacitación espermática de rata, utilizando dos inhibidores: SU6656 y SKI606, siendo este último más específico para Src (Bain et al., 2007, Bantscheff et al., 2007). Nuestros resultados revelaron la presencia de Src en el espermatozoide de rata como así también que SU6656 y SKI606 produjeron una inhibición dosis-dependiente en la fosforilación tanto de los sustratos de PKA como de proteínas en Tyr. Estas observaciones no sólo indicaron la participación de SFKs río arriba (“*upstream*”) de la fosforilación de los sustratos de PKA sino que también permitieron descartar su rol como intermediaria entre las dos fosforilaciones. Los compuestos SU6656 y SKI606 no serían capaces de inhibir directa ni inespecíficamente la actividad enzimática de PKA, ya que no ejercen efecto en ensayos de actividad enzimática *in vitro* utilizando PKA aislada de espermatozoide de ratón (Krapf et al., 2010). De manera interesante, las concentraciones de SU6656/SKI606 requeridas para el bloqueo de la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr fueron cinco veces mayores (50 μ M) que los IC_{50} postulados para estos dos inhibidores en relación con la actividad *in vitro* de la quinasa Src (Bain et al., 2007, Bantscheff et al., 2007), por lo cual, al utilizar 50 μ M de los inhibidores, no sólo se modularía a Src sino también a otras SFKs. Al respecto, cabe señalar que hallazgos similares se reportaron para espermatozoides murinos utilizando también inhibidores específicos (Krapf et al., 2010). Estas observaciones sugieren que Src y otras SFKs

estarían involucrados en la capacitación del espermatozoide de rata, tal como la Tyr quinasa Fyn descrita en el espermatozoide de esta especie (Kierszenbaum et al., 2009). Asimismo, espermatozoides provenientes de animales KO para Src y Fyn presentaron niveles normales de fosforilación en Tyr (Krapf et al., 2010, Luo et al., 2012), sugiriendo, al igual que nuestros resultados, que varios miembros de esta familia estarían involucrados en el aumento de los niveles de fosforilación durante la capacitación.

Teniendo en cuenta que las SFKs son Tyr quinazas, su regulación sobre la fosforilación de los sustratos de PKA debería ser indirecta. Mientras nos encontrábamos realizando estos estudios, se publicó un trabajo en ratón postulando que SFKs inactivarían Ser/Thr fosfatasas, las cuales serían inhibitorias de la fosforilación de los sustratos de PKA (Krapf et al., 2010). Más aún, se ha demostrado, en otros sistemas celulares, que PP2A se inactiva mediante la fosforilación en un residuo Tyr en el C-terminal por alguna SFKs (Hu et al., 2009), sugiriendo que este podría ser el mecanismo molecular por el cual SFKs modularían a Ser/Thr fosfatasas en el espermatozoide de rata durante la capacitación. De esta forma, la presencia de SU6656/SKI606 inactivaría a SFKs produciendo un aumento en la actividad de Ser/Thr fosfatasas, las cuales desfosforilarían a los sustratos de PKA, y llevarían a una disminución de los niveles de fosforilación en Tyr. Si esta regulación estuviera involucrada en la capacitación del espermatozoide de rata, el efecto observado se debería revertir al exponer las células a un inhibidor de fosfatasas tal como es el OA. Nuestros resultados mostrando que la presencia de OA previno los efectos de SU6656 y SKI606 sobre las fosforilaciones de los sustratos de PKA y en residuos Tyr, apoyan el rol de SFKs en ambas fosforilaciones inducidas por la capacitación a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas y descartan la posible regulación directa de SFKs sobre la fosforilación de proteínas en Tyr. Asimismo, nuestras observaciones indican, por primera vez, la presencia de dos Ser/Thr fosfatasas sensibles a OA en el espermatozoide de rata: PP2A y PP1 γ 2. Considerando que PP2A es 100 veces más sensible a este compuesto que PP1 γ 2 (Ishihara et al., 1989), y que para revertir los efectos de SU6656/SKI606 se requirieron concentraciones bajas de OA (0,1 nM), PP2A podría ser un candidato a participar en la vía SFKs/fosfatasas en el espermatozoide de rata. Dado que estos resultados están en línea con aquellos reportados previamente en el ratón (Krapf et al., 2010), proponemos que esta cascada de regulación de los niveles de fosforilación estaría conservada en las dos especies. La modulación de la actividad de Ser/Thr fosfatasas por fosforilación en Tyr puso en evidencia la existencia, en el espermatozoide, de interacciones entre las vías que

conducen a la fosforilación de residuos en Ser/Thr y en Tyr. Para confirmar esta hipótesis, sería interesante evaluar la actividad enzimática específica de la PP2A en presencia de los distintos inhibidores en el espermatozoide de rata. En este sentido, cabe mencionar que en el laboratorio si bien contábamos con un anticuerpo que reconoce la fosforilación en Tyr sobre PP2A, el mismo no fue capaz de detectar ninguna banda en espermatozoides de rata. Por último, no podemos descartar que otras fosfatasa presentes en testículo (por ejemplo PP4, PP5, PP6 o PP7 (Fardilha et al., 2011a)) pero aún no descritas en espermatozoides, estén involucradas en la capacitación del espermatozoide de roedor.

Con el fin de identificar el punto de convergencia entre las vías de señalización de AMPc/PKA y SFKs/fosfatasa, realizamos experimentos en los cuales una de dichas vías se encontraba inhibida mientras que la otra estaba estimulada. Nuestros resultados mostraron la posible participación de SFKs y de fosfatasa sensibles a OA río arriba de la activación de PKA ya que el agregado de agonistas de AMPc e inhibidores de PDEs (por ejemplo pentoxifilina), los cuales aumentan los niveles de AMPc, no revirtieron los efectos inhibitorios del SKI606 sobre ambas fosforilaciones. De este modo, la inactivación de fosfatasa no fue suficiente para inducir ambas fosforilaciones cuando la vía AMPc/PKA no estaba estimulada (por ausencia de HCO_3^- o por presencia de H89, inhibidor de PKA). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que los entrecruzamientos entre las vías de AMPc/PKA y SFKs/fosfatasa se encontrarían a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA, por lo cual, los niveles basales de esta fosforilación resultarían de un balance finamente ajustado entre la activación de PKA y la inactivación de Ser/Thr fosfatasa mediada por SFKs. Un dato interesante para mencionar es el hecho de que el inhibidor de las PDEs, IBMX, y el inhibidor de sAC, KH7, que comúnmente se utilizan para bloquear la actividad de dichas enzimas en espermatozoides de diferentes especies, carecieron de efecto sobre los niveles de fosforilaciones en el espermatozoide de rata. Estas observaciones sugieren diferencias de especie respecto a la permeabilidad de la membrana del espermatozoide, o la existencia de diferencias en las características de las enzimas de rata y de otras especies.

Nuestros estudios orientados a investigar la relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la capacitación de rata indicaron que la modulación de la actividad de fosfatasa por SKI606 y OA tuvo un impacto significativo en diferentes eventos funcionales dependientes de la capacitación. En primer lugar, nuestros resultados mostraron que la motilidad total del espermatozoide disminuyó por la inhibición de SFKs tal como se

describiera previamente en el ratón (Baker et al., 2006, Krapf et al., 2010). En este sentido, existen evidencias que sugieren que la fosforilación de proteínas en Tyr en la cola del espermatozoide podría estar relacionada con el desarrollo de la motilidad (Mahony y Gwathmey, 1999, Nassar et al., 1999, Si y Okuno, 1999). El hecho de que la presencia de OA también revirtiera el efecto del SKI606 sobre la motilidad espermática, reveló la participación de la vía SFKs/fosfatasa en la motilidad asociada a la capacitación.

Considerando que se ha descrito que durante la capacitación se induce la relocalización de IZUMO de la región dorsal al segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Harrison y Gadella, 2005), evaluamos la localización de esta proteína en los espermatozoides incubados bajo los distintos tratamientos como una forma de analizar el estado capacitante de los mismos. Los resultados revelaron que un mayor número de espermatozoides presentaron a IZUMO en la región dorsal en presencia de los inhibidores de SFKs, y que el agregado de OA promovió la relocalización aún en presencia de SU6656 o SKI606, confirmando que esta vía de señalización estaría involucrada en la capacitación.

Nuestros resultados también demostraron que la exposición de espermatozoides de rata a SU6656 o SKI606 durante el período de capacitación disminuyó los niveles de RA, sugiriendo la participación de SFKs durante la capacitación y/o la RA. En este sentido, es importante destacar que nuestros estudios sobre la RA utilizando no sólo SU6656/SKI606 sino también OA confirmaron la novedosa participación de SFKs en el proceso de capacitación a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasa. Por otro lado, nuestras observaciones mostraron que la exposición a OA durante la capacitación induce la RA, lo cual coincide con lo descrito en el espermatozoide bovino, utilizando otro inhibidor de Ser/Thr fosfatasa (Caliculin-A, (Adachi et al., 2008)). Los últimos resultados evaluando la funcionalidad espermática indicaron que la vía de señalización SFKs/fosfatasa estaría involucrada en la regulación de la fosforilación en Tyr e impactaría sobre otros eventos del proceso de capacitación tales como la motilidad, la RA y la relocalización de proteínas hacia el segmento ecuatorial.

Teniendo en cuenta que SFKs podrían estar modulando no sólo el proceso de capacitación sino también la RA, tal como fuera reportado con anterioridad (Varano et al., 2008), evaluamos la participación de dichas quinasas en la RA propiamente dicha. Para estos experimentos los espermatozoides fueron capacitados por 4 hs sin la presencia de los inhibidores, agregando luego los compuestos junto con la

progesterona. Los resultados revelaron que mientras no se produjo cambios en la RA espontánea, se redujeron los porcentajes de RA inducida por progesterona, de forma similar a lo reportado en el espermatozoide humano (Varano et al., 2008), sugiriendo que SFKs también estarían regulando el proceso de exocitosis acrosomal en el espermatozoide de rata.

Una posible explicación al hecho de que la vía SFKs/fosfatasa esté involucrada en la redistribución de proteínas y en la RA es que ejerza algún efecto sobre el pH intracelular, el cual es fundamental para estos dos eventos (Visconti et al., 2002). Por otro lado, tanto SFKs como Ser/Thr fosfatasa podrían ser capaces de interactuar y modular la actividad de otras enzimas o moléculas importantes para la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide que ocurre durante la capacitación. En este sentido, existen evidencias de que SFKs (Src) estimulan a la enzima fosfolipasa (Finkelstein et al., 2010), generando segundos mensajeros que actuarían como mediadores de la RA (Roldan y Fleming, 1989, Roldan y Fragio, 1993, Etkovitz et al., 2009).

A pesar de que la fosforilación de proteínas en Tyr representa un evento intracelular necesario para la capacitación, su ocurrencia no permite evaluar la compleción de este proceso (Visconti et al., 1999). Teniendo en cuenta que únicamente el espermatozoide que está capacitado y reaccionado es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, la capacidad fusogénica del espermatozoide resulta un buen indicador de un proceso de capacitación completo (Yanagimachi, 1994). Nuestros resultados aportaron evidencias de que SFKs regularían la expresión de la capacidad fusogénica en la rata ya que los espermatozoides incubados en un medio capacitante conteniendo los inhibidores de esta familia presentaron una disminución en su capacidad de penetrar ovocitos sin ZP. La presencia de estos inhibidores durante la capacitación también afectó la expresión de la capacidad del espermatozoide de ratón de fertilizar ovocitos con ZP (Krapf et al., 2010). Debido a las conocidas dificultades que presenta la realización de ensayos de fertilización *in vitro* de ovocitos con ZP en la rata, no hemos podido evaluar el rol de esta vía en la interacción espermatozoide-ZP. Considerando que en los experimentos recién descritos, la presencia de los compuestos podría estar afectando a los espermatozoides durante la capacitación y/o la co-incubación de gametas, se llevaron a cabo controles con el fin de discriminar entre estas dos posibilidades. En este sentido, el hecho de que los espermatozoides capacitados en ausencia de SKI606/SU6656 y co-incubados con ovocitos en presencia de los inhibidores presentaran un alto porcentaje de fertilización, indicó que

estos compuestos ejercerían efectos sobre el proceso de capacitación y no sobre la etapa específica de interacción de gametas.

Considerando que el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide refleja la ocurrencia de la capacitación funcional, nuestros estudios demostrando que la presencia de SU6656 o SKI606 inhibió dicha capacidad, y que la adición de OA revirtió este efecto negativo, apoyan fuertemente la relevancia funcional de la vía SFKs/fosfatasas en la capacitación del espermatozoide de rata. Teniendo en cuenta que para que los espermatozoides se fusionen con la membrana plasmática del ovocito se requiere la ocurrencia de la RA y la redistribución de proteínas al segmento ecuatorial, nuestros resultados estarían en concordancia con la inhibición de estos dos eventos en presencia de los bloqueantes de SFKs y la posterior reversión por la presencia de OA. Más aún, dado que se describió la presencia de proteínas fosforiladas en la cabeza del espermatozoide (Urner et al., 2001, Asquith et al., 2004) y que espermatozoides unidos al oolema mantienen la fosforilación en el flagelo, sugiriendo que la fosforilación en Tyr podría ser necesaria para la fusión de gametas (Urner y Sakkas, 2003), el efecto de SU6656 o SKI606 sobre la capacidad fertilizante podría ser debido al bloqueo en la fosforilación en Tyr de ciertas proteínas requeridas para la fusión.

Por otro lado, la exposición de los espermatozoides sólo a OA produjo una pequeña disminución en el porcentaje de ovocitos fertilizados, la cual parecería deberse a un efecto negativo sobre la interacción entre las gametas a juzgar por el hecho de que se observaron valores similares de inhibición cuando el OA se encontraba presente en el período de capacitación o sólo en la co-incubación de gametas. Dicha inhibición podría, por lo tanto, deberse a alteraciones tanto en los espermatozoides como en los ovocitos. En este sentido, se ha reportado que el OA inhibe el reinicio de la meiosis en el ovocito de ratón (Moride et al., 2012), apoyando la idea de que este compuesto esté afectando la capacidad fusogénica del ovocito en nuestros experimentos.

En conclusión, nuestros resultados indican la existencia de dos vías de señalización necesarias para la ocurrencia de la fosforilación en Tyr: una dependiente de la activación de PKA, y otra que involucra la inactivación de Ser/Thr fosfatasas mediada por SFKs. Además, nuestras observaciones muestran que ambas cascadas convergen a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA y serían necesarias para alcanzar un estado funcional de capacitación en el espermatozoide de rata. Estos resultados apoyan la idea de que las principales vías de señalización que participan en la

capacitación del espermatozoide de roedor se encuentran evolutivamente conservadas.

Se han reportado diferencias en los eventos moleculares del proceso de capacitación en las diferentes especies, tales como el tiempo de incubación requerido *in vitro* para alcanzar un estado funcional completo de capacitación, el cual es diferente entre las distintas especies (90 min para el ratón (Visconti et al., 1995a), 4 hs para la rata (Da Ros et al., 2004) y 18 hs para el humano (Leclerc et al., 1996)), o la composición de los medios de capacitación (se requiere acetato de Na⁺ para la rata (Shalgi et al., 1981) mientras que sulfato de Mg⁺ para el humano (Biggers, 1971)). Por otra parte, se ha descrito que el espermatozoide de ratón presenta una proteína constitutivamente fosforilada (hexoquinasa/p95/ZRK) que no se encuentra fosforilada en el espermatozoide humano no capacitado (Kalab et al., 1994, Carrera et al., 1996). Otra diferencia reportada es que el principal canal de Ca²⁺ del espermatozoide (CatSper) es modulado por progesterona en el humano, pero no así en el ratón (Lishko et al., 2011). Todas estas observaciones revelan la especie-especificidad de este proceso. En base a ello, y por sus implicancias clínicas, a continuación, estudiamos la existencia y participación de las distintas vías de señalización en el proceso de capacitación en el espermatozoide humano.

Dado que en la literatura existe una alta heterogeneidad en los medios de incubación y en los tiempos empleados para lograr la correcta capacitación del espermatozoide humano (O'Flaherty et al., 2004, Brenker et al., 2012, Itach et al., 2012, Orta et al., 2012, Li et al., 2013), en primer lugar, estudiamos la ocurrencia temporal de los eventos de señalización descritos en la sección anterior durante la capacitación del espermatozoide humano y su correlación con el estado funcional de las gametas. La actividad de PKA se evaluó a través del análisis de la fosforilación de los sustratos de PKA durante un amplio rango de tiempos de incubación (1 min a 18 hs) en medio capacitante BWW, el cual permite el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide humano (Cohen et al., 2001).

Los resultados de Western blot y de IFI revelaron un incremento inmediato (1 min) de la fosforilación de los sustratos de PKA en presencia de HCO₃⁻ que permaneció constante a lo largo de toda la incubación. Estos niveles de fosforilación no fueron detectados en espermatozoides no capacitados o incubados en ausencia de HCO₃⁻. Las bandas fosforiladas y la marca fluorescente en la cola del espermatozoide correspondieron a blancos específicos de PKA ya que aumentaron en presencia del

análogo de AMPc (dbcAMP) y el inhibidor de las PDEs (IBMX) y disminuyeron en respuesta a H89. De forma interesante, la localización de proteínas fosforiladas por PKA en el flagelo fue consistente con la localización de la subunidad reguladora de PKA (Pariset y Weinman, 1994), de sAC (Hess et al., 2005) y de proteínas fosforiladas en Tyr (Carrera et al., 1996, Ficarro et al., 2003) en el espermatozoide humano. A pesar de que el aumento de la fosforilación de los sustratos de PKA por la presencia de inductores de la capacitación del espermatozoide humano ya fue previamente reportado (O'Flaherty et al., 2004, Bedu-Addo et al., 2005, Moseley et al., 2005, Shahar et al., 2011), nuestros estudios analizan por primera vez la ocurrencia de este evento durante toda la capacitación (desde 1 min a 18 hs) y en relación con otros eventos que ocurren durante este proceso. Más aún, las condiciones de capacitación utilizadas permitieron detectar un gran número de proteínas fosforiladas en Ser/Thr por PKA en comparación con otros trabajos publicados (O'Flaherty et al., 2004, Bedu-Addo et al., 2005, Moseley et al., 2005, Shahar et al., 2011).

Consistente con los estudios de fosforilación de los sustratos de PKA, la evaluación de la cinética de los niveles de AMPc demostró el requerimiento absoluto de HCO_3^- para el incremento de los niveles de este mensajero, los cuales alcanzan el máximo al minuto de incubación. Más aún, la rápida subida en AMPc y la fosforilación de los sustratos de PKA observada en nuestros estudios serían dependientes de la actividad de sAC tal como se desprende del hecho de que KH7 fue capaz de inhibir ambos eventos. El hallazgo de que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA se incrementaron rápidamente durante la capacitación está de acuerdo con datos previos sugiriendo que el HCO_3^- ingresaría en la célula inmediatamente por el co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Demarco et al., 2003). De manera interesante, el aumento temprano en la concentración de AMPc fue seguido de un descenso rápido hasta alcanzar niveles similares al control (en ausencia de HCO_3^-) tras una 1 h de incubación. Mientras que un grupo había reportado que los niveles de AMPc se mantienen constantes durante toda la capacitación (Lefievre et al., 2002), otro describió, de forma similar a nuestras observaciones, la ocurrencia de un pico al minuto de incubación en medio capacitante, seguido de niveles bajos luego de las 2 hs de incubación (Brenker et al., 2012). Esta disminución en la concentración de AMPc podría ser explicada como consecuencia de diferentes mecanismos tales como 1) la expulsión de este mensajero del espermatozoide durante la incubación, como se evidenció en células humanas leucémicas (Copsel et al., 2011) y, recientemente, en el espermatozoide bovino (Oszycka-Salut et al., 2014), 2) la posible existencia de un “*feedback*” negativo por el cual PKA regularía negativamente la actividad de sAC (Nolan et al., 2004, Burton y

McKnight, 2007) o bien, 3) la activación de PDEs que conduciría a la degradación de AMPc.

Las cinéticas de la producción de AMPc y de los sustratos de PKA fueron similares a las observadas en el espermatozoide de rata, lo cual indica que el aumento transitorio del AMPc y los niveles constantes de la fosforilación de los sustratos de PKA durante la capacitación estarían conservados entre las distintas especies. El descenso en los niveles de AMPc y la sostenida fosforilación inducida por PKA a lo largo de la capacitación indicarían que la concentración intracelular de AMPc que se alcanza en los espermatozoides capacitados podría ser suficiente para mantener la activación de PKA en ambas especies. Alternativamente, los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA podrían mantenerse altos aún en presencia de bajas concentraciones de AMPc por mecanismos todavía no descritos tales como la inactivación de fosfatasas. En este sentido, un trabajo reciente demostró que la actividad de Ser/Thr fosfatasas disminuye con la capacitación en el espermatozoide humano (Signorelli et al., 2013). Además, se ha postulado que la actividad de PKA no sería necesaria para los eventos tardíos asociados a la capacitación ya que se ha reportado que luego de 30 min en medio capacitante, esta enzima se inactiva en el espermatozoide de ratón (Morgan et al., 2008). Estos hallazgos sugieren que, luego de fosforilar a sus sustratos, PKA no sería la responsable de mantener los altos niveles de fosforilación observados durante el proceso de capacitación.

Nuestros resultados mostraron que, a diferencia de la detección rápida tanto de la fosforilación de los sustratos de PKA como de la producción de AMPc, la fosforilación en Tyr aumentó gradualmente en función del tiempo, llegando a niveles máximos a partir de 6 hs de incubación. Estas observaciones sugieren la existencia de eventos moleculares intermedios entre ambas fosforilaciones. La comparación de los patrones de bandas correspondientes a los sustratos fosforilados por PKA y a las proteínas fosforiladas en Tyr detectadas por Western blot revelan algunas bandas que difieren en los pesos moleculares, apoyando la idea de que algunas proteínas del espermatozoide estarían fosforiladas en Ser/Thr o en Tyr mientras que otras podrían presentar ambos tipos de fosforilación.

Tal como se observó para la fosforilación de sustratos de PKA, la fosforilación en Tyr también se inhibió por KH7 apoyando el rol propuesto para sAC en la ocurrencia de este último evento (Hess et al., 2005). Estos resultados sugieren que la adenilato ciclasa de membrana (mAC) contribuiría muy poco a la ocurrencia de la fosforilación

en el espermatozoide humano, en concordancia con lo reportado recientemente en el espermatozoide de ratón (Wertheimer et al., 2013). Aunque existen trabajos que no apoyan la relevancia funcional de las mACs durante la capacitación (Brenker et al., 2012), es posible que los eventos tempranos sean iniciados por la inducción de sAC por el HCO_3^- y que, hacia el final de la capacitación, las mACs sean estimuladas por ligandos externos apropiados (Fraser, 2010) generando un pico tardío en los niveles de AMPc. Dado que estos ligandos fisiológicos estarían ausentes durante la capacitación *in vitro*, resulta lógico pensar que, bajo nuestras condiciones, no pudimos evidenciar este aumento tardío. Por otro lado, resultados recientes del laboratorio del Dr. Pablo Visconti, demostraron la localización diferencial de sAC y mACs en el flagelo y la cabeza, respectivamente, en el espermatozoide de ratón (Wertheimer et al., 2013). Estas evidencias están a favor de la teoría de la compartimentalización de la producción del AMPc (Travis y Kopf, 2002), sugiriendo un posible mecanismo por el cual los efectores moleculares del AMPc podrían estar activados selectivamente durante la capacitación. El aumento de AMPc en el flagelo estaría involucrado en la fosforilación en Tyr mientras que su incremento en la cabeza participaría en la RA (Wertheimer et al., 2013). La co-localización entre los sustratos de PKA y sAC en el flagelo apoyan esta posibilidad.

Para estudiar la correlación entre la vía de señalización AMPc/PKA y el estado funcional de capacitación del espermatozoide humano, analizamos la capacidad de estas células de desarrollar la hiperactividad, la RA espontánea e inducida por progesterona y de fertilizar al ovocito. En primer lugar, observamos que los parámetros cinéticos de la motilidad asociados a la hiperactividad tuvieron valores mayores en los espermatozoides capacitados que en los no capacitados, en concordancia con lo reportado anteriormente en los espermatozoides humanos (Yanagimachi, 1994, O'Flaherty et al., 2004). Por lo tanto, se correlacionarían los niveles de fosforilación en Tyr durante la capacitación con los parámetros relacionados a la hiperactividad. En este sentido, se han descrito casos de pacientes astenozoospermicos cuyos espermatozoides además de presentar problemas en la motilidad, exhiben deficiencias en los niveles de fosforilación en Tyr (Buffone et al., 2006, Chan et al., 2009)

De forma similar a la fosforilación en Tyr, el porcentaje de células con capacidad de desarrollar la RA tanto de manera espontánea como inducida por progesterona aumentó paulatinamente durante la capacitación llegando a niveles significativamente diferentes respecto a los controles después de 6 h, los cuales no se modificaron a tiempos más largos. Estos estudios se realizaron utilizando 25 μM de progesterona

que es la mínima concentración de hormona requerida para inducir significativamente la RA en espermatozoides capacitados por 18 hs. Esta concentración es mucho mayor que la reportada como inductora del canal de Ca^{2+} CatSper (0,5 nM) en el espermatozoide humano (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), sugiriendo que la progesterona podría tener otros blancos en el espermatozoides además de CatSper.

Como se mencionó anteriormente, la fosforilación de proteínas en Tyr representa un evento necesario para la capacitación pero no indica la compleción de este proceso (Visconti et al., 1995a). Teniendo en cuenta que por razones éticas no es posible realizar ensayos de fertilización *in vitro* utilizando gametas humanas, la capacidad fertilizante del espermatozoide humano fue analizada a través del ensayo heterólogo denominado HOPT, que evalúa la capacidad de los espermatozoides humanos capacitados de fusionarse e incorporarse a ovocitos de hámster. En estos ensayos, la ZP es removida de los ovocitos dado que, según se describiera en la Introducción, dicha matriz es una de las barreras más eficientes para impedir la fertilización entre diferentes especies. Bajo condiciones capacitantes, observamos que los espermatozoides humanos precisan al menos 6 hs de incubación para estar en condiciones de fertilizar ovocitos de hámster sin ZP, en concordancia con el aumento de la RA durante la capacitación.

En conjunto, estas observaciones indican que los espermatozoides sufrirían no sólo eventos muy tempranos tales como la producción de AMPc y la fosforilación de los sustratos de PKA, sino que también necesitarían activar vías de señalización de curso más lento con el fin de lograr un estado funcional de capacitación. Las cinéticas de los distintos eventos moleculares parecerían ser diferentes entre el espermatozoide de rata, ratón y el humano llegando a un estado completo de capacitación *in vitro* luego de distintos períodos de incubación según la especie.

Como se describiera en la primera sección de este capítulo, en el espermatozoide de rata, SFKs estarían modulando la fosforilación de los sustratos de PKA a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas. Sin embargo, en el espermatozoide humano, se había postulado que Src sería el intermediario entre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr, regulando directamente esta última fosforilación (Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008, Varano et al., 2008). Nuestros resultados muestran que SKI606 produjo una inhibición dosis-dependiente de ambas fosforilaciones en el espermatozoide humano, revelando el rol de SFKs “*upstream*” de la fosforilación mediada por PKA, e indicando que dichas quinasas no participarían directamente en la

regulación de la fosforilación de proteínas en Tyr en el espermatozoide humano. De forma interesante, la concentración de SKI606 requerida para el bloqueo de la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr fue al menos cinco veces menor a la requerida para la inactivación de esta vía en espermatozoides de ratón (Krapf et al., 2010) y rata (resultados de esta Tesis), sugiriendo que diferentes SFKs podrían estar involucrados en la capacitación según la especie. Por lo tanto, el hallazgo de que la inhibición de SKI606 tuviera lugar a una IC_{50} de 10 μ M sugiere que en el espermatozoide humano las quinasas Src y/o Abl estarían participando en dicha vía debido a su mayor sensibilidad a la acción de SKI606 que otras SFKs (Bantscheff et al., 2007). En este sentido, ambas quinasas fueron descritas en el espermatozoide humano (Naz, 1998, Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008). Contrario a lo que ha sido publicado (Lawson et al., 2008, Mitchell et al., 2008, Varano et al., 2008), en nuestras condiciones experimentales, el compuesto SU6656 no mostró efecto inhibitorio sobre las fosforilaciones en el espermatozoide humano, y por lo tanto, no ha sido utilizado en los experimentos que forman parte de esta sección.

Nuestras observaciones mostrando que la exposición de los espermatozoides a OA revirtió los efectos del SKI606 sobre ambas fosforilaciones sugieren también la participación de SFKs en la capacitación del espermatozoide humano a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasa. Estos resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos en el modelo de rata como así también con los reportados previamente en ratón (Krapf et al., 2010). Al respecto, se han descrito dos Ser/Thr fosfatasas sensibles al OA en el espermatozoide humano: PP1 γ 2 y PP2A (Fardilha et al., 2011b). Sin embargo, los espermatozoides humanos requieren de una concentración mucho más alta de OA para revertir el efecto inhibitorio de SKI606 que los espermatozoides de roedor (100 y 0,1 nM, respectivamente), sugiriendo la participación de diferentes fosfatasas sensibles al OA en cada una de las especies. En base a ello, hemos propuesto a PP2A como mediadora de la capacitación en espermatozoides provenientes de rata, mientras que el hecho de que PP1 γ sea 100 veces menos sensible a OA que PP2A (Ishihara et al., 1989), apoya la participación de PP1 γ en la vía SFKs/fosfatasas en el espermatozoide humano. Más aún, algunas evidencias indican la importancia de la participación de PP1 γ 2 en la capacitación debido a que esta variante de splicing es la predominante en el espermatozoide (Smith et al., 1996), exhibe sitios predichos de fosforilación en Tyr en su molécula, y es esencial para la fertilidad en ratón (Sinha et al., 2012). Dado que concentraciones elevadas de OA pueden también afectar a la PP2A y que en otros modelos experimentales, se demostró que esta enzima puede inactivarse mediante fosforilación en Tyr inducida

por SFKs (Hu et al., 2009), no puede descartarse la posible participación de PP2A en conjunto con PP1 γ 2 como así también de otras fosfatasa (PP4, PP5, PP6 o PP7) en la capacitación del espermatozoide humano (Fardilha et al., 2011b). En este sentido, la identificación de fosfatasa específicas del espermatozoide involucradas en la capacitación espermática podría proveer información relevante para el futuro desarrollo de anticonceptivos masculinos y de tratamientos de infertilidad.

A continuación, dilucidamos el punto de entrecruzamiento de las dos cascadas involucradas en el aumento de la fosforilación en Tyr en el espermatozoide humano. Para ello, se realizaron los mismos esquemas experimentales que los utilizados en el modelo de la rata, en los cuales una de las vías fue estimulada mientras que la otra fue bloqueada utilizando distintas estrategias. Nuestros resultados confirmaron que la participación de SFKs y de fosfatasa sensibles a OA sería río arriba de la activación de PKA ya que la adición de agonistas de AMPc y el inhibidor de PDEs no revirtió los efectos inhibitorios de SKI606 sobre las fosforilaciones de los sustratos de PKA y en Tyr. De forma similar, la inactivación de fosfatasa no fue suficiente para inducir ninguna de las dos fosforilaciones cuando la vía AMPc/PKA fue inhibida, por la ausencia de HCO₃⁻ o por la presencia de H89. En conjunto, estas observaciones apoyan la hipótesis de que el punto de convergencia entre las vías de AMPc/PKA y SFKs/fosfatasa se encontraría a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA, similar a lo propuesto para el espermatozoide de rata. De acuerdo a esto, los niveles basales de esta fosforilación resultarían de un balance finamente regulado por la activación de PKA y la inactivación de Ser/Thr fosfatasa mediada por SFKs. El hecho de que los sustratos de PKA (presente trabajo) y PP1 γ 1 (Fardilha et al., 2011b) se encuentren localizados en el flagelo del espermatozoide, apoya fuertemente esta hipótesis.

La vía SFKs/fosfatasa también tendría relevancia funcional para la capacitación del espermatozoide humano ya que hemos observado que la modulación de la actividad de SFKs por SKI606 tuvo un impacto significativo en diferentes eventos tales como motilidad, RA y capacidad fertilizante. Mientras reportes previos mostraron que los parámetros correspondientes a la motilidad del espermatozoide humano no se modifican por la inhibición de SFKs (Varano et al., 2008), nuestros resultados revelaron una disminución significativa en varios parámetros asociados a la hiperactividad en los espermatozoides expuestos a SKI606. Esta discrepancia podría deberse a los diferentes inhibidores de SFKs empleados (SU665 versus SKI606). La exposición a OA revirtió esta inhibición, indicando que la vía SFKs/fosfatasa estaría

regulando eventos asociados a la capacitación tales como la hiperactividad del espermatozoide, requerida para la penetración del cúmulus y la ZP. Al respecto, estudios previos demuestran que las fosfatasa sensibles a OA estarían involucradas en la inducción de la hiperactividad en espermatozoides de hámster (Si y Okuno, 1999).

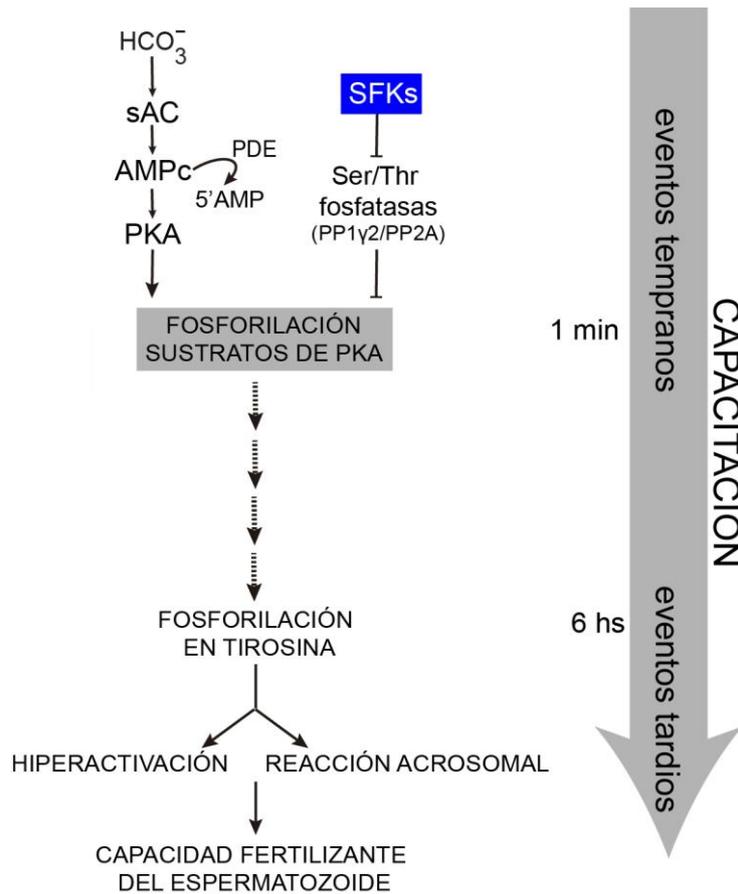
Nuestros resultados también indican que la exposición de espermatozoides humanos a SKI606 durante la capacitación no modificó los niveles de RA espontánea, pero previno la reacción inducida por progesterona, sugiriendo la participación de SFKs durante la capacitación y/o la RA tal como se describió previamente (Varano et al., 2008). Sin embargo, nuestros estudios de reversión con OA sobre la RA demostraron no sólo el rol de SFKs en la capacitación del espermatozoide humano sino que, además, revelaron que su rol sería a través de la inactivación de Ser/Thr fosfatasa. Aunque las observaciones anteriores sugieren un rol de las fosfatasa en la adquisición del estado capacitante, estos últimos estudios no permiten descartar la posibilidad de que la inactivación de Ser/Thr fosfatasa afecte directamente proteínas requeridas para la RA y/o hiperactividad. La localización en el flagelo de PKA y sus sustratos como así también de las proteínas fosforiladas en Tyr argumentan en contra de su participación en la RA. No obstante, dado que se ha descrito que la fosforilación en Tyr podría ocurrir también en la cabeza del espermatozoide (Urner et al., 2001, Asquith et al., 2004), que Src se encontraría tanto en el flagelo como en la región acrosomal, y que nuestros resultados en rata sugieren la participación de SFKs en la RA no podemos descartar la participación directa de esta vía en el proceso de exocitosis acrosomal en el espermatozoide humano

Considerando que el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide refleja la ocurrencia completa del proceso de capacitación, nuestros resultados demostrando que el SKI606 inhibe la habilidad del espermatozoide para penetrar el ovocito de hámster sin ZP y que la adición de OA revierte este efecto negativo, indicaron la relevancia de la vía SFKs/fosfatasa para la capacitación del espermatozoide humano. Más aún, la falta de efecto sobre la capacidad fertilizante y la fosforilación en Tyr al adicionar el SKI606 sólo en el medio de la co-incubación de gametas reafirmó la idea de que SFKs regularían la capacitación, generando así un impacto sobre el proceso de fertilización. Dado que se ha postulado que la fosforilación en el flagelo podría estar asociada también a la interacción de las gametas (Urner y Sakkas, 2003), los efectos de los inhibidores sobre la capacidad fertilizante podrían ser atribuidos a los cambios en la fosforilación en Tyr generados por los compuestos durante la capacitación del

espermatozoide. Aunque la presencia de los inhibidores no afectó la RA espontánea en el espermatozoide humano, es posible que se haya modificado la localización de proteínas importantes para la capacidad de fusión, tal como se observó con la proteína IZUMO en el espermatozoide de rata generando, en consecuencia, la disminución en el porcentaje de fertilización.

En conjunto, nuestros resultados apoyan fuertemente la existencia de dos vías de señalización involucradas en el aumento de fosforilación en Tyr asociados a la capacitación. La primera involucraría la entrada de HCO_3^- y la estimulación de sAC generando, en consecuencia, un aumento en los niveles de AMPc y la activación de PKA. La otra vía dependería de la inactivación de Ser/Thr fosfatasas (PP1 γ 1 y PP2A) mediada por SFKs (**Modelo 1**). Asimismo, nuestras observaciones proveen evidencias convincentes de que ambas vías de señalización convergen tempranamente a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA y son requeridas para alcanzar un estado funcional de capacitación en el espermatozoide humano. De forma interesante, mientras que estos estudios indican que las principales cascadas de señalización que participan en la capacitación del espermatozoide humano se encuentran evolutivamente conservadas, las SFKs y las Ser/Thr fosfatasas involucradas en la capacitación en el espermatozoide humano parecen ser diferentes de aquellas requeridas para la capacitación del espermatozoide de roedor, revelando la especificidad de especie de los mecanismos moleculares que subyacen a este clave proceso reproductivo.

Teniendo en cuenta que nuestros resultados analizando la correlación espacio-temporal entre las dos vías de señalización como así también el estado funcional del espermatozoide contribuirán a una mejor comprensión de los mecanismos que conducen a la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide humano. Finalmente, es importante mencionar que, a diferencia de otros tipos celulares, el espermatozoide depende más fuertemente de modificaciones post-traduccionales como reguladores de su función, ya que el mismo es transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar proteínas. De este modo, la identificación de las proteínas que sufren fosforilaciones en Tyr permitirá no sólo esclarecer la relevancia de dichas modificaciones post-traduccionales para la función espermática sino contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para aquellos pacientes con deficiencias en moléculas involucradas en el proceso de capacitación.



Modelo 1: Cascadas de señalización involucradas en el proceso de capacitación.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo publicado: “*Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases*”. **Battistone MA**, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. *Molecular Human Reproduction* 2013 Sep;19(9):570-80.

CAPÍTULO 2

Dada la importancia del Ca^{2+} para la fisiología del espermatozoide, en este capítulo exploramos los mecanismos moleculares involucrados en la decodificación de las señales que involucran al Ca^{2+} durante la capacitación del espermatozoide humano. Para ello, evaluamos en primer lugar el impacto de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sobre la fosforilación de los sustratos de PKA, la cual no había sido estudiada hasta el momento. Los resultados indicaron que dicha fosforilación no se modifica por exposición de los espermatozoides a distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ o bien a EGTA, que reduce la concentración de Ca^{2+} a valores cercanos a cero. Como otra aproximación, los espermatozoides fueron incubados en medio control (BWW) o en medio sin el agregado de Ca^{2+} ($\ominus \text{Ca}^{2+}$) pero conteniendo distintas concentraciones de HCO_3^- , con el objetivo de modular la fosforilación dependiente de PKA. Bajo estas condiciones, sin embargo, tampoco se observaron grandes cambios a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA, sugiriendo que el efecto del Ca^{2+} no sería río arriba de PKA. Estos resultados difieren de los hallados por otros grupos mostrando que la incubación de espermatozoides humanos en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ produce una disminución de la activación de sAC y, en consecuencia, una bajada en los niveles de AMPc (Jaiswal y Conti, 2003, Torres-Flores et al., 2011), sin generar cambios en la actividad de PDEs (Lefievre et al., 2002). Una posible explicación para estas diferentes observaciones podría ser que los niveles basales de AMPc detectados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ sean suficientes para inducir y mantener la fosforilación de los sustratos de PKA. En este sentido, en el Capítulo 1 de esta Tesis, observamos que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA se mantienen constantes durante la capacitación aunque los valores de AMPc bajen (Battistone et al., 2013), posiblemente por inactivación de Ser/Thr fosfatasas que regularían negativamente esta fosforilación. Por otro lado, el haber detectado niveles constantes de los sustratos fosforilados de PKA durante la capacitación también estaría en conflicto con la activación de la sAC por Ca^{2+} ya que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado durante dicho proceso, estimularía a la sAC llevando a la activación de PKA y, por ende, a un incremento en los niveles de sus sustratos fosforilados. Alternativamente, la falta de efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación de los sustratos de PKA podría deberse a efectos compensatorios entre enzimas dependientes de Ca^{2+} responsables de las vías de señalización que, finalmente, llevarían a un estado de equilibrio en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA. En conjunto, estas evidencias no descartan un efecto del Ca^{2+} río arriba de la fosforilación de los sustratos de PKA, pero sugieren que el efecto resultante del Ca^{2+} no produciría

modificaciones en los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA en espermatozoides humanos.

Por otro lado, observamos un aumento en la fosforilación en Tyr en función de la disminución de la $[Ca^{2+}]_e$ en concordancia con reportes previos (Luconi et al., 1996, Carrera et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003, Baker et al., 2004). Asimismo, cuando los espermatozoides fueron incubados en $\ominus Ca^{2+}$, las proteínas fosforiladas en Tyr fueron detectadas más tempranamente o a concentraciones menores de HCO_3^- . Estos resultados podrían deberse a un aumento de la actividad de Tyr quinasas (Luconi et al., 1996) por incremento en la concentración temprana de ATP (Baker et al., 2004, Torres-Flores et al., 2011). En concordancia con esta posibilidad, se detectaron concentraciones de ATP más altas en espermatozoides incubados en $\ominus Ca^{2+}$ que en aquellos incubados en medio control. Una posible explicación para esta observación sería que los espermatozoides en $\ominus Ca^{2+}$ presenten bajas $[Ca^{2+}]_i$, que lleven a una menor expulsión de Ca^{2+} del interior celular dependientes de ATP y, en consecuencia, a un aumento en la concentración de ATP disponible. En este sentido, se ha reportado que los espermatozoides expuestos a tapsigargina, un inhibidor de la bomba endoplásmica intracelular de Ca^{2+} , presentan un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Dorval et al., 2003), generando una disminución en la concentración del ATP (Baker et al., 2004) y en la fosforilación en Tyr (Luconi et al., 1996, Baker et al., 2004). Una posibilidad alternativa sería que este aumento se generara como consecuencia de la disminución en la hiperactividad observada en $\ominus Ca^{2+}$, la cual, al depender también del ATP, generaría una acumulación del mismo. Por otro lado, considerando que la falta de Ca^{2+} en el medio genera una despolarización de la membrana plasmática por aumento de Na^+ intracelular (Gonzalez-Martinez, 2003, Torres-Flores et al., 2011), no descartamos la posibilidad de que otro mecanismo molecular producido por las bajas $[Ca^{2+}]_e$ module la fosforilación en Tyr.

Aunque la $[Ca^{2+}]_e$ no produjo modificaciones en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA, la incubación de los espermatozoides en $\ominus Ca^{2+}$ en presencia de inhibidores farmacológicos de PKA o SFKs (H89 o SKI606, respectivamente) produjo un bloqueo en ambas fosforilaciones. Tal como fuera descrito en el Capítulo 1, ambas vías controlan los niveles de los sustratos fosforilados por PKA y, en consecuencia, el aumento de fosforilación en Tyr. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el incremento en la fosforilación en Tyr observado en $\ominus Ca^{2+}$ sería dependiente de la fosforilación de los sustratos de PKA y, por ende, los efectores

moleculares del Ca^{2+} estarían directa o indirectamente relacionados con dichos sustratos.

Con el fin de investigar los mecanismos moleculares dependientes de Ca^{2+} involucrados en las vías de señalización que conducen a la fosforilación en Tyr, estudiamos la participación de la CaM, sensor universal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en el incremento en la fosforilación en Tyr. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de esta proteína por W7 mantiene constantes los niveles de los sustratos fosforilados por PKA mientras que, en concordancia con reportes previos (Carrera et al., 1996, Leclerc et al., 1998), produce un incremento dosis-dependiente de la fosforilación en Tyr. Como se esperaba, no se observaron modificaciones en ninguna de las fosforilaciones al exponer los espermatozoides a W5, un análogo del W7 con menor actividad sobre CaM.

A continuación, estudiamos la participación de moléculas que son reguladas por CaM en la inducción de la fosforilación en Tyr. Considerando reportes previos que demuestran que la inhibición de la Ser/Thr quinasa-dependiente de CaM (CaMK), no afecta los niveles de fosforilación en Tyr en los espermatozoides humanos (Marin-Briggiler et al., 2003) o de caballo (Gonzalez-Fernandez et al., 2013), estudiamos el rol de otra molécula regulada por CaM, tal como la Ser/Thr fosfatasa PP2B. Si bien, la inhibición farmacológica de PP2B con Ciclosporina-A, no produjo modificaciones en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA, la fosforilación en Tyr se incrementó en función de la concentración del inhibidor. Este efecto sobre la fosforilación en Tyr está en concordancia con observaciones previas en el espermatozoide humano (Carrera et al., 1996) pero no con las evidencias reportadas en el espermatozoide de caballo (Gonzalez-Fernandez et al., 2013), posiblemente debido a las características propias de cada especie. De forma interesante, PP2B es una Ser/Thr fosfatasa, por lo cual su regulación sobre la fosforilación en Tyr sería indirecta mediada por algún mecanismo aún desconocido.

El hecho de que la inhibición de CaM y PP2B mimeticen el efecto generado al incubar los espermatozoides en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ sobre la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr, sugiere que ambas proteínas estarían involucradas en la vía de señalización dependiente del Ca^{2+} . Resultados similares se observaron al inhibir CaM y PP2B en $\ominus \text{Ca}^{2+}$, apoyando la idea que estos efectores de Ca^{2+} podrían también mediar el incremento en la fosforilación en Tyr observado bajo estas condiciones. Sin embargo, el efecto generado al inhibir CaM no sería debido exclusivamente a la regulación de la

actividad de PP2B sino que otros efectores moleculares modulados por este sensor de Ca^{2+} podrían estar involucrados en el aumento de la fosforilación en Tyr detectado en ΘCa^{2+} (tales como los canales de membrana regulados por CaM (canales de Na^+ voltajes sensibles) (Wang et al., 2014), la Inositol 1,4,5-triphosphate 3-quinasa (IP3 3-K) (Franco-Echevarria et al., 2014) o la Ca^{2+} ATPasa PMCA4 (Wilhelm et al., 2008)). Asimismo, es importante mencionar que los niveles de CaM disminuyen a lo largo de la capacitación en el espermatozoide humano (Leclerc et al., 1998), y que la distribución espacio-temporal de CaM y PP2B dentro del flagelo se modifica a lo largo de la capacitación en roedor (Chung et al., 2014). Por lo tanto, en concordancia con nuestras observaciones, la inhibición, degradación o relocalización de CaM durante la capacitación podrían ser eventos que favorezcan el aumento en la fosforilación en Tyr que ocurre durante este proceso.

Si bien nuestras observaciones indican que PP2B podría estar involucrada en el aumento de la fosforilación en Tyr en ΘCa^{2+} , los espermatozoides incubados en medio BWW o ΘCa^{2+} mostraron actividad similar de fosfatasa, sugiriendo que ésta no sería la razón del aumento en los niveles de fosforilación en ΘCa^{2+} , como fuera previamente sugerido (Carrera et al., 1996). No podemos descartar sin embargo, modificaciones en las actividades de algunas fosfatasa que no sean detectadas bajo las condiciones de nuestros ensayos.

Teniendo en cuenta que el Ca^{2+} modula la fosforilación en Tyr sin afectar los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA, y que los efectores moleculares que decodifican la señal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son pocos conocidos, analizamos Tyr quinasas reguladas por Ca^{2+} . En primer lugar, postulamos a Yes, una de las SFKs descrita en el espermatozoide, cuya actividad aumenta en ausencia de Ca^{2+} extracelular y pudiendo mediar el aumento de la fosforilación en Tyr (Leclerc y Goupil, 2002). Sin embargo, en base a los resultados del Capítulo 1 sugiriendo que SFKs estarían regulando la fosforilación de los sustratos de PKA y no directamente la fosforilación en Tyr, descartamos la posibilidad de que esta quinasa se encuentre regulando la fosforilación en Tyr río abajo de PKA. Otra enzima dependiente de Ca^{2+} sería PYK2, la cual es miembro de la familia FAK. En otros sistemas celulares, se ha reportado que PYK2, sería sensible a diferencias en los niveles de Ca^{2+} (Yu et al., 1996) y que su actividad podría ser modificada positiva o negativamente por las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ según el contexto celular. Más aún, en una misma célula, PYK2 podría modularse de forma distinta dependiendo del estímulo (Lysechko et al., 2010). La información sobre esta familia de quinasas en el espermatozoide es muy escasa, habiéndose postulado

solamente la presencia de PYK2 en el espermatozoide de ratón (Chieffi et al., 2003). Estas evidencias nos llevaron a investigar si las proteínas de la familia FAK (cuyos miembros son FAK y PYK2) estaban involucradas en el aumento de los niveles de fosforilación observados en el espermatozoide humano. En primer lugar, estudiamos la presencia de las proteínas de la familia FAK en el espermatozoide humano por la técnica de Western blot, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente a FAK y PYK2. Los resultados revelaron la presencia, por primera vez, de PYK2 pero no de su homólogo FAK, en el espermatozoide eyaculado humano. Cabe mencionar que mientras estábamos realizando estos estudios, se publicó un trabajo mostrando la activación de los dos miembros de la familia en los espermatozoides de caballo, al ser incubados en un medio sin el agregado de Ca^{2+} (Gonzalez-Fernandez et al., 2013). A diferencia de nuestras observaciones, ambos miembros de la familia fueron detectados en espermatozoides de caballo utilizando los anticuerpos que reconocen a las formas fosforiladas de cada una de las dos proteínas en vez de aquellos que reconocen a las proteínas en su conformación total (Gonzalez-Fernandez et al., 2013). Dado que los anticuerpos utilizados en el trabajo de caballo fueron producidos contra péptidos fosforilados de los dos miembros de la familia FAK, no se descarta la posibilidad de que, además de la proteína correspondiente, dichos anticuerpos que poseen motivos de reconocimiento similares, detecten al otro miembro de esta familia. A pesar de esta limitación, nuestros anticuerpos contra las proteínas totales, solamente reconocen a PYK2 en espermatozoides humanos. Asimismo, la discrepancia entre nuestras observaciones y las reportadas en caballo podría deberse a diferencias entre las distintas especies.

A continuación, estudiamos la relevancia de PYK2 en la inducción de la fosforilación en Tyr en ΘCa^{2+} . Para ello, los espermatozoides fueron incubados en este medio en presencia de distintas concentraciones de PF431396, un bloqueante competitivo y específico de la familia FAK (Buckbinder et al., 2007, Han et al., 2009). Bajo estas condiciones, observamos una disminución en los niveles de la fosforilación en Tyr, sugiriendo que PYK2 estaría involucrada en la inducción de dicha fosforilación evidenciada en ΘCa^{2+} . Por su parte, los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA no sólo no estaban disminuidos sino que se encontraban incrementados. Si comparamos ambos niveles de fosforilaciones, podemos concluir que cuando la fosforilación en Tyr comienza a disminuir, se incrementan los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA.

Se ha reportado que la actividad catalítica de PYK2 se regula por diversas fosforilaciones y que esta molécula presenta 4 posibles sitios de fosforilación en residuos Tyr: Tyr-402, Tyr-579, Tyr-580 y Tyr-881 (Gil-Henn et al., 2007). El modelo propuesto de activación de PYK2 en algunos tipos celulares, pero aún no demostrado en el espermatozoide, incluye la dimerización y la auto/trans-fosforilación en la Tyr-402 de PYK2 y el posterior reclutamiento de alguna SFKs (Park et al., 2004, Gil-Henn et al., 2007), que fosforila otros residuos Tyr presentes en PYK2, favoreciendo el aumento en su actividad (Tyr-579/Tyr-580) y proveyendo un nuevo sitio de unión a otras proteínas que contienen el dominio SH2 (Tyr-881) (Park et al., 2004). Si bien el mecanismo por el cual se inicia la primera fosforilación en PYK2 es poco conocido, evidencias más recientes revelaron que el dominio N-terminal denominado FERM y el dominio quinasa de PYK2 se unen y forman una estructura de auto-inhibición (Cai et al., 2008, Lietha y Eck, 2008). Por lo tanto, la estimulación de PYK2 podría causar, en primer lugar, la desestabilización entre la interacción de FERM y el dominio quinasa, permitiendo así, la apertura de la molécula, la dimerización, la auto-fosforilación en la Tyr-402 y el consecuente reclutamiento de SFKs.

Con el fin de evaluar la activación de PYK2 en Θ Ca^{2+} se analizaron los niveles de fosforilación en el residuo Tyr-402 de la molécula. Observamos que los espermatozoides incubados en Θ Ca^{2+} presentaron aumento en dicha fosforilación y una disminución en presencia de PF431396, confirmando así el aumento de la actividad de PYK2 en Θ Ca^{2+} . Estos resultados concuerdan con estudios previos reportando el aumento en la activación de Tyr quinetasas en espermatozoides incubados en Θ Ca^{2+} (Luconi et al., 1996, Baker et al., 2004). En este sentido, como mencionamos anteriormente, se ha postulado que Yes aumentaría su actividad en ausencia de Ca^{2+} extracelular y estaría involucrada en el aumento de la fosforilación en Tyr (Leclerc y Goupil, 2002). Sin embargo, el hecho de que PF431396 haya bloqueado la inducción de la fosforilación en Tyr en Θ Ca^{2+} sugiere que alguna Tyr quinasa sensible a PF431396 sería la molécula responsable de inducir dicha fosforilación. Si bien, en Θ Ca^{2+} , tanto Yes como PYK2 podrían estar estimuladas, la evidencia de que PF431396 no presente actividad inhibitoria sobre Yes (Han et al., 2009) y bloquee la fosforilación en Tyr inducida por la ausencia de Ca^{2+} , apoya la idea de que dicha SFKs esté ubicada río arriba de PYK2.

En concordancia con observaciones previas en el espermatozoide de caballo (Gonzalez-Fernandez et al., 2013) y en linfocitos T citotóxicos (Lysechko et al., 2010), nuestros resultados muestran que la inhibición de CaM por W7 aumenta los niveles de

fosfo-PYK2. El hecho de que W7 incremente tanto la activación de PYK2 como la fosforilación en Tyr sugiere que la regulación de PYK2 en Θ Ca^{2+} podría estar mediada por la acción de CaM. Aunque PYK2 presenta en su secuencia un sitio atípico de unión a CaM (Kohno et al., 2008), es probable que en espermatozoides humanos, la CaM regule negativamente a PYK2 por un mecanismo indirecto y aún desconocido. En este sentido, la regulación de PYK2 por CaM también es controversial. Algunos trabajos proponen la interacción directa entre las dos moléculas (Cai et al., 2008, Lietha y Eck, 2008), postulando que el sensor de Ca^{2+} se uniría al dominio FERM de PYK2 a pesar de que el mismo no sea un dominio típico de unión a CaM. Sin embargo, esta interacción directa y positiva no fue descrita en otros trabajos (Schaller, 2008), proponiéndose inclusive que la unión de CaM a este dominio generaría desestabilización con otras interacciones importantes y pérdida de la funcionalidad de PYK2 (Nunomura et al., 2014). En el caso del espermatozoide, la regulación de CaM sobre la actividad de PYK2 no sería a través de PP2B ya que la presencia de Ciclosporina-A no modificó los niveles de fosfo-PYK2. Estas observaciones concuerdan con resultados reportados en células neuronales, donde PP2B desfosforila a PYK2 regulando su translocación al núcleo, y no la autofosforilación en la Tyr-402 (Faure et al., 2013). Otro mecanismo para explicar el efecto del W7, podría ser a través de la regulación de CaM sobre la bomba ATPasa (PMCA4) requerida para mantener los niveles de Ca^{2+} intracelular (Wennemuth et al., 2003a). En este caso, la inhibición de CaM podría generar acumulación de ATP y, en consecuencia, aumento de la actividad de PYK2 y de la fosforilación en Tyr.

La mayor disponibilidad de ATP en el interior celular también podría generar un aumento en la actividad de PYK2 y otras quinasas. Esta posibilidad está apoyada por los mayores niveles de ATP observados en espermatozoides incubados con PF431396 comparado con el control ya que, al estar inhibida PYK2, no se utilizaría el ATP para las fosforilaciones ni para el desarrollo de la hiperactividad. Por último, no podemos excluir que PYK2 se active en Θ Ca^{2+} por otros mecanismos. En este sentido, es sabido que, en otras células, esta quinasa incrementa su actividad al responder ante estímulos estresantes (aumento de los radicales libres del oxígeno) (Avraham et al., 2000) y aumentos en la concentración del ATP extracelular (Block et al., 2011, Martel-Gallegos et al., 2013).

Dado que PYK2 parecería ser la responsable del aumento en la fosforilación de Tyr en Θ Ca^{2+} , estudiamos si PYK2 también estaba involucrada en el aumento de la fosforilación en Tyr que ocurre durante la capacitación del espermatozoide humano.

Los resultados revelaron que PYK2 se activa en función del tiempo de incubación durante dicho proceso en concordancia con el aumento de los niveles de fosforilación en Tyr observados anteriormente. Como PYK2 fue descrita como una quinasa dependiente de Ca^{2+} en otros sistemas (Lev et al., 1995), la activación de esta quinasa durante la capacitación podría ocurrir como consecuencia del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado durante este proceso (Baldi et al., 1991, Wall et al., 1994, Perry et al., 1997). Esta hipótesis fue apoyada por el hallazgo de que los espermatozoides expuestos al quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM presentaron niveles bajos de fosfo-PYK2 en comparación con el control.

La fosforilación de PYK2 está regulada por las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en distintos tipos celulares como neuronas (Lev et al., 1995), células epiteliales (Yu et al., 1996), megacariocitos (Hiregowdara et al., 1997), plaquetas (Raja et al., 1997) y cardiomiocitos (Hirovani et al., 2004), y PYK2 fue identificada inicialmente como una quinasa dependiente de Ca^{2+} . Si bien el mecanismo por el cual el Ca^{2+} regula a PYK2 aún no fue dilucidado completamente, esta modulación debería ser indirecta ya que PYK2 no presenta un sitio de unión al Ca^{2+} . En varios sistemas celulares se propusieron mecanismos regulatorios que involucran a la CAMK (Ginnan y Singer, 2002, Guo et al., 2005a) y la interacción directa de CaM con el dominio FERM (Kohno et al., 2008). No se sabe si todos estos mecanismos operan en todos los tipos celulares o si existen múltiples maneras de regular la actividad de PYK2 dependiendo del entorno celular. En este sentido, PYK2 puede activarse en respuesta a numerosos estímulos externos como la conglomeración de integrinas (Avraham et al., 2000, Ostergaard y Lysechko, 2005). Considerando que se ha reportado que las integrinas como laminina y fibronectina presentes en el cúmulus inducen el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la fosforilación en Tyr en el espermatozoide humano durante la capacitación (Tapia et al., 2011), y que en varios tipos celulares estas proteínas activan a FAK y PYK2 (Giancotti y Ruoslahti, 1999), es posible que PYK2 se estimule durante la capacitación por la presencia de integrinas en el tracto genital femenino.

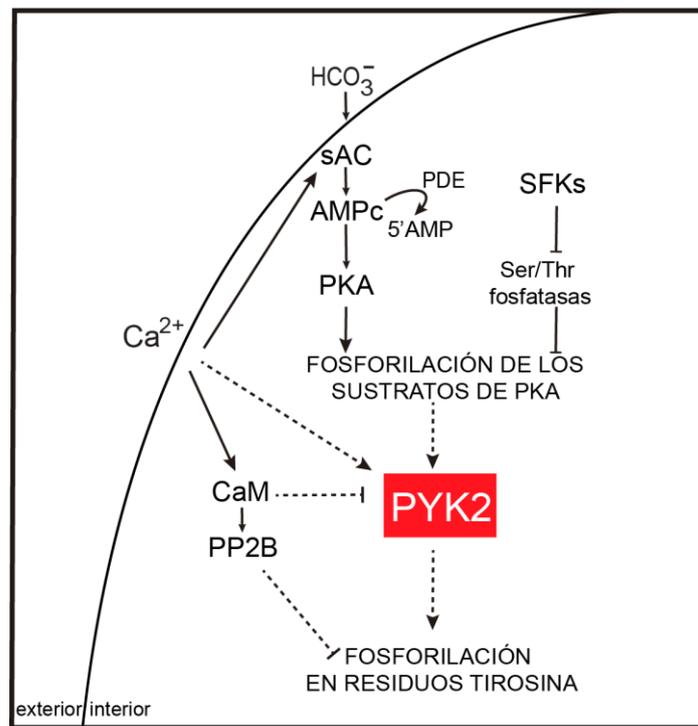
La activación de PYK2 en la capacitación fue confirmada al detectar solamente fosfo-PYK2 en extractos proteicos inmunoprecipitados con anti-PYK2 provenientes de espermatozoides capacitados y no en aquellos obtenidos a partir de células no capacitadas. En este sentido, es interesante mencionar que si bien fosfo-PYK2 y PYK2 fueron detectadas en la fracción insoluble de espermatozoides tratados con Tritón X-100, fue posible solubilizar a PYK2 mediante un tratamiento utilizado para la solubilización de proteínas que interactúan con el citoesqueleto, sugiriendo que PYK2,

al igual que lo que ocurre para las proteínas fosforiladas en Tyr (Galantino-Homer et al., 1997, Chung et al., 2014), se encontraría asociada al citoesqueleto.

La inhibición de los niveles de fosfo-PYK2 en espermatozoides capacitados en presencia de PF431396 apoya la activación de PYK2 durante la capacitación. Teniendo en cuenta que la activación de PYK2 se incrementó durante la capacitación, analizamos el rol de PYK2 en el aumento de la fosforilación en Tyr inducido durante este proceso. En primer lugar, se observó que el inhibidor bloqueó la fosforilación en Tyr, sugiriendo la participación de PYK2 en la inducción de dicha fosforilación. Sin embargo, no se detectaron disminuciones a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA. Este resultado es muy interesante debido a que representa la primera evidencia de una disociación entre ambas fosforilaciones. Más aún, a partir de una concentración igual o mayor a 3 μM de PF431396, se observó un incremento en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA que coincidió con la inhibición de la fosforilación en Tyr. Este hallazgo nos hizo pensar en la existencia de un “*feedback*” negativo que frenaría las fosforilaciones dependientes de PKA durante la capacitación. De este modo, las proteínas fosforiladas en Tyr modularían las actividades de PKA o de Ser/Thr fosfatasa que, a su vez, serían las que regulan los niveles de los sustratos fosforilados de PKA. En este sentido, un artículo reciente demostró que PKA puede ser fosforilada en Tyr durante la capacitación (Chung et al., 2014), abriendo la posibilidad de que esta fosforilación pueda cumplir un rol en el “*feedback*” negativo sugerido por nuestros resultados. En conjunto, proponemos que en nuestras condiciones experimentales, en las cuales está bloqueada la fosforilación en Tyr por PF431396, el “*feedback*” negativo no existiría y, en consecuencia, los niveles de la fosforilación de los sustratos de PKA se incrementarían. La existencia del “*feedback*” negativo también se evidenció en los experimentos llevados a cabo en ΘCa^{2+} en los cuales se observaron niveles altos de fosforilación en Tyr sin modificaciones en la fosforilación de los sustratos de PKA, posiblemente debido a que esta última fosforilación se encontrara frenada por los altos niveles de proteínas fosforiladas en Tyr.

A continuación, evaluamos las interacciones entre PYK2 y las cascadas de señalización descritas en el capítulo anterior. Cuando las vías de AMPc/PKA o SFKs/fosfatasa estaban estimuladas con dbcAMP/IBMX u OA, respectivamente, el inhibidor de PYK2 no afectó la fosforilación de los sustratos de PKA pero inhibió marcadamente la fosforilación en Tyr, sugiriendo que PYK2 sería un componente intermediario entre los sustratos fosforilados por PKA y la fosforilación en Tyr.

Asimismo, al inhibir farmacológicamente a PKA y SFKs, disminuyeron los niveles de fosfo-PYK2. Estas últimas observaciones confirmaron que PYK2 sería una de las moléculas responsables del aumento de la fosforilación en Tyr inducido por la capacitación, situándose por debajo de los sustratos fosforilados de PKA, y que su activación dependería directa o indirectamente de las vías de señalización que regulan los niveles de dicha fosforilación (**Modelo 2**).



Modelo 2. Cascadas de señalización involucradas en el proceso de capacitación. Las líneas de puntos indican regulaciones aún no dilucidadas completamente

Con respecto a la posible regulación de PYK2 por PKA, cabe mencionar que PKA es capaz de fosforilar a PYK2 en células neuronales permitiendo su translocación al núcleo y su activación como factor de transcripción (Faure et al., 2013). Sin embargo, la falta de transcripción de genes en el espermatozoide descartaría dicho mecanismo. Por otro lado, recientemente, se demostró que PKA estimularía indirectamente la fosforilación de PYK2 en Tyr en células dendríticas y células del hipocampo, a través de la inactivación de una Tyr fosfatasa (PTP-PEST) que desfosforila la Tyr-402 (Yang et al., 2013, Rhee et al., 2014). Este último mecanismo de regulación de PYK2 por PKA podría estar presente durante la capacitación del espermatozoide. Por su parte, la posible regulación de PYK2 por SFKs sugerida por nuestras observaciones, podría ocurrir a través de un mecanismo indirecto, regulando los niveles de los sustratos fosforilados de PKA, y/o directo ya que las SFKs interactúan y modulan positivamente la actividad de PYK2 en otros sistemas (Lysechko et al., 2010, Nika et al., 2010).

En resumen, demostramos que la Tyr quinasa PYK2 puede ser activada de dos formas: por un lado, mediante la exposición de los espermatozoides a bajos niveles de Ca^{2+} extracelular, probablemente por inactivación de la CaM o por algún mecanismo aún desconocido, y por otro lado, a través del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ junto con la activación de las cascadas que regulan la fosforilación de los sustratos de PKA durante la capacitación. Más aún, brindamos evidencias de que PYK2 sería una de las responsables del aumento de la fosforilación en Tyr (**Modelo 2**). Nuestra hipótesis es que PYK2 sería un sensor de diversas señales extracelulares, generando la integración y amplificación de las respuestas a los distintos estímulos. Por lo tanto, es importante tener en cuenta el contexto celular para comprender la función y regulación de PYK2.

Una vez estudiadas la presencia y la activación de PYK2 durante la capacitación del espermatozoide humano, se investigó la relevancia funcional de esta proteína analizando diferentes eventos asociados a la capacitación. En primer lugar, se evaluó la participación de PYK2 en el desarrollo de la hiperactividad espermática, observándose que mientras 10 μM de PF431396 afectó algunos de los parámetros cinéticos de la motilidad evaluada por CASA, la exposición a mayores concentraciones de PF431396 (30 μM) redujo significativamente todos los parámetros examinados en forma similar a lo observado tanto en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ como en presencia del inhibidor de SFKs (Capítulo 1). Las células tratadas con PF431396 (10 o 30 μM) o incubadas en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ mostraron disminución en los porcentajes de motilidad progresiva y de hiperactividad en comparación con el control. Dado que las proteínas fosforiladas en Tyr están localizadas en el flagelo y se encuentran asociadas a moléculas involucradas en el desarrollo de la hiperactividad, la inhibición en la fosforilación podría ser la razón del efecto en la hiperactividad. En este sentido, es importante mencionar que PYK2 se encuentra localizada en la cola del espermatozoide de ratón (Chieffi et al., 2003).

Dado que otro de los eventos que ocurren como consecuencia del proceso de capacitación es la RA, se analizó el efecto de PF431396 sobre los niveles de RA espontánea e inducida por progesterona. Bajo estas condiciones, se observó una disminución significativa de los porcentajes de RA estimulada por progesterona sin modificaciones en la RA espontánea. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente al inhibir la vía de señalización de SFKs en el espermatozoide humano ((Battistone et al., 2013) y Capítulo 1). Asimismo, los espermatozoides incubados en $\ominus \text{Ca}^{2+}$ presentaron menores niveles de RA espontánea e inducida respecto al control. Considerando que el inhibidor se encontraba presente tanto en el período de

capacitación como de inducción con progesterona, no podemos discriminar que el efecto detectado fue a nivel del proceso de capacitación o de modulación de la RA. Los resultados de RA observados son llamativos si consideramos que las fosforilaciones mayoritariamente se desarrollan en el flagelo. Sin embargo, como explicamos en el capítulo anterior, se describió la existencia de proteínas fosforiladas en Tyr en la cabeza del espermatozoide humano y de ratón (Galantino-Homer et al., 1997, Chung et al., 2014), las cuales podrían estar regulando la RA. Además, se reportó localización de PYK2 en el acrosoma del espermatozoide de ratón (Chieffi et al., 2003) apoyando la participación de dicha quinasa en la regulación de la RA. Si bien realizamos ensayos de inmunolocalización de PYK2 en el espermatozoide humano, no logramos detectar marcas específicas en ninguna de las condiciones ensayadas que incluyeron diferentes métodos de fijación, soluciones de permeabilización y condiciones de incubación del anticuerpo.

Para evaluar si los efectos inhibitorios sobre la RA y la motilidad tendrían algún impacto sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide humano, realizamos dos ensayos heterólogos diferentes. En primer lugar, se evaluó el efecto de PF431396 sobre la capacidad del espermatozoide humano de penetrar una matriz viscosa como lo es el *cumulus oophorus* del ratón, observándose una disminución en el número de espermatozoides dentro del cúmulus similar a lo encontrado para espermatozoides no capacitados. Este resultado es consistente con la reducción en la hiperactividad generada por la presencia de PF431396, ya que la hiperactividad es un requisito fundamental para que el espermatozoide logre penetrar dicha envoltura. Otro de los ensayos funcionales utilizados fue el test de HOPT que evalúa la capacidad de los espermatozoides humanos de fertilizar ovocitos de hámster sin ZP. En este caso, observamos que la exposición a 30 μM de PF431396 durante la capacitación generó una reducción del número de ovocitos fertilizados, sugiriendo que la inhibición de PYK2 durante la capacitación afectaría la capacidad del espermatozoide de fusionarse con el ovocito. Dicho efecto no se debería a la inhibición del fenómeno de fusión de membranas *per se* o a un efecto del PF431396 sobre los ovocitos ya que la presencia del inhibidor solamente durante el período de co-incubación de gametas a una concentración de 10 μM (correspondiente a la concentración de arrastre descrita en la sección Resultados) no produjo cambios en el porcentaje de ovocitos fertilizados.

Considerando que los espermatozoides necesitan desarrollar una motilidad vigorosa para penetrar el cúmulus y también sufrir la RA para fusionarse con el oolema, nuestros resultados apoyan la idea de que PYK2 jugaría un papel importante en la

adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide durante la capacitación. Además, el hecho de que diferentes parámetros funcionales fueran afectados al incubar los espermatozoides en Θ Ca^{2+} confirma evidencias previas acerca de la relevancia funcional de la señalización de Ca^{2+} en el proceso de fertilización del espermatozoide humano (Yanagimachi, 1978, Ahmad et al., 1995, Marin-Briggiler et al., 2003, Shahar et al., 2011). Al respecto, si bien las bajas $[\text{Ca}^{2+}]_e$ generaron un incremento en la fosforilación de PYK2 y en Tyr, estas condiciones no fueron suficientes para la expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide humano. Dicha expresión, requeriría de grandes inlfujos de Ca^{2+} a través de CatSper, los cuales producen incrementos sostenidos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Strunker et al., 2011) generados por la activación de los reservorios de Ca^{2+} (Lefievre et al., 2012). En concordancia con esta hipótesis, un trabajo reciente propone que la penetración de los espermatozoides humanos a través de un medio viscoso (comparable a lo evaluado en nuestro ensayo de penetración del cúmulus de ratón) sería inducida por la estimulación de CatSper, y que la hiperactividad se adquiriría al movilizar el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Alasmari et al., 2013a). Estas observaciones revelan que los mediadores de la señalización de Ca^{2+} llevan a comportamientos diferentes en el espermatozoide dependiendo de la fuente de Ca^{2+} involucrada (Alasmari et al., 2013a). En este sentido, se ha postulado que dentro de una célula especializada como el espermatozoide, la especificidad de la señal de Ca^{2+} estaría producida por la localización espacio-temporal del canal CatSper (Clapham, 2007) como de las moléculas de señalización que interactúan con el mismo (Chung et al., 2014). Estos hallazgos, junto al efecto inhibitorio de PF431396 sobre los diferentes parámetros funcionales del espermatozoide, apoyan la idea de que PYK2 podría actuar como plataforma integradora de señales de Ca^{2+} proveniente de diferentes fuentes, llevando a distintos eventos funcionales río abajo.

En conclusión, en este capítulo brindamos evidencias de que PYK2 actúa como un componente de la vía de señalización que involucra al Ca^{2+} en la fosforilación en Tyr, encontrándose ubicado río abajo de la activación de PKA. Más aún, se requeriría la activación de PYK2 para la adquisición y expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Estos resultados contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados no sólo en la fisiología del espermatozoide humano sino también en condiciones patológicas tales como las vinculadas a deficiencias en la cascada de señalización dependientes del Ca^{2+} . En este sentido, es importante de mencionar que han reportado asociaciones entre problemas de fertilidad y mutaciones en algunas moléculas relacionadas al Ca^{2+} tales como CAMK4, CatSper,

PMCA4, (Khattari et al., 2012, Alasmari et al., 2013b, Mohamed et al., 2013, Smith et al., 2013, Tamburrino et al., 2014).

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo publicado: "*Evidence for the involvement of Proline-rich Tyrosine Kinase 2 (PYK2) in tyrosine phosphorylation downstream of PKA activation during human sperm capacitation*". **Battistone MA**, Alvau A; Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros, VG, Cuasnicú PS. *Molecular Human Reproduction* Nov 2014, 20(11):1054-66.

CAPÍTULO 3

Como se mencionara a lo largo de esta Tesis la capacitación involucra la liberación de numerosas proteínas de la superficie del espermatozoide denominadas “factores decapacitantes”. Diversos estudios sugieren que la proteína epididimaria de rata CRISP1 podría actuar como uno de estos factores, dado que durante la capacitación de espermatozoides de rata, se produce la remoción de una gran cantidad de CRISP1 de la superficie de los mismos, que corresponde a la población asociada débilmente a la membrana por interacciones iónicas. Sin embargo, existe otra población de CRISP1 que permanece aún luego de la capacitación y está fuertemente unida, comportándose como una proteína integral de membrana (Kohane et al., 1980a, Kohane et al., 1980b, Cohen et al., 2000a). Los resultados presentados en esta Tesis mostrando que CRISP1 también se libera durante la capacitación de los espermatozoides de ratón, apoyan el rol decapacitante de esta proteína en el espermatozoide murino y son concordantes con observaciones previas indicando que CRISP1 es una de las proteínas que se remueve de la superficie de los espermatozoides murinos durante la capacitación *in vitro* (Nixon et al., 2006) y que su presencia inhibe la fosforilación en Tyr en la rata (Roberts et al., 2003). Con el fin de evaluar si la población débilmente unida de CRISP1 podría regular el proceso de capacitación en ratón, analizamos la influencia de CRISP1 sobre distintos eventos moleculares que ocurren durante dicho proceso. Por un lado, examinamos los efectos de impedir la liberación de CRISP1 de los espermatozoides durante la capacitación exponiendo a los mismos a la proteína purificada del epidídimo. Por otro lado, estudiamos las consecuencias producidas por la ausencia de CRISP1 en los espermatozoides KO durante la capacitación.

Teniendo en cuenta que la liberación de los factores decapacitantes que ocurre durante la capacitación permite que los espermatozoides incrementen los niveles de fosforilación en Tyr y desarrollen la hiperactividad (Fraser, 2010), la exposición a CRISP1, podría modular dichos procesos al impedir que la proteína débilmente unida se libere de los espermatozoides, desplazando el equilibrio de unión y liberación hacia una mayor asociación de CRISP1 a la membrana. Los resultados indicaron que la presencia de CRISP1 durante 90 min en condiciones capacitantes no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de los sustratos de PKA ni en Tyr. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Nixon y colaboradores (2006) en el modelo del ratón mostrando que una solución de proteínas con capacidad de inhibir la RA inducida por progesterona, no tuvo efecto inhibitorio sobre la fosforilación de proteínas en Tyr (Nixon et al., 2006).

Dado que la hiperactividad ocurre como consecuencia de la capacitación (Yanagimachi, 1994), evaluamos este patrón de motilidad en los espermatozoides expuestos a CRISP1. El hecho de que el agregado de CRISP1 haya inhibido ciertos parámetros cinéticos asociados a la hiperactividad indica que CRISP1 podría regular la capacitación de los espermatozoides de ratón. Asimismo, esta inhibición concuerda no sólo con la localización de CRISP1 en la cola del espermatozoide, sino también con evidencias mostrando que dicha proteína es capaz de unirse *in vitro* al flagelo del espermatozoides de rata (Roberts et al., 2003, Maldera et al., 2011). A su vez, nuestros resultados utilizando la técnica de CASA y mostrando la falta de efecto de CRISP1 sobre la motilidad total y progresiva son consistentes con observaciones previas del laboratorio, obtenidas por microscopía óptica, describiendo que la presencia de la proteína no afecta la motilidad total de las gametas (Busso et al., 2007).

Considerando que la hiperactividad es necesaria para que el espermatozoide pueda atravesar las envolturas que rodean al ovocito (Yanagimachi, 1994), la inhibición producida por CRISP1 sobre el número de espermatozoides que penetran el cúmulus de ratón, podría deberse a una disminución en la hiperactividad de los espermatozoides incubados en presencia de CRISP1. En este sentido, cabe mencionar resultados previos de nuestro laboratorio mostrando que la presencia de CRISP1 durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos con ZP, produce una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados como consecuencia de la unión de CRISP1 a los sitios complementarios en la ZP (Busso et al., 2007). En vista de nuestras recientes observaciones indicando la importancia de CRISP1 para el desarrollo de la hiperactividad, es posible que la inhibición en el porcentaje de ovocitos con ZP fertilizados se deba también al efecto inhibitorio de CRISP1 sobre la hiperactividad.

En cuanto a la participación de CRISP1 en la regulación de la RA, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la exposición de los espermatozoides a CRISP1 durante la capacitación no modifica los niveles de RA espontánea ni inducida por progesterona en ratón (Tesis Doctoral Julieta Maldera) pero sí en rata ((Roberts et al., 2003), Tesis Doctoral Julieta Maldera). Si bien no se conoce la razón de esta discrepancia, es posible que existan diferencias especie-específicas en las regulaciones de las vías de transducción de señales durante la capacitación, apoyando la importancia del estudio de dicho proceso en las distintas especies.

Evidencias en la bibliografía sugieren que los flujos de iones a través de la membrana del espermatozoide serían esenciales para que éste adquiriera la capacidad de fertilizar al ovocito, apoyando la participación de distintos canales iónicos durante la capacitación (Visconti et al., 2002, Darszon et al., 2006). Teniendo en cuenta que numerosas proteínas CRISPs de reptiles y mamíferos regulan canales iónicos (Mochca-Morales et al., 1990, Nobile et al., 1994, Yamazaki et al., 2002, Gibbs et al., 2008, Gibbs et al., 2011), es posible que la disminución en la hiperactividad observada en presencia de CRISP1 se deba a una inhibición de los canales iónicos del espermatozoide. Con el fin de estudiar esta hipótesis, se realizaron experimentos en colaboración con el laboratorio del Dr. Alberto Darszon (Universidad Nacional Autónoma de México, México), experto a nivel internacional en canales del espermatozoide. En primer lugar, evaluamos la actividad de CRISP1 sobre corrientes totales iónicas por la técnica de “*patch-clamp*”, detectando que CRISP1 inhibió aproximadamente 30% de estas corrientes en el espermatozoide testicular de ratón. Este efecto no se evidenció cuando las células fueron expuestas a la proteína desnaturalizada por calor, indicando la especificidad de la respuesta.

Dado que CRISP4 regula al canal de Ca^{2+} TRPM8 del espermatozoide (Gibbs et al., 2011), examinamos si CRISP1 también modula la actividad de este canal, mediante la técnica de “*patch-clamp*”, utilizando al Cs^+ como principal transportador. Similar a lo reportado para CRISP4, se observó un efecto inhibitorio de CRISP1 sobre los registros de corrientes catiónicas a través del canal TRPM8, en ausencia o en presencia de mentol, un clásico agonista de estos canales (Malkia et al., 2007, Martínez-Lopez et al., 2011), confirmando el rol modulador de CRISP1 sobre TRPM8.

En concordancia con la localización de TRPM8 en la cabeza del espermatozoide de ratón (Martínez-Lopez et al., 2011), este canal está involucrado en la RA ya que la presencia de sus activadores, mentol o icilin, incrementan el porcentaje de RA y los espermatozoides KO para dicho canal presentan deficiencias en este proceso (De Blas et al., 2009, Martínez-Lopez et al., 2011). Si bien, se ha descrito que TRPM8 está también localizado en la cola del espermatozoide y que sus inductores incrementan el batido del flagelo, los espermatozoides carentes de este canal no muestran alteraciones en la hiperactividad (Martínez-Lopez et al., 2011). Teniendo en cuenta estas observaciones, y que no se ha detectado corriente iónica a través de este canal en los espermatozoides epididimarios (Lishko et al., 2012, Zheng et al., 2013), en la actualidad, se cuestiona la relevancia funcional de este canal en el espermatozoide maduro. No obstante, dado que aún restan registrarse las corrientes a

través de TRPM8 en los espermatozoides capacitados de ratón, no se puede descartar que dicho canal se encuentre activo y participe durante el proceso de capacitación.

Considerando que las corrientes a través de TRPM8 fueron detectadas en espermatozoides testiculares (De Blas et al., 2009, Martínez-Lopez et al., 2011) pero no así en epididimarios (Lishko et al., 2012, Zheng et al., 2013), y que CRISP1 interactúa con los espermatozoides en el epidídimo, el siguiente paso fue investigar si CRISP1 sería capaz de regular el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide de ratón y humano denominado CatSper (Kirichok et al., 2006, Lishko y Kirichok, 2010). Para ello, se analizó el efecto de CRISP1 sobre las corrientes de dicho canal registradas por “*patch-clamp*” en espermatozoides epididimarios de ratón, encontrándose que la exposición a la proteína inhibe las corrientes a través de CatSper. En concordancia con estos resultados, la presencia de CRISP1 produjo una inhibición de la entrada de Ca^{2+} inducida por mentol, el cual también estimula las corrientes a través de CatSper en el espermatozoide humano (Brenker et al., 2012), apoyando la capacidad de CRISP1 de regular canales de Ca^{2+} . Con respecto a la regulación de CatSper, se sabe que la progesterona lo modula positivamente en el espermatozoide humano (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011). Sin embargo, en el espermatozoides de ratón, esta regulación no ha sido observada, habiéndose reportado sólo estimulación del canal por la presencia de BSA (Xia y Ren, 2009). Más aún, no se conoce en esta especie otras moléculas moduladoras de la actividad de CatSper. De este modo, nuestros resultados estarían identificando a CRISP1 como un regulador endógeno de CatSper, canal esencial para la fertilidad masculina (Ren et al., 2001, Smith et al., 2013).

Dado que CatSper participa en la regulación de la hiperactividad (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), la modulación negativa que ejerce CRISP1 tanto sobre ciertos parámetros cinéticos asociados a la hiperactividad como sobre el aumento de Ca^{2+} constituye otra evidencia a favor de la actividad regulatoria de CRISP1 sobre CatSper en el espermatozoide de ratón. De forma similar, el inhibidor farmacológico de CatSper, NNC55-0396, inhibió el aumento intracelular de Ca^{2+} producido por la progesterona como así también la hiperactividad en el espermatozoide humano (Alasmari et al., 2013a). Asimismo, nuestros resultados son consistentes con la localización de CatSper en la pieza principal de la cola del espermatozoide, y con la capacidad de CRISP1 de unirse a esa región *in vitro* (Roberts et al., 2003, Maldera et al., 2011).

Los resultados hasta aquí descriptos indicarían que CRISP1 unida débilmente al espermatozoide tendría la capacidad de regular negativamente los canales de Ca^{2+} TRPM8 y CatSper, de modo tal que su liberación durante la capacitación en el tracto femenino permitiría la activación de dichos canales y el desarrollo de la hiperactividad. En este sentido, es posible que la exposición de los espermatozoides a altas concentraciones de CRISP1 en el epidídimo mantenga los canales inhibidos contribuyendo al estado quiescente o decapacitante del espermatozoide. Por lo tanto, CRISP1 podría directa o indirectamente, interactuar con el canal y regular el flujo de Ca^{2+} en ambos tractos reproductivos.

Existe la posibilidad de que la proteína CRISP1 regule los canales iónicos localizados en la cola del espermatozoide a través del dominio Cysteine Rich Domain (CRD), al cual se le asignó esta función en otros miembros de dicha familia (Guo et al., 2005b, Gibbs et al., 2008). Por otro lado, CRISP1 también se localiza en la cabeza del espermatozoide y trabajos previos muestran que la población fuertemente unida a la cabeza sería la que se re-distribuye de la región dorsal al segmento ecuatorial durante la capacitación y participa en la fusión entre el espermatozoide-ovocito a través de su unión a sitios complementarios en la gameta femenina (Rochwerger y Cuasnicu, 1992, Cohen et al., 2000b, Cohen et al., 2001). A diferencia de la actividad regulatoria sobre canales, dicha capacidad reside en el dominio llamado Pathogenesis Related 1 (PR-1) de CRISP1 (Ellerman et al., 2006). Por lo tanto, nuestros resultados estarían sugiriendo la existencia no sólo de dos poblaciones de CRISP1 sobre el espermatozoide sino también dos actividades diferentes ubicadas en distintos dominios de la molécula.

Teniendo en cuenta la importancia de las fluctuaciones de Ca^{2+} durante la capacitación para garantizar el proceso de fertilización, a continuación, analizamos la participación de otra molécula esencial para la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la bomba Ca^{2+} -ATPasa 4 (PMCA4), en el proceso de capacitación. En base a la función de PMCA4 como expulsora de Ca^{2+} y al aumento de los niveles intracelulares de este catión durante la capacitación, estudiamos la participación de PMCA4 en distintos procesos asociados a la capacitación del espermatozoide de ratón, tales como la fosforilación de proteínas, la hiperactividad y la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los resultados revelaron que mientras la inhibición de PMCA4 no produjo modificaciones en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA ni en Tyr, generó leves alteraciones en el desarrollo de la hiperactividad y en el porcentaje de penetración del cúmulus, indicando que las modificaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de PMCA4 impactarían sobre la

capacitación de forma similar a lo observado por la exposición a CRISP1. Más aún, aunque los espermatozoides incubados con el inhibidor de PMCA4 no presentaron modificaciones en la capacidad fusogénica, mostraron una disminución en la capacidad de fertilizar COCs y ovocitos con ZP, indicando que la actividad de PMCA4 sería importante para la expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide desarrollada durante la capacitación. Considerando que los ratones machos KO para PMCA4 son infértiles debido a que sus espermatozoides epididimarios son inmóviles por una alta $[Ca^{2+}]_i$ (Okunade et al., 2004, Schuh et al., 2004) y que la inhibición de PMCA4 modifica algunos parámetros asociados a la hiperactividad, es probable que la disminución en la capacidad fertilizante en presencia del inhibidor de PMCA4 se produzca por desbalances en la $[Ca^{2+}]_i$ y alteraciones en la hiperactividad. En conjunto, los resultados obtenidos al inactivar PMCA4 también apoyarían la importancia de la regulación del Ca^{2+} en el interior celular para el correcto funcionamiento del espermatozoide.

En paralelo a los estudios anteriores, y como otra estrategia complementaria para explorar la participación de CRISP1 en el proceso de capacitación, utilizamos espermatozoides carentes de esta proteína provenientes de animales *Crisp1*^{-/-}. Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que, si bien estos animales son fértiles, los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} presentan niveles claramente menores de fosforilación en Tyr en comparación con los espermatozoides control. Con el fin de estudiar si la mayoría de los espermatozoides KO presentaban niveles bajos de fosforilación o si existían poblaciones que exhibían diferentes intensidades de fosforilación, evaluamos los niveles en cada célula por Citometría de flujo. Los resultados revelaron una distribución unimodal de los niveles de fosforilación en los espermatozoides control y KO, observándose, además, que las células KO exhibían una única población con niveles bajos de fosforilación en Tyr respecto del control. Estos hallazgos resultaron la primera evidencia mostrando niveles bajos de fosforilación acompañados de fertilidad normal (Da Ros et al., 2008), sugiriendo que dichos bajos niveles serían suficientes para el desarrollo de la capacidad fertilizante del espermatozoide *in vivo* o bien que existirían mecanismos compensatorios de las deficiencias en la fosforilación para favorecer el éxito reproductivo. En concordancia con nuestros resultados, más recientemente, Chau y colaboradores (2011), mostraron que mientras los animales KO para otra proteína no relacionada con CRISP, denominada CRE, no presentaban alteraciones en la fertilidad, sus espermatozoides exhibían baja capacidad fertilizante y fosforilación en Tyr (Chau y Cornwall, 2011). En la mayoría de los casos, los niveles de fosforilación en Tyr correlacionan con la

capacidad fertilizante de los espermatozoides y con la fertilidad de los machos, tal como ocurre en los animales KO para la proteína CRIS (presenta un dominio de unión a nucleótidos cíclicos como el AMPc), para la subunidad catalítica de PKA, y para SAC, los cuales presentaron subfertilidad y espermatozoides con niveles bajos tanto de capacidad fertilizante como de fosforilación en Tyr (Esposito et al., 2004, Nolan et al., 2004, Hess et al., 2005, Xie et al., 2006, Kraehling et al., 2013). Sin embargo, recientemente, se demostró que el ionóforo de Ca^{2+} , el cual actúa por debajo de las vías de transducción de señales involucradas en el aumento de fosforilación en Tyr, no favorece la inducción en dicha fosforilación pero aún así estos espermatozoides son capaces de fertilizar ovocitos (Tateno et al., 2013). De este modo, un mecanismo similar podría ocurrir *in vivo* que llevaría a los espermatozoides KO a desarrollar la capacitación. En este sentido, sería interesante evaluar los niveles de fosforilación en Tyr de espermatozoides recuperados del oviducto de hembras apareadas con machos *Crisp1*^{-/-}.

Por otro parte, la inhibición en la fosforilación en Tyr reportada con anterioridad por nuestro laboratorio (Da Ros et al., 2008) y confirmada por los ensayos de Citometría descriptos en esta Tesis, fue opuesta a lo esperado para un factor decapacitante el cual, al no estar presente, promovería la capacitación y produciría un aumento en los niveles de fosforilación en Tyr. Es interesante mencionar que la vasectomía genera importantes cambios en el transcriptoma del epidídimo humano, siendo la expresión del gen *hCrisp1* una de las más afectadas por esta intervención quirúrgica (Thimon et al., 2008). De esta manera, luego de una *vasovasostomía* (tratamiento para revertir quirúrgicamente la vasectomía), se observa un aumento significativo tanto de la cantidad de CRISP1 soluble en el plasma seminal como de la proteína asociada a los espermatozoides en comparación con individuos no vasectomizados. Más aún, Legare y colaboradores (2010) describieron que los espermatozoides de individuos *vasovasectomizados* también presentaban un nivel mayor de proteínas fosforiladas en Tyr. Si bien *hCrisp1* no es el único gen afectado por la vasectomía (Legare et al., 2001), estos resultados muestran un aumento de fosforilación en Tyr en espermatozoides expuestos a un exceso de CRISP1, en concordancia con el efecto observado en los ratones *Crisp1*^{-/-} donde se evidencia que la ausencia de la proteína es acompañada de menores niveles de fosforilación en Tyr.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} presentaban disminución en la fosforilación en Tyr, el paso siguiente consistió en estudiar los mecanismos por los cuales la falta de CRISP1 afectaría la fosforilación de proteínas durante la

capacitación. Dado que resultados preliminares sugerían que los espermatozoides KO presentan bajos niveles de AMPc (Tesis Doctoral Julieta Maldera), investigamos la vía de transducción de señales que involucra a AMPc/PKA en dichos espermatozoides. Para ello, se evaluaron los patrones de esta fosforilación en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} utilizando el anticuerpo que reconoce específicamente los sustratos fosforilados por PKA. Los resultados indicaron que los espermatozoides carentes de CRISP1 presentaban niveles menores de fosforilación de los sustratos de PKA durante los distintos tiempos estudiados en comparación con las células control, en forma similar a lo observado anteriormente en la fosforilación en Tyr (Da Ros et al., 2008).

Los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr correlacionan entre sí en la mayoría de los casos tal como fuera reportado para los espermatozoides KO para la subunidad catalítica específica del espermatozoide de la quinasa PKA (Morgan et al., 2008) como así también, para las células carentes de la proteína CRIS (Krahling et al., 2013). No obstante, recientemente, se publicó un trabajo donde se demostró que espermatozoides que provienen de animales KO para la Rnase9, presentan una disminución en los niveles de los sustratos fosforilados por PKA y niveles normales de fosforilación en Tyr (Westmuckett et al., 2014), sugiriendo que la vía de PKA podría estar involucrada en otras cascadas de señalización relevantes para la capacitación. El hecho de que en los espermatozoides KO para CRISP1 se haya observado una disminución en ambas fosforilaciones, indica que la deficiencia presente en estas células se encontraría río arriba de PKA, afectando en consecuencia a la fosforilación en Tyr. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que otras vías no conocidas estén también modificadas en estas células.

Considerando que los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} tendrían una actividad deficiente de algún componente de la vía AMPc/PKA, la cual es activada por el HCO₃⁻, las células fueron capacitadas en presencia de mayores concentraciones de este anión, observando que las fosforilaciones de los sustratos de PKA y en Tyr se incrementaban en función de la concentración del mismo. A pesar de ello, los espermatozoides KO mostraron niveles menores de fosforilación que los HT en todas las condiciones evaluadas, sugiriendo que si bien una mayor concentración de HCO₃⁻ sería capaz de aumentar las fosforilaciones, dicho estímulo no sería suficiente para incrementar la fosforilación hasta los niveles control.

A continuación, se estudió si el efecto de la falta de CRISP1 podía ser revertido aumentando los niveles de AMPc a través del agregado de un análogo permeable del

AMPC (dbcAMP) junto a un inhibidor de las PDEs (IBMX). Bajo estas condiciones, se observó una reversión total en la fosforilación de los sustratos de PKA hasta niveles similares a los controles. Además, evidenciamos dicho efecto sobre la fosforilación en Tyr (concordante con lo observado anteriormente en la Tesis Doctoral Julieta Maldera), sugiriendo un defecto en la acumulación de AMPC en el espermatozoide KO. La concentración menor de AMPC intracelular podría deberse a una menor producción o a una mayor degradación del mismo. En este sentido, se reportó que los espermatozoides *sAC*^{-/-} incubados en condiciones capacitantes no presentan fosforilación en Tyr por defectos en el producción de AMPC y muestran niveles normales de fosforilación luego del agregado de otro análogo permeable del AMPC (cAMP-AM) y el inhibidor IBMX (Xie et al., 2006). En nuestro modelo, la reversión total por la exposición al análogo de AMPC e IBMX junto con la reversión parcial observada por el agregado de mayores concentraciones de HCO₃⁻ estarían sugiriendo que el AMPC generado a partir del HCO₃⁻ sería rápidamente hidrolizado en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} y que los mismos serían capaces de producir AMPC endógeno ya que la estimulación de la sAC produciría un aumento en los niveles de fosforilación. Por otro lado, el hecho de que para lograr una completa reversión se requiera también inhibir a las PDEs sugería que los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} presentarían una deficiencia en la actividad de esta enzima. Si bien los espermatozoides KO exhibieron a niveles mayores de actividad de PDEs respecto al control, el mismo no fue estadísticamente significativo, sugiriendo que las PDEs participarían sólo parcialmente en la inhibición de la fosforilación en los espermatozoides KO. Una explicación alternativa para nuestras observaciones sería que los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} tuvieran una actividad alterada de sAC como consecuencia de una deficiencia en su expresión o actividad. En este sentido, observamos que los bajos niveles de ambas fosforilaciones en los animales KO dependerían de la actividad de PKA, ya que dichos niveles disminuyeron aún más en presencia de H89, inhibidor de esta quinasa. Estos resultados confirman que los espermatozoides KO presentarían una deficiencia “*upstream*” de PKA en las vía de señalización conducentes a la fosforilación en Tyr durante la capacitación.

Hallazgos recientes en ratón (Krapf et al., 2010) y los descriptos en el Capítulo 1 de esta Tesis (Battistone et al., 2013) proponen un modelo en el cual la fosforilación de los sustratos de PKA y la consecuente fosforilación en Tyr estarían reguladas por dos caminos convergentes: uno que requeriría la activación de la vía AMPC/PKA, y otro que involucraría la inactivación de Ser/Thr fosfatasa mediado por SFKs. En base a ello, investigamos la participación de esta última vía en la disminución de ambas

fosforilaciones observadas en los espermatozoides KO para CRISP1. Se ha propuesto que la Ser/Thr fosfatasa que estaría participando en esta vía en el espermatozoide de roedor sería la PP2A (rata en esta Tesis y ratón en (Krapf et al., 2010)). En concordancia con esta hipótesis, se ha demostrado, en otros sistemas, que SFKs pueden fosforilar a PP2A en una Tyr presente en el C-terminal, generando la inactivación de la misma (Hu et al., 2009). Si bien nuestros resultados revelaron que los espermatozoides KO para CRISP1 presentaban mayor actividad de la fosfatasa PP2A que los controles, la presencia de OA, inhibidor de dichas fosfatasas, no generó reversión en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA ni en los residuos Tyr, indicando que la mayor actividad de PP2A no sería el mecanismo involucrado en la bajada en los niveles de fosforilación. Dado que esta segunda vía de señalización involucra no sólo a Ser/Thr fosfatasas sino también a SFKs, investigamos la contribución de dichas quinasas en los niveles de fosforilación de los espermatozoides KO para CRISP1. Los resultados mostraron que los niveles bajos de ambas fosforilaciones presentes en estos espermatozoides dependerían de la actividad de dichas quinasas. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó en espermatozoides control, el OA no revirtió la inhibición de SFKs en los espermatozoides KO. En base a estas observaciones, postulamos la existencia de alteraciones río arriba de la vía SFKs/fosfatasas en los espermatozoides KO para CRISP1 que generarían los defectos en la señalización de dicha cascada encontrados en este trabajo. Consistente con los resultados anteriores sugiriendo la existencia de deficiencias también río arriba de PKA en dichos espermatozoides.

Considerando que existen evidencias en la bibliografía mostrando que los niveles de fosforilación de proteínas correlacionan con las concentraciones de ATP (Goodson et al., 2012), que los espermatozoides KO para PKA presentan niveles bajos de ATP (Nolan et al., 2004) y que PKA es fundamental para la glicólisis en los espermatozoides (Hereng et al., 2014), postulamos que el espermatozoide *Crisp1*^{-/-} presentaría alteraciones en la concentración de ATP. Dado que en otros sistemas celulares, el compuesto CBX genera acumulación de ATP en el interior celular que (Wei et al., 2014), los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} fueron expuestos a CBX, observando reversión en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. De este modo, es probable que en los espermatozoides KO para CRISP1, la deficiencia en los niveles de AMPc genere menor actividad de PKA y, en consecuencia, menores niveles de ATP que los controles. En base a ello, la exposición a CBX produciría un aumento en el ATP intracelular, favoreciendo ambas fosforilaciones. En otros modelos de animales KO se han observado niveles bajos de ATP intracelular acompañados de

inhibición de la fosforilación en Tyr, tal como es el caso de los espermatozoides provenientes de machos KO para la ATP endonucleasa 1 (Kauffenstein et al., 2014) o la lactato deshidrogenada tipo C (Goodson et al., 2012, Odet et al., 2013). Si bien esto podría ocurrir en los espermatozoides carentes de CRISP1, no podemos descartar que los mismos presenten niveles normales de ATP intracelular y que, al aumentarlos farmacológicamente, se favorezcan las fosforilaciones compensando de alguna manera otra deficiencia, distinta al ATP intracelular, que traen los espermatozoides KO.

En conjunto, los menores niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr observados en los espermatozoides KO podrían deberse a concentraciones bajas de AMPc intracelular, generando, en consecuencia, deficiencias en diferentes cascadas de transducción de señales. Asimismo, teniendo en cuenta que numerosas evidencias apoyan la existencia de un “*cross-talk*” entre las señales dependientes del AMPc y el Ca^{2+} en el espermatozoide (Wiesner et al., 1998, Wennemuth et al., 2003b, Brenker et al., 2012), el siguiente paso fue analizar la cascada dependiente de este catión en el espermatozoide KO para CRISP1.

Antes de comenzar con el análisis de los resultados de esta sección, es pertinente aclarar las diferencias que observamos en la respuesta de los espermatozoides humano y murino al ser incubados en un medio capacitante sin el agregado de Ca^{2+} extracelular ($\ominus \text{Ca}^{2+}$). Mientras que los espermatozoides de ratón presentaron disminución en la fosforilación en Tyr (Visconti et al., 1995b, Chung et al., 2014), los espermatozoides humanos exhibieron niveles altos de dicha fosforilación (Carrera et al., 1996, Luconi et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Battistone et al., 2014). Sin embargo, cuando los espermatozoides de ratón fueron expuestos al $\ominus \text{Ca}^{2+}$ en presencia de EGTA, quelante de Ca^{2+} extracelular, los mismos presentaron niveles altos de fosforilación en Tyr similares a los que muestran las células capacitadas (Chung et al., 2014, Navarrete et al., 2015). Navarrete y colaboradores (2015) también demostraron que la exposición de los espermatozoides de ratón al $\ominus \text{Ca}^{2+}$ en presencia del inhibidor de la Ser/Thr fosfatasa PP2B produjo los mismos efectos que el EGTA sobre los niveles de fosforilación en Tyr, sugiriendo que el Ca^{2+} y estas fosfatasas impactarían negativamente sobre las cascadas de señalización que llevan a la fosforilación durante la capacitación (Navarrete et al., 2015). Más aún, bajo estas últimas condiciones, los espermatozoides humanos se comportaron de forma similar a las células del ratón. También se observaron diferencias entre los espermatozoides humanos y murinos en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA en

respuesta a las modificaciones del $[Ca^{2+}]_e$ (esta Tesis y (Chung et al., 2014, Battistone et al., 2014)), indicando la existencia de variaciones en la sensibilidad a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ entre los espermatozoides de estas dos especies. Si bien, se desconoce la razón de esta discrepancia, la misma podría deberse a que los espermatozoides de ratón provienen del epidídimo mientras que los de humano son espermatozoides eyaculados. No obstante, se ha reportado que los espermatozoides de semen bovino incubados en ΘCa^{2+} presentan niveles semejantes a los de roedor (Tardif et al., 2003).

Mientras que la incubación de los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} en ΘCa^{2+} produjo una disminución en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr al igual que los controles, los espermatozoides KO incubados en ΘCa^{2+} junto con EGTA, no respondieron frente a esta condición de igual manera que los HT. Asimismo, los espermatozoides KO tampoco generaron grandes cambios en las fosforilaciones al ser expuestos a Ciclosporina-A (CsA), inhibidor de PP2B. Los espermatozoides HT, por su parte, mostraron un aumento en ambas fosforilaciones, alcanzando valores similares a las observadas bajo condiciones capacitantes. Estos resultados abrieron la posibilidad de que la falta de CRISP1 genere una desregulación de la vía dependiente del Ca^{2+} y alteraciones en los mecanismos que censan o responden a las modificaciones intracelulares de este catión en los espermatozoides KO para CRISP1. De este modo, es probable que los espermatozoides KO requieran de mayores concentraciones de EGTA o CsA para lograr niveles de fosforilación similares a los presentados por las células control, sugiriendo que los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} tendrían aumentados los niveles de Ca^{2+} intracelular.

A continuación, con la idea de revertir los bajos niveles de fosforilación, los espermatozoides KO fueron capacitados en presencia de CRISP1. El hecho de que este tratamiento no produjera ningún cambio en las fosforilaciones, sugiere que el agregado de proteína no sería suficiente para corregir la deficiencia del espermatozoide KO. Esto podría deberse a que, bajo estas condiciones, sólo pueda transferirse al espermatozoide la población débilmente unida debido a que la asociación fuerte de CRISP1 a la gameta masculina requiere la presencia de epidididosomas en el medio de incubación (Tesis Doctoral Julieta Maldera). En base a ello, sería muy interesante en un futuro evaluar el efecto de la asociación de las dos poblaciones sobre los niveles de fosforilación, exponiendo a estas células a CRISP1 soluble junto con las vesículas epididimarias.

Dado que los espermatozoides KO para CRISP1 presentaron deficiencias en la respuesta a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, PMCA4 podría estar involucrada en estas alteraciones. Con el objetivo de investigar esta posibilidad, los espermatozoides KO fueron expuestos al inhibidor específico para PMCA4 (caloxin 1b1) (Pande et al., 2006), evaluándose luego, los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. La exposición a caloxin 1b1 no produjo modificaciones en la fosforilación de los sustratos de PKA ni en Tyr en los espermatozoides KO, sugiriendo que las desregulaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células KO no se modificarían al inactivar a PMCA4.

Considerando que las fluctuaciones de Ca^{2+} cumplen un papel central en la capacitación y que los espermatozoides KO mostraron una deficiencia en los niveles de fosforilación de proteínas en respuesta a las variaciones intracelulares de dicho catión, el siguiente paso consistió en evaluar la $[Ca^{2+}]_i$. A diferencia de los experimentos anteriores de medición de Ca^{2+} realizados con microscopía de fluorescencia, la $[Ca^{2+}]_i$ de los espermatozoides KO fue analizada utilizando la técnica de Citometría de flujo la cual, si bien no permite evaluar cambios producidos frente a los estímulos en función del tiempo, brinda información acerca de los espermatozoides a nivel individual y permite analizar su distribución discriminando entre los cambios producidos en células vivas y muertas. Nuestros resultados indicaron que los espermatozoides KO presentaron una tendencia a mayores niveles de Ca^{2+} intracelular luego de la capacitación en comparación a los controles, apoyando la idea que, en los espermatozoides KO para CRISP1, la deficiencia en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr podría deberse a desregulaciones en la $[Ca^{2+}]_i$.

Debido a que los espermatozoides KO presentan alteraciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular y que la motilidad espermática es regulada principalmente por dicho catión (Chang y Suarez, 2010), a continuación, evaluamos parámetros cinéticos de la motilidad en los espermatozoides de los dos genotipos. Los resultados indicaron que la falta de CRISP1 modificó la motilidad espermática de los espermatozoides frescos (sin capacitar), sugiriendo que los mismos presentarían deficiencias en la motilidad previo al comienzo del proceso de capacitación. Por otro lado, observamos que los parámetros cinéticos asociados a la hiperactivación variaron entre espermatozoides “frescos” y “capacitados” sólo en las células HT y no KO. Más aún, las células *Crisp1*^{-/-} presentaron niveles bajos de hiperactividad respecto a los controles. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los espermatozoides carentes de CRISP1 presentarían

alteraciones en las cascadas de señalización dependientes de $[Ca^{2+}]_i$, generando, en consecuencia, defectos en la hiperactivación. Sin embargo, otras desregulaciones podrían ser la causa de la disminución en la hiperactividad observada, tales como deficiencias en la vía de AMPc/PKA, que también presentarían las células KO. En este sentido, existen diversos estudios que demuestran que animales carentes de proteínas relacionadas con la cascada de señales del AMPc (PKA subunidad $C\alpha$, AKAP4, sNHE y sAC) poseen espermatozoides con severos defectos en la motilidad (Ren et al., 2001, Miki et al., 2002, Skalhegg et al., 2002, Wang et al., 2007). Asimismo, la reducción en la hiperactividad en los espermatozoides KO para CRISP1 podría deberse también a fallas en la concentración de ATP, como se observara en los espermatozoides carentes de la ATP endonucleasa 1 (Kauffenstein et al., 2014) o la lactato deshidrogenada tipo C (Odet et al., 2013).

En resumen, los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} exhibieron una menor fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr durante la capacitación *in vitro* debido, posiblemente, a una deficiencia en la acumulación de AMPc y/o alteraciones en $[Ca^{2+}]_i$, produciendo una activación defectuosa de las cascadas de señalización y una reducción en el porcentaje de hiperactividad. Estas observaciones podrían deberse a un efecto indirecto generado por la ausencia de CRISP1 en la membrana plasmática de la gameta durante la maduración epididimaria, que podría interferir con la correcta formación de los microdominios lipídicos “rafts” de membrana. En este sentido, el análisis proteómico de las proteínas aisladas de “rafts” de membrana de espermatozoides de ratón indicó la presencia de CRISP1 entre las aproximadamente 25 proteínas identificadas (Sleight et al., 2005). Dado que estos microdominios lipídicos están involucrados en la transducción de señales (Simons y Toomre, 2000, Alonso y Millan, 2001) no se descarta la posibilidad de que la falta de CRISP1 haya producido una desorganización de dichos dominios, de manera tal de afectar la correcta activación de la señalización. Considerando que el análisis de EST indicó que la mayoría de las proteínas asociadas a los “rafts” tienen una expresión específica testicular (Sleight et al., 2005), parecería poco factible que la falta de una proteína epididimaria como CRISP1 pudiera afectar la organización de una estructura ya establecida desde estadios anteriores. Sin embargo, recientes resultados de nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Visconti, demostraron que la quinasa Src, involucrada en vías de señalización que llevan al aumento de la fosforilación en Tyr y la hiperactivación, estaría asociada a “rafts” y se incorporaría a los espermatozoides en el epidídimo (Krapf et al., 2012). Por otro lado, resulta relevante mencionar que los espermatozoides murinos adquieren la capacidad

potencial de desencadenar la fosforilación en Tyr dependiente de AMPc a medida que transitan por el epidídimo (Lin et al., 2006), apoyando la posibilidad de que los niveles menores de fosforilación observados en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} se deban a un defecto ocurrido durante la maduración de los mismos. Más aún, estudios realizados por Hess y colaboradores (2005) utilizando tanto el modelo del ratón KO para sAC como el inhibidor específico de esta enzima (KH7), sugieren que sAC no sólo sería una enzima clave para la fosforilación en Tyr durante la capacitación sino que también estaría involucrada en la maduración epididimaria (Hess et al., 2005). Asimismo, se ha reportado que la $[Ca^{2+}]_i$ se regula negativamente en los espermatozoides a medida que transitan por el epidídimo (Ecroyd et al., 2003), siendo concomitante con la asociación de CRISP1 durante la maduración (Cohen et al., 2000a). En base a estas observaciones, podemos postular que se podrían producir modificaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células KO durante la maduración epididimaria.

Otra posibilidad para explicar el fenotipo observado en los espermatozoides KO se centraría en el posible rol de CRISP1 como regulador negativo de CatSper. Según esta hipótesis, la falta de CRISP1 en la membrana del espermatozoide KO generaría la estimulación prematura de este canal durante la capacitación. Al comparar los fenotipos de los espermatozoides carentes de CatSper con los espermatozoides KO para CRISP1, podemos observar que, en parte, son consistentes. Mientras estudios en espermatozoides carentes de CatSper demostraron que estas células presentan no sólo baja $[Ca^{2+}]_i$ sino también un aumento en los niveles de AMPc y en ambas fosforilaciones asociadas a la capacitación respecto a los controles (Carlson et al., 2003, Chung et al., 2014), los espermatozoides KO para CRISP1 presentan baja concentración de AMPc acompañada de desregulaciones en los niveles de Ca^{2+} , que posiblemente sean responsables de la inhibición en la fosforilación en los sustratos de PKA y en Tyr. Estos resultados serían concordantes a lo esperado para espermatozoides que presenten mayor estimulación de CatSper y, en consecuencia, alteraciones en el “*cross-talk*” entre las señales dependientes del AMPc y del Ca^{2+} , apoyando la hipótesis de CRISP1 como regulador de este canal.

El hecho de que los espermatozoides KO para CRISP1 presenten una reducción en la hiperactividad al igual que los espermatozoides KO para CatSper parecería en principio contradictorio. No obstante, se ha reportado que los espermatozoides KO para la ATPasa PMCA4, responsable de la extrusión de Ca^{2+} en los espermatozoides, presenta altos niveles de este catión y también inhibición de la hiperactividad (Okunade et al., 2004), apoyando la hipótesis de la importancia de la regulación fina

de la $[Ca^{2+}]_i$ para mantener la hiperactividad y la funcionalidad espermática. Las deficiencias encontradas en los espermatozoides KO para CatSper y CRISP1 también están a favor de esta teoría.

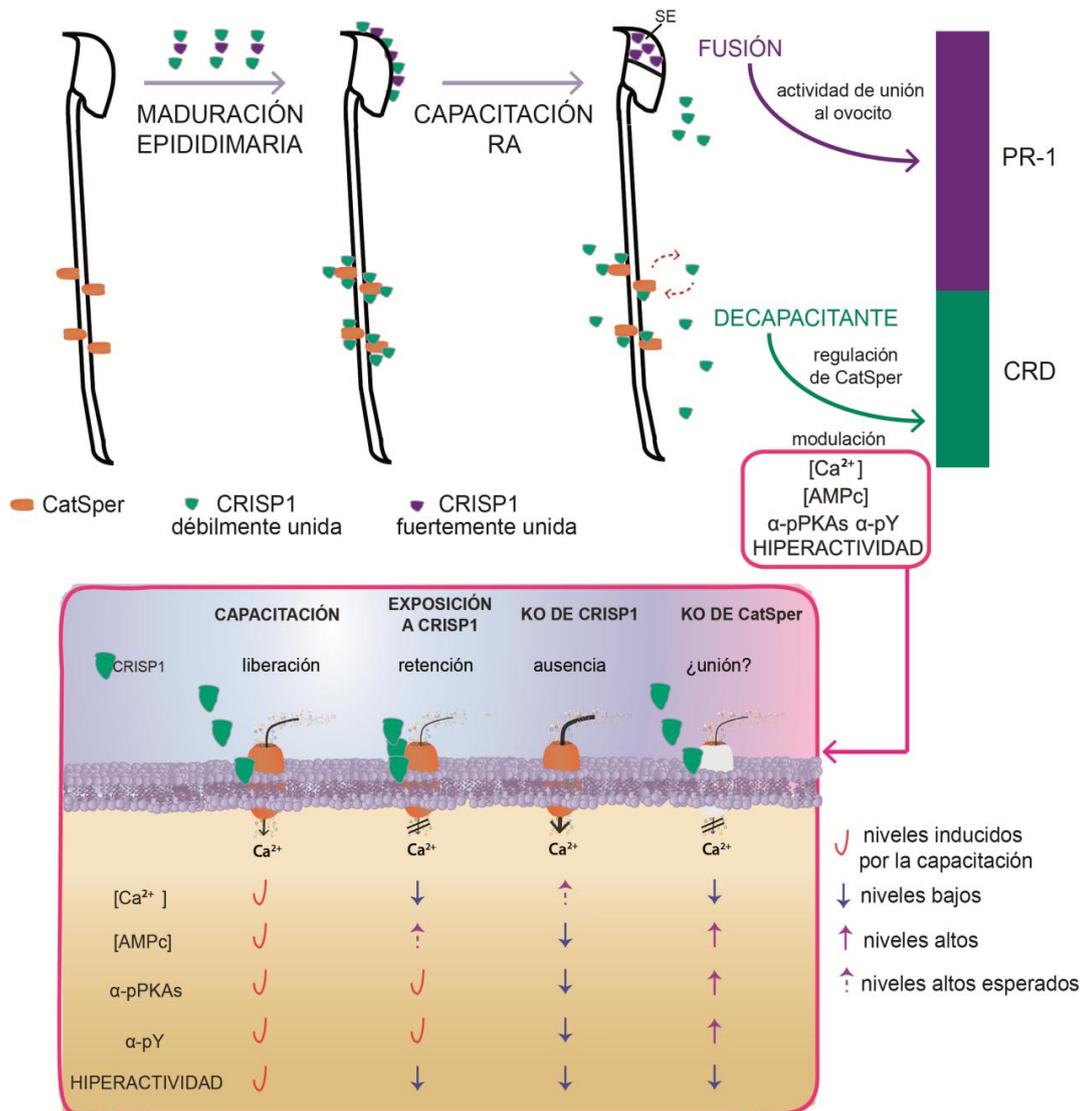
En conjunto, los resultados observados en espermatozoides provenientes de animales *Crisp1*^{-/-} confirmaron aquellos obtenidos previamente con la proteína CRISP1 purificada. En primer lugar, vimos que CRISP1 tendría la capacidad de regular canales de Ca^{2+} , incluyendo a CatSper, el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide. Dado que CatSper es esencial para la fertilidad de un individuo, el posible rol de CRISP1 sobre dicho canal es consistente con que el agregado de la proteína afecte varios de los parámetros asociados a la capacitación ya que la presencia de CRISP1 durante este proceso bloquearía CatSper, disminuiría la $[Ca^{2+}]_i$ y, en consecuencia, produciría una inhibición de la hiperactividad y de la capacidad de los espermatozoides de penetrar el cúmulus. Por otro lado, la ausencia de las dos poblaciones de CRISP1 en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-}, generaría la activación desmedida de CatSper, llevando posiblemente a incrementos en el Ca^{2+} intracelular, que producirían la reducción en la hiperactividad acompañada de disminución en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr. Un punto que queda por esclarecer es por qué la presencia de CRISP1 durante la capacitación no produce cambios en los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA ni en Tyr, mientras que la falta de CatSper en el espermatozoide influye positivamente sobre las cascadas de señalización asociadas a las fosforilaciones (Chung et al., 2014).

Teniendo en cuenta que las fluctuaciones de Ca^{2+} cumplen un papel central en la capacitación del espermatozoide, y que es fundamental la correcta regulación de CatSper para la fisiología espermática (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), podemos hipotetizar que CRISP1 cumpliría un importante rol durante la capacitación a través de la modulación fina (*"fine-tuning"*) de la actividad de este canal durante el ascenso de los espermatozoides por el tracto genital femenino. Nuestros resultados muestran que tanto en condiciones donde CatSper está mayoritariamente inhibido por la presencia de CRISP1, o no regulado por la proteína, como es el caso del espermatozoide *Crisp1*^{-/-}, se producirían desbalances en las $[Ca^{2+}]_i$ y, en consecuencia, se afectaría el proceso de capacitación (**Modelo 3**).

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten re-analizar algunas observaciones previamente descritas en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-}. De este modo, la disminución en la capacidad de los espermatozoides KO para penetrar

ovocitos con ZP (Da Ros et al., 2008) podría deberse no sólo a su menor capacidad de unirse a dicha matriz sino también a la bajada en los niveles de hiperactivación observados en dichas células. Si bien, la hiperactividad también es necesaria para penetrar el cúmulus, la bajada en la penetración de esta matriz por los espermatozoides KO parecería estar compensada a juzgar por los niveles normales de fertilización obtenidos al utilizar COCs (Da Ros et al., 2008). Dicha compensación podría deberse al hecho de que CRISP1, expresada por el cúmulus (Tesis Doctoral Juan I. Ernesto), interactúe con el espermatozoide KO y module la activación de CatSper, favoreciendo la fertilización. Asimismo, la proteína CRISP1 distribuida en forma de gradiente en el cúmulus, ejercería un efecto quimioattractante conduciendo a los espermatozoides hiperactivados hacia el ovocito (Tesis Doctoral Juan I. Ernesto). Estos resultados indican que CRISP1 sería una proteína crítica en el proceso de fertilización ya que escoltaría al espermatozoide a lo largo de los dos tractos reproductores. De este modo, CRISP1 se asociaría a los espermatozoides durante el tránsito de los mismos por el epidídimo, inactivando a CatSper y evitando una capacitación prematura, para luego liberarse en parte del espermatozoide en el tracto femenino, permitiendo la activación de CatSper y la capacitación (**Modelo 3**).

Considerando que las corrientes de CatSper son activadas por distintos inductores (pH, voltaje y, en el espermatozoide humano, por progesterona y prostaglandinas) (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011, Brenker et al., 2012), se lo propuso como un sensor polimodal de diferentes estímulos que asistiría al espermatozoide por el tracto reproductivo masculino y femenino. Por lo tanto, el desarrollo de bloqueantes de CatSper podría ser un potencial candidato a la generación de nuevos anticonceptivos, los cuales son de gran interés para la salud reproductiva. En este sentido, CRISP1 ha sido postulada como un potencial “*target*” para anticoncepción en base a la inhibición de la fertilidad en animales inmunizados con dicha proteína (Ellerman et al., 1998). De este modo, los resultados obtenidos en esta Tesis indican que el estudio de las interacciones entre CRISP1-CatSper podría ayudar al desarrollo de anticonceptivos más específicos y, por ende, más seguros basados en la regulación de la actividad inhibitoria de CRISP1 sobre CatSper. Dado que existen diferencias en la regulación de CatSper presente en el espermatozoide humano o de ratón, sería interesante estudiar los efectos de CRISP1 humana sobre CatSper en este modelo.



Comparación entre las distintas condiciones que relacionan a CRISP1 con CatSper analizadas durante este capítulo. Las tildes rojas significan niveles normales, las flechas con puntos significan eventos postulados pero aún no demostrados.

En resumen, en el presente capítulo aportamos nuevos conocimientos sobre la participación de CRISP1 en los mecanismos moleculares involucrados en las cascadas de señalización que conducen a la capacitación del espermatozoide de ratón. En este sentido, CRISP1 estaría involucrada en la regulación fina (*“fine tuning”*) de CatSper y en las vías de transducción de señales dependientes del Ca²⁺. Más aún, nuestros resultados confirman que la modulación de las fluctuaciones [Ca²⁺]_i durante la capacitación sería fundamental para garantizar la fertilización, apoyando la idea de que la especificidad de la señal de Ca²⁺ estaría dada no sólo por la localización de CatSper (Clapham, 2007, Chung et al., 2014) sino también por moléculas involucradas en su regulación, tales como CRISP1.

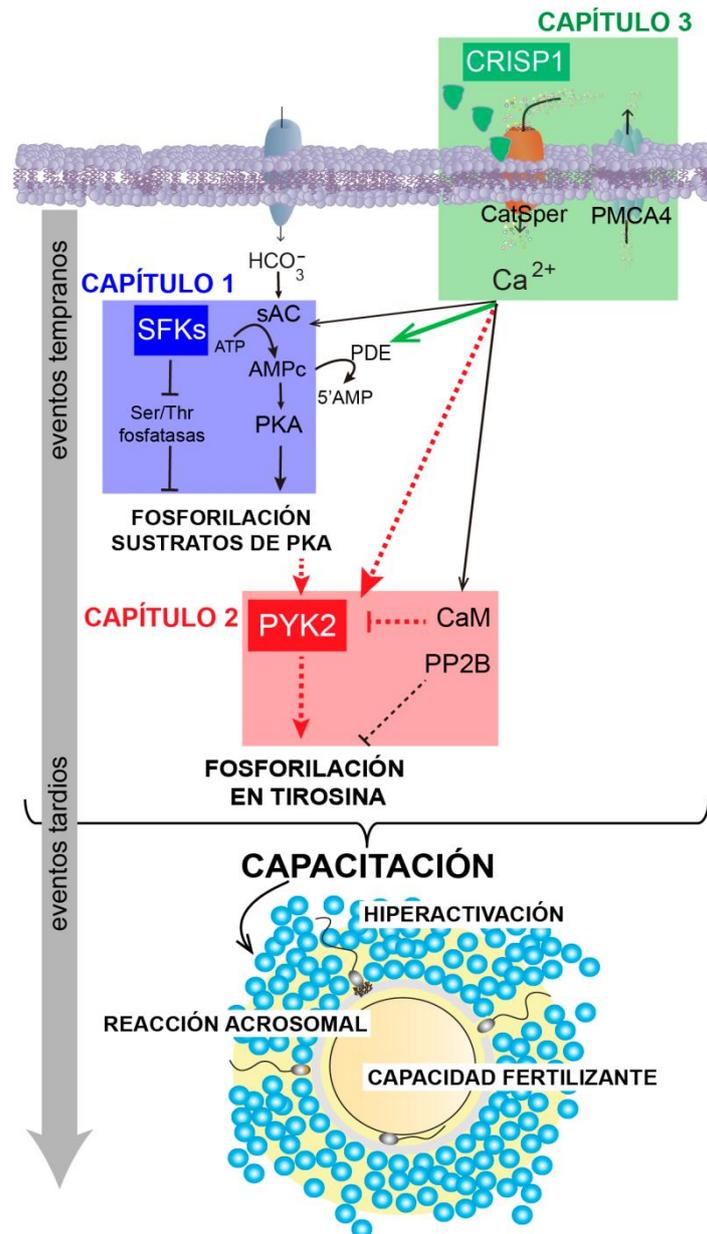
Tal como fuera mencionado en la Introducción, el objetivo general de esta Tesis de Doctorado ha sido aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en las cascadas de señalización que conducen a la capacitación del espermatozoide de mamífero y, en consecuencia, profundizar los estudios en el proceso de interacción entre el espermatozoide y el ovocito. Los resultados obtenidos utilizando una combinación de estrategias y modelos experimentales (rata, humano y ratones modificados genéticamente) forman parte de los tres capítulos que conforman esta Tesis.

El primer objetivo consistió en investigar la correlación temporal entre distintos eventos de señalización relacionados con la quinasa PKA, como así también evaluar la participación de una novedosa cascada que involucra a SFKs en el proceso de capacitación del espermatozoide de rata y humano. Los resultados indicaron que los espermatozoides sufren no sólo eventos muy tempranos tales como la producción de AMPc y la fosforilación de los sustratos de PKA, sino que también necesitan activar vías de señalización de curso más lento con el fin de lograr un estado funcional de capacitación (**Modelo 4**). Asimismo, las observaciones indicaron la existencia de dos vías conducentes a la fosforilación de proteínas en Tyr para alcanzar una capacitación funcional: una cascada dependiente de la activación de PKA, y otra mediada por la inactivación de Ser/Thr fosfatasa a través de SFKs, las cuales se entrecruzan a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA (sombreado azul del **Modelo 4**). Mientras estos resultados apoyan la idea de que las principales vías de señalización que participan en la capacitación del espermatozoide se encuentran evolutivamente conservadas, las SFKs y las Ser/Thr fosfatasas involucradas en la capacitación parecen ser diferentes para el espermatozoide humano y de roedor, revelando no sólo la especie-especificidad de los mecanismos moleculares que subyacen a este clave proceso reproductivo sino también la importancia de caracterizar las distintas cascadas de señalización en diferentes modelos.

El segundo objetivo de esta Tesis fue explorar los mecanismos moleculares involucrados en la decodificación de las señales dependientes de Ca^{2+} durante la capacitación de los espermatozoides humanos. Los resultados indicaron que el Ca^{2+} modula la fosforilación en Tyr sin afectar los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA, y que los efectores moleculares que decodifican la señal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ están asociados a CaM y Ser/Thr fosfatasa PP2B. Más aún, observamos que la Tyr quinasa PYK2 puede ser activada mediante la exposición de los espermatozoides a bajos niveles de Ca^{2+} extracelular, probablemente por inactivación de CaM, como así

también, a través del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ junto con la activación de las cascadas que regulan la fosforilación de los sustratos de PKA durante la capacitación. Asimismo, brindamos evidencias de que PYK2 actuaría como una plataforma integradora de las distintas señales conducentes a la fosforilación en Tyr, siendo esta quinasa el primer intermediario reportado ubicado río abajo de PKA y requerido para la capacidad fertilizante del espermatozoide humano (sombreado rojo del **Modelo 4**).

El tercer objetivo consistió en investigar las distintas vías de señalización reguladas por CRISP1 durante la capacitación del espermatozoide. Nuestras observaciones revelaron que dicha proteína inhibe las corrientes de Ca^{2+} a través de los canales TRPM8 y CatSper, lo cual impactaría en el proceso de capacitación del espermatozoide de ratón. Más aún, la ausencia de la actividad inhibitoria sobre los canales de Ca^{2+} en los espermatozoides KO para CRISP1, generaría una desregulación en las vías dependientes de AMPc y Ca^{2+} , llevando a una disminución tanto de la fosforilación de proteínas como de la hiperactividad (sombreado verde del **Modelo 4**). Estos resultados confirmaron que la modulación de las fluctuaciones de los niveles de Ca^{2+} intracelular sería fundamental para lograr una capacitación funcional que garantice la correcta fertilización.



Modelo 4: Esquema de las conclusiones más relevantes de los tres capítulos de la Tesis. Las líneas de puntos representan regulaciones aún no dilucidadas completamente. Las flechas rojas corresponden modulaciones estudiadas en el espermatozoide humano. La flecha verde corresponde a una modulación descrita solamente en el espermatozoide de ratón a través de la activación de CaM.

En conjunto, los estudios presentados en esta Tesis Doctoral permitirán una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición y expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide. La identificación de moléculas claves en estos procesos abre la posibilidad de una futura aplicación clínica, contribuyendo así al desarrollo de nuevos y mejores métodos tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.

- Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Felix R, Darszon A (2006) KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol* 289, 395-405.
- Adachi J, Tate S, Miyake M, Harayama H (2008) Effects of protein phosphatase inhibitor calyculin a on the postacrosomal protein serine/threonine phosphorylation state and acrosome reaction in boar spermatozoa incubated with a cAMP analog. *J Reprod Dev* 54, 171-6.
- Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, Tash JS (1995) Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl* 35, 187-208.
- Aitken RJ, Nixon B (2013) Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 19, 785-93.
- Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins da Silva S, Oxenham SK (2013b) The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod* 28, 866-76.
- Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S *et al.* (2013a) Ca²⁺ signals generated by CatSper and Ca²⁺ stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem* 288, 6248-58.
- Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P (2003) Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci* 116, 2149-55.
- Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG *et al.* (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81, 1095-104.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff J, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alonso MA, Millan J (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114, 3957-65.
- Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, Ando S (2005) Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4753-61.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE (2008) Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 52, 463-72.
- Arts EG, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D (1993) Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur J Biochem* 217, 1001-9.
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 117, 3645-57.
- Aumuller G, Renneberg H, Schiemann PJ, Wilhelm B, Seitz J, Konrad L, Wennemuth G (1997) The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv Exp Med Biol* 424, 193-219.
- Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4, 581-96.
- Austin CR (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Austin CR (1982) The egg. In C.R.Austin and R.V.Short e (ed) *In Reproduction in Mammals*. Cambridge University Press, pp. 46-62.
- Austin CR (1985) Sperm maturation in the male and female genital tracts. In C.B.Metz and A.Monroy e (ed) *Biology of Fertilization*. New York: Academic Press, pp. 121-55.
- Austin CRaSFRS (1972) University Press, Cambridge.
- Avella MA, Baibakov B, Dean J (2014) A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol* 205, 801-9.

- Avella MA, Xiong B, Dean J (2013) The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod* 19, 279-89.
- Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S (2000) RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12, 123-33.
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T (2002) Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 277, 30310-4.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 269, 31845-9.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J (2007) Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 134, 933-43.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315.
- Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ (2006) Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 119, 3182-92.
- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ (2004) Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci* 117, 211-22.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12, 323-30.
- Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C *et al.* (2007) Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 25, 1035-44.
- Barford D (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21, 407-12.
- Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicu PS (2013) Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod* 19, 570-80.
- Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicu PS (2014) Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 20, 1054-66.
- Baumber J, Meyers SA (2006) Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl* 27, 578-87.
- Baxendale RW, Fraser LR (2003) Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 66, 181-9.
- Bedford JM (2004) Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79, 429-60.
- Bedford JM, Moore HD, Franklin LE (1979) Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 119, 119-26.
- Bedford JMaC, G.W. (1978) Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs (Membrane fusion). In G.Poste and G.L.Nicolson e (ed) *Membrane surface reviews*. Amsterdam: North-Holland, pp. 65-125.
- Bedu-Addo K, Lefievre L, Moseley FL, Barratt CL, Publicover SJ (2005) Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly 'switch' capacitation-induced events in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 11, 683-91.

- Bellvé A RaOB, D.A. (1983) The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In J. Hartman e (ed) Mechanisms and control of animal fertilization. New York: Academic Press, pp. 55-137.
- Bendahmane M, Lynch C, 2nd, Tulsiani DR (2001) Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys* 390, 1-8.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483-7.
- Bianchi E, Wright GJ (2015) Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Biggers JD (1971) Metabolism of mouse embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 14, 41-54.
- Bigler D, Takahashi Y, Chen MS, Almeida EA, Osbourne L, White JM (2000) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J Biol Chem* 275, 11576-84.
- Blaquier JA, Cameo MS, Burgos MH (1972) The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology* 90, 839-42.
- Block ER, Tolino MA, Klarlund JK (2011) Extracellular ATP stimulates epithelial cell motility through Pyk2-mediated activation of the EGF receptor. *Cell Signal* 23, 2051-5.
- Bray C, Son JH, Kumar P, Meizel S (2005) Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. *Biol Reprod* 73, 807-14.
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahling M, Muller A, Kaupp UB, Strunker T (2012) The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J* 31, 1654-65.
- Brown MT, Cooper JA (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121-49.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 79-84.
- Buckbinder L, Crawford DT, Qi H, Ke HZ, Olson LM, Long KR, Bonnette PC, Baumann AP, Hambor JE, Grasser WA, 3rd et al. (2007) Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10619-24.
- Buffone MG, Brugo-Olmedo S, Calamera JC, Verstraeten SV, Urrutia F, Grippo L, Corbetta JP, Doncel GF (2006) Decreased protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Mol Reprod Dev* 73, 1591-9.
- Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdiushev T, Aghajanian HK, Gerton GL (2012) Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev* 79, 4-18.
- Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jimenez-Movilla M, Dean J (2012) Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol* 197, 37-44.
- Burton KA, McKnight GS (2007) PKA, germ cells, and fertility. *Physiology (Bethesda)* 22, 40-6.
- Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS (2007) A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod* 77, 848-54.
- Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, Karginov AV, Rajfur Z, Jacobson K, Hahn KM, Eck MJ, Schaller MD (2008) Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol* 28, 201-14.
- Cameo MS, Blaquier JA (1976) Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocrinol* 69, 47-55.

- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003) CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14864-8.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB (1996) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 180, 284-96.
- Casey JR, Grinstein S, Orlowski J (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 50-61.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-58.
- Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS (2008) Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol* 52, 737-42.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M, Cuasnicu PS (2001) Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol Reprod* 65, 1000-5.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicu PS (2000b) Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod* 63, 462-8.
- Cohen DJ, Maldera JA, Weigel Munoz M, Ernesto JI, Vasen G, Cuasnicu PS (2011) Cysteine-rich secretory proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biol Res* 44, 135-8.
- Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicu PS (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 PT (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241-56.
- Cooper TG (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 119-36.
- Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, Russel FG, Shayo C, Davio C (2011) Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 286, 6979-88.
- Courtens JL, Courot M, Flechon JE (1976) The perinuclear substance of boar, bull ram and rabbit spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 57, 54-64.
- Cowan AE, Koppel DE, Vargas LA, Hunnicutt GR (2001) Guinea pig fertilin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. *Dev Biol* 236, 502-9.
- Crane LH, Martin L (1991) Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy. *Reprod Fertil Dev* 3, 685-98.
- Crosby JA, Jones R, Barros C, Carvallo P (1998) Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 49, 426-34.
- Cross NL (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.
- Cross NL, Lambert H, Samuels S (1986) Sperm binding activity of the zona pellucida of immature mouse oocytes. *Cell Biol Int Rep* 10, 545-54.
- Cuasnicu PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG (2001) Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch Med Res* 32, 614-8.
- Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza AD, Cameo MS, Blaquier JA (1984) Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil* 72, 467-71.
- Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP *et al.* (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* 141, 3732-9.
- Chan CC, Shui HA, Wu CH, Wang CY, Sun GH, Chen HM, Wu GJ (2009) Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *J Proteome Res* 8, 5382-6.
- Chang H, Suarez SS (2010) Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod* 83, 507-13.
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-8.
- Chau KM, Cornwall GA (2011) Reduced fertility in vitro in mice lacking the cystatin CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic): rescue by exposure of spermatozoa to dibutyryl cAMP and isobutylmethylxanthine. *Biol Reprod* 84, 140-52.
- Chavez JC, de la Vega-Beltran JL, Escoffier J, Visconti PE, Trevino CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM (2013) Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One* 8, e60578.
- Chavez JC, Ferreira Gregorio J, Butler A, Trevino CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM (2014) SLO3 K⁺ Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm. *J Biol Chem*.
- Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11830-5.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-8.
- Cherr GN, Meyers SA, Yudin AI, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW (1996) The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev Biol* 175, 142-53.
- Chieffi P, Barchi M, Di Agostino S, Rossi P, Tramontano D, Geremia R (2003) Prolin-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) expression and localization in mouse testis. *Mol Reprod Dev* 65, 330-5.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281, 1857-9.
- Chung JJ, Shim SH, Everley RA, Gygi SP, Zhuang X, Clapham DE (2014) Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* 157, 808-22.
- Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS (2008) Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol* 320, 12-8.
- Da Ros VG, Muncu MJ, Cohen DJ, Marin-Briggiler CI, Busso D, Visconti PE, Cuasnicu PS (2004) Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol Reprod* 70, 1325-32.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernandez-Gonzalez EO, Nishigaki T, Trevino CL, Wood C, Beltran C (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131, 977-88.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL (2011) Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev* 91, 1305-55.
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernandez-Gonzalez EO, Chirinos M, Larrea F, Beltran C, Trevino CL (2009) TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* 4, e6095.
- de Lamirande E, Gagnon C (2002) The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod* 8, 124-35.

- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE (2003) Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278, 7001-9.
- Desseyn JL, Burton KA, McKnight GS (2000) Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6433-8.
- Diaz-Perez E, Meizel S (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. *Mol Reprod Dev* 31, 122-30.
- Diaz-Perez E, Thomas P, Meizel S (1988) Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. *J Exp Zool* 248, 213-21.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P (2003) Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca²⁺ store depletion during human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 9, 125-31.
- Ducibella T (1991) Mammalian egg cortical granules and cortical reaction. In P.M.Wassarman e (ed) *Elements of mammalian fertilization*. Boca Raton, Florida.: CRC Press, pp. 205-31.
- Ducibella T (1996) The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update* 2, 29-42.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J (1994) Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50, 467-73.
- Ebensperger CaB, C. (1984) Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. *Gam Res* 9, 387-97.
- Ecroyd HW, Jones RC, Aitken RJ (2003) Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation. *Biol Reprod* 69, 347-54.
- Eddy EMaOB, D.A. (1994) The spermatozoon. In E.Knobel and J.D.Neill e (ed) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, pp. 29-78.
- Ellerman DA, Brantua VS, Martinez SP, Cohen DJ, Conesa D, Cuasnicu PS (1998) Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol Reprod* 59, 1029-36.
- Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicu PS (2006) Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Dev Biol* 297, 228-37.
- Ellerman DA, Da Ros VG, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Cuasnicu PS (2002) Expression and structure-function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biol Reprod* 67, 1225-31.
- Eppig JJ (1979) FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281, 483-4.
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M *et al.* (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2993-8.
- Etkovitz N, Tirosh Y, Chazan R, Jaldety Y, Daniel L, Rubinstein S, Breitbart H (2009) Bovine sperm acrosome reaction induced by G-protein-coupled receptor agonists is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *Dev Biol* 334, 447-57.
- Evans JP (1999) Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci* 4, D114-31.
- Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Pelech S, da Cruz ESOA, da Cruz ESE (2011a) Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol Hum Reprod* 17, 466-77.

- Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Vintem AP, Domingues SC, Rebelo S, Morrice N, Cohen PT, da Cruz e Silva OA, da Cruz e Silva EF (2011b) Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochem Pharmacol* 82, 1403-15.
- Faure C, Ramos M, Girault JA (2013) Pyk2 cytonuclear localization: mechanisms and regulation by serine dephosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 70, 137-52.
- Fernandez C, Szyperski T, Bruyere T, Ramage P, Mosinger E, Wuthrich K (1997) NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J Mol Biol* 266, 576-93.
- Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF *et al.* (2003) Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 278, 11579-89.
- Finkelstein M, Etkovitz N, Breitbart H (2010) Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J Biol Chem* 285, 39702-9.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nieveelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114, 3543-55.
- Florman HMaD, T (2006) Fertilization in Mammals. . In Press JDNeSDE (ed) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction., pp. 55-112.
- Fornes MW, Barbieri A, Sosa MA, Bertini F (1991) First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. *Andrologia* 23, 347-51.
- Fouquet JP, Kann ML (1994) The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell* 81, 89-93.
- Franco-Echevarria E, Banos-Sanz JI, Monterroso B, Round A, Sanz-Aparicio J, Gonzalez B (2014) A new calmodulin binding motif for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase regulation. *Biochem J*.
- Fraser LR (2010) The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* 77, 197-208.
- Fraser LR, Drury LM (1975) The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol Reprod* 13, 513-8.
- Fraser LR, Harrison RA, Herod JE (1990) Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 89, 135-48.
- Freeman B (2003) The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction* 125, 635-43.
- Frenette G, Legare C, Saez F, Sullivan R (2005) Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod* 11, 575-82.
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R (2002) Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* 67, 308-13.
- Frenette G, Sullivan R (2001) Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* 59, 115-21.
- Fulcher KD, Mori C, Welch JE, O'Brien DA, Klapper DG, Eddy EM (1995) Characterization of Fsc1 cDNA for a mouse sperm fibrous sheath component. *Biol Reprod* 52, 41-9.
- Furlong LI, Hellman U, Krimer A, Tezon JG, Charreau EH, Vazquez-Levin MH (2000) Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol Reprod* 62, 606-15.
- Gaddum-Rosse P (1985) Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* 174, 347-56.
- Gadella BM, Flesch FM, van Golde LM, Colenbrander B (1999) Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q* 21, 142-6.

- Gadella BM, Harrison RA (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407-20.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 56, 707-19.
- Garberi JC, Fontana JD, Blaquier JA (1982) Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int J Androl* 5, 619-26.
- Garberi JC, Kohane AC, Cameo MS, Blaquier JA (1979) Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol Cell Endocrinol* 13, 73-82.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285, 1028-32.
- Gibbs GM, Orta G, Reddy T, Koppers AJ, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Lo JC, 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.
- Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK (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 GM, Scanlon MJ, Swarbrick J, Curtis S, Gallant E, Dulhunty AF, O'Bryan MK (2006) The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 281, 4156-63.
- Gil-Henn H, Destaing O, Sims NA, Aoki K, Alles N, Neff L, Sanjay A, Bruzzaniti A, De Camilli P, Baron R *et al.* (2007) Defective microtubule-dependent podosome organization in osteoclasts leads to increased bone density in Pyk2(-/-) mice. *J Cell Biol* 178, 1053-64.
- Ginnan R, Singer HA (2002) CaM kinase II-dependent activation of tyrosine kinases and ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C754-61.
- Gmachi M, Sagan S, Ketter S, Kreil G (1993) The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett* 336, 545-8.
- Go KJ, Wolf DP (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 32, 145-53.
- Gonzalez-Fernandez L, Macias-Garcia B, Loux SC, Varner DD, Hinrichs K (2013) Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol Reprod* 88, 138.
- Gonzalez-Martinez MT (2003) Induction of a sodium-dependent depolarization by external calcium removal in human sperm. *J Biol Chem* 278, 36304-10.
- Goodson SG, Qiu Y, Sutton KA, Xie G, Jia W, O'Brien DA (2012) Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 87, 75.
- Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-Deleon PA (2008) Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev* 75, 1627-36.
- Guo HJ, Wang X, Liu YC, Wan YL, Yin HF, Li T, Zhu J (2005a) [Expression of proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) in gastric carcinoma and its significance]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 37, 261-4.
- Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q (2005b) Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem* 280, 12405-12.
- Haendler B, Kratzschmar J, Theuring F, Schleuning WD (1993) Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 133, 192-8.

- Han S, Mistry A, Chang JS, Cunningham D, Griffor M, Bonnette PC, Wang H, Chrnyk BA, Aspnes GE, Walker DP *et al.* (2009) Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design. *J Biol Chem* 284, 13193-201.
- Hanada A, Chang MC (1972) Penetration of zone-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod* 6, 300-9.
- Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 145-74.
- Harder KW, Moller NP, Peacock JW, Jirik FR (1998) Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 273, 31890-900.
- Hardy DM, Huang TT, Jr., Driscoll WJ, Tung KK, Wild GC (1988) Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 38, 423-37.
- Harrison RA, Gadella BM (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-51.
- Hayashi M, Fujimoto S, Takano H, Ushiki T, Abe K, Ishikura H, Yoshida MC, Kirchhoff C, Ishibashi T, Kasahara M (1996) Characterization of a human glycoprotein with a potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1). *Genomics* 32, 367-74.
- He ZY, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG (2003) None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol* 254, 226-37.
- Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 801-11.
- Henriksen A, King TP, Mirza O, Monsalve RI, Meno K, Ipsen H, Larsen JN, Gajhede M, Spangfort MD (2001) Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins* 45, 438-48.
- Hereng TH, Elgstoen KB, Eide L, Rosendal KR, Skalhogg BS (2014) Serum albumin and HCO₃⁻ regulate separate pools of ATP in human spermatozoa. *Hum Reprod* 29, 918-30.
- Hermo L, Jacks D (2002) Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 63, 394-410.
- Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE (2006) Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 281, 5623-33.
- Hernandez-Gonzalez EO, Trevino CL, Castellano LE, de la Vega-Beltran JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A (2007) Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 282, 24397-406.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS *et al.* (2005) The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9, 249-59.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS *et al.* (2010) Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 18, 1178-84.
- Hinrichsen MJ, Blaquier JA (1980) Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 60, 291-4.
- Hiregowdara D, Avraham H, Fu Y, London R, Avraham S (1997) Tyrosine phosphorylation of the related adhesion focal tyrosine kinase in megakaryocytes upon stem cell factor and phorbol myristate acetate stimulation and its association with paxillin. *J Biol Chem* 272, 10804-10.
- Hirotsu S, Higuchi Y, Nishida K, Nakayama H, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Kashiwase K, Watanabe T, Asahi M *et al.* (2004) Ca²⁺-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAK beta-

- dependent signaling is essential for G-protein-coupled receptor agonist-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 36, 799-807.
- Ho K, Wolff CA, Suarez SS (2009) CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev* 21, 345-50.
- Hoodbhoy T, Dean J (2004) Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* 127, 417-22.
- Hoodbhoy T, Talbot P (1994) Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39, 439-48.
- Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R (2001) Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci* 114, 4127-36.
- Hu X, Wu X, Xu J, Zhou J, Han X, Guo J (2009) Src kinase up-regulates the ERK cascade through inactivation of protein phosphatase 2A following cerebral ischemia. *BMC Neurosci* 10, 74.
- Huang Z, Khatra B, Bollen M, Carr DW, Vijayaraghavan S (2002) Sperm PP1gamma2 is regulated by a homologue of the yeast protein phosphatase binding protein sds22. *Biol Reprod* 67, 1936-42.
- Ikawa M, Tokuhira K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M (2011) Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem* 286, 5639-46.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-8.
- Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R (2011) Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20008-11.
- Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D *et al.* (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 871-7.
- Itach SB, Finklestein M, Etkovitz N, Breitbart H (2012) Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev Biol* 362, 154-61.
- Jaiswal BS, Conti M (2003) Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10676-81.
- Jalkanen J, Huhtaniemi I, 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.
- Jarnaess E, Tasken K (2007) Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans* 35, 931-7.
- Jegou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C (2011) CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10946-51.
- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ (2006) Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 12, 253-67.
- Jimenez T, Sanchez G, Blanco G (2012) Activity of the Na,K-ATPase alpha4 isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. *J Androl* 33, 1047-57.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N (2011) Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4892-6.

- Johnson MH, Eager D, Muggleton-Harris A, Grave HM (1975) Mosaicism in organisation concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature* 257, 321-2.
- Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2772-6.
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet* 24, 279-82.
- Kalab P, Visconti P, Leclerc P, Kopf GS (1994) p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J Biol Chem* 269, 3810-7.
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* 362, 623-39.
- Kasahara M, Gutknecht J, Brew K, Spurr N, Goodfellow PN (1989) Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5, 527-34.
- Kauffmanstein G, Pelletier J, Lavoie EG, Kukulski F, Martin-Satue M, Dufresne SS, Frenette J, Ribas Furstenau C, Sereda MJ, Toutain B *et al.* (2014) Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 Ectonucleotidase Is Required for Normal Vas Deferens Contraction and Male Fertility through Maintaining P2X1 Receptor Function. *J Biol Chem* 289, 28629-39.
- Khatti A, Reddy VP, Pandey RK, Sudhakar DV, Gupta NJ, Chakravarty BN, Deenadayal M, Singh L, Thangaraj K (2012) Novel mutations in calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CAMK4) gene in infertile men. *Int J Androl* 35, 810-8.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Talmor-Cohen A, Shalgi R, Tres LL (2009) Expression of full-length and truncated Fyn tyrosine kinase transcripts and encoded proteins during spermatogenesis and localization during acrosome biogenesis and fertilization. *Mol Reprod Dev* 76, 832-43.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T (2005) Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18028-33.
- Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park KE, Kimura M, Kashiwabara S, Baba T (2006) Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 281, 5634-9.
- Kim KS, Gerton GL (2003) Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol* 264, 141-52.
- Kirchhoff C, Hale G (1996) Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2, 177-84.
- Kirichok Y, Lishko PV (2011) Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 17, 478-99.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 439, 737-40.
- Kjeldsen L, Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N (1996) SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett* 380, 246-50.
- Kohane AC, Cameo MS, Pineiro L, Garberi JC, Blaquier JA (1980a) Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod* 23, 181-7.
- Kohane AC, Gonzalez Echeverria FM, Pineiro L, Blaquier JA (1980b) Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol Reprod* 23, 737-42.
- Kohane AC, Pineiro L, Blaquier JA (1983) Androgen-controlled synthesis of specific proteins in the rat epididymis. *Endocrinology* 112, 1590-6.

- Kohno T, Matsuda E, Sasaki H, Sasaki T (2008) Protein-tyrosine kinase CAKbeta/PYK2 is activated by binding Ca²⁺/calmodulin to FERM F2 alpha2 helix and thus forming its dimer. *Biochem J* 410, 513-23.
- Kota V, Rai P, Weitzel JM, Middendorff R, Bhande SS, Shivaji S (2010) Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 77, 773-83.
- Krahling AM, Alvarez L, Debowski K, Van Q, Gunkel M, Irsen S, Al-Amoudi A, Strunker T, Kremmer E, Krause E *et al.* (2013) CRIS-a novel cAMP-binding protein controlling spermiogenesis and the development of flagellar bending. *PLoS Genet* 9, e1003960.
- Kraicer RKaPF (1978) Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. *Gam Res.* pp. 281-5.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE (2010) Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* 285, 7977-85.
- Krapf D, Ruan YC, Wertheimer EV, Battistone MA, Pawlak JB, Sanjay A, Pilder SH, Cuasnicu P, Breton S, Visconti PE (2012) cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Dev Biol* 369, 43-53.
- Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD (1996) The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* 236, 827-36.
- Kulanand J, Shivaji S (2001) Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia* 33, 95-104.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lawson C, Goupil S, Leclerc P (2008) Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium. *Biol Reprod* 79, 657-66.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H (1997) Subcellular distribution of protein kinase C alpha and beta in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol Reprod* 56, 454-9.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-21.
- Lea IA, Richardson RT, Widgren EE, O'Rand MG (1996) Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human sperm protein, Sp17. *Biochim Biophys Acta* 1307, 263-6.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55, 684-92.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1997) Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22, 643-56.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1998) Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* 19, 434-43.
- Leclerc P, Goupil S (2002) Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inhibition by Ca(2+). *Biol Reprod* 67, 301-7.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M *et al.* (2004) Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19, 1580-6.
- Lefievre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C (2002) Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 23, 709-16.

- Lefievre L, Nash K, Mansell S, Costello S, Punt E, Correia J, Morris J, Kirkman-Brown J, Wilson SM, Barratt CL *et al.* (2012) 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca²⁺ signals in human sperm. *Biochem J* 448, 189-200.
- Legare C, Berube B, Boue F, Lefievre L, Morales CR, El-Alfy M, Sullivan R (1999) Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 52, 225-33.
- Legare C, Thabet M, Picard S, Sullivan R (2001) Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biol Reprod* 64, 720-7.
- Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376, 737-45.
- Li K, Ni Y, He Y, Chen WY, Lu JX, Cheng CY, Ge RS, Shi QX (2013) Inhibition of sperm capacitation and fertilizing capacity by adjuvin is mediated by chloride and its channels in humans. *Hum Reprod* 28, 47-59.
- Li Y, Sosnik J, Brassard L, Reese M, Spiridonov NA, Bates TC, Johnson GR, Anguita J, Visconti PE, Salicioni AM (2011) Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) family in mouse and human sperm and testis. *Mol Hum Reprod* 17, 42-56.
- Lietha D, Eck MJ (2008) Crystal structures of the FAK kinase in complex with TAE226 and related bis-anilino pyrimidine inhibitors reveal a helical DFG conformation. *PLoS One* 3, e3800.
- Lin M, Lee YH, Xu W, Baker MA, Aitken RJ (2006) Ontogeny of tyrosine phosphorylation-signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse. *Biol Reprod* 75, 588-97.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P (1994) A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125, 1157-63.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471, 387-91.
- Lishko PV, Kirichok Y (2010) The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 588, 4667-72.
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE (2012) The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 74, 453-75.
- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003) Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 278, 15922-6.
- Liu DY, Liu ML, Clarke GN, Baker HW (2007) Hyperactivation of capacitated human sperm correlates with the zona pellucida-induced acrosome reaction of zona pellucida-bound sperm. *Hum Reprod* 22, 2632-8.
- Livera G, Xie F, Garcia MA, Jaiswal B, Chen J, Law E, Storm DR, Conti M (2005) Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol Endocrinol* 19, 1277-90.
- Londesborough J (1976) Quantitative estimation of 3'5' cyclic AMP phosphodiesterase using anion exchange resin in a batch process. *Anal Biochem* 71, 623-8.
- Lopez LC, Shur BD (1987) Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J Cell Biol* 105, 1663-70.
- Lu Q, Shur BD (1997) Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* 124, 4121-31.
- Luconi M, Barni T, Vannelli GB, Krausz C, Marra F, Benedetti PA, Evangelista V, Francavilla S, Properzi G, Forti G *et al.* (1998) Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 58, 1476-89.

- Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E (1996) Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 55, 207-16.
- Luo J, Gupta V, Kern B, Tash JS, Sanchez G, Blanco G, Kinsey WH (2012) Role of FYN kinase in spermatogenesis: defects characteristic of Fyn-null sperm in mice. *Biol Reprod* 86, 1-8.
- Luo J, McGinnis LK, Carlton C, Beggs HE, Kinsey WH (2014) PTK2b function during fertilization of the mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 1212-7.
- Lysechko TL, Cheung SM, Ostergaard HL (2010) Regulation of the tyrosine kinase Pyk2 by calcium is through production of reactive oxygen species in cytotoxic T lymphocytes. *J Biol Chem* 285, 31174-84.
- Mahony MC, Gwathmey T (1999) Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* 60, 1239-43.
- Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Weigel-Munoz M, Cohen DJ, Cuasnicu PS (2011) Evidence for the involvement of zinc in the association of CRISP1 with rat sperm during epididymal maturation. *Biol Reprod* 85, 503-10.
- Maldera JA, Weigel Munoz M, Chirinos M, Busso D, F GER, Battistone MA, Blaquier JA, Larrea F, Cuasnicu PS (2014) Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Mol Hum Reprod* 20, 341-9.
- Malkia A, Madrid R, Meseguer V, de la Pena E, Valero M, Belmonte C, Viana F (2007) Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J Physiol* 581, 155-74.
- Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria F, Buffone M, Calamera JC, Tezon JG, Vazquez-Levin MH (2003) Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 79, 1396-403.
- Martel-Gallegos G, Casas-Pruneda G, Ortega-Ortega F, Sanchez-Armass S, Olivares-Reyes JA, Diebold B, Perez-Cornejo P, Arreola J (2013) Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochim Biophys Acta* 1830, 4650-9.
- Martinez-Lopez P, Santi CM, Trevino CL, Ocampo-Gutierrez AY, Acevedo JJ, Alisio A, Salkoff LB, Darszon A (2009) Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 204-9.
- Martinez-Lopez P, Trevino CL, de la Vega-Beltran JL, De Blas G, Monroy E, Beltran C, Orta G, Gibbs GM, O'Bryan MK, Darszon A (2011) TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J Cell Physiol* 226, 1620-31.
- Mashiach R, Fisch B, Eltes F, Tadir Y, Ovadia J, Bartoov B (1992) The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil Steril* 57, 1052-7.
- Means AR, Tash JS, Chafouleas JG, Lagace L, Guerriero V (1982) Regulation of the cytoskeleton by Ca²⁺-calmodulin and cAMP. *Ann N Y Acad Sci* 383, 69-84.
- Mendieta J, Gago F (2004) In silico activation of Src tyrosine kinase reveals the molecular basis for intramolecular autophosphorylation. *J Mol Graph Model* 23, 189-98.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM (2002) Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol* 248, 331-42.
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG (2000) Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J Cell Biol* 149, 1289-96.
- Mishra S, Somanath PR, Huang Z, Vijayaraghavan S (2003) Binding and inactivation of the germ cell-specific protein phosphatase PP1gamma2 by sds22 during epididymal sperm maturation. *Biol Reprod* 69, 1572-9.
- Mitchell LA, Nixon B, Baker MA, Aitken RJ (2008) Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 14, 235-43.

- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A *et al.* (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287, 321-4.
- Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y *et al.* (2008) The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12921-6.
- Mizuki N, Sarapata DE, Garcia-Sanz JA, Kasahara M (1992) The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm Genome* 3, 274-80.
- Mochca-Morales J, Martin BM, Possani LD (1990) Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. *Toxicon* 28, 299-309.
- Mohamed TM, Zakeri SA, Baudoin F, Wolf M, Oceandy D, Cartwright EJ, Gul S, Neyses L (2013) Optimisation and validation of a high throughput screening compatible assay to identify inhibitors of the plasma membrane calcium ATPase pump--a novel therapeutic target for contraception and malaria. *J Pharm Pharm Sci* 16, 217-30.
- Morgan DJ, Weisenhaus M, Shum S, Su T, Zheng R, Zhang C, Shokat KM, Hille B, Babcock DF, McKnight GS (2008) Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20740-5.
- Moride N, Kuwahara A, Sutoh A, Tanaka Y, Mukai Y, Yamashita M, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M (2012) Okadaic acid-sensitive phosphatase is related to MII/G1 transition in mouse oocytes. *Zygote* 20, 193-8.
- Morrisette J, Kratzschmar J, Haendler B, el-Hayek R, Mochca-Morales J, Martin BM, Patel JR, Moss RL, Schleuning WD, Coronado R *et al.* (1995) Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. *Biophys J* 68, 2280-8.
- Mortimer ST (1998) Minimum sperm trajectory length for reliable determination of the fractal dimension. *Reprod Fertil Dev* 10, 465-9.
- Mortimer ST, Mortimer D (1990) Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 11, 195-203.
- Moseley FL, Jha KN, Bjorndahl L, Brewis IA, Publicover SJ, Barratt CL, Lefievre L (2005) Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. *Mol Hum Reprod* 11, 523-9.
- Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowski A, Herrmann A (1994) Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* 33, 9968-74.
- Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73, 673-99.
- Munoz-Garay C, De la Vega-Beltran JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A (2001) Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234, 261-74.
- Munoz MW, Ernesto JI, Bluguermann C, Busso D, Battistone MA, Cohen DJ, Cuasnicu PS (2012) Evaluation of testicular sperm CRISP2 as a potential target for contraception. *J Androl* 33, 1360-70.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Luconi M, Baldi E (2011) Markers of human sperm functions in the ICSI era. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1344-63.
- Myles DG, Primakoff P (1997) Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56, 320-7.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S (1999) Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 71, 919-23.

- Navarrete FA, Garcia-Vazquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sanchez-Cardenas C, Salicioni AM, Darszon A, Visconti PE (2015) Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways. *J Cell Physiol*.
- Naz RK (1998) c-Abl proto-oncoprotein is expressed and tyrosine phosphorylated in human sperm cell. *Mol Reprod Dev* 51, 210-7.
- Naz RK, Ahmad K, Kumar R (1991) Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J Cell Sci* 99 (Pt 1), 157-65.
- Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, Fugger L, Polzella P, Cerundolo V, Dushek O *et al.* (2010) Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 32, 766-77.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P (2001) Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233, 204-13.
- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T (2004) Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem* 279, 34957-62.
- Nixon B, MacIntyre DA, Mitchell LA, Gibbs GM, O'Bryan M, Aitken RJ (2006) The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod* 74, 275-87.
- Nobile M, Magnelli V, Lagostena L, Mochca-Morales J, Possani LD, Prestipino G (1994) The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. *J Membr Biol* 139, 49-55.
- Nobile M, Noceti F, Prestipino G, Possani LD (1996) Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Exp Brain Res* 110, 15-20.
- Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS (2004) Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13483-8.
- Nolan MA, Wu L, Bang HJ, Jelinsky SA, Roberts KP, Turner TT, Kopf GS, Johnston DS (2006) Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol Reprod* 74, 984-91.
- Numomura W, Isozumi N, Nakamura S, Jinbo Y, Ohki S, Kidokoro S, Wakui H, Takakuwa Y (2014) Unique structural changes in calcium-bound calmodulin upon interaction with protein 4.1R FERM domain: novel insights into the calcium-dependent regulation of 4.1R FERM domain binding to membrane proteins by calmodulin. *Cell Biochem Biophys* 69, 7-19.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C (2004) Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod* 10, 355-63.
- O'Rand MG, Welch JE, Fisher SJ (1986) Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. *Adv Exp Med Biol* 205, 131-44.
- Odet F, Gabel S, London RE, Goldberg E, Eddy EM (2013) Glycolysis and mitochondrial respiration in mouse LDHC-null sperm. *Biol Reprod* 88, 95.
- Okabe M (2013) The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 140, 4471-9.
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T *et al.* (2004) Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-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. *J Biol Chem* 279, 33742-50.
- Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 174, 269-83.
- Organización Mundial de la Salud. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. Geneva, Switzerland:World Health Organization Press, 2010.

- Orta G, Ferreira G, Jose O, Trevino CL, Beltran C, Darszon A (2012) Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol* 590, 2659-75.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS (1999) Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 5, 1017-26.
- Ostergaard HL, Lysechko TL (2005) Focal adhesion kinase-related protein tyrosine kinase Pyk2 in T-cell activation and function. *Immunol Res* 31, 267-82.
- Osycka-Salut C, Diez F, Burdet J, Gervasi MG, Franchi A, Bianciotti LG, Davio C, Perez-Martinez S (2014) Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 20, 89-99.
- Pan X, Chen X, Tong X, Tang C, Li J (2015) Ppp2ca knockout in mice spermatogenesis. *Reproduction*.
- Pande J, Mallhi KK, Sawh A, Szewczyk MM, Simpson F, Grover AK (2006) Aortic smooth muscle and endothelial plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms are inhibited differently by the extracellular inhibitor caloxin 1b1. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1341-9.
- Pariset C, Weinman S (1994) Differential localization of two isoforms of the regulatory subunit RII alpha of cAMP-dependent protein kinase in human sperm: biochemical and cytochemical study. *Mol Reprod Dev* 39, 415-22.
- Park SY, Avraham HK, Avraham S (2004) RAFTK/Pyk2 activation is mediated by trans-acting autophosphorylation in a Src-independent manner. *J Biol Chem* 279, 33315-22.
- Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, Barone C, Galileo DS, Strehler EE, Martin-DeLeon PA (2013) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biol Reprod* 89, 6.
- Peitz B, Olds-Clarke P (1986) Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod* 35, 608-17.
- Perez Martinez S, Conesa D, Cuasnicu PS (1995) Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J Reprod Immunol* 29, 31-45.
- Perry RL, Barratt CL, Warren MA, Cooke ID (1997) Elevating intracellular calcium levels in human sperm using an internal calcium ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl) hydroquinone (TBQ), initiates capacitation and the acrosome reaction but only in the presence of extracellular calcium. *J Exp Zool* 279, 291-300.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA (2003) Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 68, 1208-14.
- Primakoff P, Hyatt H, Myles DG (1985) A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101, 2239-44.
- Publicover S, Harper CV, Barratt C (2007) [Ca²⁺]_i signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nat Cell Biol* 9, 235-42.
- Quill TA, Wang D, Garbers DL (2006) Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. *Mol Cell Endocrinol* 250, 84-92.
- Raja S, Avraham S, Avraham H (1997) Tyrosine phosphorylation of the novel protein-tyrosine kinase RAFTK during an early phase of platelet activation by an integrin glycoprotein IIb-IIIa-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 10941-7.
- Rankin T, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J (1996) Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 122, 2903-10.
- Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J (1999) Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126, 3847-55.

- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J (2003) Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 5, 33-43.
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J (2001) Defective zona pellucida in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128, 1119-26.
- Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B (2011) Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl* 13, 88-96.
- Reiss K, Saftig P (2009) The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20, 126-37.
- Ren D (2010) Sperm and the proton channel. *N Engl J Med* 362, 1934-5.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-9.
- Ren D, Xia J (2010) Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)* 25, 165-75.
- Rhee I, Zhong MC, Reizis B, Cheong C, Veillette A (2014) Control of dendritic cell migration, T cell-dependent immunity, and autoimmunity by protein tyrosine phosphatase PTPN12 expressed in dendritic cells. *Mol Cell Biol* 34, 888-99.
- Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW (2003) Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 69, 572-81.
- Rochwerger L, Cohen DJ, Cuasnicu PS (1992) Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol* 153, 83-90.
- Rochwerger L, Cuasnicu PS (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev* 31, 34-41.
- Rodeheffer C, Shur BD (2004) Sperm from beta1,4-galactosyltransferase I-null mice exhibit precocious capacitation. *Development* 131, 491-501.
- Roldan ER, Fleming AD (1989) Is a Ca²⁺-ATPase involved in Ca²⁺ regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa? *J Reprod Fertil* 85, 297-308.
- Roldan ER, Fragio C (1993) Phospholipase A2 activity and exocytosis of the ram sperm acrosome: regulation by bivalent cations. *Biochim Biophys Acta* 1168, 108-14.
- Rotman T, Etkovitz N, Spiegel A, Rubinstein S, Breitbart H (2010) Protein kinase A and protein kinase C(alpha)/PPP1CC2 play opposing roles in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction* 140, 43-56.
- Ruknudin A, Silver IA (1990) Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol Reprod Dev* 26, 63-8.
- Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta SK, Modi D (2012) Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl* 35, 633-44.
- Saling PM, Storey BT (1979) Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 83, 544-55.
- Santi CM, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L (2010) The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 584, 1041-6.
- Schaller MD (2008) Calcium-dependent Pyk2 activation: a role for calmodulin? *Biochem J* 410, e3-4.

- Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM (2007) Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl* 28, 706-16.
- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobeloch KP *et al.* (2004) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279, 28220-6.
- Shahar S, Wisner A, Ickowicz D, Lubart R, Shulman A, Breitbart H (2011) Light-mediated activation reveals a key role for protein kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility. *Hum Reprod* 26, 2274-82.
- Shalgi R, Kaplan R, Nebel L, Kraicer PF (1981) The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. *J Exp Zool* 217, 399-402.
- Shalgi R, Phillips DM (1980) Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol Reprod* 23, 433-44.
- Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W (1999) Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* 61, 1445-51.
- Shum WW, Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Roy JW, Hill E, Pittet MJ, Breton S, Da Silva N (2014) Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 90, 90.
- Si Y, Okuno M (1999) Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 61, 240-6.
- Si Y, Olds-Clarke P (2000) Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 62, 1231-9.
- Sidhu KS, Mate KE, Gunasekera T, Veal D, Hetherington L, Baker MA, Aitken RJ, Rodger JC (2004) A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tamar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction* 127, 95-103.
- Signorelli JR, Diaz ES, Fara K, Baron L, Morales P (2013) Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event. *PLoS One* 8, e81286.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-9.
- Sinha N, Pilder S, Vijayaraghavan S (2012) Significant expression levels of transgenic PPP1CC2 in testis and sperm are required to overcome the male infertility phenotype of Ppp1cc2 null mice. *PLoS One* 7, e47623.
- Skalhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA (2002) Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol* 16, 630-9.
- Sleight SB, Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrabble H, Herr JC, Visconti PE (2005) Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod* 73, 721-9.
- Smith FD, Scott JD (2006) Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur J Cell Biol* 85, 585-92.
- Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, da Cruz e Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S (1996) Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod* 54, 719-27.
- Smith JF, Syritysyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV (2013) Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6823-8.
- Soderling SH, Beavo JA (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 174-9.

- Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE (2009) Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 122, 2741-9.
- Soulsby M, Bennett AM (2009) Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. *Physiology (Bethesda)* 24, 281-9.
- Stein KK, Primakoff P, Myles D (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 117, 6269-74.
- Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 471, 382-6.
- Suarez S (2006) Gamete and Zygote Transport. In ed KaN (ed) *Physiology of Reproduction*. Academic Press, pp. 113-45.
- Suarez SS (1996) Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 17, 331-5.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44, 375-81.
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2, 168-84.
- Superti-Furga G (1995) Regulation of the Src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett* 369, 62-6.
- Sutovsky P (2009) Proteomic analysis of mammalian gametes and sperm-oocyte interactions. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66, 103-16.
- Tachibana I, Hemler ME (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* 146, 893-904.
- Takano H, Yanagimachi R, Urch UA (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, 79-91.
- Takano H, YR, and Urch U.A. (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, 79-91.
- Talbot P (1985) Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat* 174, 331-46.
- Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E (2014) The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 29, 418-28.
- 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. *Mol Reprod Dev* 61, 414-24.
- Tapia S, Rojas M, Morales P, Ramirez MA, Diaz ES (2011) The laminin-induced acrosome reaction in human sperm is mediated by Src kinases and the proteasome. *Biol Reprod* 85, 357-66.
- Tardif S, Dube C, Bailey JL (2003) Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68, 207-13.
- Tardif S, Dube C, Chevalier S, Bailey JL (2001) Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 65, 784-92.
- Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR (1988) Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* 106, 1625-33.
- Tash JS, Means AR (1988) cAMP-dependent regulatory processes in the acquisition and control of sperm flagellar movement. *Prog Clin Biol Res* 267, 335-55.

- Tateno H, Krapf D, Hino T, Sanchez-Cardenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE (2013) Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18543-8.
- Tatosyan AG, Mizenina OA (2000) Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65, 49-58.
- Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP (2012) Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 646-58.
- Thimon V, Calvo E, Koukoui O, Legare C, Sullivan R (2008) Effects of vasectomy on gene expression profiling along the human epididymis. *Biol Reprod* 79, 262-73.
- Thompson WJ, Brooker G, Appleman MM (1974) Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates. *Methods Enzymol* 38, 205-12.
- Torres-Flores V, Picazo-Juarez G, Hernandez-Rueda Y, Darszon A, Gonzalez-Martinez MT (2011) Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod* 26, 2626-35.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Travis AJ, Kopf GS (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110, 731-6.
- Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall A, Cowland JB, Borregaard N, Kjeldsen L (2005) Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl* 26, 333-42.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D (2001) Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* 64, 1350-7.
- Urner F, Sakkas D (2003) Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 125, 17-26.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM (2005) Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 11, 583-90.
- Varano G, Lombardi A, Cantini G, Forti G, Baldi E, Luconi M (2008) Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Hum Reprod* 23, 2652-62.
- Varmuza S, Jurisicova A, Okano K, Hudson J, Boekelheide K, Shipp EB (1999) Spermiogenesis is impaired in mice bearing a targeted mutation in the protein phosphatase 1c γ gene. *Dev Biol* 205, 98-110.
- Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW (1999) Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol Endocrinol* 13, 705-17.
- Virshup DM, Shenolikar S (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33, 537-45.
- Visconti PE (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 667-8.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-37.
- Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Acevedo JJ, Darszon A (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13, 395-405.

- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-50.
- Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG (1999) Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61, 76-84.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53, 133-50.
- Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* 3, 174-82.
- Wall M, O'Flaherty V, Ginty F, Houghton JA (1994) Measurement of intracellular calcium levels of human spermatozoa acrosome reacted by electroporation. *Arch Androl* 32, 185-95.
- Wang C, Chung BC, Yan H, Wang HG, Lee SY, Pitt GS (2014) Structural analyses of Ca²⁺/CaM interaction with NaV channel C-termini reveal mechanisms of calcium-dependent regulation. *Nat Commun* 5, 4896.
- Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL (2007) A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9325-30.
- Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL (2003) A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5, 1117-22.
- Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D (2009) A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* 81, 539-44.
- Wang HX, Kolesnikova TV, Denison C, Gygi SP, Hemler ME (2011) The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J Cell Sci* 124, 2702-10.
- Wasco WM, Orr GA (1984) Function of calmodulin in mammalian sperm: presence of a calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with demembrated rat caudal epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 118, 636-42.
- Wassarman PM (1988a) Fertilization in mammals. *Sci Am* 259, 78-84.
- Wassarman PM (1988b) Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57, 415-42.
- Wassarman PM, Bleil JD, Florman HM, Greve JM, Roller RJ, Salzmann GS, Samuels FG (1985) The mouse egg's receptor for sperm: what is it and how does it work? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 11-9.
- Wassarman PM, Litscher ES (2001) Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168, 36-45.
- Wei H, Deng F, Chen Y, Qin Y, Hao Y, Guo X (2014) Ultrafine carbon black induces glutamate and ATP release by activating connexin and pannexin hemichannels in cultured astrocytes. *Toxicology* 323, 32-41.
- Wennemuth G, Babcock DF, Hille B (2003a) Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol* 122, 115-28.
- Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003b) Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ -channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130, 1317-26.
- Wertheimer E, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Sanchez-Cardenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J *et al.* (2013) Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem* 288, 35307-20.
- Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Trevino CL, Chavez J, Hernandez-Gonzalez EO, Darszon A, Visconti PE (2008) Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 35539-50.

- Westmuckett AD, Nguyen EB, Herlea-Pana OM, Alvau A, Salicioni AM, Moore KL (2014) Impaired sperm maturation in RNASE9 knockout mice. *Biol Reprod* 90, 120.
- Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 142, 473-84.
- Wilhelm B, Brandenburger T, Post H, Aumuller G (2008) Expression and localization of PMCA4 in rat testis and epididymis. *Histochem Cell Biol* 129, 331-43.
- Xia J, Ren D (2009) The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 119.
- Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M (2006) Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 296, 353-62.
- Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M (2006) Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmegin (Clgn)-deficient mice. *Biol Reprod* 75, 760-6.
- Yamazaki Y, Brown RL, Morita T (2002) Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry* 41, 11331-7.
- Yamazaki Y, Morita T (2004) Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44, 227-31.
- Yanagimachi R (1969) In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* 18, 275-86.
- Yanagimachi R (1978) Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol Reprod* 19, 949-58.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction* 189-317.
- Yanagimachi R, Bhattacharyya A (1988) Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J Exp Zool* 248, 354-60.
- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H (1985) Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat* 172, 317-30.
- Yang S, Roselli F, Patchev AV, Yu S, Almeida OF (2013) Non-receptor-tyrosine kinases integrate fast glucocorticoid signaling in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 288, 23725-39.
- Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderegg RJ, Graves LM *et al.* (1996) Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 271, 29993-8.
- Yudin AI, Vandevoort CA, Li MW, Overstreet JW (1999) PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 53, 350-62.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171, 554-63.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM (1996) pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 173, 510-20.
- Zhang H, Martin-Deleon PA (2003) Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 24, 51-8.
- Zhang H, Yu H, Wang X, Zheng W, Yang B, Pi J, He G, Qu W (2012) (S)-alpha-chlorohydrin inhibits protein tyrosine phosphorylation through blocking cyclic AMP - protein kinase A pathway in spermatozoa. *PLoS One* 7, e43004.
- Zheng LP, Wang HF, Li BM, Zeng XH (2013) Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception* 88, 485-91.

Zhou C, Kang W, Baba T (2012) Functional characterization of double-knockout mouse sperm lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in fertilization. *J Reprod Dev* 58, 330-7.

Zhuo L, Kimata K (2001) Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 26, 189-96.

RESUMEN

En los mamíferos, los espermatozoides testiculares no tienen la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito. Para adquirir dicha capacidad, deben primero sufrir un proceso de maduración epididimaria, seguido por un proceso de capacitación que ocurre en el tracto femenino. La capacitación espermática es de suma importancia ya que sólo luego de ocurrir dicho proceso, un espermatozoide puede sufrir la reacción acrosomal y la hiperactivación, penetrar el cúmulus y la zona pelúcida que rodean al ovocito y, finalmente, fusionarse con la membrana plasmática de la gameta femenina para dar comienzo al desarrollo de un nuevo individuo. A pesar de la relevancia del proceso de capacitación, es aún muy escasa la información disponible acerca de la identidad de las moléculas involucradas. Dado que el espermatozoide es transcripcional y traduccionalmente inactivo, el mismo depende fuertemente de segundos mensajeros intracelulares como así también de modificaciones post-traduccionales para su funcionamiento tales como el aumento en la fosforilación de múltiples proteínas en tirosina (Tyr) que ocurre durante la capacitación. El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en las cascadas de señalización conducentes a la capacitación del espermatozoide de mamífero y, de este modo, contribuir a una mejor comprensión del proceso de interacción entre el espermatozoide y el ovocito. Teniendo en cuenta que el control de la fosforilación en Tyr involucra una vía de transducción de señales mediada por AMPc y PKA, el primer objetivo del presente trabajo consistió en investigar la activación temporal de dicha cascada y su correlación con el estado funcional del espermatozoide, como así también evaluar la participación de un novedoso mecanismo molecular que involucra Tyr quinasas de la familia Src (SFKs). Los resultados indicaron que los espermatozoides sufren no sólo eventos muy tempranos tales como la producción de AMPc y la fosforilación de los sustratos de PKA, sino que también necesitan activar vías de señalización de curso más lento tales como el incremento en la fosforilación de proteínas en Tyr para lograr un estado funcional. Asimismo, los resultados apoyaron la existencia de dos vías conducentes a la fosforilación en Tyr y requeridas para desarrollar una capacitación funcional en el espermatozoide tanto de roedor como de humano: una cascada dependiente de la activación de PKA, y otra mediada por la inactivación de Serina/Treonina fosfatasa a través de SFKs, las cuales se entrecruzan a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA. Considerando que la capacitación espermática también se correlaciona con un incremento en la concentración intracelular de calcio (Ca^{2+}), el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral se centró en estudiar los mecanismos moleculares involucrados en

la decodificación de las señales dependientes del Ca^{2+} y dilucidar la posible participación de la Tyr quinasa rica en Prolina 2 (PYK2) en dicha cascada de señalización en el espermatozoide humano. Los resultados revelaron que el Ca^{2+} modula la fosforilación en Tyr sin afectar los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA, a través de efectores moleculares tales como la calmodulina y la Serina/Treonina fosfatasa PP2B. Además, brindamos evidencias de que PYK2 sería la Tyr quinasa que actuaría como una plataforma integradora de las distintas señales conducentes a la fosforilación en Tyr, siendo el primer intermediario reportado ubicado río abajo de PKA, y requerido para la capacidad fertilizante del espermatozoide humano.

Por otro lado, la capacitación involucra la liberación de diversas proteínas asociadas a la superficie del espermatozoide denominadas factores decapacitantes, entre las cuales se encuentra la proteína epididimaria CRISP1 (Cysteine-Rich Secretory Proteins 1). Sin embargo, los espermatozoides carentes de dicha proteína presentan niveles bajos de fosforilación en Tyr. En base a estas observaciones, el último objetivo de este trabajo consistió en estudiar las distintas vías de señalización reguladas por CRISP1 durante la capacitación del espermatozoide utilizando dos estrategias experimentales complementarias: la exposición de espermatozoides a CRISP1 purificada y el empleo del modelo de animales “*knockout*” para dicha proteína. Los resultados revelaron que CRISP1 inhibe las corrientes de Ca^{2+} a través de los canales TRPM8 y CatSper, lo cual impactaría en las vías de transducción de señales que conducen a la capacitación del espermatozoide. De este modo, la falta de la actividad inhibitoria sobre CatSper en los espermatozoides KO llevaría a una desregulación en las cascadas de señalización que involucran al AMPc y al Ca^{2+} que, finalmente, conducirían a una disminución en la fosforilación de los sustratos de PKA y en Tyr, como así también en la hiperactividad.

En conjunto, los estudios presentados en esta Tesis Doctoral permitirán una mayor comprensión de los mecanismos moleculares por los cuales el espermatozoide expresa su capacidad fertilizante como consecuencia de la capacitación, contribuyendo así al futuro desarrollo de nuevos y mejores métodos tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.