



Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires



TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Función de la proteína MARCKS en la exocitosis
acrosomal de espermatozoides humanos**

Autor

Lic. Marcelo Rodriguez Peña

Directora

Dra. Marcela Michaut

Co-Directora

Dr. Luis Mayorga

Consejero de Estudio

Dr. Luis Palaoro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Reproductiva y
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de
Histología y Embriología de Mendoza Dr. M. Burgos (IHEM-
CONICET) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad
Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

2014

"La ciencia es un diez por ciento de inspiración y un noventa por ciento de transpiración" Thomas Edison

el noventa por ciento de este doctorado se lo debo a

A mi familia (Ohana) Jime y Lupe. Guille, Cristian, Chino, Brat y 1220.

que fueron los que estuvieron en los momentos duros de la ciencia.

*Y a todos **mis amigos** que de alguna manera hicieron esto posible y que me acompañaron día a día y me alentaron a finalizar esta etapa*

(Cele, Orne, Mati, Flores, Mili, Gaby, Euge, Roggero, Ale, Cueto, Claudio, Julián, Matilde, Gio, Claudia, a los chicos del futbol de los jueves, a mi querida amiga corredora Laura, a mis alumnos-profe Marianela y Osvaldo, mi familia de Stgo Pato, Renta, Emilia, Juan, Sofía, Santi y Xoaquin)

y a los que tuvieron la paciencia de leer y corregir las primeras versiones que querían ser las ultimas y eran siempre las penúltimas ya que siempre había algo que corregir

Agradecimientos

Por darme la oportunidad de doctorarme:

IHEM-CONICET

Universidad Nacional de Cuyo

CONICET

Al programa de posgrado de la Facultad de

Farmacia y Bioquímica de la

Universidad de Buenos Aires

Por dirigirme:

Marcela Michaut

Luis Mayorga

A mi consejero de estudio:

Luis Palaoro

INDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
EL ESPERMATOZOIDE	6
MADURACIÓN ESPERMÁTICA	12
CAPACITACIÓN	14
Adquisición de la motilidad hiperactivada	16
Cambios a nivel de la membrana plasmática durante la capacitación	17
Cambio en los estados de fosforilación durante la capacitación	18
EXOCITOSIS ACROSOMAL: UN TIPO ESPECIAL DE EXOCITOSIS REGULADA	21
Calcio	27
Maquinaria de fusión en espermatozoides humanos permeabilizados	30
Función de los lípidos durante la exocitosis acrosomal	34
MARCKS: CONCEPTOS CLÁSICOS	38
Estructura de MARCKS	39
Unión reversible de MARCKS a las membranas	40
Evidencia de MARCKS en procesos exocíticos	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	46
HIPÓTESIS	47
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Reactivos	52

Mutagenesis sitio dirigida del dominio efector de MARCKS	53
Producción del dominio efector de MARCKS recombinante y sus mutantes	54
Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	54
Ensayo de Western blot	55
Ensayo de Dot blot	56
Obtención de membranas de espermatozoides humanos	57
Ensayo de exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados	57
Ensayo de exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos	59
Inmunofluorescencia indirecta	59
Evaluación de la difusión de los dominios recombinantes en espermatozoides permeabilizados	60
Evaluación de la permeabilidad del péptido ED ₁₅₄₋₁₆₅ -TMR	61
Microscopía electrónica e inmunomarcado	61
Mediciones de Ca ²⁺ intracelular en espermatozoides humanos intactos	62
Análisis estadístico	62
RESULTADOS	64
Objetivo específico uno	65
MARCKS está presente en espermatozoides humanos	65
MARCKS participa en las vías de señales durante la exocitosis acrosomal	70
El dominio efector de MARCKS inhibe la vía de señal que conduce a la exocitosis acrosomal	75
La fosforilación del dominio efector de MARCKS bloquea su efecto durante la exocitosis acrosomal	77
El efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS es revertido por PIP2 y por adenofostina	82

CONCLUSIÓN DEL OBJETIVO UNO	85
Objetivo específico dos	86
El péptido que posee la secuencia aminoacídica 154-165 del dominio efector de MARCKS es permeable a membrana	86
El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos intactos	89
El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe los movimientos de Ca ²⁺ durante la exocitosis acrosomal	90
MARCKS se fosforila durante la exocitosis acrosomal	93
MARCKS se transloca desde las membranas al citosol celular durante la exocitosis acrosomal	98
Las PKC clásicas son activadas durante la exocitosis acrosomal	101
MARCKS es desfosforilada durante la capacitación	104
CONCLUSIÓN DEL OBJETIVO DOS	106
DISCUSIÓN	108
RESUMEN	122
BIBLIOGRAFÍA	124
TRABAJO PUBLICADO	146

ABREVIATURAS

$\gamma^{32}\text{ATP}$: ATP marcado con ^{32}P .

αSNAP : Proteína soluble alfa de unión a NSF.

2-APB: 2-amino-etoxidifenilborato.

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

Anti-ED: Anticuerpo que reconoce específicamente la secuencia próxima al residuo de serina 162 del dominio efector de MARCKS.

Anti-fosfo MARCKS: Anticuerpo que reconoce los residuos de serina 152/156 fosforilados del dominio efector de MARCKS.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CatSper: Canales de Ca^{2+} Cation Sperm.

DAG: Diacilglicerol.

ED: Dominio Efector de MARCKS.

Epac: Proteína de intercambio directamente activada por AMPc.

GST: Glutación S-transferasa.

HRP: Peroxidasa de rabanito.

HTF: Fluido tubárico humano.

IP_3 : Inositol 1,4,5-trifosfato.

LCA-TRITC: Lectina *Lens culinaris* conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina.

MARCKS: Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate.

N-19: anticuerpo que reconoce los residuos aminoacídicos 1-19 de la región N-terminal de MARCKS.

N-66: anticuerpo que reconoce los residuos de los aminoácidos 2-66 de la región N-terminal de MARCKS.

NSF: Factor sensible a N-etilmaleimida.

pED: Dominio Efecto de MARCKS fosforilado *in vitro*

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.

PI4K: Fosfatidilinositol 4-quinasa.

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PLD: Fosfolipasa D.

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.

PSA-FITC: Lectina *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína.

sAC: Adenilato ciclasa soluble.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SLO: Estreptolisina O.

SNARE: Receptores de SNAP.

SOCCs: Canales de calcio operados por reservorios.

TMR: Tetrametilrodamina.

VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas.

INTRODUCCIÓN

Durante la fecundación la gameta masculina, el espermatozoide, se fusiona con la gameta femenina, el ovocito, para formar un nuevo embrión diferente a sus progenitores. Para que esta fusión sea exitosa, cada gameta sufre una serie de transformaciones y modificaciones que la preparan para este encuentro. En el caso particular del espermatozoide, éste es formado durante la espermatogénesis y luego durante la espermiogénesis el espermatozoide adquiere sus estructuras distintivas que son la cabeza y el flagelo. A pesar de estos grandes cambios morfo-genéticos el espermatozoide es incapaz de fusionarse con el ovocito, para ello el espermatozoide debe sufrir otros cambios, que le permiten adquirir la capacidad fecundante. A continuación se describen los procesos a partir de los cuales se forma el espermatozoide y luego se describirán los eventos previos requeridos para que el espermatozoide fecunde al ovocito como maduración espermática, capacitación y un tipo especial de secreción denominada exocitosis acrosomal, proceso esencial para la penetración de la zona pelúcida y fusión con el ovocito.

EL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides son generados en el testículo durante la espermatogénesis (De Rooij D. G. and Russell L. D. 2000; Chiarini-Garcia H. and Russell L. D. 2002; Xiao X. and Yang W. X. 2007). En el testículo se encuentran células llamadas espermatogonias que son células diploides, inmóviles y sin diferenciar. Estas células son capaces de dividirse y generar células diploides llamadas espermatocitos primarios. Estas células mediante división meiótica generan dos espermatocitos secundarios que luego vuelven a sufrir una segunda meiosis generando cuatro células haploides denominadas espermátides. Finalmente, las espermátides adquieren las características distintivas del espermatozoide mediante la espermiogénesis

(Fig. 1). Durante la espermiogénesis ocurren varios cambios morfológicos que incluyen: *I*) la formación de una única y gran vesícula denominada vesícula acrosomal, *II*) se genera la cabeza del espermatozoide, el cual contiene el núcleo altamente condensado, *III*) se origina el flagelo a partir de los centriolos, *IV*) se produce la migración y el ordenamiento de las mitocondrias en una vaina helicoidal alrededor del axonema en la pieza media de la cola del espermatozoide y *V*) se pierde la mayor parte del citoplasma (Olivera M., et al 2007) (Fig. 2).

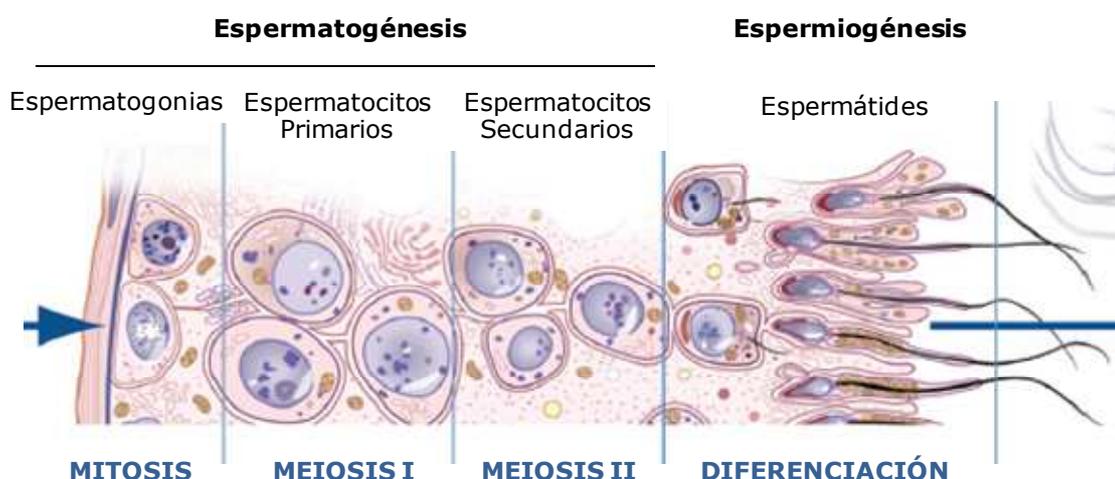


Figura 1: Representación esquemática de la formación de los espermatozoides. Figura modificada de [Http://biol2medio.com.ar/2009/06/espermatogenesis-en-los-tubulos.html](http://biol2medio.com.ar/2009/06/espermatogenesis-en-los-tubulos.html)

Una vez finalizado los procesos de espermatogénesis y la espermiogénesis se obtiene un espermatozoide formado por una cabeza responsable de transportar la carga nuclear y una cola la cual permite al espermatozoide a travesar el tracto reproductor femenino y las diversas envolturas que recubren al ovocito (Olivera M., et al 2007; Buffone M.G., et al 2012) (Fig. 3A).

La forma de la cabeza del espermatozoide varía de acuerdo a la especie, por ejemplo los espermatozoides de ratón presentan una cabeza falciforme, mientras que los espermatozoides humanos presentan una cabeza espatulada (Eddy E. M. and O'Brien D. A. 1995). Además la cabeza de los espermatozoides humanos puede ser dividida en el núcleo y en la región acrosomal, que comprende una única vesícula secretoria denominada acrosoma, que puede a su vez subdividirse en la tapa acrosomal (TA) donde

encuentran enzimas hidrolíticas que son liberadas durante la exocitosis acrosomal y el segmento ecuatorial (SE), que tiene una función primordial durante la fusión con el ovocito (Fig. 3A y B).

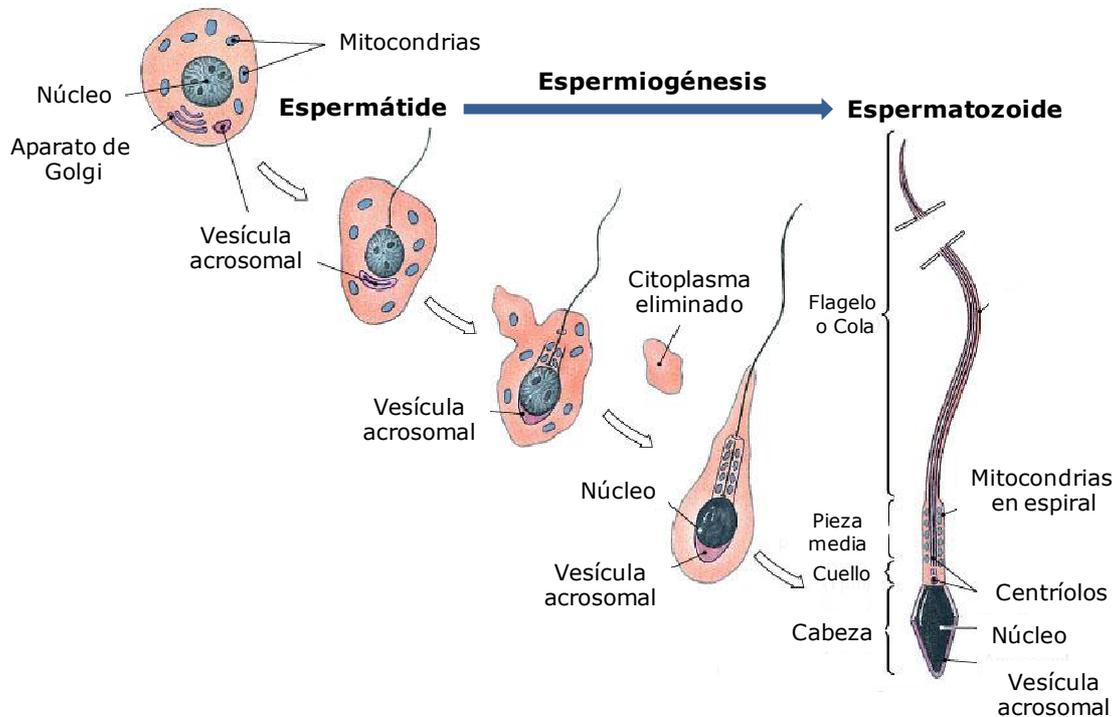


Figura 2: Representación esquemática de la espermiogénesis. La espermiogénesis produce grandes alteraciones morfo-genéticas en la espermátide lo que lleva a la obtención de una célula altamente diferenciada formada por una cabeza y una cola. Figura modificada de <https://wikis.engrade.com/gametogenesisyfecundaci1>

El núcleo, se caracteriza por tener la cromatina altamente condensada y esto se debe al reemplazo de las histonas, por protaminas (Ward W. S. and Coffey D. S. 1991). La interacción del ADN con las protaminas es mediante puentes disulfuro, produciendo un empaquetamiento mayor del ADN, formando una estructura muy compacta denominada estructura cristalina del ADN. Este alto grado de compactación del ADN es incompatible con el proceso de replicación y transcripción (Ward W. S. and Coffey D. S. 1991). Si bien se ha descrito la presencia de ARN mensajeros en el espermatozoide (Boerke A., et al 2007), se desconoce la función de los mismos ya que el espermatozoide no presenta ribosomas. Recientemente se ha demostrado síntesis de proteínas en las mitocondrias (Gur Y. and Breitbart H. 2006), aunque la tasa de síntesis es prácticamente nula y todavía hay mucha controversia al respecto, por lo que se asume que

el espermatozoide no es capaz de sintetizar proteínas. Por lo tanto la mayor parte de la actividad del espermatozoide se lleva a cabo mediante modificaciones postraduccionales ya que la síntesis de proteínas *de novo* es casi nula.

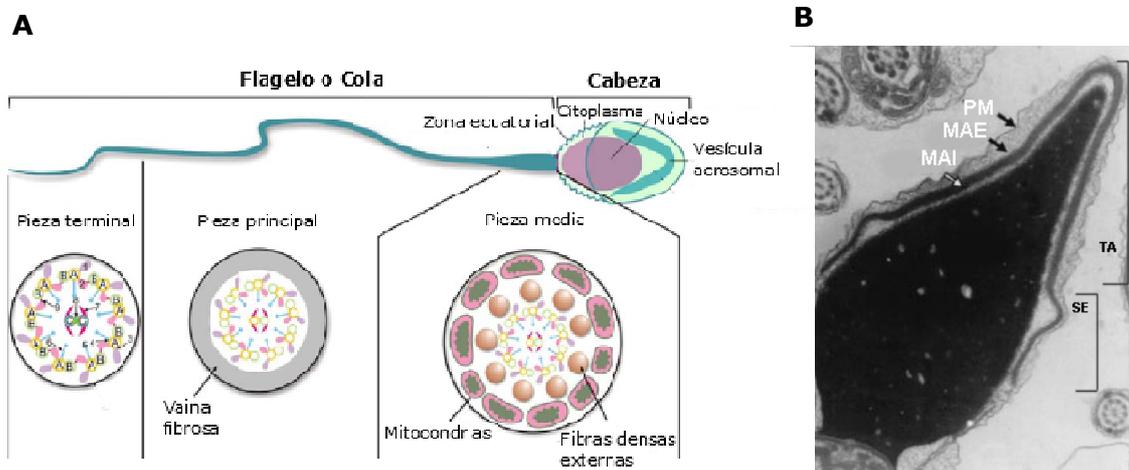


Figura 3: Características de un espermatozoide humano. (A) Esquema de un espermatozoide humano. El espermatozoide tiene dos regiones distintivas: el flagelo y la cola. El flagelo se divide en tres regiones: la pieza terminal, la pieza media y la pieza principal. La cabeza contiene el núcleo altamente condensado y, por encima de éste, la vesícula acrosomal. **(B)** Micrografía electrónica de la cabeza de un espermatozoide humano donde se destacan la membranas que limitan el acrosoma: la membrana acrosomal externa (MAE) cercana a la membrana plasmática (PM) y la membrana acrosomal interna (MAI) cercana al núcleo, tapa acrosomal (TA) y segmento ecuatorial (SE). Esquema y foto modificada de Olivera M., et al 2007 y Michaut M.A., et al 2000 respectivamente

El acrosoma es una gran vesícula que se localiza por encima del núcleo y al igual que la cabeza del espermatozoide, el tamaño y la forma de esta vesícula varía entre especies. Esta gran vesícula se origina a partir del aparato de Golgi (Burgos M. H. and Fawcett D. W. 1955; Yanagimachi R. 1994; Yang W. X. and Sperry A. O. 2003) y es delimitado por una membrana acrosomal interna próxima al núcleo y se continúa formando la membrana acrosomal externa, próxima a la membrana plasmática (Fig. 3B). En el interior del acrosoma hay enzimas hidrolíticas, en su mayoría son glicosidasas y proteasas. Acrosina es la enzima que se encuentra en mayor proporción y la que más se ha estudiado durante la fecundación. Acrosina es una serina-proteasa similar a la tripsina, que se expresa solamente en el espermatozoide y se localiza en la matriz acrosomal (Eddy E. M. and O'Brien

D. A. 1995). Otra enzima serina-proteasa que se localiza en las membranas del gránulo acrosomal es PRSS21 o también llamada testisin (Netzel-Arnett S., et al 2009). Acrosina y PRSS21 se sintetizan como pro-enzimas, y se produce su activación una vez que son secretadas durante la exocitosis acrosomal. Por casi por más de treinta años ha sido ampliamente aceptado que estas enzimas una vez secretadas al medio extracelular, le permiten al espermatozoide degradar y atravesar la zona pelúcida (Florman H.M. and Storey B.T. 1982) una cubierta de glicoproteínas que rodea al ovocito, para luego alcanzar y fecundar al ovocito. Recientemente varios trabajos donde se ha demostrado que estas proteasas son importantes pero no esenciales para la fecundación (Baba T., et al 1994; Zhou C., et al 2012). Mediante el uso de ratones knock-out para las enzimas acrosina ($Acr^{-/-}$) y PRSS21 ($Prss21^{-/-}$) se demostró que estos ratones son capaces de atravesar la zona pelúcida y fecundar el ovocito a pesar de que carecen de estas enzimas (Netzel-Arnett S., et al 2009). Aun más los ratones doble knock-out para estas enzimas ($Acr^{-/-}/Prss21^{-/-}$) siguen siendo fértiles, aunque la fertilidad de su descendencia es un 50 % menor comparado con los ratones del tipo salvaje. Otro dato peculiar es que los espermatozoides de los ratones doble knock-out son incapaces de fecundar el ovocito en condiciones *in vitro* y esto se debe a que estos espermatozoides no pueden penetrar la matriz de las células del cúmulus, que consiste en células foliculares dispersas en una matriz de ácido hialurónico. Estos resultados han llevado a replantear cuál es mecanismo por el cual el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida del ovocito, si se debe a un efecto mecánico o químico. Además han surgido más controversias acerca de la función del acrosoma y de su contenido a partir del trabajo presentado por Jin y colaboradores, donde demuestran en el modelo de ratón, que los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito deben iniciar la exocitosis acrosomal cuando estos atraviesan la matriz del cúmulo, y no cuando se unen a la zona pelúcida del ovocito (Jin M., et al 2011).

Otra característica importante del gránulo acrosomal es que actúa como un reservorio de Ca^{2+} , y se ha demostrado que durante la exocitosis acrosomal se producen movimientos de Ca^{2+} desde el acrosoma a través de

canales de Ca^{2+} sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (De Blas G., et al 2002; Herrick S. B., 2005).

Entre la cabeza y la cola del espermatozoide se encuentra el cuello donde se localiza el centríolo que da origen al flagelo (Fig. 3A). El flagelo es el responsable de impulsar al espermatozoide a través del tracto reproductor femenino y atravesar las diversas cubiertas que rodean al ovocito como las células del cúmulo y la zona pelúcida. El flagelo se puede dividir en tres regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Fig. 3A). Internamente y a lo largo del flagelo se extiende un axonema central el cual está compuesto por una disposición característica de microtúbulos 9+2 (Eddy E. M. and O'Brien D. A. 1995). Rodeando esta estructura se encuentran las fibras densas externas. En la pieza media estas fibras son recubiertas, por un gran número de mitocondrias, mientras que en el resto del flagelo se encuentra rodeado por la vaina fibrosa (Eddy E. M., et al 2003; Eddy E. M. 2007) (Fig. 3A). La gran cantidad de mitocondrias que presenta el espermatozoide son las responsables de otorgar la energía necesaria para el viaje del espermatozoide a través del tracto reproductor femenino.

La cabeza y la cola del espermatozoide se encuentran rodeadas por la membrana plasmática y al igual que en otros modelos celulares la membrana plasmática de los espermatozoides presenta diferentes dominios bien definidos. Estos dominios se caracterizan por presentar diferente composición lipídica y distintas proteínas (Eddy E. M. and O'Brien D. A. 1995). En la cabeza se encuentran dos dominios principales, el dominio acrosomal y el dominio post-acrosomal, mientras que la membrana plasmática de la cola está dividida en dos dominios: uno cubre la pieza media y el otro abarca la pieza principal y la pieza terminal (Eddy E. M. and O'Brien D. A. 1995). Se cree que estos dominios de membranas se especializan en concentrar moléculas involucradas en diferentes vías de señalización (Reid A.T., et al 2011; Gadella B.M. 2012).

A pesar de que mediante los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis se obtienen espermatozoides que se caracterizan por la presencia de un flagelo y una cabeza que contiene al núcleo celular y a la

vesícula acrosomal, estos espermatozoides son inmóviles e incapaces de excitar el gránulo acrosomal, por lo que no pueden fecundar al ovocito. Para ello los espermatozoides deben sufrir procesos post-testiculares conocidos como maduración espermática, capacitación y exocitosis acrosomal.

MADURACIÓN ESPERMÁTICA

Luego de la espermiogénesis, los espermatozoides son liberados en una forma funcionalmente inactiva (incapaces de fecundar el ovocito) hacia la luz del túbulo seminífero donde son transportados hacia el epidídimo, lugar donde se produce la maduración espermática. La característica más importante que se adquiere durante la maduración espermática es el desarrollo de la motilidad (Yanagimachi R., 1994; Reid A.T., et al 2011; Buffone M.G., et al 2012). Si bien se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la maduración espermática, este proceso ha sido íntimamente relacionado con cambios producidos en la membrana plasmática ya que la misma sufre varios cambios físicos y químicos, produciéndose cambios en la localización de proteínas. Un paso fundamental durante la maduración espermática es la incorporación de proteínas del epidídimo (Yanagimachi R., et al 1985; Caballero J., et al 2010; Sullivan R., et al 2007). La incorporación de estas proteínas se lleva a cabo mediante vesículas llamadas epididimosomas, las cuales son secretadas por las células epiteliales del epidídimo mediante un proceso apocrina hacia el compartimento intraluminal (Fig. 4). Los epididimosomas tienen un diámetro de 50 a 500 nm y presentan una compleja composición de proteínas. Estas proteínas han sido involucradas en varios procesos como la adquisición de la motilidad, efecto protector ante las especies reactivas del oxígeno, eliminación de espermatozoides defectuosos y también han sido involucradas durante la fecundación del ovocito.

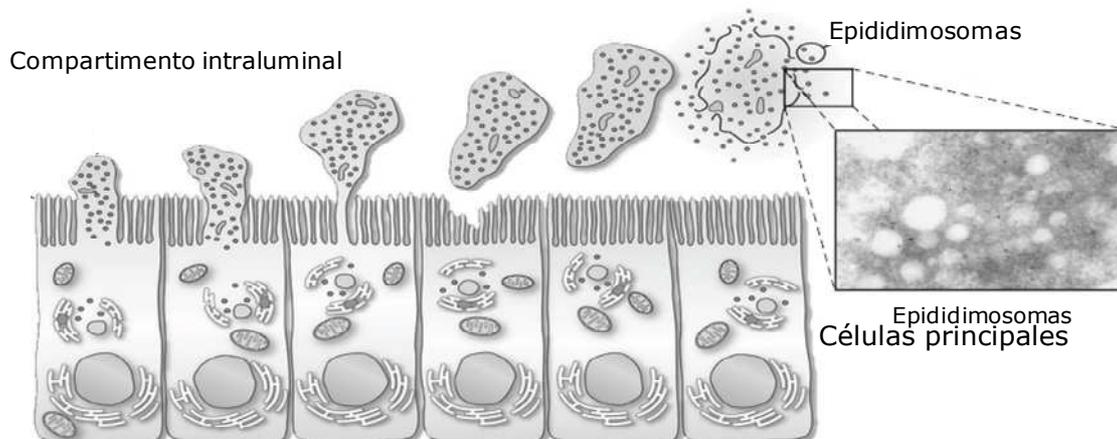


Figura 4: Representación esquemática de la secreción apocrina en las células principales del epidídimo. En el recuadro se muestra una microscopía electrónica de los epididimosomas. Figura modificada de Sullivan G., et al 2007.

La transferencia de proteínas a los espermatozoides no es por fusión de los epididimosomas con los espermatozoides, sino más bien por un proceso de transferencia regulada de proteínas ya que sólo se transfieren un selecto grupo de proteínas y a ciertas zonas del espermatozoide (Caballero J., et al 2010) (Fig. 5). Por ejemplo estas proteínas son transferidas a la pieza media y a la región acrosomal, siendo estas regiones involucradas en la motilidad y en la interacción con el ovocito, respectivamente.

Además durante la maduración espermática se produce la fosforilación y la glicosilación de varias proteínas. Estos cambios actuarían como punto de control ya que impiden que el proceso de exocitosis acrosomal ocurra prematuramente.

Después de la maduración espermática en el epidídimo los espermatozoides deben sufrir la capacitación espermática en el tracto reproductor femenino, fenómeno que se describirá a continuación.

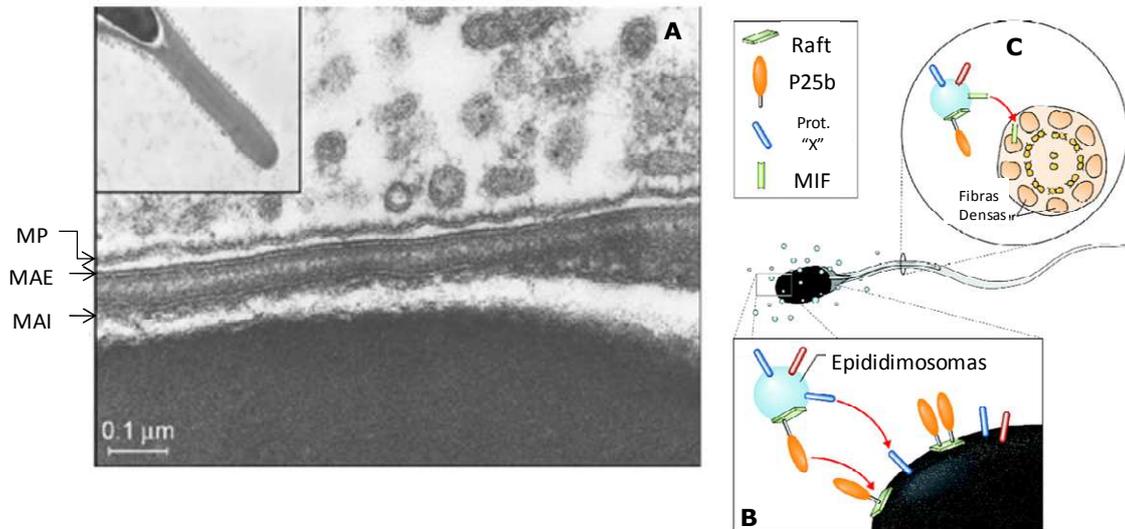


Figura 5: (A) Microscopía electrónica mostrando los epididimosomas alrededor de un espermatozoide de hámster. En el recuadro se muestra la apariencia general del acrosoma rodeado por estas vesículas. Foto modificada de Yanagimachi et al. 1985. **(B y C)** Representación esquemática de la transferencia de proteínas desde un epididimosoma hacia un espermatozoide epididimal. **(B)** La proteína epididimal bovina P25b se asocia principalmente con los microdominios Raft de los epididimosomas y es transferida hacia los microdominios Raft presentes en la superficie de los espermatozoides. Otras proteínas no identificadas (Proteína "X") son transferidas a la superficie de los espermatozoides pero no a los microdominios Raft. **(C)** Otra proteína asociada a los epididimosomas es el Factor Inhibitorio de Migración de Macrófagos (MIF), el cual es internalizado y se asocia con las fibras densas presentes en el flagelo. Figura modificada de Sullivan R., et al 2007.

CAPACITACIÓN

Una de las características sobresaliente acerca de la capacitación espermática se demostró en la década de los 50's. Chang (Chang M. C. 1951) y Austin (Austin C. R. 1951) observaron que los espermatozoides recién eyaculados eran incapaces de fecundar al ovocito y que los espermatozoides deben estar en el tracto reproductor femenino por un tiempo antes de adquirir su capacidad fecundante. Durante la capacitación los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y biofísicos, necesarios para fecundar el ovocito (Reid A.T., et al 2011). Estos cambios pueden ocurrir apenas el espermatozoide es eyaculado mientras que otros cambios requieren un tiempo mayor de incubación en el tracto reproductor femenino (Visconti P.E. 2009; Visconti P.E., et al 2011).

Los cambios característicos que se producen durante la capacitación son: por un lado alteraciones en los patrones de motilidad del flagelo, lo que se conoce como motilidad hiperactivada (Suarez S. S. 2008). Por otro lado, a nivel de la membrana plasmática, se produce una hiperpolarización de la misma y esto se debe a que se produce la activación de varios canales iónicos, lo que conduce a un aumento en la concentración intracelular de diferentes iones como K^+ y HCO_3^- (Zeng Y., et al 1995; Florman H.M., et al 2008), además se produce una redistribución de antígenos de membrana (Gadella B. M., et al 1994; Gadella B. M., et al 1995) y cambios en la composición lipídica como pérdida de colesterol (Cross N. L. 1998). Otro rasgo característico de la capacitación es el cambio en el estado de fosforilación de varias proteínas tanto en residuo tirosina como en residuos de serina/treonina (Visconti P. E., et al 1994; Flesch F. M., et al 1999; Visconti P. E., et al 2002; Visconti P.E. 2009; Alnagar F.A., et al 2010; Visconti P.E., et al 2011;). Los cambios anteriormente mencionados llevan a la adquisición de la motilidad hiperactivada y la capacidad de excitar el gránulo acrosomal en respuesta a un estímulo apropiado, siendo estos dos fenómenos esenciales para fecundar el ovocito.

En condiciones fisiológicas la capacitación espermática se produce en el tracto genital femenino, principalmente en el oviducto. El fluido del oviducto tiene la composición iónica adecuada donde además hay proteínas aceptoras de colesterol, como la albúmina y las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés High density lipoprotein) (Thérien I., et al 2001; Jha K. N., et al 2008). A su vez, los espermatozoides también pueden ser capacitados *in vitro*. Si bien el contenido de los medios capacitantes para espermatozoide depende de la especie en estudio, en general HCO_3^- , Ca^{+2} y albúmina son los componentes esenciales para la capacitación en todas las especies (Visconti P. E. et al 1998). Varios estudios han demostrado que el HCO_3^- y el Ca^{2+} son necesarios para los procesos de movilización de iones y transducción de señales, como se explicará más adelante, mientras que la albúmina se requiere para que se produzca la salida de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Adquisición de la motilidad hiperactivada

Una vez que los espermatozoides son eyaculados, éstos muestran un patrón de motilidad conocido como motilidad progresiva. Sin embargo y a pesar de que los espermatozoides son móviles, éstos aún son incapaces de penetrar las diferentes envolturas que recubren el ovocito. Luego de incubar los espermatozoides en condiciones capacitantes los espermatozoides obtienen un patrón de movimiento conocido como motilidad hiperactivada que se caracteriza por un movimiento del flagelo más amplio y más activo (Marquez B. and Suarez S.S. 2007; Suarez S. S. 2008). Este tipo de motilidad es muy útil para los espermatozoides cuando se encuentran en el tracto genital femenino ya que les permite nadar en el líquido viscoso presente en el oviducto, pasar entre las células del cúmulo y una vez que ocurre la exocitosis acrosomal atravesar la zona pelúcida.

El fenómeno de hiperactivación es iniciado por un aumento en el pH intracelular y por un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Mediante diferentes técnicas se han identificado diversos canales de Ca^{2+} que pueden ser activados por voltaje o por otros mecanismos. Los miembros de la familia de los canales CatSper (CatSper, del inglés Cation Sperm) son sensibles a la alcalinización intracelular y se ha demostrado que estos canales de Ca^{2+} son fundamentales para desarrollar el fenómeno de motilidad hiperactivada, durante la capacitación espermática y en la exocitosis acrosomal (Ren D., and Xia J. 2010; Lishko P.V., et al 2011). Hasta el momento se han identificado cuatro proteínas pertenecientes a esta familia (CatSper 1-4), los cuales se localizan en la pieza principal del flagelo y además se han identificado tres subunidades auxiliares adicionales β , γ y δ . Se ha demostrado mediante el uso de ratones knock-out que se requiere de los cuatro miembros de los CatSper para la formación de un canal funcional ya que los espermatozoides de ratones knock-out para alguno de estos miembros son incapaces de desarrollar un patrón de motilidad hiperactivado y son infértiles (Ho K., et al 2009). También mutaciones en los canales CatSper en humanos han sido asociadas con

infertilidad (Avenarius M.R., et al 2009) otra clara evidencia de la importancia de estos canales durante la fecundación.

Cambios a nivel de la membrana plasmática durante la capacitación

El aumento de pH intracelular durante la capacitación no sólo activa los canales CatSper, sino que también afecta drásticamente el potencial de membrana, produciendo una rápida hiperpolarización de la célula. Mediante el uso de sondas fluorescentes se determinó que los espermatozoides de ratón no capacitados se encuentran relativamente despolarizados (E_m : aproximado -35 a -45 mV) y durante la capacitación, éstos se hiperpolarizan (aproximadamente -70 mV) (Florman H.M., et al 2008). Esta hiperpolarización en parte se debe a un aumento en la permeabilidad de los iones K^+ . Recientemente mediante el uso de ratones knock-out para el canal de K^+ denominado KCNU1 se estableció que KCNU1 es el principal canal de K^+ en espermatozoides de ratón (Martínez-López P., et al 2009). Los ratones knock-out para KCNU1 son infértiles y esto se debe a que los espermatozoides de estos ratones en condiciones capacitantes se encuentran despolarizados y su motilidad se ve afectada. Además, los espermatozoides que no expresan el canal de K^+ son incapaces de secretar el gránulo acrosomal, por lo que se ha sugerido que la hiperpolarización regula la capacidad de excitar el gránulo acrosomal en respuesta a un estímulo adecuado (Santi C.M., et al 2010; Zeng X-H., et al 2011).

Otro ion que tiene importantes funciones en las vías de señales que se generan durante la capacitación es bicarbonato. La concentración de HCO_3^- aumenta aproximadamente 5 veces cuando el espermatozoide pasa desde el epidídimo (4 mmol/l) al oviducto (20 mmol/l), lo que produce varios cambios en el espermatozoide. A nivel de la membrana plasmática produce una reorganización de los lípidos de la membrana, en el cual hay movilización de fosfolípidos entre la hemicapa interna y externa (Flesch F. M. and Gadella B. M. 2000; Harrison R. A. and Gadella B. M. 2005). Estos arreglos en la membrana inducen una redistribución del colesterol hacia la

parte apical de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide; sólo después de esta redistribución es que se produce la pérdida de colesterol de la membrana plasmática (Flesch F. M., et al 2001). En el tracto reproductor femenino, tanto albúmina como HDL serían las responsables de captar el colesterol que efluye de la membrana, mientras que en condiciones *in vitro* el principal responsable es albúmina. La salida de colesterol desde la membrana altera la fluidez de los subdominios de la membrana plasmática durante la capacitación. Esto permite que las proteínas presentes en la membrana puedan moverse y así generar nuevas interacciones. Estos cambios podrían ser los responsables de desencadenar nuevas vías de señales que caracterizan al proceso de capacitación (Travis A. and Kopf G.S. 2002), así como también la presentación de nuevos receptores capaces de unirse a las proteínas de la zona pelúcida y con ello inducir la exocitosis acrosomal (Yanagimachi R. 1994). Además el eflujo de colesterol optimiza las condiciones para el ensamblaje de la maquinaria de fusión que se requiere durante la exocitosis acrosomal (Belmonte S.A., et al 2005).

Durante la capacitación la membrana plasmática del espermatozoide también sufre otras alteraciones en espermatozoides de bovinos, se ha descrito la activación de fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K) y de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), enzimas implicadas en la producción de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), dos importantes fosfolípidos involucrados en varias vías de señales y que actúan en la producción de segundos mensajeros (Etkovitz N., et al 2007).

Cambio en los estados de fosforilación durante la capacitación

Otro efecto que produce el ingreso de HCO₃⁻ y Ca²⁺, es la activación de vías de señales responsables de los cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas tanto en residuos de tirosina como en serina/treonina (Visconti P. E., et al 1994; Flesch F. M., et al 1999; Visconti P. E., et al 2002; Alnagar F.A., et al 2010). El ingreso de HCO₃⁻ y Ca²⁺ producen la activación de la adenilato ciclasa soluble (sAC), la cual se encuentra

presente en espermatozoides, con aumento en la producción de AMP cíclico (AMPc) (Visconti P.E et al 1998). El aumento de los niveles de AMPc activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) en espermatozoides de varias especies incluida la especie humana. La activación de esta quinasa está asociada con la fosforilación en residuos tirosina que caracteriza la capacitación, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual ocurre dicha fosforilación. Existen tres mecanismos propuestos: estimulación directa o indirecta de una tirosina quinasa por PKA, inhibición directa o indirecta de una fosfotirosina fosfatasa y la fosforilación directa o indirecta en residuos serina/treonina por PKA que permita la posterior fosforilación por tirosinas quinasas (Fraser L.R. 2010). A pesar de que la fosforilación en residuos de tirosina es un rasgo característico de la capacitación es limitada la identidad y función de las proteínas fosforiladas, se cree que la fosforilación puede regular la actividad y localización de estas proteínas. Además se ha demostrado que durante la capacitación no sólo se produce un aumento en la fosforilación de varias proteínas en residuos serina/treonina, sino que también se produce la desfosforilación de varias fosfo proteínas en residuos serina/treonina (Alnagar F.A., et al 2010).

En la figura 6 se resumen las vías de señales involucradas en la capacitación de espermatozoides.

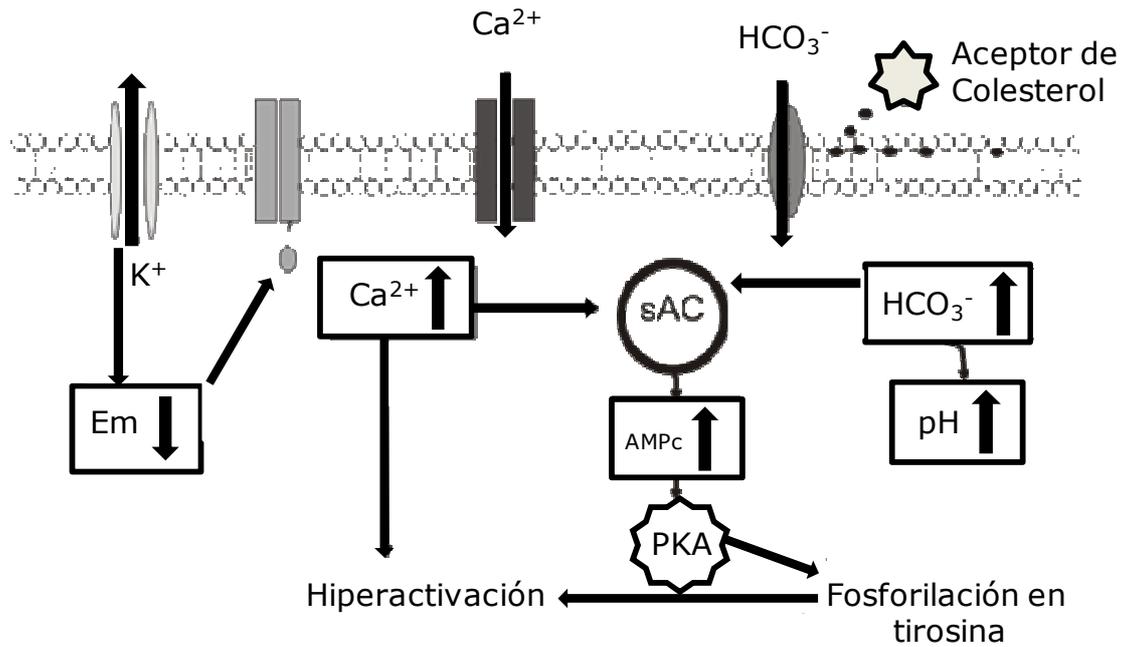


Figura 6: Esquema de las vías de señales involucradas en la capacitación de espermatozoides. Durante la capacitación los espermatozoides sufren cambios fundamentales para que esta célula adquiera la capacidad de fecundar al ovocito. Se ha demostrado que es fundamental la salida de colesterol desde la membrana plasmática, que requiere aceptores en el medio capacitante. El ingreso de HCO_3^- activa la adenilato ciclasa soluble (sAC) con mayor producción de AMPc, éste activa PKA que desencadena la fosforilación en residuos tirosina característica de la capacitación y participa de la hiperactivación del espermatozoide. Por otro lado también se produce el ingreso de calcio, el incremento en las concentraciones citoplasmáticas de este ión participa también de la activación de la sAC y la hiperactivación. El ingreso de HCO_3^- altera también el pH intracelular. Además la capacitación se caracteriza por una hiperpolarización debido a la salida de K^+ . Este cambio en el potencial de membrana altera el estado de los canales de calcio voltaje dependientes cuya apertura durante la exocitosis acrosomal es fundamental. Figura modificada de Darszon A., et al 2006.

EXOCITOSIS ACROSOMAL: UN TIPO ESPECIAL DE EXOCITOSIS REGULADA

La exocitosis acrosomal también conocida como reacción acrosomal es un prerequisite indispensable para la fecundación, ya que este proceso secretorio produce cambios morfológicos en el espermatozoide, permitiéndole atravesar la zona pelúcida y fecundar el ovocito (Yanagimachi R. 1994). La exocitosis acrosomal es una exocitosis regulada dependiente de Ca^{2+} y si bien comparte las moléculas básicas de fusión con cualquier otro tipo de exocitosis, también presenta características particulares como: *I)* dado que en el espermatozoide no se produce reciclaje de membrana, la exocitosis acrosomal es un proceso irreversible que ocurre una única vez en la vida del espermatozoide; *II)* otra característica particular de este proceso exocítico es que la fusión entre la membrana acrosomal externa, con la membrana plasmática ocurre en múltiples puntos; *III)* además de la liberación del contenido acrosomal, se produce la liberación de vesículas híbridas constituidas por membrana plasmática y membrana acrosomal externa (Mayorga L.S., et al 2007; Tomes C.N. 2007). Como resultado de la exocitosis acrosomal se pierde la membrana plasmática de la región acrosomal y también la membrana acrosomal externa excepto en la región ecuatorial, por lo que parte de la cabeza del espermatozoide queda recubierta sólo por la membrana acrosomal interna (Yanagimachi R. 1994) (Fig. 7).

En general se asume que la exocitosis acrosomal se inicia luego de que el espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito (Florman H.M. and Storey B.T. 1982). ZP3, una de las glicoproteínas que componen la zona pelúcida, es capaz de inducir la exocitosis acrosomal en espermatozoides de varias especies, además recientemente se ha demostrado que ZP4 y ZP1, son capaces de inducir la exocitosis acrosomal (Gupta S. K., et al 2007; Ganguly A., et al 2010) (Fig. 8).

Otro agonista natural de la exocitosis acrosomal en varias especies es progesterona la cual es secretada por las células del cúmulo (Osman R.A., et al 1989; Thérien I. and Manjunath P. 2003). Progesterona es capaz de inducir un influjo de Ca^{2+} mediante los canales Catsper, disparando vías de señales que llevan a la exocitosis del gránulo acrosomal (Lishko P.V., et al 2011). Además se ha demostrado que extractos celulares de las células del cúmulo y el ácido hialurónico (matriz donde se encuentran dispersas las células del cúmulo) induce o aumentan la exocitosis acrosomal (Sabeur K., et al 1998; Hong S.J., et al 2009).

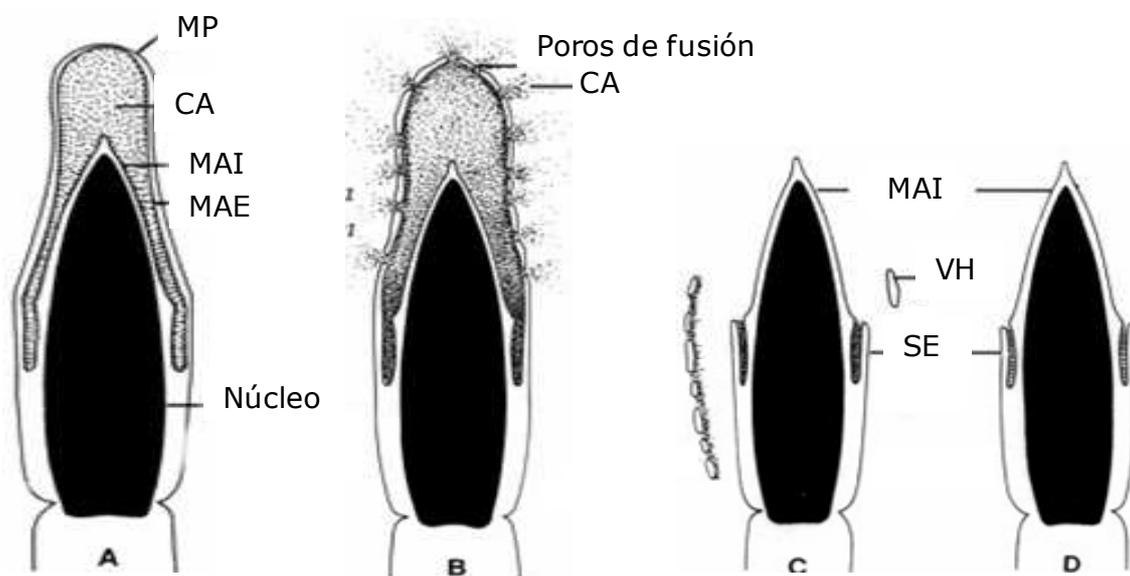


Figura 7: Esquema de la exocitosis acrosomal. (A) Los espermatozoides en reposo presentan la membrana acrosomal externa (MAE) paralela a la membrana plasmática (MP). (B) La estimulación desencadena la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática en múltiples puntos, con formación de poros a través de los cuales se libera el contenido acrosomal (CA). (C y D) La unión entre estas membranas produce vesículas híbridas (VH) que son también liberadas exponiendo así la membrana acrosomal interna (MAI). Cabe aclarar que el segmento ecuatorial (SE) se mantiene morfológicamente intacto. Figura modificada de Yanagimachi R. 1994.

Recientemente Jin y colaboradores (Jin M., et al 2011) han publicado datos de relevancia fisiológica en el campo de la fecundación, que han llevado a replantear dónde se inicia la exocitosis acrosomal y quién es el desencadenante de este proceso exocítico *in vivo* (Inoue N., et al 2011; Avella M.A. and Dean J. 2011). Haciendo uso de espermatozoides de ratón que expresan la proteína fluorescente verde (EGFP, del inglés Enhanced Green Fluorescence Protein) en su acrosoma y la proteína fluorescente roja (Ds-Red2) en la pieza media (Hasuwa H., et al 2010) y mediante video

microscopía se evaluó el estado del acrosoma antes y después de contactar las células del cúmulo y la zona pelúcida (Fig. 9A). De esta manera se demostró que la exocitosis acrosomal en espermatozoides de ratón se inicia antes que el espermatozoide tome contacto con la zona pelúcida y que los espermatozoides que han iniciado este proceso exocítico atraviesan la zona pelúcida en menos tiempo que aquellos espermatozoides que contactan la zona pelúcida y no han iniciado la exocitosis acrosomal. Además un dato sorprendente es que aquellos espermatozoides que contactan la zona pelúcida sin haber sufrido la exocitosis acrosomal, raramente atraviesan la zona pelúcida (Fig. 9B). Si bien estos resultados cambian el panorama donde se inicia y quien desencadena la exocitosis acrosomal, a su vez reafirman que sólo aquellos espermatozoides reaccionados son capaces de atravesar la zona pelúcida y fecundar al ovocito, corroborando que este proceso exocítico es fundamental para que se lleve a cabo la fecundación.

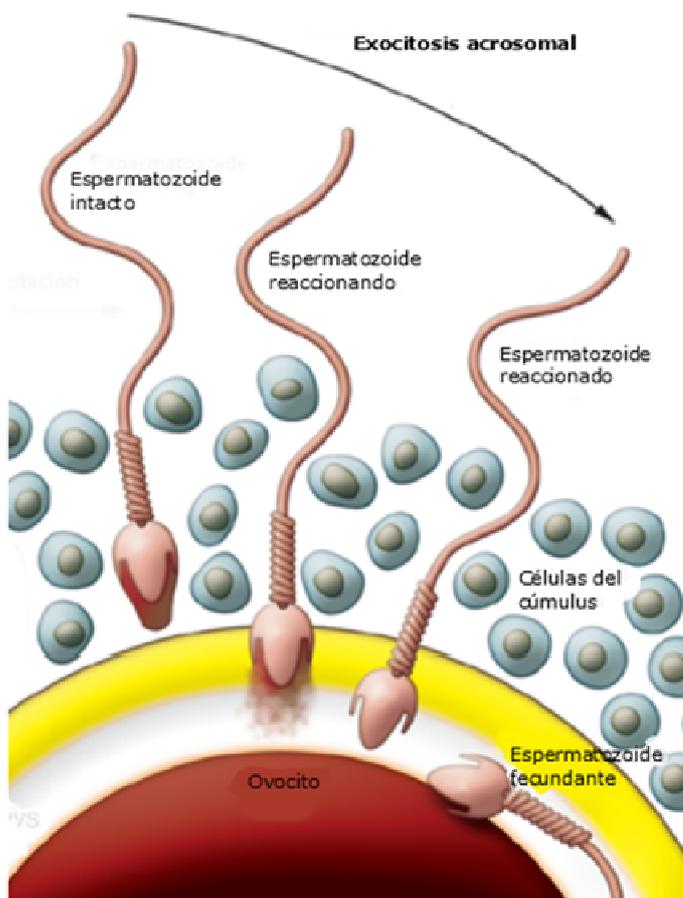


Figura 8: Modelo clásico de la exocitosis acrosomal.

El proceso de exocitosis acrosomal es iniciado una vez que los espermatozoides capacitados contactan la zona pelúcida (ZP). Sólo los espermatozoides reaccionados pueden atravesar la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito mediante el segmento ecuatorial. Figura modificada de Ikawa M., et al 2010.

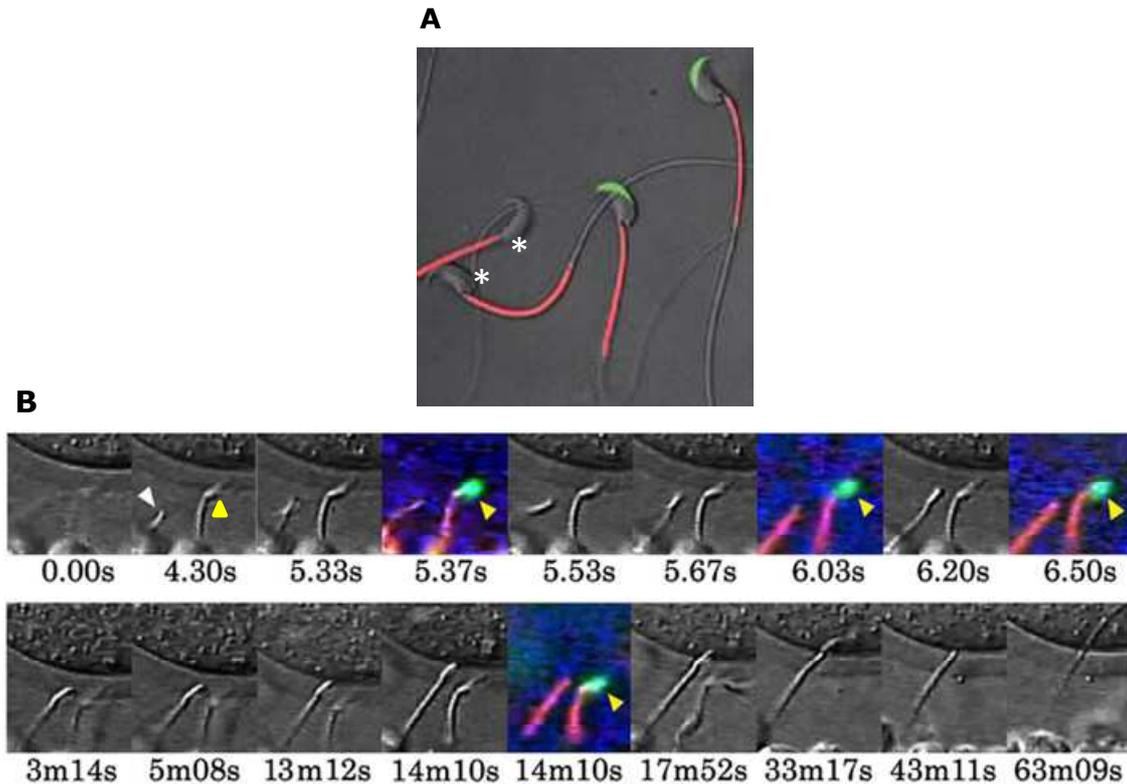


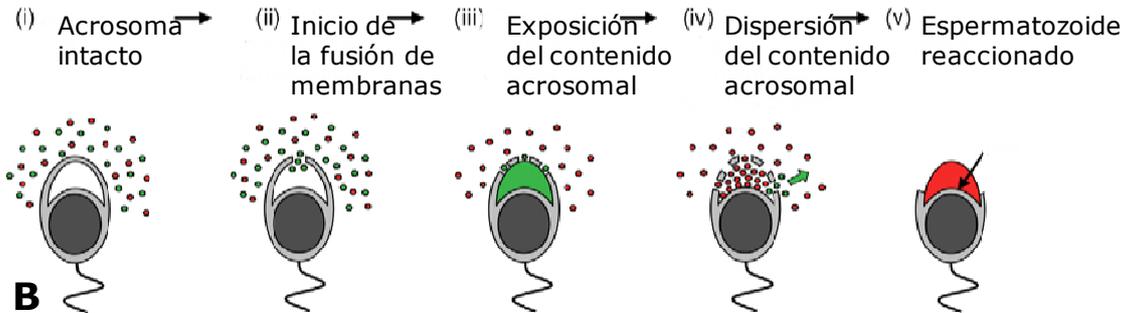
Figura 9: La exocitosis acrosomal es iniciada por las células del cúmulo.

Espermatozoides de ratón transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (EGFP) en su acrosoma y la proteína fluorescente roja (Ds-Red2) en la pieza media. La proteína EGFP es liberada durante la exocitosis acrosomal, por lo que los espermatozoides reaccionados pierden la marca verde en su acrosoma (espermatozoides con asteriscos blancos), mientras que la marca Ds-Red2 no varía durante la exocitosis acrosomal (A). En (B) se muestra como un espermatozoide ha reaccionado (punta de flecha blanca 4 min 30 seg) sin haber contactado la zona pelúcida. Además este espermatozoide reaccionado es capaz de atravesar la zona pelúcida y alcanzar la superficie del ovocito (13 min 12 seg). A su vez se observa la presencia de un espermatozoide que a pesar de contactar la zona pelúcida (espermatozoide punta de flecha amarilla 4 min 30 seg) no ha sufrido la exocitosis acrosomal. Imagen modificada de Jin M et al 2011.

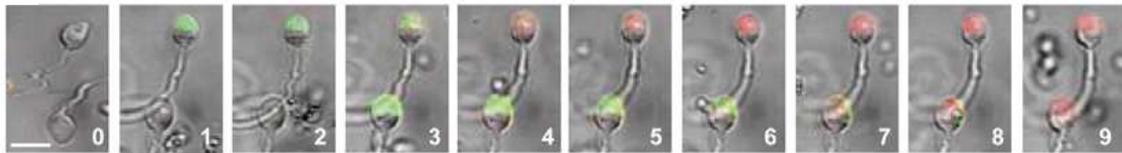
Otro avance logrado mediante el uso de microscopía de fluorescencia es que se determinó la cinética de la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos en tiempo real (Harper C.V., et al 2010). Mediante el uso de dos sondas en la cual una reconoce el contenido acrosomal y la otra la membrana acrosomal interna (Fig. 10A), Harper y colaboradores determinaron que la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática ocurre rápidamente (aproximadamente en 1 minuto) (Fig. 10B y C). Un dato revelador obtenido de este estudio es que el contenido acrosomal, no es liberado inmediatamente y permanece unido a la membrana acrosomal interna por varios minutos (hasta 12 min.).

Una vez que se ha dispersado el contenido acrosomal se expone la membrana acrosomal interna, de esta manera se desenmascaran proteínas que son fundamentales para la fusión del espermatozoide con el ovocito.

A



B



C

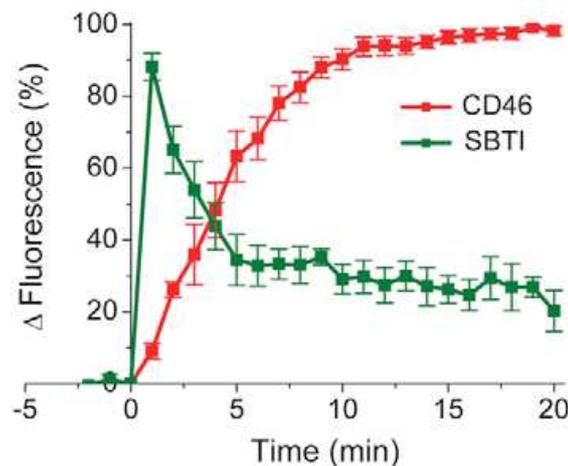


Figura 10: Cinética de la exocitosis acrosomal. La cinética de la exocitosis acrosomal fue determinada mediante el uso del inhibidor de la tripsina de soya (SBTI) acoplado al fluoróforo Alexa 488 (círculos verdes) y un anticuerpo fluorescente que reconoce la proteína del complemento CD46 (Anti-CD46, círculos rojos). El inhibidor de la tripsina de soya se utilizó para determinar el inicio de la exocitosis acrosomal ya que una vez formado los poros de fusión SBTI es capaz de unirse específicamente a la acrosina (**A, ii y iii**). El anticuerpo anti-CD46 se utilizó para determinar la dispersión del contenido acrosomal. La proteína del complemento CD46 localiza específicamente en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides, por lo que el anticuerpo anti-CD46 sólo puede reconocer esta proteína una vez que se ha producido la dispersión del contenido acrosomal (**A, iv y v**). (**B**) Secuencia de fotos donde se observa la exposición del contenido acrosomal (espermatozoide verde) y luego la dispersión de este contenido (espermatozoide rojo). La exocitosis acrosomal fue estimulada con 10 μ M de A23187. Mediante el uso de estas dos sondas se determinó que si bien la exocitosis acrosomal ocurre rápidamente (**C**; trazo verde), el contenido del acrosoma permanece unido a la membrana acrosomal interna por varios minutos (**C**, trazo rojo). Figura modificada de Harper C.V., et al. 2008.

Una proteína bien caracterizada durante la fusión entre el espermatozoide y el oolema (nombre con el que se conoce la membrana plasmática del ovocito) es Izumo (Inoue N., et al 2005). Por medio de ratones knock-out para Izumo se ha demostrado que esta proteína es esencial para la fusión de las gametas. Izumo no localiza en la superficie de la membrana plasmática en espermatozoides no reaccionados, pero una vez que ocurre la exocitosis acrosomal la presencia de Izumo es revelada en la cabeza de los espermatozoides (Inoue N., et al 2005; Ellerman D.A., et al 2009) (Fig. 11 A y B).

Además el proceso de exocitosis acrosomal produce ciertas alteraciones en la membrana plasmática remanente que la tornan fusogénica, así la membrana plasmática presente en la región ecuatorial es lo primero que se fusiona al oolema. Posteriormente, la región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas por fusión de membranas mientras la región anterior de la cabeza cubierta por membrana acrosomal interna es envuelta por la membrana del ovocito como una especie de fagocitosis (Yanagimachi R. 1994).

También se ha demostrado que varios inductores farmacológicos como diacilglicerol (DAG) y sus análogos (ésteres de forbol como 12-miristato-13 acetato PMA), ionóforos de Ca^{2+} como A23187, análogos del AMPc como dbcAMP, mentol, etc, desencadenan el proceso de exocitosis acrosomal. Se cree que estos inductores son capaces de desencadenar la exocitosis acrosomal por diferentes vías de señalización ya que se ha demostrado la presencia de receptores para estas moléculas en espermatozoides de mamíferos. Por otro lado recientemente fue publicado un trabajo donde demuestra que los canales CatSper pueden ser activados por progesterona, prostaglandinas, diversos odorantes, mentol y análogos a nucleótidos cíclicos, por lo que los canales CatSper actuarían como un quimiosensor de varias moléculas y de esta manera integrar varias vías de señales que son esenciales para la exocitosis acrosomal (Brenker C., et al 2012). A continuación se realizará una breve descripción de la vía de transducción de señales de Ca^{2+} y se describirá la maquinaria proteica involucrada durante la exocitosis acrosomal. Por último se abordará la función de los fosfolípidos durante la exocitosis acrosomal.

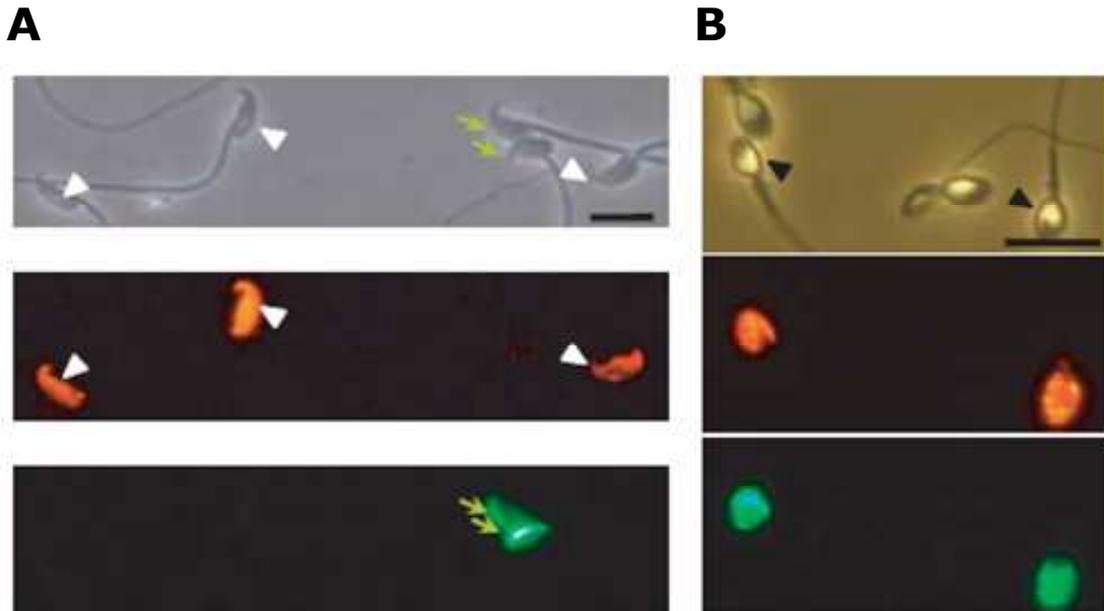


Figura 11: Izumo es detectada luego de la exocitosis acrosomal. La proteína Izumo, la cual tiene un rol fundamental durante la fusión de las gametas sólo es detectada en espermatozoides que han sufrido el proceso de exocitosis acrosomal. **(A)** Inmunofluorescencia indirecta de Izumo en espermatozoides transgénicos de ratón que sobreexpresan la proteína EGFP en su acrosoma. En A se observa la presencia de Izumo (rojo) sólo en aquellos espermatozoides que han sufrido el proceso de exocitosis acrosomal (punta de flechas blancas, panel medio), mientras que en espermatozoides intactos (flechas verdes, panel inferior) Izumo no es detectada. **(B)** Espermatozoides humanos también fueron teñidos con un anticuerpo que reconoce específicamente Izumo (rojo, panel medio). Al igual que en los espermatozoides de ratón Izumo sólo es detectada en espermatozoides reaccionados (teñidos con anti -CD46, espermatozoides verdes, panel inferior). Figura modificada de Inoue N., et al. 2004.

Calcio

La exocitosis acrosomal es una exocitosis regulada dependiente de Ca^{2+} , por lo que esta vía de señalización ha sido ampliamente estudiada. La señalización por Ca^{2+} está muy regulada y compartimentalizada. A pesar de que los espermatozoide maduros no tienen retículo endoplasmático, que es principal reservorio de Ca^{2+} en la mayoría de las células estos presentan varios reservorios de Ca^{2+} como: el acrosoma, las mitocondrias y la envoltura nuclear redundante (Bedu-Addo K., et al. 2008; Costello S., et al 2009; Ren D., and Xia J. 2010). A su vez estos reservorios y la membrana plasmática presentan una gran diversidad de canales de Ca^{2+} (Darszon A., et al 2006). En espermatozoides humanos tanto ZP3 como progesterona producen un aumento bifásico en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático,

inicialmente hay un incremento transiente que es seguido por un segundo aumento más lento y sostenido (Kirkman-Brown J. C., et al 2000; Kirkman-Brown J. C., et al 2002; Harper C. V., et al 2006) (Fig. 12).

En espermatozoides humanos y de ratón se postula que el aumento transitorio de Ca^{2+} disparado por ZP3 es dependiente de canales de Ca^{2+} tipo T activados por bajo voltaje de (del inglés transient low voltage activated channels), presentes en la membrana plasmática (Arnoult C., et al 1999; Ni Y., et al 2007). Sin embargo, datos recientes demuestran que estos canales tipo T no están presente en espermatozoides de ratón maduros y que los canales CatSper serían los responsables del incremento transiente de Ca^{2+} inducido por ZP3 y progesterona (Xia J. and Ren D. 2009), mientras que la respuesta sostenida de Ca^{2+} se mantiene presente en espermatozoides de ratones deficientes para CatSper1, lo que sugiere que la respuesta sostenida de Ca^{2+} es independiente de los canales CatSper. Mediante el uso de tapsigargina (el cual depleta los reservorios de Ca^{2+} intracelular), se ha propuesto que el ingreso de Ca^{2+} sostenido es mediado por la apertura de canales de Ca^{2+} operados por reservorios intracelulares (del inglés store operated Ca^{2+} channels o SOCCs) (Jungnickel M. K., et al 2001; O'Toole C.M., et al 2003). Además durante la fase sostenida se requiere la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), ya que los espermatozoides de ratones deficientes para la enzima fosfolipasa $\text{C}\delta 4$ (enzima responsable de generar IP_3 a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) son incapaces de incrementar los niveles de Ca^{2+} en respuesta a ZP3 (Fukami K., et al 2001; Fukami K., et al 2003). Se ha reportado que el acrosoma es un reservorio de Ca^{2+} y a su vez se ha demostrado la presencia de canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 en espermatozoides de ratón y humanos (Walensky L.D. and Snyder S.H. 1995; Kuroda Y. et al. 1999), por lo que el incremento de IP_3 activaría los canales presente en el acrosoma produciendo la liberación del Ca^{2+} acrosomal. Este eflujo de Ca^{2+} a partir del acrosoma sería el responsable de la apertura de canales de Ca^{2+} operados por reservorios intracelulares presentes en la membrana plasmática, generando un ingreso masivo de Ca^{2+} desde el medio extracelular, desencadenando la exocitosis acrosomal (Ikawa K. et al 2010) (Fig. 13). Se postula que los canales TRPC2 (del inglés Transient Receptor

Potencial) podrían ser los canales SOCCs (Jungnickel M. K., et al 2001; Castellano L. E., et al 2003) en espermatozoides de ratón, aunque más estudios se requieren para establecer la identidad de los canales SOCCs ya que ratones knock-out para *Trpc2* son fértiles y los espermatozoides no presentan ningún defecto (Leypold B. G., et al 2002; Stowers L., et al 2002), además en humanos *Trpc2* es un pseudogen (Vannier B., et al 1999).

Nuestro Laboratorio ha desarrollado un modelo de espermatozoides permeabilizados con estreptolisina O (SLO) (Diaz A., et al 1996; Yunes R., et al 2000) (ver más adelante), mediante el uso de este modelo se demostró que no es suficiente la apertura de los SOCCs para desencadenar la exocitosis acrosomal sino que hace falta una salida de Ca^{2+} del acrosoma posterior a la apertura de los SOCCs para que se produzca la fusión de las membranas (De Blas G., et al 2002) (Fig. 13), por lo que el eflujo de Ca^{2+} a partir de los canales de Ca^{2+} dependiente de IP_3 se requiere en dos fases de la exocitosis acrosomal una para la apertura de los SOCC y otra para el paso final de este proceso secretorio.

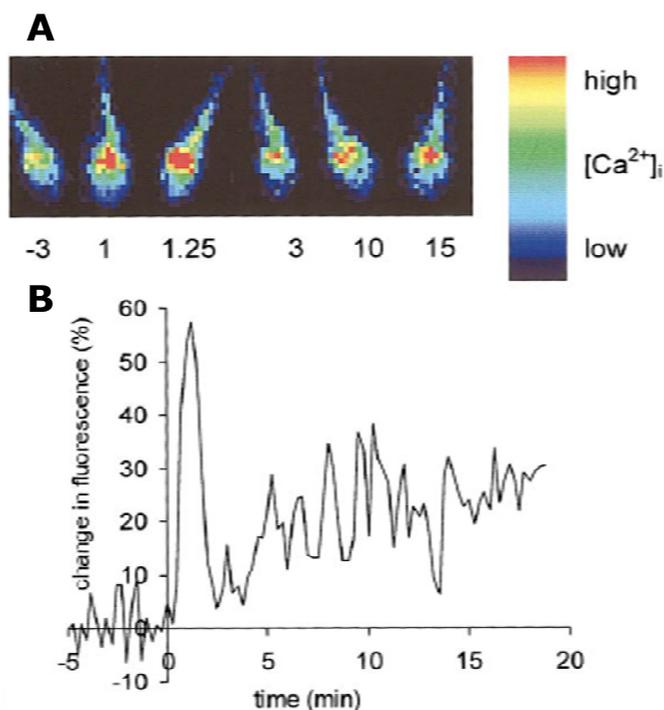


Figura 12: Elevación bifásica de Ca^{2+} en respuesta a progesterona. En **(A)** se observa una secuencia de fotos de un espermatozoide humano marcado con el sensor de Ca^{2+} Calcium Green y luego estimulado con progesterona. La figura se presenta en pseudocolor y la escala se encuentra a la derecha. En **(B)** se observa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Se observa que primero hay una elevación transitoria de Ca^{2+} seguida por un aumento progresivo. Figura modificada de Kirkman-Brown et al. 2000.

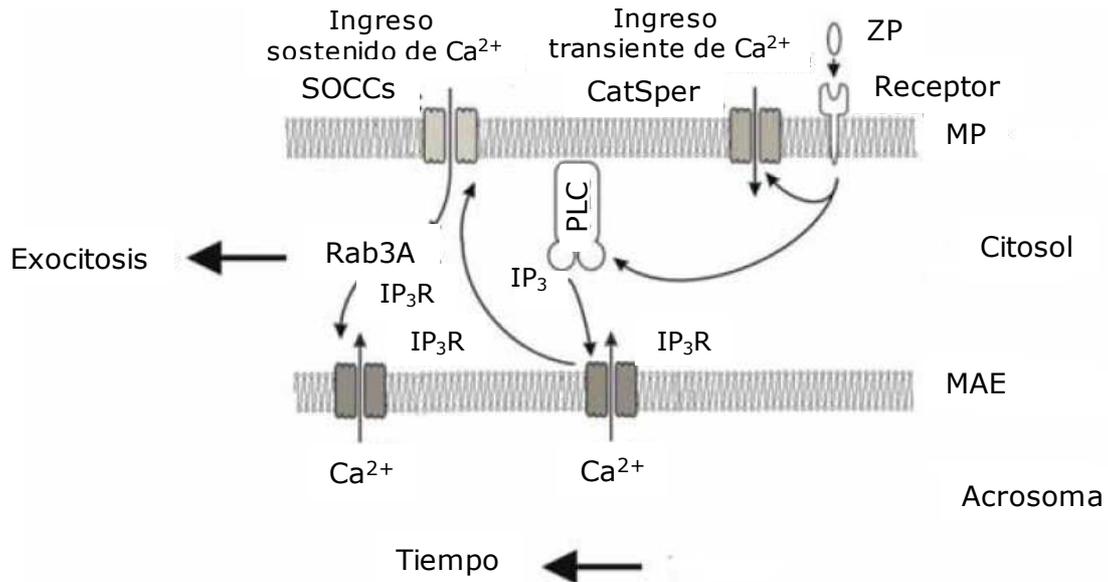


Figura 13: Esquema de los movimientos de Ca^{2+} durante la exocitosis acrosomal. Cuando el espermatozoide toma contacto con proteínas presentes en la zona pellucina (ZP) se produce el ingreso de Ca^{2+} a través de los canales CatSper presentes en la membrana plasmática (MP) produciendo un ingreso transiente de Ca^{2+} . Esto estimula a PLC δ 4 que produce IP_3 e induce la salida de Ca^{2+} desde el acrosoma por activación de los canales dependientes de IP_3 (IP_3R) presentes en la membrana acrosomal externa (MAE). El vaciamiento de este reservorio produce la apertura de canales operados por reservorios (SOCCs) presentes en la membrana plasmática produciéndose un segundo ingreso de Ca^{2+} sostenido. Finalmente la cascada de señales que incluye la activación de la proteína Rab3A activa una segunda salida de Ca^{2+} del acrosomal por apertura de canales dependientes de IP_3 . Figura modificada de Tomes C.N. 2007.

Maquinaria de fusión en espermatozoides humanos permeabilizados

El modelo de espermatozoides humanos permeabilizados ha sido ampliamente utilizado en nuestro Laboratorio no tan sólo para describir los movimientos de Ca^{2+} durante la exocitosis acrosomal (De Blas G., et al 2002) sino también para caracterizar la maquinaria de fusión involucrada durante la exocitosis acrosomal (Mayorga L.S., et al 2007). Los espermatozoides son permeabilizados con SLO de tal manera que se producen poros en la membrana plasmática pero no en la membrana acrosomal (Diaz A., et al 1996; Yunes R., et al 2000). De esta forma pueden ingresar proteínas recombinantes y anticuerpos además de otros reactivos impermeables a membranas dentro del espermatozoide y estudiar así la maquinaria de fusión de la exocitosis acrosomal.

Es importante mencionar que la permeabilización de la membrana plasmática hace que se pierdan los gradientes de membrana, por lo que el modelo de espermatozoides permeabilizados, en el cual el Ca^{2+} del medio puede entrar libremente en la célula, se asemeja al estado luego de la apertura de los canales SOCCs en las células intactas. Nuestro Laboratorio ha establecido el siguiente modelo de la maquinaria de fusión de membranas durante la exocitosis acrosomal.

El ingreso de Ca^{2+} a través de los canales SOCCs produce la activación de la sAC que provoca un incremento de AMPc intracelular, este incremento es fundamental para la exocitosis acrosomal, ya que produce la activación de la proteína Epac, que actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina de GPTasa Rap (Branham M.T., et al 2006) (Fig. 14).

La activación de Epac activa por un lado la vía relacionada con Rap, que a su vez activa a la fosfolipasa C (PLC) responsable de la producción de IP_3 requerido para la salida de Ca^{2+} desde el acrosoma (Branham M. T., et al 2009). Epac también activa a Rab3A por un mecanismo indirecto aún desconocido (Branham M. T., et al 2006; Branham M. T., et al 2009). Rab3A tiene un rol fundamental durante la exocitosis acrosomal, permitiendo el acercamiento de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática (Yunes R., et al 2000; Michaut M. A., et al. 2000 y De Blas G., et al. 2002) (Fig. 14).

Una vez que se produce el acercamiento entre las membranas a fusionar, se activa la maquinaria de fusión, cuyo núcleo son las proteínas SNAREs. Se ha demostrado la presencia de diferentes proteínas SNAREs en espermatozoides humanos como SNAP-23, SNAP-25, VAMP2, sintaxina 1B, 4 y 6. Mediante el uso de anticuerpos específicos o utilizando las toxinas botulínicas o tetánicas se demostró que se requiere de estas proteínas y de su correcto ensamble para la exocitosis acrosomal (Tome C. N., et al 2000).

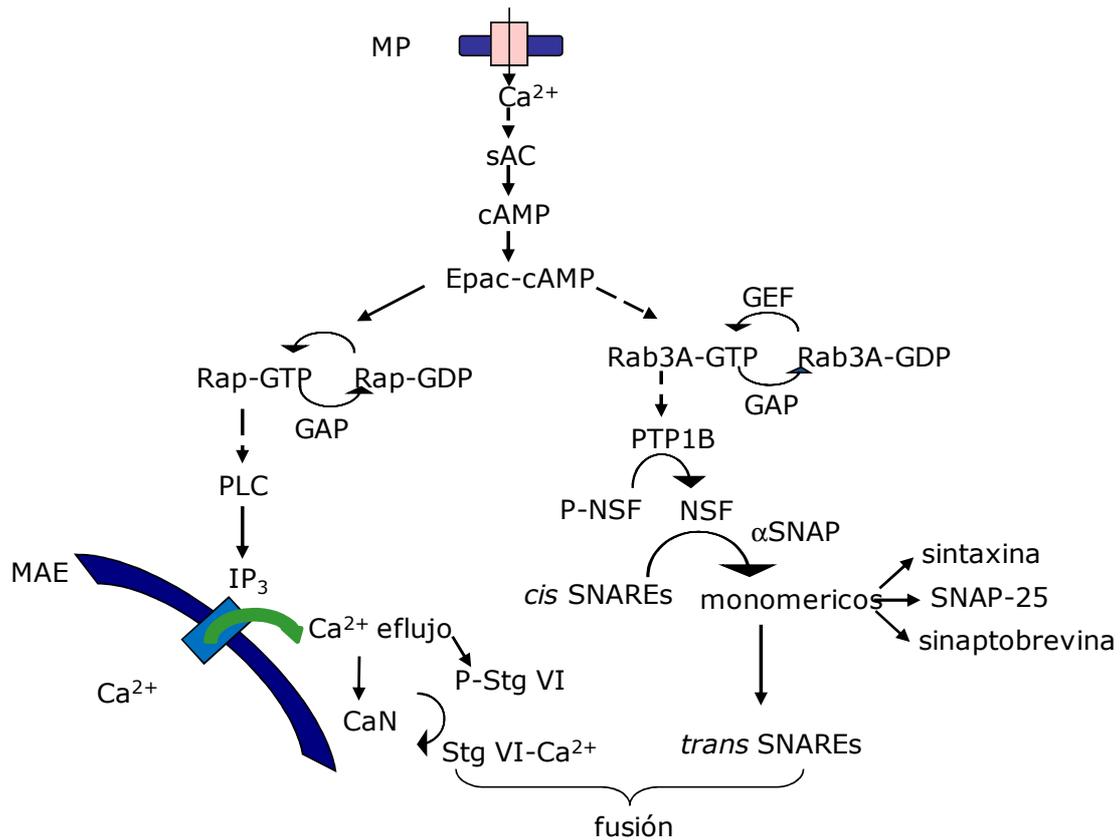


Figura 14: Maquinaria de fusión activada durante la exocitosis acrosomal.

El ingreso de Ca^{2+} lleva a la activación de la enzima adenilato ciclasa soluble (sAC) que sintetiza cAMP, activando Epac que a su vez inicia dos vías: la vía de Rap y la vía de Rab3A. Rap activa PLC produciendo IP_3 , el cual se une a canales de Ca^{2+} sensible a IP_3 presentes en la membrana acrosomal externa (MAE) y desencadenando la salida del acrosoma. Esta salida de Ca^{2+} produce la desfosforilación de sinaptotagmina VI (StgVI), la cual es mediada por calcineurina (CaN). Rab3A activa a la fosfatasa PTP1B, quien desfosforila y activa NSF permitiendo la formación de SNAREs competentes para la fusión. Figura modificada de Branham M.T., et al 2009.

Las proteínas NSF y αSNAP participan en el desensamble de los complejos SNAREs cuando se encuentran en configuración *cis* es decir que todas estas proteínas se encuentran en la misma membrana. Se ha demostrado que NSF y αSNAP se encuentran presentes en espermatozoides y que son requeridas para la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o por Rab3A (Michaut M. A., et al 2000; Tomes C. N. et al 2005). La actividad de NSF es regulada por su estado de fosforilación, en espermatozoides en reposo, esta proteína se encuentra fosforilada y por ello inactiva. La activación de Rab3A en la cascada de señales de la exocitosis acrosomal

activa a PTP1B, fosfatasa responsable de la defosforilación y con ello activación de NSF y el desensamble de los complejos SNAREs en configuración *cis* (Zarelli V., et al 2009) (Fig 14). El desensamble de los complejos SNAREs en configuración *cis* permite que se formen los complejos en configuración *trans*, en donde VAMP se encuentra en la membrana acrosomal externa, mientras que syntaxina y SNAP-25 se encuentran en la membrana plasmática, sólo en esta configuración se podrá traccionar las dos membranas para que se produzca su fusión (Duman J. G. and Forte J. G. 2003; De Blas G., et al 2005) (Fig. 14).

Los complejos *trans* comienzan a formarse, pero quedan estabilizados por complexina en una estructura intermedia llamada *trans flojo* (*loose trans*). La presencia de complexina genera el bloqueo de la exocitosis en este estadio (Roggero C. M., et al 2007), por lo que el proceso exocítico queda detenido en este punto. Sólo luego de un influjo de Ca^{2+} desde el acrosoma a través de canales sensibles a IP_3 se logra el ensamblaje de los complejos *trans* SNAREs y la fusión de las membranas. Esta etapa es mediada por sinaptotagmina VI, una proteína que actúa como sensor de Ca^{2+} durante la exocitosis acrosomal y actúa desplazando a complexina eliminando el bloqueo de la fusión (Roggero C. M., et al 2007). Se ha demostrado que en espermatozoides en reposo sinaptotagmina VI se encuentra fosforilada en el residuo treonina de la región polibásica del dominio C2B y se requiere de su defosforilación por parte de calcineurina para que sinaptotagmina VI sea capaz de desplazar a complexina del complejo SNARE (Castillo Bennett J., et al 2010).

A modo de conclusión podemos decir que la exocitosis acrosomal en los espermatozoides permeabilizados transcurre con características funcionales y morfológicas similares a aquellas observadas en células intactas (Zanetti N. and Mayorga L. S. 2009) y este modelo nos ha permitido caracterizar la maquinaria de fusión involucrada durante la exocitosis acrosomal y los movimientos de Ca^{2+} que ocurren en este proceso secretorio.

Función de los lípidos durante la exocitosis acrosomal

Dado que la exocitosis acrosomal ocurre una única vez en la vida del espermatozoide, es un proceso altamente regulado que además de la acción sincronizada de varios iones y proteínas requiere la participación de varios lípidos y de las enzimas involucradas en su síntesis. Se han estudiado diversas vías de señalización por lípidos durante la exocitosis acrosomal. Si bien hay numerosas publicaciones que abordan el estudio de los lípidos en la exocitosis acrosomal no está bien caracterizado de qué manera ni en qué momento actúan. Esto plantea la necesidad de estudiar con mayor profundidad su papel durante la exocitosis acrosomal, para poder llegar a un modelo que explique su función.

Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato es un importante fosfolípido que se localiza principalmente en la membrana plasmática y participa en casi todos los eventos que ocurren o involucran la superficie celular (Di Paolo G. and De Camilli P. 2006) (Fig. 15). Varios autores han demostrado que PIP_2 y las enzimas involucradas en su síntesis tienen un rol fundamental durante los procesos exocíticos regulados por Ca^{2+} (Hay J. C., et al 1995; Milosevic I., et al 2005; Wen P.J., et al 2011; Koch M. and Holt M. 2012). Dada la importancia de PIP_2 en los procesos exocíticos recientemente se ha estudiado la función de este fosfolípido durante la exocitosis acrosomal (Lopez C.I., et al 2012). Se ha demostrado que durante la exocitosis acrosomal se produce un aumento en la concentración de PIP_2 cuando ésta es estimulada por Ca^{2+} o PMA. Además mediante el uso del dominio PH de la fosfolipasa $C\delta 1$ o utilizando un anticuerpo específico contra PIP_2 se demostró que este fosfolípido tiene un rol fundamental durante la vía de señales durante la exocitosis acrosomal.

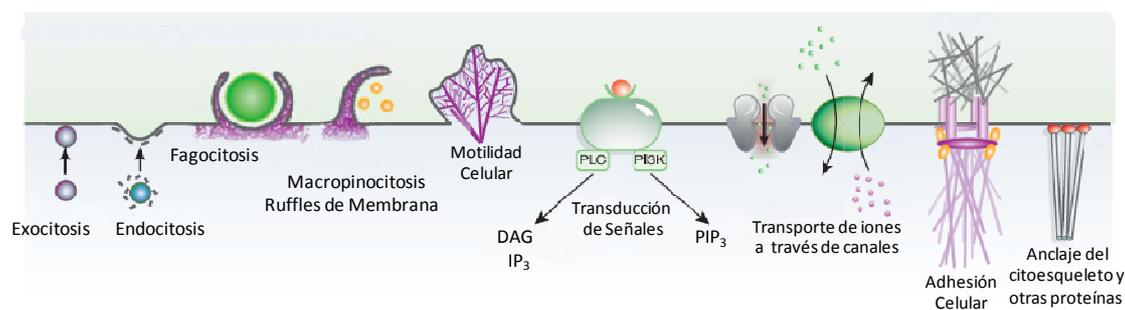


Figura 15: Procesos que regula PIP_2 en la membrana plasmática. PIP_2 regula varios pasos durante la exocitosis y ha sido involucrado en el tráfico intracelular de las vesículas sinápticas. Además se requiere de este fosfolípido durante la endocitosis mediada por clatrina y también ha sido involucrado durante la fagocitosis. Asimismo PIP_2 activa varios canales iónicos que se localizan en la membrana plasmática. PIP_2 también regula el anclaje de proteínas a la membrana plasmática mediante dominios PH y otros dominios, a su vez regula el anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática y regula la actividad de varias proteínas que participan en el remodelamiento del citoesqueleto. A partir de PIP_2 se generan tres segundos mensajeros: como DAG, IP_3 mediante la acción de PLC y PIP_3 por medio de la enzima PI3 quinasa (PI3K). Figura modificada de Di Paolo G. and De Camilli P. 2006.

Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato puede regular diferentes pasos durante los procesos exocíticos ya que este fosfolípido regula la actividad de varias proteínas involucradas en la exocitosis. Asimismo PIP_2 recluta proteínas involucradas en la fusión de membrana y además a partir de PIP_2 (van den Bogaart G., et al 2011) se generan tres importante segundos mensajeros como IP_3 , DAG (Vazquez J.M. and Roldan E.R. 1997) y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3) que cumplen importantes funciones durante la exocitosis acrosomal (Jungnickel M.K., et al 2007). Por ejemplo, previamente se mencionó que IP_3 es el responsable de la liberación de Ca^{2+} a partir del acrosoma siendo este un paso esencial en las vías de señales que conduce a la exocitosis del acrosoma (De Blas G., et al 2002) (Figura 13).

Diacilglicerol es un importante metabolito durante la exocitosis acrosomal debido a que tiene un rol central como segundo mensajero ya que es capaz de activar a PKC (Roldan E.R. and Shi Q.X. 2007) y fosfolipasa A_2 (PLA_2) (Roldan E.R. and Fragio C. (1994) en espermatozoides humanos. A su vez se ha demostrado que durante la exocitosis acrosomal se genera un feedback positivo en la generación de PIP_2 y DAG (Lopez C.I., et al 2012). Esto se debe a que por un lado DAG es capaz aumenta la actividad

de PLC (Ebinu J.O., et al 1998), y por otro lado DAG es capaz de activar a (PLD1), mediante un mecanismo dependiente de PKC. El ácido fosfatídico (producto de la reacción catalizada por fosfolipasa D o PLD) es un componente crítico durante las vías de señales que conduce a la exocitosis acrosomal ya que activaría a la enzima fosfatidilinositol 4-fosfato 5 quinasa (PI4P5K), estimulando la síntesis de PIP₂. Estos mecanismos asegurarían que durante la exocitosis acrosomal se produzca constantemente PIP₂, IP₃ y DAG (Lopez C.I., et al 2012) (Figura 16).

Otro mecanismo por el cual DAG estimula la secreción del gránulo acrosomal es la activación de la proteína Rab3A, proteína capaz de inducir la exocitosis acrosomal como se mencionó previamente (Lopez C.I., et al 2012). Además DAG podría ser capaz de activar proteínas que contienen dominios C1 como la proteína Munc13 (Rhee J.S., et al 2002) y canales de Ca²⁺ perteneciente a la familia de los TRP (Albert A.P. 2011).

Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato es otro importante segundo mensajero que se genera durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos. También se ha reportado en espermatozoides de ratón que ZP3 lleva a un aumento en la concentración de PIP₃ y la inhibición de la producción de este fosfolípido lleva a un bloqueo de la exocitosis acrosomal. El aumento en la concentración de PIP₃ activa Akt y PKCζ, dos importantes quinastas involucradas en las vías de señales que conducen a la exocitosis del gránulo acrosomal (Jungnickel M.K., et al 2007).

Los antecedentes mencionados anteriormente demuestran que diferentes lípidos participan en las vías de señales durante la exocitosis acrosomal y PIP₂ presenta un rol central durante la exocitosis acrosomal, aunque hasta el momento se desconoce qué proteínas o enzimas regulan la concentración de este lípido y qué proteínas y vías de señales regula PIP₂ durante la exocitosis acrosomal.

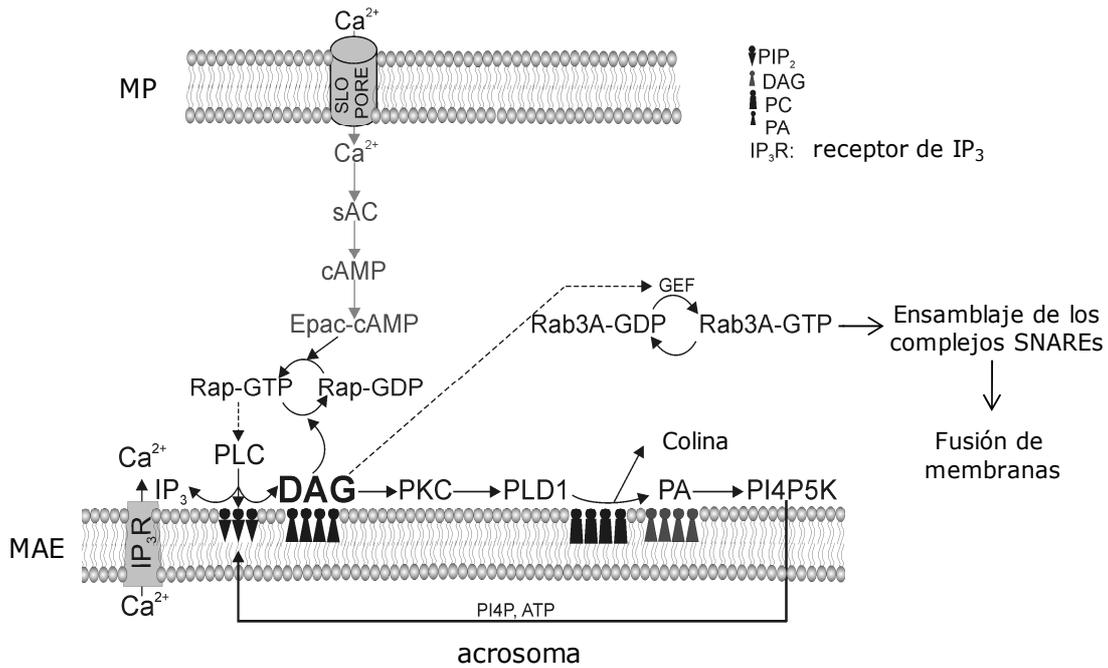


Figura 16: Función de los lípidos durante la exocitosis acrosomal. Durante la exocitosis acrosomal se activa PLC enzima capaz de hidrolizar PIP_2 generando dos importante segundos mensajeros DAG e IP_3 . DAG activa a PLD1 por un mecanismo dependiente de PKC. PLD1 hidroliza fosfatidilcolina (PC) generando colina y ácido fosfatídico (PA), el cual es capaz de activar la enzima fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa ($PI4P5K$), produciendo la síntesis PIP_2 a partir de $PI4P$ y ATP. A su vez DAG activa PLC, por lo que durante la exocitosis acrosomal se generaría un feedback positivo asegurando la producción de PIP_2 . DAG también activa Rab3A, lo que llevaría al ensamblaje de los complejos SNAREs y fusión de membranas. Inositol trifosfato tiene un importante rol en las vías de señales que conduce a la exocitosis del acrosomal ya que produce un eflujo de Ca^{2+} a partir del acrosoma siendo este un paso esencial en la exocitosis acrosomal. Figura modificada de López C.I., et al 2012.

Dado que PIP_2 ha sido involucrado en una gran variedad de procesos biológicos y que este fosfolípido es capaz de regular la actividad de varias proteínas surge la pregunta: cómo PIP_2 que se encuentra inmerso en una fase fluida como la membrana plasmática, es capaz de regular varios procesos. Varios autores sugieren que la organización espacio-temporal puede ser la clave para este interrogante. Se ha sugerido que existen diferentes microdominios intracelulares de PIP_2 capaces de regular diferentes procesos biológicos y que la formación de estos microdominios de PIP_2 depende tanto de la síntesis localizada de este fosfolípido como el "secuestro" y la "liberación" local de PIP_2 en las membranas (McLaughlin

S. and Murray D. 2005). Específicamente varias proteínas pueden secuestrar (unir) electrostáticamente PIP₂ en las membranas y liberarlo ante un estímulo adecuado dejando disponible PIP₂ para interactuar con otras proteínas. Este secuestro reversible de PIP₂ regula la concentración localizada de PIP₂ y contribuye a la regulación espacio-temporal de este fosfolípido (Glaser M., et al 1996).

La proteína MARCKS es el prototipo de las proteínas denominadas *pipmodulinas* (Laux T., et al 2000) ya que esta proteína es capaz de secuestrar reversiblemente PIP₂.

MARCKS: CONCEPTOS CLÁSICOS

La proteína MARCKS acrónimo de Myristylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate, es una proteína intracelular que presenta una expresión abundante y ubicua (Aderem A. 1992; Blackshear P.J. 1993; Arbuzova A., et al 2002; Sundaram M., 2004). A pesar de que MARCKS no posee ninguna actividad enzimática intrínseca, tiene una función sobresaliente durante las vías de señales intracelulares y esto se debe a que interactúa con importantes moléculas involucradas en diferentes vías de señales. MARCKS es capaz de unir y secuestrar reversiblemente a PIP₂ en las membranas (Glaser M., et al 1996). Se ha reportado que MARCKS es el principal sustrato de proteína quinasa C (PKC) en varios modelos celulares y se ha demostrado que esta proteína interactúa con alta afinidad con calmodulina (CaM) (Gallant C., et al 2005), el principal mediador de las señales de Ca²⁺. Además varios trabajos han reportado que MARCKS es capaz de unir y regular el citoesqueleto de actina (Hartwig J.H., et al 1992). Dado que MARCKS puede interactuar con estas importantes moléculas esta proteína ha sido involucrada en diversos procesos biológicos como motilidad y migración celular, durante procesos endocíticos y exocíticos y regulando el ciclo celular.

Estructura de MARCKS

Con respecto a la estructura primaria y secundaria, la proteína MARCKS presenta varias particularidades. Una peculiaridad es que en su estructura primaria MARCKS presenta un elevado número de residuos cargados negativamente (ácido glutámico), por lo que a pH neutro esta proteína es altamente ácida (punto isoeléctrico= 4,5-4,7). Además presenta varios residuos de alanina, glicina y prolina. Otra peculiaridad que presenta MARCKS es con respecto a su peso molecular. Si bien mediante espectrometría de masa y a partir de la secuencia del ADN de la proteína, se determinó que el peso molecular de MARCKS es 31,75 kDa, el valor obtenido en geles de poliacrilamida es de aproximadamente 80 kDa. Este efecto de retardo en gel se explica mediante su estructura secundaria, por dicroísmo circular se demostró que sólo un 10 % de la proteína presenta estructura secundaria (α -hélice), mientras que el resto de la proteína no presenta una estructura secundaria definida, por lo que MARCKS presenta una conformación extendida y ha sido clasificada en el grupo de proteínas denominadas "naturalmente desplegada" (del inglés natively unfolded) (Arbuzova A., et al 2002). Esta conformación extendida, sería en parte la responsable del efecto del retraso en gel, ya que esta conformación dificultaría la migración de la proteína a través de los poros de los geles de poliacrilamida.

Varios estudios han identificado tres regiones altamente conservadas en la proteína MARCKS. La región en el extremo N-terminal, que contiene la secuencia consenso para la miristoilación, una modificación postraduccional que consiste en la adición de un grupo miristoilo en un residuo de glicina siendo esta unión covalente e irreversible. Cercano a la región N-terminal se encuentra el dominio MH2. Este dominio es similar a la cola citoplasmática del receptor de manosa-6-fosfato catión independiente, y hasta el momento se desconoce su función. Cerca de la mitad de la proteína se encuentra el dominio efector (ED, del inglés Efecter Domain) o también conocido indistintamente como o sitio de fosforilación (PSD, del inglés Phosphorylation Site Domain) (Fig. 17). Este dominio es el responsable de

la mayoría de las funciones que se le atribuyen a la proteína MARCKS. El dominio efector es capaz de secuestrar PIP₂ en las membranas y a su vez en este dominio se encuentra el sitio de unión a CaM (Gallant C., et al 2005). Además se ha demostrado que este dominio es capaz de unir y regular el citoesqueleto de actina. A su vez el dominio efector de MARCKS también puede ser fosforilado en cuatro residuos de serina (posiciones 152, 156, 160 y 163 en ratón) por PKC u otras quinasas (Sasaki Y. 2003) (Figura 16). La fosforilación del dominio efector inhibe las interacciones mencionadas previamente.

Unión reversible de MARCKS a las membranas

MARCKS se une a las membranas celulares y esta unión es dependiente de dos interacciones. Por un lado el grupo miristoilo presente en la región N-terminal es capaz de introducirse dentro de las membranas hidrofóbicas (Arbuzova A., et al 2002). Por otro lado, el dominio efector de MARCKS que a diferencia del resto de la proteína es altamente básico ya que presenta varios residuos cargados positivamente (un residuo de arginina y doce residuos de lisina), es capaz de interactuar electrostáticamente con los fosfolípidos ácidos presentes en las membranas como PIP₂ (Wang J., et al 2002; McLaughlin S. and Murray D. 2005; Dietrich U., et al 2009) (Fig. 17). A su vez el dominio efector de MARCKS presenta varios residuos hidrofóbicos (cinco residuos de fenilalanina), los cuales contribuyen a la unión de las membranas ya que los anillos aromáticos presentes en estos aminoácidos son capaces de introducirse en las membranas hidrofóbicas (Gambhir A., et al 2004) (Fig. 17). Cabe mencionar que la proteína MARCKS requiere de ambas interacciones para la unión a las membranas, inserción del grupo miristoilo en las membranas hidrofóbicas y de la interacción electrostática del dominio efector con los fosfolípidos ácidos de las membranas. Ninguna de estas interacciones por si sola es lo suficientemente fuerte para unir MARCKS a las membranas (Arbuzova A., et al 2002).

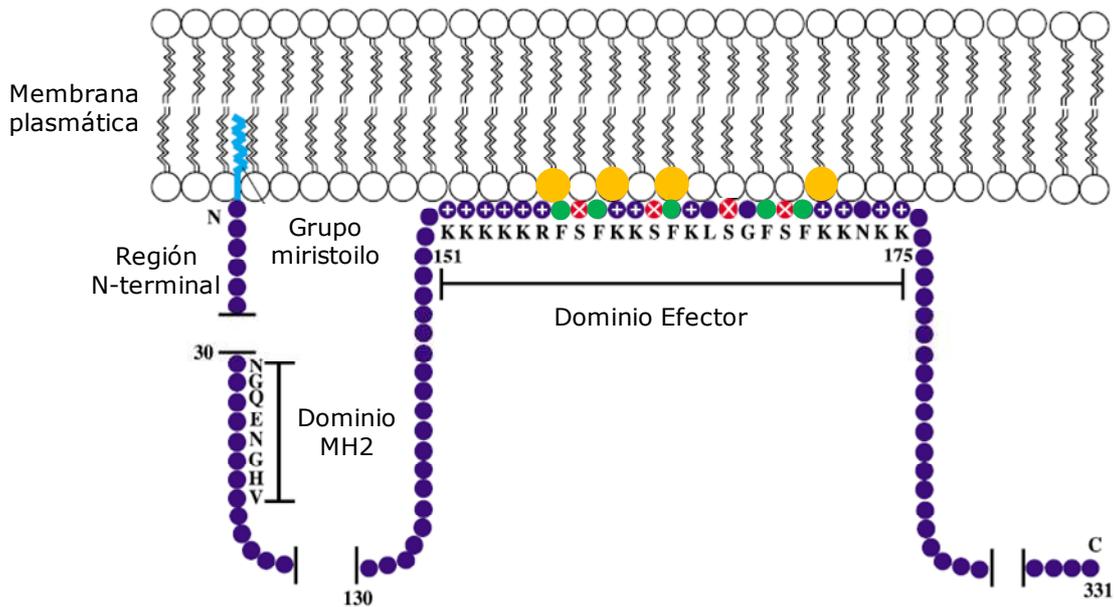


Figura 17: Representación esquemática de MARCKS y su interacción con las membranas. MARCKS presenta tres regiones bien definidas funcional y estructuralmente, la región N-terminal que puede ser miristoilada en un residuo de glicina; el dominio MH2 de función desconocida y el dominio efector (aminoácidos 151-175). El dominio efector presenta varios residuos cargados positivamente (un residuo de arginina "R" y doce residuos de lisina "L") y cinco residuos de fenilalanina (círculos verdes). Además el dominio efector presenta cuatro residuos de serina que pueden ser fosforilables por PKC u otras quinasas (círculos rojos con una X). MARCKS interactúa con las membranas por la inserción del grupo miristoilo presente en el extremo N-terminal y por interacción electrostática del dominio efector con los fosfolípidos de membrana como PIP₂ (círculos amarillos). Además los residuos de fenilalanina se introducen en las membranas hidrofóbicas, contribuyendo a esta interacción. Figura modificada de Sundaram M. et al. 2004.

La unión de MARCKS con las membranas le permite regular la disponibilidad de PIP₂ en las membranas (Laux T., et al 2000; McLaughlin S. and Murray D. 2005). Varios trabajos han demostrado que PIP₂ y MARCKS colocalizan en microdominios de la membrana plasmática denominados balsas lipídicas y en otras estructuras subcelulares como adhesiones focales, en los "ruffles" de membrana y durante la formación de fagosomas (Sundaram M., et al 2004). MARCKS es capaz de regular la disponibilidad de PIP₂ ya que al secuestrar este fosfolípido evita que otras enzimas interactúen con PIP₂. Por ejemplo se ha demostrado que el dominio efector de MARCKS evita que PIP₂ sea hidrolizado por PLC (Glaser M., et al 1996; Gambhir A., et al 2004). Asimismo MARCKS promueve la formación de dominios ricos en PIP₂ en la membrana plasmática de células PC12 (Laux

T., et al 2000) y la formación de estos dominios de membranas se debe a que el dominio efector de MARCKS presenta una gran afinidad por PIP₂ y a la gran capacidad de unión que presenta este dominio, ya que una sola molécula de dominio efector es capaz de secuestrar tres moléculas de este fosfolípido.

Otra característica importante de la unión de MARCKS con las membranas es que esta una unión es reversible, y este mecanismo puede ser regulado por PKC o CaM (McLaughlin S. and Aderem A. 1995; Arbuzova A., et al 2002) (Fig. 18).

Como se mencionó anteriormente el dominio efector de MARKCS es el principal sustrato de PKC en varios modelos celulares (Thelen M., et al 1991) y puede ser fosforilado por varias quinasas (Sasaki Y. 2003). Una vez que se produce la fosforilación en los residuos de serina presente en el dominio efector, las cargas negativas de los grupos fosfatos reducen la atracción electrostática entre el dominio efector y los fosfolípidos de las membranas, produciendo la translocación de la proteína desde la membrana plasmática hacia el citosol celular, permitiendo así que PIP₂ interaccione con otras proteínas como PLC. Una vez que MARCKS se localiza en el citosol, está puede ser desfosforilada por diferentes fosfatasas y translocarse nuevamente a hacia la membrana plasmática (Seki K., et al 1995). Este mecanismo de fosforilación/desforilación explica la unión reversible de MARCKS a las membranas (Fig. 18).

Otro proteína que interacciona con MARCKS y regula su unión a membrana es CaM (McLaughlin S. and Murray D. 2005). El incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular produce la activación de CaM lo que le permite interaccionar con varias proteínas. Calmodulina interacciona con gran afinidad con MARCKS a través del dominio efector y esta unión produce la translocación de MARCKS desde la membrana plasmática al citosol. Una vez que la concentración de Ca²⁺ intracelular retorna a los niveles normales, CaM libera a MARCKS permitiéndole interaccionar nuevamente con las membranas (Fig. 18).

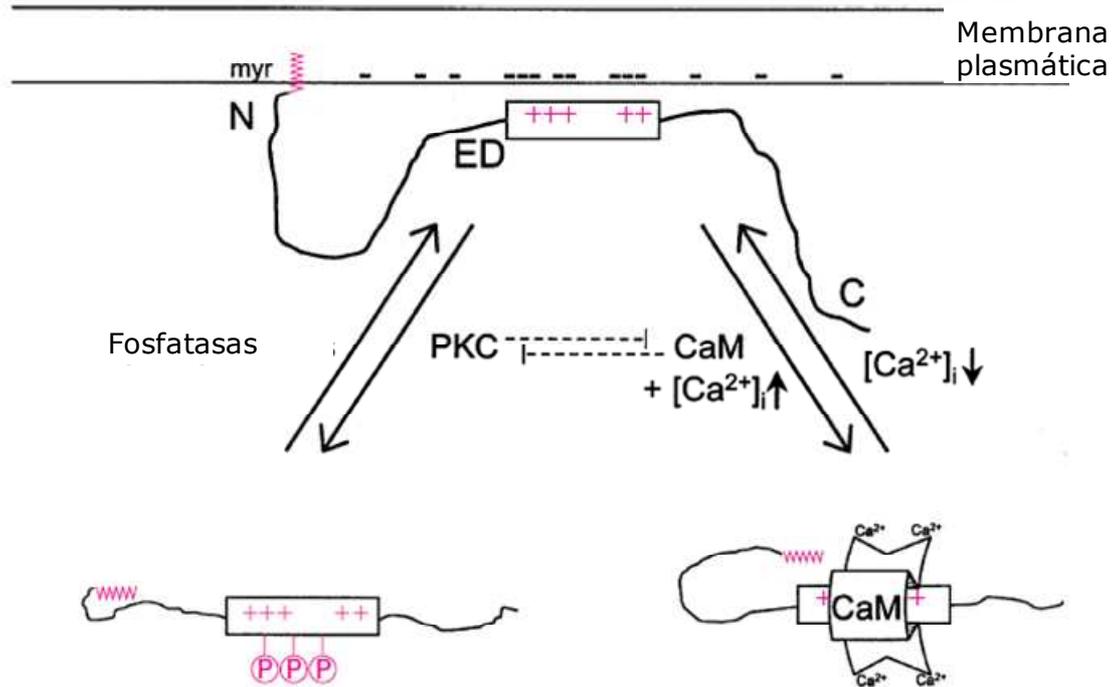


Figura 18: Unión reversible de MARCKS a las membranas. MARCKS puede translocar reversiblemente desde la membrana plasmática hacia el citosol celular por fosforilación por PKC u otras quinasas. Una vez que MARCKS es fosforilada, las cargas negativas de los grupos fosfatos producen una repulsión electrostática con las cargas negativas de los fosfolípidos, produciendo la translocación de MARCKS hacia el citosol. En el citosol celular MARCKS puede ser desfosforilada permitiéndole interactuar nuevamente con las membranas. Otro mecanismo por el que MARCKS se transloca reversiblemente al citosol celular es por la interacción con Ca^{2+} -CaM. El complejo Ca^{2+} -CaM interactúa con gran afinidad con MARCKS, produciendo la translocación de MARCKS. Una vez que los niveles de Ca^{2+} vuelven a los valores normales MARCKS se disocia de CaM, lo que le permite interactuar nuevamente con las membranas. Cabe mencionar que las interacciones de PKC y CaM con MARCKS son mutuamente excluyentes. Figura modificada de Arbutova A., et al 2002.

Debido a que MARCKS ha sido involucrada en las vías de señales de PKC y CaM y se ha planteado que MARCKS podría ser un punto de cruce (cross-talk) entre estas vías de señalización. Cabe mencionar que las interacciones de MARCKS con CaM y PKC son mutuamente excluyentes ya que una vez que se produce la unión de CaM al dominio efector de MARCKS, se bloquean los residuos de serina fosforilables. A su vez la fosforilación de MARCKS inhibe la interacción con CaM (Arbutova A., et al 2002).

Evidencias de MARCKS en procesos exocíticos

Numerosos trabajos han sugerido que la proteína MARCKS participa en diversos procesos exocíticos. Por ejemplo, PMA produce un aumento en la secreción de noradrenalina en células de neuroblastoma humano, durante este proceso secretorio se produce la fosforilación y posterior translocación de MARCKS desde las membranas hacia el citosol, sugiriendo una correlación entre la translocación de MARCKS y el aumento en la liberación de noradrenalina (Goodall A.R., et al 1997). Los esteroides de forbol también inducen un aumento en la fosforilación de MARCKS en células cromafines, lo que lleva al desensamble de los filamentos de actina corticales produciendo la liberación de noradrenalina en este modelo celular (Trifaró J.M., et al. 2000; Rosé S.D., et al 2001). Además, se ha reportado que prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) estimula la fosforilación de MARCKS y la secreción de oxitocina, siendo este proceso secretorio inhibido cuando se expresa una mutante de MARCKS no fosforilable (Salli U., et al. 2000; Salli U., et al 2003). Asimismo, en células humanas normales bronquiales epiteliales se ha demostrado que MARCKS es un componente importante en las vías de señales que conducen a la secreción de mucina y que al igual que en otros modelos, se produce la fosforilación y translocación de MARCKS durante este proceso exocítico (Li Y., et al 2001). Finalmente, Eliyahu y colaboradores (Eliyahu E., et al 2005; Eliyahu E., et al 2006) demostraron que MARCKS se encuentra presente en ovocitos de rata y que se requiere la fosforilación y translocación de esta proteína para que se produzca la exocitosis de los gránulos corticales.

A partir de estos trabajos se puede concluir que durante las vías de señales que conducen a la exocitosis en diferentes modelos celulares, se produce la fosforilación y translocación de la proteína MARCKS, ambos sucesos requeridos para que ocurra la exocitosis. Dado que MARCKS *in vitro* puede unir y polimerizar filamentos de actina, algunos autores han propuesto que MARCKS actúa como un punto de anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática, por lo que la fosforilación de MARCKS además de producir la translocación de la proteína, también produciría el

desensamble del citoesqueleto de actina próximo a la membrana plasmática. De esta manera se facilitaría el acercamiento y translocación de las vesículas secretorias hacia la membrana plasmática para su posterior fusión. Sin embargo, las evidencias de una interacción directa entre MARCKS y actina *in vivo* son escasas, y dado que existe una correlación entre las funciones biológicas de MARCKS y PIP₂ y debido a que PIP₂ tiene una función fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina, también se ha propuesto que MARCKS podría regular el citoesqueleto de actina mediante la unión de PIP₂.

Recientemente Gadi y colaboradores (Gadi D., et al 2011) propusieron un nuevo mecanismo de acción de MARCKS durante la degranulación de mastocitos. Mediante el uso de un dominio efector de MARCKS mutante, el cual no se puede fosforilar porque los cuatros residuos de serina presentes en el dominio efector fueron mutados por alanina, inhibieron la degranulación de los mastocitos. Ellos proponen que la inhibición de este proceso secretorio se debe a que el dominio efector no fosforilable permanece unido a la membrana plasmática secuestrando permanentemente PIP₂, por lo tanto impediría la producción de IP₃ y los movimientos de Ca²⁺ necesarios para la degranulación de los mastocitos.

Estos trabajos indican que MARCKS podría actuar regulando diferentes etapas durante los procesos exocíticos, por un lado, la translocación de las vesículas hacia la membrana plasmática, proceso regulado por el citoesqueleto de actina, y por otro lado, los movimientos de Ca²⁺ necesarios para la fusión de membranas.

Si bien la bibliografía sugiere la participación de MARCKS en varios procesos exocíticos, se desconoce si MARCKS participa en la exocitosis acrosomal. Hasta el momento no se ha documentado la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos. Este trabajo de tesis propone estudiar la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos y su participación durante la exocitosis acrosomal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

MARCKS está presente en espermatozoides humanos y participa en las vías de señales que conducen a la exocitosis acrosomal, regulando la disponibilidad de PIP_2 y los movimientos de Ca^{2+} que ocurren durante este proceso secretorio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si MARCKS está presente en espermatozoides humanos y estudiar la función de MARCKS y su relación con la maquinaria de fusión involucrada en la exocitosis acrosomal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-** Determinar si MARCKS está presente en espermatozoides humanos y si participa en las vías de señales que conducen a la exocitosis acrosomal, actuando como una *pipmodulina*.

MARCKS es una proteína ubicua, aunque hasta el momento se desconoce su presencia y localización en espermatozoides humanos. En una primera etapa se utilizarán diferentes anticuerpos que reconocen los diferentes dominios de la proteína MARCKS y mediante la técnica de Western blot e inmunofluorescencia indirecta nos proponemos estudiar la presencia y localización de MARCKS en espermatozoides humanos.

Dado que MARCKS ha sido involucrada en varios procesos exocíticos también en este objetivo nos proponemos estudiar la participación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal. Para ello se utilizará el modelo de espermatozoides permeabilizados lo que nos permitirá utilizar diferentes reactivos como anticuerpos y proteínas recombinantes para evaluar la función de MARCKS durante la exocitosis acrosomal. Por otro lado se conoce que MARCKS interacciona con varias moléculas y que estas interacciones son reguladas por su estado de fosforilación, por ello mediante el uso del dominio efector salvaje de MARCKS recombinante y mutantes de este dominio se estudiará cómo influye el estado de fosforilación de MARCKS en la exocitosis acrosomal.

Además durante este objetivo se analizará si el dominio efector de MARCKS actúa como una *pipmodulina* regulando las concentraciones disponibles de PIP₂ un importante fosfolípido que ha sido involucrado en las vías de señales que ocurren durante la exocitosis acrosomal.

2- Estudiar si MARCKS regula los movimientos de Ca²⁺ que ocurren durante la exocitosis acrosomal y si su estado de fosforilación varía durante la exocitosis acrosomal y la capacitación en espermatozoides humanos intactos.

Durante este objetivo se estudiará si MARCKS regula las movilizaciones de Ca²⁺ durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos. Dado que los espermatozoides permeabilizados pierden los gradientes de membrana, durante este objetivo se utilizarán espermatozoides intactos. Una desventaja que presentan los espermatozoides intactos es que son transcripcionalmente inactivos por lo que no se pueden utilizar técnicas como transfección y ARN de interferencia para el estudio de la función de las proteínas durante la exocitosis acrosomal. Para superar esta limitante se estudiará la función de MARCKS durante los movimientos de Ca²⁺ que ocurren en la exocitosis acrosomal, mediante el uso de un péptido cargados positivamente el cual es permeable a membrana (López C.I., et al, 2007; Garnier-Lhomme M., et al 2009). La secuencia aminoacídica 154-165 correspondiente al dominio efector de MARCKS presenta una alta densidad de cargas positivas, lo que le permite ser permeable a las membranas. En una primera etapa se evaluará si la secuencia aminoacídica 154-165 correspondiente al dominio efector de MARCKS es permeable a membranas. Esta propiedad nos permitirá estudiar la función de MARCKS durante la exocitosis acrosomal y evaluar la participación de MARCKS durante los movimientos de Ca²⁺ durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos. De esta manera obtendremos información acerca de la función de MARCKS en condiciones fisiológicas, lo que nos permitirá tener un panorama más completo acerca de los mecanismos que se producen durante la exocitosis acrosomal.

En relación al objetivo uno se ampliarán los estudios para determinar cómo influye el estado de fosforilación de MARCKS en la exocitosis acrosomal, por lo que durante este objetivo se evaluará el estado de fosforilación de la proteína endógena durante la exocitosis acrosomal. Además debido a que durante la capacitación se producen varios cambios que le permiten al espermatozoide secretar el gránulo acrosomal y dado que en la capacitación se producen cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas, también nos proponemos estudiar si el estado de fosforilación de MARCKS varía durante la capacitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Estreptolisina O recombinante se obtuvo del Dr. Bhakdi (University of Mainz, Mainz, Germany). Como medio de cultivo se utilizó Human Tubal Fluids (HTF). PKC β II, 2-amino-etoxidifenilborato (2-APB) y adenofostina A se obtuvieron de Calbiochem (Merck Química Argentina SAIC, Buenos Aires, Argentina). Tanto la estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano (HRP) como los anticuerpos secundarios biotilizados fueron obtenidos de DAKO, TecnoLab (Buenos Aires, Argentina). La lectina *Pisum sativum* marcada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC), el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), el anticuerpo anti- β tubulina y el anticuerpo monoclonal anti-fosfo MARCKS de conejo (fosfo-Ser^{152/156}, anti-fosfo MARCKS) provienen de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Los marcadores de peso molecular preteñidos provienen de Bio Rad (Buenos Aires, Argentina). En anticuerpo AntiIgG de conejo marcado con Cy3 o con oro coloidal de 6 nm y el antiIgG de ratón marcado con DyLight™ fueron obtenidos de Jackson Immunochemicals (Sero-immunoDiagnostics, Inc., Tucker, GA). Glutacion-sefarosa proviene de GE Healthcare. ATP marcado con [γ ³²P] se obtuvo de Perkin Elmer Life Science (Migliore-Laclaustra. Buenos Aires, Argentina). Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) se obtuvo de Avanti Polar Lipids, Inc., (Alabaster, USA). El anticuerpo policlonal de cabra que reconoce la región N-terminal de MARCKS (N-19) y el péptido de bloqueo MARCKS N-19 provienen de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). El anticuerpo monoclonal anti-MARCKS de ratón que reconoce el extremo N-terminal correspondiente a los aminoácidos 2-66 de la proteína MARCKS humana (N-66), y el anticuerpo policlonal anti-MARCKS que reconoce el dominio efector de MARCKS, alrededor de la serina 162 (anti-ED) se obtuvieron de Abcam. A23187 se obtuvo de Alomone Laboratories Ltd. (Jerusalem, Israel). La aglutinina *Lens culinaris* marcada con isotiocianato de tetrametilrodamina (LCA-TRITC) o acoplado a isotiocianato de fluoresceína (LCA-FITC) proviene de Vector Labs (Bioars, Argentina) y el péptido correspondiente a la secuencia (154-165) del dominio efector de MARCKS humana marcado con tetrametilrodamina (ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR) proviene de Anaspec (USA). El resto de los reactivos se obtuvieron de TecnoLab o

Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El anticuerpo anti-fosfo PKC α/β II (Thr 638/641) que reconoce el residuo fosforilado de treonina 638 de la PKC α y el residuo de treonina fosforilado 641 de la PKC β II y el anticuerpo anti-fosfo PKC δ/θ (Ser643/676) que reconoce el residuo de serina fosforilado 643 de la PKC δ y el residuo de serina fosforilado 676 de la PKC θ fueron obtenidos de Cell Signaling. El anticuerpo policlonal anti-GST de conejo se obtuvo de Novus Biologicals.

Mutagénesis sitio dirigida del dominio efector de MARCKS

El plásmido codificante para el dominio efector de MARCKS de ratón, pGEX3X-ED-MARCKS (96-184) fusionado a GST fue gentilmente provisto por el Dr. Jae-Won Soh (University of Inha, Incheon, Korea). Las mutantes del dominio efector de MARCKS fueron obtenidas a partir del plásmido pGEX3X-ED-MARCKS (96-184) utilizando el kit de mutagenesis sitio-dirigida por fusión de New England BioLabs. Las mutantes del dominio efector de MARCKS en las cuales las serinas de las posiciones 152, 156, 159 y 163 fueron sustituidas por alanina (ED4A) o por ácido aspártico (ED4D) fueron construidas por PCR convencional usando los siguientes oligonucleótidos mutagénicos fosforilados in vitro como cebadores de cadena adelantada:

5'-

GAAGCGCTTTGCCTTCAAGAAGGCCTTCAAGCTGGCCGGCTTCGCCTTCAAGAAG
AGC -3' (ED4A) y 5'-GCGCT
TTGACTTCAAGAAGGACTTCAAGCTGGACGGCTTCGACTTCAAGCCG-3' (ED4D).

Siendo para ambos el cebador de reversa 5'-TTTTTTTTTTTCGGGGTCTCGCTGCTGGGCGACGG-3'. La ligación, transformación y el análisis de la transformación fueron llevados a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación.

Producción del dominio efector de MARCKS recombinante y sus mutantes

Los plásmidos codificantes para el dominio efector de MARCKS tipo salvaje (ED) así como los codificantes para los dominios mutantes, no fosforilable (ED4A) y fosfomiméticos (ED4D) fueron transformados en células *E.coli* cepa BL21 (Stratagene, La Jolla, CA) y luego suspendidas en 3 ml de medio LB con ampicilina e incubadas a 37°C en un agitador a 200 RPM durante 16 horas. Posteriormente esta suspensión de bacterias se colocó en 200 ml de medio LB con ampicilina y fue incubada nuevamente a 37°C en un agitador a 200 RPM hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5. Luego la expresión génica del plásmido fue inducida con 0,5-0,7 mM de isopropiol 1-tio-D-galactosido (IPTG) por 3 horas a 37°C en agitación a 200 RPM. El cultivo fue posteriormente centrifugado a 15.000 RPM, a 4°C durante 45 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en PBS. Para realizar la lisis bacteriana, se agregó lisozima 1 mg/ml y se incubó con agitación durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se agregó 1 % de Tritón X-100 y el cultivo nuevamente fue incubado con agitación durante 15 minutos a 4°C. Luego se agregó 1 % de estreptomina, 1 mM EDTA e inhibidor de Proteasas (P2714, Sigma). A continuación se realizó lisis por ultrasonido mediante 4 ciclos de 1 minuto cada uno. La suspensión se centrifugó a 15.000 RPM, a 4°C, durante 45 minutos. Los dominios recombinantes se purificaron en columnas de glutatión sefarosa, para ello el sobrenadante obtenido fue incubado con glutatión-sefarosa a 4°C durante 16 horas y se eluyó la proteína con buffer de elución (NaCl 120 mM, Glutatión reducido 50 mM, Tris 100 mM; pH 8).

Ensayo de fosforilación *in vitro*

Para los ensayos de fosforilación 15 μ M del dominio efector de MARCKS fueron incubados por 40 min a 37°C en 20 mM Hepes pH 7,4 con 2 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, 100 μ M $CaCl_2$, 140 μ M de

fosfatidilserina, PMA 325 nM , inhibidores de proteasas 1 x y 0,6 U/ml de PKC β II. La mezcla fue filtrada a través de sefadex G-25, equilibrada con buffer de sacarosa (250 mM sacarosa, 20 mM HEPES-K, 0,5 mM EGTA, pH 7,4) para eliminar PMA y otras moléculas pequeñas (Roggero et al. 2005). Para los ensayos de marcación con $\gamma^{32}\text{P}$ de las proteínas recombinantes, 5 μM del ED, ED4A, ED4D y GST fueron fosforilados como se describe arriba utilizando 10 μM de ATP marcado con $[\gamma^{32}\text{P}]$ cuya actividad era de 5 $\mu\text{Ci/ml}$. Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE de tris-glicina al 10 % que posteriormente fue secado y expuesto a placa Pierce CL-XPosure Film (Tecnolab, Argentina). Los ensayos de fosforilación fueron diseñados para esta tesis en nuestro Laboratorio.

Ensayo de Western blot

Los espermatozoides fueron lavados en PBS 2 veces y posteriormente resuspendidos en buffer sample (2 % SDS, 10 % glicerol y 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) sin agentes reductores. Las proteínas fueron extraídas por calentamiento a 95°C, 3 veces, por 4 minutos cada una, intercalando incubaciones a 4°C durante 3 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g por 10 min. El sobrenadante fue ajustado a 5 % de β -mercaptoetanol.

Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamina al 10 % y luego fueron transferidos a membrana de PVDF (PVDF, del inglés polyvinyl difluoride) (Millipore). La reactividad inespecífica fue bloqueada mediante incubación por 1 hora a 25°C en solución de bloqueo [leche descremada al 5% disuelta en T-TBS, (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl y 0,1 % tween-20)], posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios N-66 de Abcam (0,26 $\mu\text{g/ml}$), N-19 de Santa Cruz (0,13 $\mu\text{g/ml}$), anti-fosfo MARCKS (0,06 $\mu\text{g/ml}$) en. Los anticuerpos anti-fosfo PKC α/β II y el anticuerpo anti-fosfo PKC δ/θ se usaron en una dilución 1/4000 en solución de bloqueo y durante 16 horas a 4°C. Como anticuerpos secundarios se utilizaron, anticuerpo AntiIgG de ratón biotinilado (0,076 $\mu\text{g/ml}$), anticuerpo

antiIgG de cabra biotinilado (0,4 $\mu\text{g/ml}$) o anticuerpo AntiIgG de conejo biotinilado (0,076 $\mu\text{g/ml}$), por 1 hora a 25°C y luego las membranas fueron incubadas con estreptavidina acoplada a HRP (0,17 $\mu\text{g/ml}$) por 1 hora a 25°C. Los excesos de anticuerpos primarios y secundarios así como de la estreptavidina acoplada a HRP se removieron con 5 lavados de 10 min cada uno con T-TBS. Como control de carga las membranas se retrataron con anticuerpo anti- β tubulina o anti actina. La detección se realizó mediante sistema de quimioluminiscencia (ECL; GE Healthcare) y las imágenes de las bandas fueron obtenidas usando un analizador de imágenes luminiscentes LAS-4000 (Fujifilm).

Ensayo de Dot blot

Para los ensayos de Dot blot 200 ng del dominio efector de MARCKS fusionando a GST fue inmovilizada en una membrana de PVDF. En la misma membrana también se sembraron iguales cantidades del dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro* (pED), la mutante no fosforilable (ED4A), la mutante fosfomimética (ED4D) y glutation s-transferasa. La reactividad inespecífica fue bloqueada mediante incubación por 1 hora a 25°C en solución de bloqueo. Posteriormente se incubó por 16 hora a 4°C con anticuerpo anti-GST (0,016 $\mu\text{g/ml}$ en solución de bloqueo o anti-fosfo MARCKS (0,06 $\mu\text{g/ml}$), en solución de bloqueo. Las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS 0.1 % Tween-20 e incubadas con un anticuerpo AntiIgG de ratón acoplada a HRP (0,016 $\mu\text{g/ml}$ en T-TBS 0,1 % Tween-20, 1 hora a 25°C), posteriormente se lavó 5 veces con T-TBS 0,1 % Tween-20. Finalmente las imágenes de las bandas fueron obtenidas usando un analizador de imágenes luminiscentes LAS-4000 (Fujifilm).

Obtención de membranas de espermatozoides humanos

Se siguió el protocolo descrito por Bohring y Krause (Bohring C. and Krause W. 1999), modificado por Tomes et al (Tomes C.N., et al 2005). Después de los tratamientos correspondientes se tomaron aproximadamente 60×10^6 espermatozoides, las cuales fueron lavadas dos veces con PBS y después se incubaron con el buffer hipoosmótico (citrate de sodio $2H_2O$ 7,35 mg/ml, fructosa 13,5 mg/ml) durante 2 horas a $37^\circ C$. Luego se agregó inhibidores de proteasas y se sónico. Se separaron los restos celulares centrifugando 15 min a $10.600 \times g$ a $4^\circ C$ y 10 min a $20.800 \times g$ también a $4^\circ C$. Luego se separaron las membranas centrifugando a $208.000 \times g$ en una ultracentrífuga Beckman Optima. El pellet final que contiene las proteínas de membrana se resuspendió en buffer sample sin agentes reductores. Luego el sobrenadante fue ajustado a 5 % de β -mercaptoetanol.

Ensayo de exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados

Para los ensayos de exocitosis acrosomal se utilizaron espermatozoides humanos de donantes sanos, quienes firmaron un consentimiento informado sobre los protocolos a utilizar en esta tesis en concordancia con la Declaración de Helsinki (2008) y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo.

Los espermatozoides de mayor movilidad se obtuvieron por separación por medio de la técnica de swim up en HTF, preparado como está formulado por Irvine Scientific (Santa Ana, CA), suplementado con 0,5 % de BSA por 1 hora a $37^\circ C$ en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 95 % aire. Tras ajustar la concentración a $5-10 \times 10^6$ células/ml se incubaron en condiciones similares por 2 horas para su capacitación. Los espermatozoides

incubados en condiciones capacitantes fueron usados sin permeabilización (espermatozoides intactos) o permeabilizados. Para la permeabilización los espermatozoides se incubaron con 1,9 U/ml de SLO como se describe en (Yunes R., et al 2000) y posteriormente fueron resuspendidos en buffer sacarosa a 4°C (250 mM sacarosa, 0,5 mM EGTA, 20 mM Hepes-K pH) con 2 mM de DTT. Para los ensayos de exocitosis acrosomal, los inhibidores y estimuladores fueron agregados en secuencia como lo indican las figuras e incubados por 10 a 15 min a 37°C luego de cada adición. Una vez secas las muestras se fijaron y permeabilizaron inmediatamente con metanol frío durante 30 segundos. Las muestras fijadas se tiñeron con 50 µg/ml de lectina *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) en PBS en una cámara húmeda en la oscuridad durante 40 minutos a 25°C. Luego se lavó el exceso de lectina con agua destilada durante 20 minutos a 4°C. Se evaluó el estado acrosomal de al menos 200 células en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot II) con objetivo de inmersión (X630). Este procedimiento nos permitió diferenciar dos patrones de tinción: *I*) ausencia de tinción en el acrosoma o tinción del segmento ecuatorial (espermatozoides reaccionados) y *II*) tinción selectiva y completa del acrosoma (espermatozoides no reaccionados o intactos) (Fig. 19).

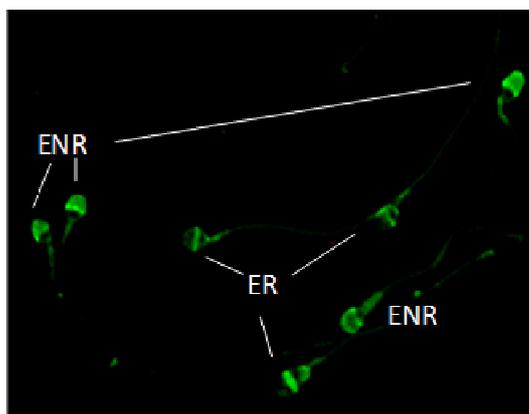


Figura 19: Fotografía de microscopía de fluorescencia de espermatozoides humanos. La fotografía muestra los diferentes patrones de evaluación de la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos teñidos con *Pisum Sativum* Agglutinin conjugada a isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC). ENR, espermatozoides no reaccionados que presentan tinción completa de su acrosoma, ER, espermatozoides reaccionados, sólo muestran tinción del segmento ecuatorial

En todos los experimentos se incluyeron células no estimuladas como controles negativos y células estimuladas con 10 µM Ca²⁺ libre como control positivo. Para cada experimento los datos fueron estandarizados mediante la sustracción del número de espermatozoides reaccionados en el control negativo (rango 10 al 20 %) al valor de reaccionados en cada condición

(rango entre 20 al 30 %) y expresando estos resultados como porcentajes de la exocitosis acrosomal observada en el control positivo. La diferencia promedio entre los controles negativo y positivo fue de un 13%. Experimentos con diferencias menores al 10 % fueron descartados.

Ensayo de exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos

Espermatozoides capacitados fueron ajustados a una concentración de $5-10 \times 10^6$ células/ml. Posteriormente se realizaron dos lavados con HTF sin BSA, y se incubaron las células con el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR a diferentes concentraciones (1-4 μ M) durante 30 minutos a 37°C, en oscuridad. Luego se estimuló la exocitosis acrosomal con 200 nM de PMA, 10 μ M de ionóforo de calcio o 15 μ M de progesterona durante 15 minutos a 37°C, en oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS y sembradas en portaobjetos. Una vez secas las muestras se fijaron y permeabilizaron inmediatamente con metanol frío durante 45 segundos. Las muestras fijadas se tiñeron con 50 μ g/ml de PSA-FITC en PBS en una cámara húmeda en la oscuridad durante 40 minutos a 25°C. Luego se lavó el exceso de lectina con agua destilada durante 20 minutos a 4°C. Se evaluó el estado acrosomal de al menos 200 células en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot II) y se procedió como se indica en los ensayos de exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados.

Inmunofluorescencia indirecta

Cien ml de espermatozoides capacitados ajustados a 7×10^6 fueron sembradas en cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina. Los cubreobjetos se incubaron 0,5 mg/100ml de poli-L-lisina en PBS en cámara húmeda por 1 hora a 25°C, luego se descartó el exceso de poli-L-lisina. Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 2 % en PBS por 10 min a 25°C y posteriormente incubadas con 50 mM glicina-PBS por 10 min a 25°C y

permeabilizadas con 0,1 % tritón X-100 por 10 min. Las células fueron bloqueadas por 1 hora en PBS-PVP 0,5 % con 5 % de BSA y posteriormente fueron marcados con anticuerpo N-66 (16 horas a 4°C, 135 nM en PBS-PVP 0,5 % y 2 % de BSA), seguido por la incubación con AntiIgG de ratón marcado con DyLight488 (1 hora a RT, 3µg/ml en PBS-PVP 0,5 %) o anti-fosfo MARCKS (16 hs a 4°C, 135 nM en PBS-PVP 0,5 % y 2 % de BSA), seguido por la incubación con AntiIgG de conejo marcado con Cy3 (1 hora a RT, 3µg/ml en PBS-PVP 0,5 %). En algunos experimentos, el anticuerpo anti-fosfo MARCKS fue preincubado con el dominio efector de MARCKS fosforilado (1,35 µM). Finalmente, las células fueron incubadas 30 seg en metanol frío y teñidas con PSA-FITC o LCA-TRICT por 40 min a 25°C y lavadas con agua destilada por 20 min a 4°C. Los cubreobjetos fueron montados en 1 % Vectashield (Vector Labs). Los espermatozoides fueron evaluados en microscopio de fluorescencia usando un Confocal FV1000 de Olympus y procesado con el programa FV10-ASW1.7.

Evaluación de la difusión de los dominios recombinantes en espermatozoides permeabilizados

Espermatozoides capacitados y permeabilizados con SLO fueron incubados durante 30 min a 37°C con 1 µM de los dominios ED, pED, ED4A y ED4D. Posteriormente los espermatozoides fueron lavados con PBS y luego incubados con un anticuerpo anti-GST (166 nM en PBS-PVP 0,5 % con 3 % de BSA) durante una hs a 25°C. A continuación los espermatozoides fueron lavados e incubados con un anticuerpo anti-rabbit acoplado a Cy3 (3 µg/ml en PBS con PBS-PVP 0,5 % y 1 % BSA), por 1 hs a 25°C. Luego las células se lavaron y se procedió como se describe previamente en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

Evaluación de la permeabilidad del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR

Para los ensayos de permeabilidad del péptido ED₁₅₁₋₁₇₅-TMR, espermatozoides intactos y capacitados en una concentración de 7×10^6 células/ml fueron incubados con 4 μ M del péptido ED₁₅₁₋₁₇₅-TMR en medio HTF sin albúmina durante una hora en oscuridad. Las células fueron tratadas con 0,5 mg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C y la reacción se frenó con 1 mg/ml de inhibidor de tripsina. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS. A continuación los espermatozoides fueron colocados sobre cubreobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina. Luego los espermatozoides fueron fijados con paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos. Se neutralizaron los aldehídos residuales con glicina 50 mM en PBS durante 15 minutos. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-PVP 0,5 %. A continuación, las células fueron incubadas durante 45 seg en metanol frío, y teñidas con lectina *Pisum sativum* acoplada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) durante 40 minutos para poder visualizar el estado del acrosoma. Posteriormente se les realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-PVP 0,5 %. Finalmente, se montó en 1 % de Vectashield. Los espermatozoides fueron evaluados en microscopio de fluorescencia usando un Confocal FV1000 de Olympus y procesado con el programa FV10-ASW1.7.

Microscopía electrónica e inmunomarcado

Se tomaron por lo menos 20×10^6 espermatozoides y fueron fijadas con paraformaldehído en buffer fosfato 0,2 M pH 7,4 durante dos horas a 4°C. Luego las células fueron lavadas con buffer fosfato y luego fueron incubadas en buffer fosfato con 50 mM de glicina. Posteriormente las células fueron colocadas en gelatina al 10 %. A continuación las células fueron embebidas en sacarosa al 2,3 M durante 2 hs a 4°C y luego fueron congeladas en N₂ líquido. Crioultracortes fueron obtenidos usando Leica ultracut R y recuperados con un mezcla de metilcelulosa al 2 % y sacarosa

al 2,3 M (vol/vol). Secciones de 60 nm fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS (300 µg/ml) y a continuación se utilizó un anticuerpo anti rabbit acoplado a partículas de oro de 6 nm. Las secciones fueron contrastadas con una mezcla de metilcelulosa y acetato de uranilo y observadas con un microscopio electrónico Zeiss 900.

Mediciones de Ca²⁺ intracelular en espermatozoides humanos intactos

Las mediciones de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ en suspensiones de espermatozoides se hicieron utilizando la sonda fluorescente Fluo 3-AM. Espermatozoides motiles (5-10 x10⁶ cel/ml) se incubaron con 2 µM de la sonda permeable Fluo 3-AM 30 min a 37°C. Luego las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en HTF. Las suspensiones de espermatozoides se transfirieron a cubetas termostastizadas a 37°C para realizar mediciones fluorescentes bajo continua agitación. A los tiempos indicados se adicionó 15 µM de progesterona a las muestras de espermatozoides control y a los espermatozoides pretratados con 4 µM de él péptido ED₁₅₁₋₁₇₅-TMR. La fluorescencia de Fluo 3-AM (505 nm excitación, 525 nm emisión) se leyó en un espectrofluorómetro AMICO-Bowman Serie 2 (AB2) durante 600 seg con un rango de muestreo de 0,5Hz. Para calibrar la respuesta máxima [Ca²⁺]_i se determinó utilizando 0,1 % de Tritón X-100. Las mediciones se realizaron al menos 3 veces con distintos lotes de espermatozoides. El criterio para la inclusión de los resultados en el análisis fue la respuesta normal de la muestra a 15 µM de progesterona.

Análisis estadístico

Las diferencias entre las condiciones experimentales y los controles fueron analizados mediante ANOVA de una vía. El test de Dunnett fue usado

para comparaciones múltiples con un grupo control. Intervalos de confianza del 95 % o 99 % se utilizaron para establecer diferencias significativas con valores pre-establecidos, 0 para el control negativo y 100 para el control positivo. En caso de ser necesario se realizó test de Student apareado para comparar algunas medidas con su respectivo control. En todos los casos se considera significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

OBJETIVO ESPECÍFICO UNO:

Determinar la presencia y localización de MARCKS en espermatozoides humanos. Estudiar si MARCKS participa en las vías de señales que conducen a la exocitosis acrosomal, actuando como una *pipmodulina*.

Hasta el momento la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos no ha sido demostrada. En este objetivo nos proponemos estudiar la presencia y localización de MARCKS en espermatozoides humanos y, ya que MARCKS ha sido involucrada en varios procesos exocíticos, también nos proponemos estudiar la participación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal. Se evaluará si el estado de fosforilación de MARCKS regula su participación en la exocitosis acrosomal y se analizará si MARCKS actúa como una *pipmodulina* regulando la concentración de PIP₂.

MARCKS está presente en espermatozoides humanos

MARCKS es una proteína ubicua que se expresa en varias células. Por ejemplo, Michaut (Michaut M.A., et al 2005) y Eliyahu (Eliyahu E., et al 2005) determinaron la presencia de MARCKS en ovocitos de ratón y de rata, respectivamente. Además Mosevitsky y Silicheva (Mosevitsky M. and Silicheva I. 2011) por medio de Western blot demostraron que MARCKS se expresa en testículo de rata. Asimismo estos autores determinaron mediante inmunohistoquímica que MARCKS está presente en todos los estadios durante la espermatogénesis excepto en el estadio de espermatozoides maduros. Este resultado es llamativo, por lo que la presencia de MARCKS en espermatozoides maduros es todavía controversial.

El primer objetivo de esta tesis es determinar la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos y su localización intracelular. Para ello se utilizaron, en una primera instancia, dos anticuerpos que reconocen diferentes secuencias de la región N-terminal de MARCKS. Uno de ellos reconoce los residuos de los aminoácidos 2-66 (N-66), y el otro anticuerpo

reconoce los residuos aminoacídicos 1-19 (N-19) de la misma región. Las proteínas obtenidas a partir de espermatozoides humanos no capacitados, fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a una membrana de PVDF. Como se muestra en la figura 20A, ambos anticuerpos reconocieron una única banda acorde al peso molecular en el cual la proteína ha sido identificada en ensayos de Western blot. Hay que mencionar que el peso molecular de MARCKS es de 31,75 kDa, sin embargo presenta un corrimiento anómalo en geles de SDS-PAGE, observándose en un rango entre 70 y 87 kDa (Blackshear P.J. 1993; Arbuzova A., et al. 2002; Sundaram M., et al 2004). Esto se debe principalmente a que MARCKS presenta una conformación extendida o elongada, lo que dificultaría la migración de la proteína a través del gel de SDS-PAGE. En nuestras condiciones de ensayo el peso molecular aparente de MARCKS en espermatozoides humanos fue de 72 kDa. Este resultado fue confirmado cuando se grafico la distancia de migración relativa de la proteína (Rf) versus el logaritmo del peso molecular, de esta manera se determinó que MARCKS en geles de SDS-PAGE migra como una proteína de un peso molecular de 73,029 kDa (datos no mostrados). Como control positivo se utilizó extracto de cerebro de ratón ya que la proteína se expresa en grandes concentraciones en este tejido (Arbuzova A., et al 2002) y al igual que en espermatozoides humanos se observó una única banda en el rango esperado. Para demostrar la especificidad de los anticuerpos utilizados, éstos fueron preincubados con el péptido contra el cual fue generado el anticuerpo N-19. Como se observa en la figura 20A el pretratamiento de los anticuerpos con el péptido (Ac+pep) redujo un 90% la intensidad de la banda correspondiente a MARCKS, para el anticuerpo N-66 y un 75 % para el anticuerpo N-19 demostrando que la misma corresponde a la proteína MARCKS.

Para confirmar la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos decidimos utilizar un tercer anticuerpo pero, a diferencia de los anticuerpos N-66 y N-19, este anticuerpo reconoce específicamente la secuencia próxima al residuo de serina 162 del dominio efector de MARCKS (anti-ED). En la figura 20B se observa que el anticuerpo anti-ED en espermatozoides humanos no capacitados reconoció una única banda acorde al peso molecular en el que se identificó esta proteína en ensayos de Western blot

mostrados previamente (Fig. 20A). Al igual que para los anticuerpos N-66 y N-19 se utilizó cerebro de ratón como control positivo donde este anticuerpo reconoció una única banda y en el rango esperado.

De esta manera, haciendo uso de dos anticuerpos que reconocen la región N-terminal y un anticuerpo que reconoce el dominio efector de MARCKS podemos afirmar que la proteína MARCKS se encuentra presente en espermatozoides humanos.

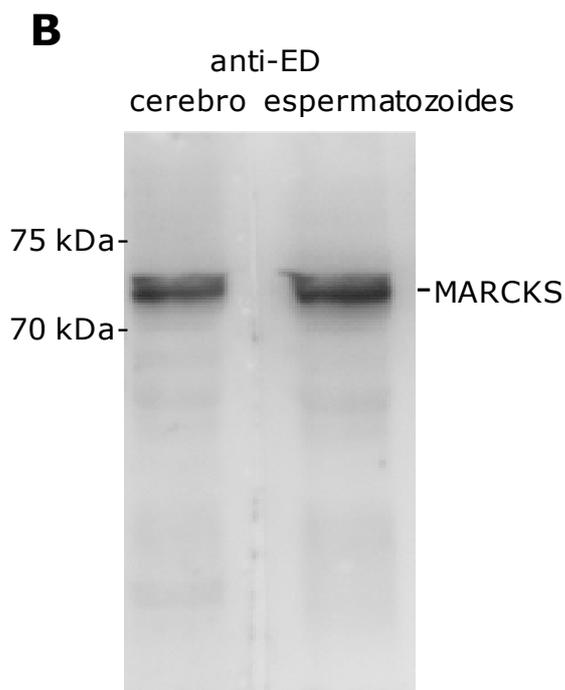
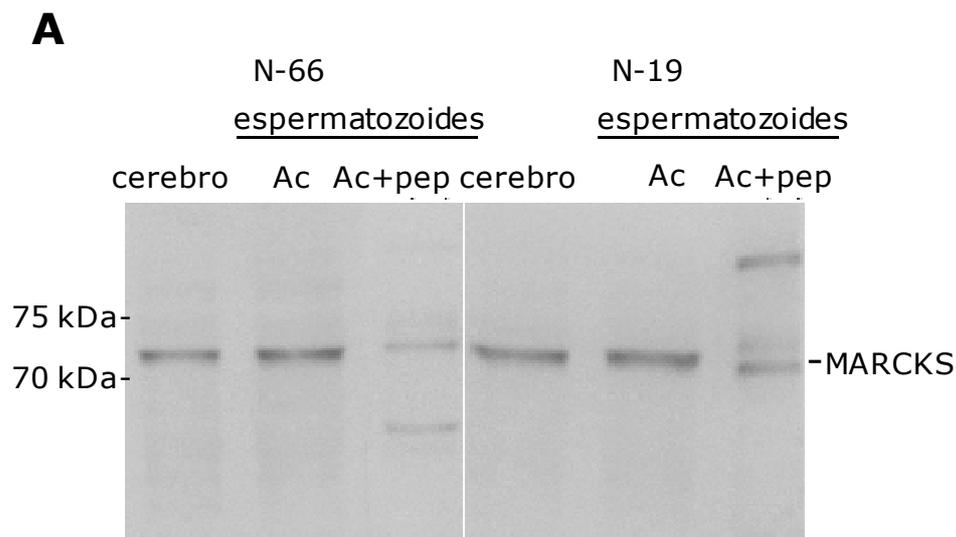


Figura 20: MARCKS se expresa en espermatozoides humanos. Las proteínas de los espermatozoides no capacitados (5×10^6) fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a membranas de PVDF. En **(A)** las membranas fueron incubadas con los anticuerpos que reconocen la región N-terminal de MARCKS, N-66 (panel izquierdo, carril Ac) y N-19 (panel derecho, carril Ac). Como control positivo se utilizó extracto de cerebro (1 μ g). Como control de la especificidad de los anticuerpos N-66 y N-19, estos fueron preincubados con un exceso (1:10) del péptido inmunogénico correspondiente a la región N-terminal de MARCKS (péptido N-19) (Ac+pep). En **(B)** la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-ED que reconoce el dominio efector de MARCKS.

Una vez determinada la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos decidimos evaluar su localización intracelular. Para ello realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo N-66. Los espermatozoides fueron fijados, permeabilizados y teñidos con el anticuerpo N-66 seguido de un anticuerpo secundario anti-mouse acoplado al fluoróforo DyLight 488. Como se muestra en la figura 21A, el anticuerpo N-66 reveló la presencia de la proteína en la cola, en la región postacrosomal y en la región acrosomal en espermatozoides humanos no capacitados. Cabe mencionar que en la región acrosomal se observó un patrón punteado en el 98 % de las células evaluadas. Es importante indicar que este patrón punteado ha sido descrito previamente en neuronas (Wiederkehr A., et al 1997). Para descartar una marca inespecífica del anticuerpo secundario se incubaron espermatozoides con el anticuerpo secundario en ausencia del anticuerpo N-66, no observándose inmunomarcación (Fig. 21B). Para determinar la localización y el estado del acrosoma, los espermatozoides fueron teñidos con la lectina *Lens culinaris* conjugada con TRITC (LCA-TRITC), la cual se une específicamente al acrosoma de los espermatozoides humanos (Kallajoki M., et al 1985) (Fig. 21A y B). Estos resultados demuestran que la proteína MARCKS se encuentra presente en espermatozoides humanos no capacitados y se observa una fuerte presencia de MARCKS en la cola y en la región postacrosomal, mientras que en la región acrosomal la presencia de MARCKS es menor y con un patrón punteado.

Una vez determinada la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos y debido a que el estado de fosforilación de MARCKS regula su interacción con los lípidos de membranas y con proteínas como calmodulina y actina (Hartwig J.H., et al 1992; Gallant C., et al 2005), nos propusimos estudiar mediante la técnica de Western blot el estado de fosforilación de MARCKS en espermatozoides humanos no capacitados. Para llevar a cabo este tipo de ensayos utilizamos un anticuerpo (anti-fosfo MARCKS) que reconoce los residuos de serina 152/156 fosforilados del dominio efector de MARCKS. Como se describió anteriormente, las proteínas obtenidas de espermatozoides humanos no capacitados fueron resueltas en gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a una membrana de PVDF. Luego la

membrana fue incubada con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS el cual reconoció una única banda de peso molecular aproximado de 73 kDa. Como control positivo se utilizó cerebro de ratón donde también se detectó una única banda en el mismo peso molecular (Fig. 22). Por lo que podemos concluir que MARCKS está presente en espermatozoides humanos y que al menos una fracción de la misma se encuentra fosforilada.

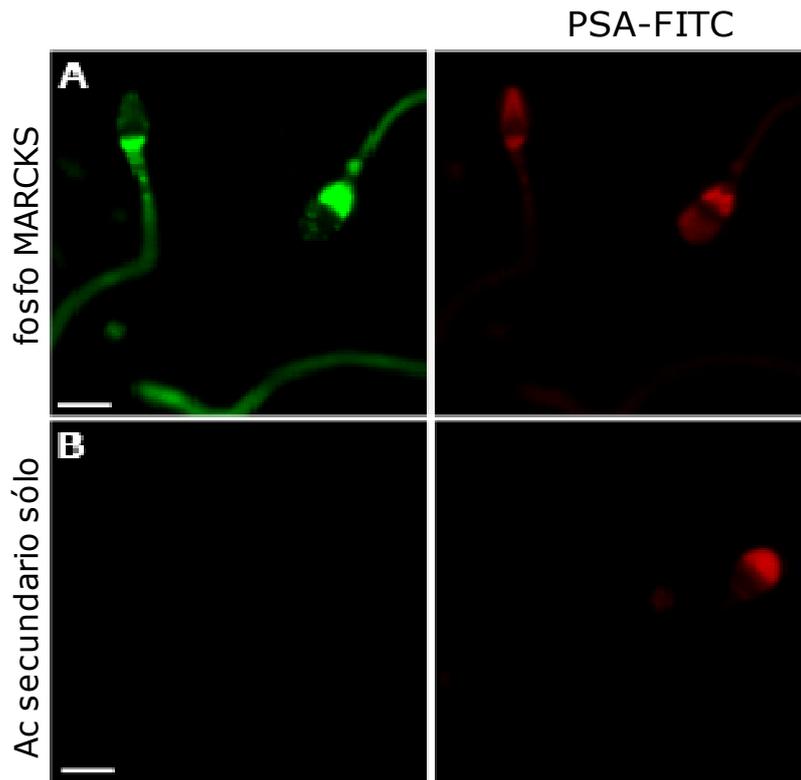


Figura 21: MARCKS localiza en la cola, región post acrosomal y en la región acrosomal en espermatozoides humanos. (A) Espermatozoides humanos fijados y permeabilizados fueron inmunomarcados con el anticuerpo N-66 y su presencia fue revelada mediante el uso de un anticuerpo anti-mouse acoplado al fluoróforo Dylight 488. Los acrosomas fueron teñidos con la lectina *Lens culinaris* acoplada al fluoróforo isotiocianato de tetrametilrodamina (LCA-TRITC). **(B)** Para determinar la especificidad del anticuerpo secundario, los espermatozoides sólo fueron incubados con el anticuerpo anti-mouse acoplado al fluoróforo Dylight 488 (Ac secundario sólo). Barra= 5 μ m.

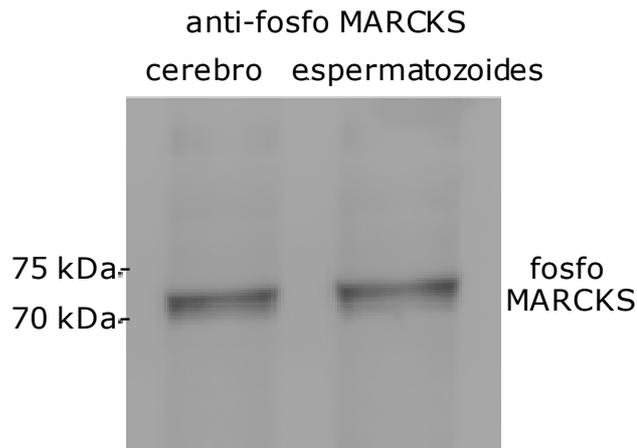


Figura 22: MARCKS se encuentra fosforilada en espermatozoides humanos.

Las proteínas de los espermatozoides no capacitados (5×10^6) fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a membranas de PVDF. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti-fosfo MARKCS que

reconoce los residuos de serina 152/156 fosforilado del dominio efector de MARCKS. Como control positivo se utilizó extracto de cerebro (1 μ g).

MARCKS participa en las vías de señales durante la exocitosis acrosomal

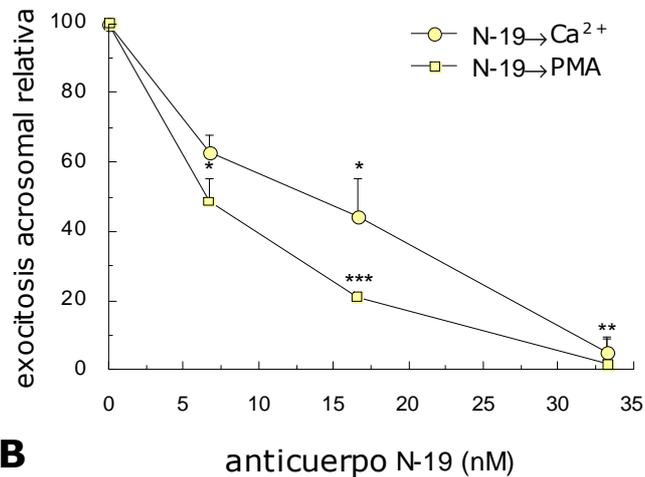
Se ha demostrado que MARCKS participa en varios procesos exocíticos (Rosé S.D., et al 2001; Li Y., et al 2001; Sasaki Y. 2003; Eliyahu E., et al 2006; Gadi D., et al 2011) y esto asociado a la presencia de MARCKS en la región acrosomal, nos llevó a plantearnos la hipótesis de que MARCKS participaría en la vías de señales que conducen a la exocitosis acrosomal.

La ausencia de transcripción y traducción en el espermatozoide restringe las estrategias para el estudio de los mecanismos moleculares que ocurren durante la exocitosis acrosomal. Para superar esta limitante, nuestro grupo de trabajo desarrolló un método de permeabilización controlada de la membrana plasmática con SLO (Diaz A., et al 1996; Yunes R., et al 2000). Esto nos permitió hacer uso de herramientas bioquímicas y de biología molecular, introduciendo en el espermatozoide proteínas exógenas tales como anticuerpos y proteínas recombinantes que, por lo general, son incapaces de penetrar la membrana plasmática. Con esta metodología podemos analizar la función de la molécula endógena en la exocitosis acrosomal.

Para poder estudiar la participación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos, inhibimos la función de la proteína

endógena mediante la incubación con el anticuerpo N-19 en espermatozoides permeabilizados. La incubación de espermatozoides permeabilizados con concentraciones crecientes del anticuerpo N-19 produjo una inhibición de la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA, dos conocidos inductores de la exocitosis acrosomal (Fig. 23A). Cuando la exocitosis acrosomal fue estimulada con Ca^{2+} la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) del anticuerpo N-19 expresada como la media \pm E.S. fue 15 ± 3 nM y cuando se estimuló con PMA la IC_{50} fue 7 ± 2 nM. Para asegurarnos de que el efecto inhibitorio que observamos se debía al secuestro específico de la proteína endógena por el anticuerpo, prebloqueamos el anticuerpo con el péptido contra el cual se sintetizó. Como se observa en la figura 23B el anticuerpo N-19 prebloqueado no inhibió la exocitosis acrosomal disparada por Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que el anticuerpo N-19 se une a MARCKS y bloquea su función durante la exocitosis acrosomal disparada por Ca^{2+} o PMA. Podemos entonces concluir que MARCKS participa en la vía de señales que conducen a la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos permeabilizados.

A



B

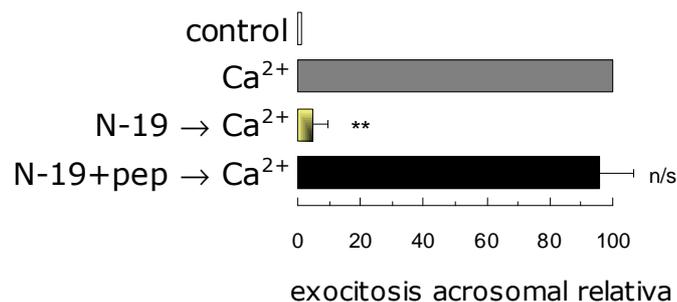


Figura 23: El anticuerpo N-19 inhibe la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} y PMA. (A) Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados por 15 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo N-19. Luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre (círculos) o $200\ \text{nM}$ de PMA (cuadrados). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C y el acrosoma fue evaluado mediante la unión de la lectina *Pisum sativum* aglutinina conjugada con FITC como se describe en Materiales y Métodos. **(B)** Espermatozoides permeabilizados fueron incubados por 15 minutos a 37°C en presencia de $33\ \text{nM}$ del anticuerpo N-19 pretratado con un exceso (1:10) del péptido inmunogénico MARCKS N-19 (N-19+pep). Luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} y los espermatozoides fueron nuevamente incubados por 15 minutos a 37°C (barra negra). Condiciones de control experimental (barras grises) incluyen: espermatozoides no estimulados (control) y espermatozoides estimulados con $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre (Ca^{2+}) (control positivo corresponde al 100 % de la exocitosis acrosomal relativa). En la barra amarilla se observa el efecto del anticuerpo N-19 sin pretratamiento con el péptido bloqueante (N-19). En A y B el porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca^{2+} (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n/s diferencia no significativa).

El dominio efector de MARCKS es considerado el responsable de la mayoría de las funciones de esta proteína (Arbuzova A., et al 2002; Sundaram M., et al 2004). Para determinar si el dominio efector de MARCKS participa en la exocitosis acrosomal se utilizó el anticuerpo anti-ED que reconoce la secuencia próxima al residuo de serina 162 del dominio efector. Espermatozoides permeabilizados fueron incubados con concentraciones crecientes de este anticuerpo y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con Ca^{2+} o con PMA. Como se muestra en la figura 24A el anticuerpo anti-ED inhibió la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA. Cuando la exocitosis acrosomal fue estimulada por Ca^{2+} , la IC_{50} para el anticuerpo anti-ED fue $7 \pm 3\ \text{nM}$ y cuando la exocitosis acrosomal fue estimulada con PMA, el IC_{50} fue $7 \pm 2\ \text{nM}$. Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-ED este anticuerpo se preincubó en presencia del dominio efector de MARCKS recombinante y luego se evaluó su efecto en ensayos de exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA. El anticuerpo anti-ED previamente bloqueado con el dominio efector de MARCKS recombinante fue incapaz de inhibir la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA (Fig. 24B). La

inhibición de la exocitosis acrosomal por el anticuerpo anti-ED sugiere que este anticuerpo se une al dominio efector, bloqueando las interacciones de este dominio con la maquinaria de fusión que se activa durante la exocitosis acrosomal.

Estudios previos han demostrado que la fosforilación de MARCKS inhibe su unión a las membranas y además una vez que la proteína es fosforilada es incapaz de interactuar con CaM y los filamentos de actina (Hartwig J.H., et al 1992; Gallant C., et al 2005). Por esto se ha considerado a la forma fosforilada de MARCKS como la forma inactiva de la proteína (Garrett A.M., et al. 2012). En función de estos datos bibliográficos nos preguntamos si la forma fosforilada de MARCKS tiene alguna función durante la exocitosis acrosomal o si, al igual que en otros modelos celulares, la proteína fosforilada es la forma inactiva de MARCKS. Para responder a esta pregunta se incubaron espermatozoides humanos permeabilizados con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-fosfo MARCKS que reconoce los residuos de serina 152/156 fosforilado del dominio efector de MARCKS. A diferencia de los tratamientos con los anticuerpos N-19 y anti-ED, el tratamiento con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS no tuvo efecto sobre la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA (Fig. 24A). Este resultado es consistente con la idea de que fosfo-MARCKS no interacciona con la maquinaria de fusión durante la exocitosis acrosomal.

De acuerdo a los ensayos realizados con los anticuerpos N-19 y anti-ED en nuestro modelo de espermatozoides permeabilizados, podemos concluir que MARCKS participa durante las vías de señales que conducen a la exocitosis acrosomal y que su participación estaría mediada por el dominio efector. Además debido a que el anticuerpo anti-fosfo MARCKS fue incapaz de inhibir la exocitosis acrosomal, concluimos que fosfo MARCKS es la forma inactiva de la proteína y que no participaría en el proceso exocítico.

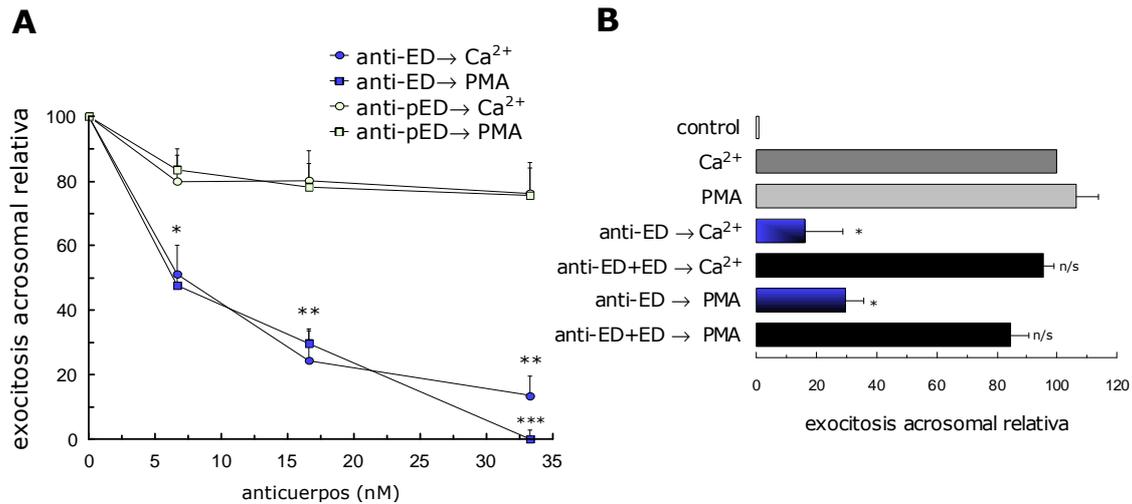


Figura 24: El dominio efector de MARCKS no fosforilado participa en las vías de señales que conduce a la exocitosis acrosomal. (A) Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados por 15 minutos a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-ED (símbolos azules) y anti-pED (símbolos blancos). Luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM de Ca^{2+} libre (círculos) o 200 nM de PMA (cuadrados). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C y el acrosoma fue evaluado mediante la unión de la lectina *Pisum sativum* aglutinina conjugada con FITC como se describe en Materiales y Métodos. **(B)** Espermatozoides permeabilizados fueron incubados por 15 minutos a 37°C en presencia de 33 nM del anticuerpo anti-ED pretratado con un exceso (1:10) del dominio efector de MARCKS recombinante (anti-ED+ED), luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM de Ca^{2+} o 200 nM de PMA y los espermatozoides fueron nuevamente incubados por 15 minutos a 37°C (barras negras). Condiciones de control experimental (barras grises) incluyen: espermatozoides no estimulados (control) y espermatozoides estimulados con 10 μM de Ca^{2+} libre (Ca^{2+}) o 200 nM de PMA (PMA). En las barras azules se observa el efecto del anticuerpo anti-ED sin pretratamiento con el dominio efector de MARCKS recombinante (anti-ED). En A y B el porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca^{2+} (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$); n/s diferencia no significativa.

El dominio efector de MARCKS inhibe la vía de señal que conduce a la exocitosis acrosomal

Se conoce que la mayoría de las interacciones de MARCKS son mediadas por el dominio efector (Arbuzova A., et al 2002; Sundaram M., et al 2004). Varios estudios han demostrado que este dominio es capaz de interactuar con PIP₂ y CaM, dos importantes moléculas involucradas en varias vías de señalización intracelular (Hartwig J.H., et al 1992; Gallant C., et al 2005). Estudios recientes determinaron que la función de MARCKS durante los procesos exocíticos estaría asociada principalmente con el dominio efector (Rosé S.D., et al 2001; Eliyahu E., et al 2006; Gadi D., et al 2011). Además, previamente demostramos que el anticuerpo que reconoce el dominio efector de MARCKS (anti-ED), inhibe la exocitosis acrosomal estimulada por Ca²⁺ o PMA, sugiriendo que este dominio estaría involucrado en las vías de señales durante la exocitosis acrosomal.

Para determinar el efecto del dominio efector de MARCKS durante la exocitosis acrosomal, este dominio fue expresado en bacterias y purificado como proteína de fusión con GST a partir del plásmido pGEX3X-ED-MARCKS (96-184) (Fig. 25A y 27A). Este dominio recombinante contiene la secuencia aminoacídica entre los aminoácidos 96 y 184 de MARCKS, secuencia que abarca el dominio efector de MARCKS (Soh J.W., et al 1999). Una vez que se obtuvo el dominio efector de MARCKS, éste fue utilizado en ensayos de exocitosis acrosomal, en donde espermatozoides permeabilizados fueron incubados con concentraciones crecientes del dominio efector de MARCKS recombinante y se estimuló la exocitosis acrosomal con Ca²⁺ o PMA. Como se muestra en la figura 25B, la exocitosis acrosomal estimulada por Ca²⁺ o PMA fue inhibida por esta proteína recombinante de manera dosis dependiente, (Fig. 25B IC₅₀, 0,55 ± 0,05 µM). La inhibición de la exocitosis acrosomal por el dominio efector de MARCKS podría deberse a que este dominio interactúa y/o bloquea componentes de la maquinaria de fusión necesarios para el proceso de exocitosis acrosomal.

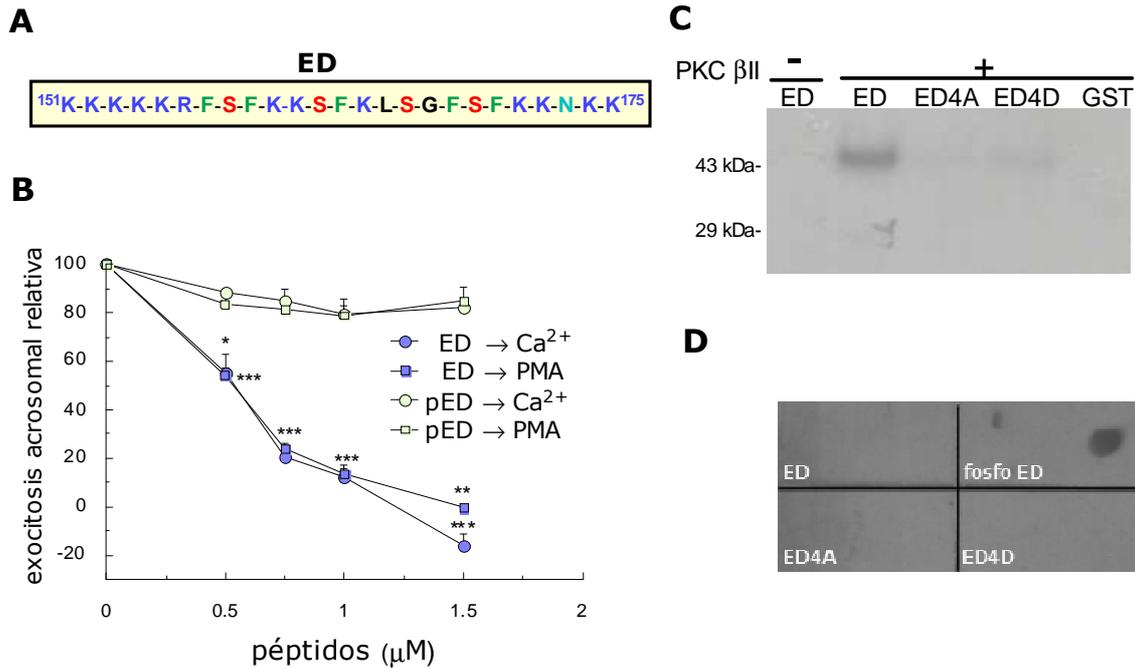


Figura 25: El dominio efector de MARCKS inhibe la vía de señal que conduce a la exocitosis acrosomal. **(A)** Esquema de la secuencia aminoacídica (residuos 151-175) del dominio efector de MARCKS de ratón. En rojo se muestran los cuatro residuos de serina fosforilables. **(B)** Espermatozoides permeabilizados fueron incubados con concentraciones crecientes del dominio efector de MARCKS recombinante (ED, símbolos azules) y con el dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro* (pED, símbolos blancos), luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM de Ca^{2+} libre (círculos) o 200 nM de PMA (cuadrados). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C y el acrosoma fue evaluado mediante la unión de la lectina *Pisum sativum* aglutinina conjugada con FITC como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca^{2+} (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$). **(C)** El dominio efector de MARCKS fusionado a GST (ED), los dominios mutantes del dominio efector recombinante (ED4A y ED4D) y GST (26 kDa) fueron incubados con ATP marcado con $[\gamma^{32}\text{P}]$ en condiciones fosforilantes, como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de la enzima PKC βII (+) o sin ella (-) por 40 minutos a 37°C. A continuación las muestras fueron resueltas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y las proteínas radiomarcadas fueron detectadas por autoradiografía. **(D)** Ensayo de Dot Blot en el cual los dominios ED, ED fosforilado (fosfo ED), ED4A y ED4D fueron inmovilizados en membrana de nitrocelulosa, la que fue incubada con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS.

La fosforilación del dominio efector de MARCKS bloquea su efecto durante la exocitosis acrosomal

El dominio efector de MARCKS presenta varios residuos de serina que pueden ser fosforilados por diferentes quinasas (Sasaki Y. 2003). Previamente se mencionó que la forma fosforilada de MARCKS es considerada la forma inactiva de la proteína, ya que un vez fosforilada la proteína es incapaz de interactuar con proteínas y lípidos involucrados en importantes vías de transducción de señales (Hartwig J.H., et al 1992; Garrett A.M., et al. 2012). Resultados previos mostraron que el tratamiento de espermatozoides humanos permeabilizados con anticuerpo anti-fosfo MARCKS no fue capaz de inhibir la exocitosis acrosomal, mientras que el anticuerpo anti-ED inhibió este proceso exocítico. Estos resultados sugieren que la forma fosforilada de MARCKS no interaccionaría con la maquinaria de fusión durante la exocitosis acrosomal. Para corroborar estos resultados el dominio efector de MARCKS recombinante fue fosforilado *in vitro*. Para ello el dominio efector de MARCKS fue incubado en condiciones fosforilantes en presencia de PKC β II y ATP marcado con [γ^{32} P]. Luego la muestra fue resuelta en un gel de SDS-PAGE y las proteínas marcadas con 32 P fueron visualizados por autorradiografía. Como se muestra en la figura 25C la marca con γ^{32} P confirmó que el dominio efector de MARCKS recombinante (\sim 45 kDa) es fosforilado en presencia de PKC β II. Cabe mencionar que si bien el peso molecular para el dominio efector recombinante es 34,9 kDa (8,9 kDa dominio efector + 26 kDa GST) esta proteína recombinante migra en un rango aproximado entre 45 y 50 kDa (Soh J.W., et al 1999). Además dado que el dominio efector de MARCKS es expresado y purificado como proteína de fusión con GST, esta proteína también fue sometida a condiciones fosforilantes con ATP marcado [γ^{32} P]. Como se observa en la figura 25C GST no incorporó la marca con γ^{32} P, demostrando que sólo el dominio efector es capaz de ser fosforilado por PKC.

Otro método que utilizamos para evaluar el estado de fosforilación de MARCKS fue mediante ensayos de Dot blot. Para ello la forma fosforilada del dominio efector de MARCKS y la forma no fosforilada, fueron incubados en una membrana de nitrocelulosa y luego esta membrana fue tratada con el

anticuerpo anti-fosfo MARCKS. Como se muestra en el panel superior de la figura 25D el anticuerpo anti-fosfo MARCKS sólo reconoció el dominio efector de MARCKS fosforilado (fosfo ED), pero no fue capaz de reconocer el dominio efector de MARCKS no fosforilado (ED). Este resultado también confirma la especificidad del anticuerpo anti-fosfo MARCKS en reconocer sólo la forma fosforilada de la proteína.

Una vez que se comprobó que este dominio es fosforilado *in vitro* se utilizó en ensayos de exocitosis acrosomal. Como se observa en la figura 25B, la fosforilación *in vitro* del dominio efector de MARCKS eliminó completamente el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en la exocitosis acrosomal. Este resultado demuestra que las interacciones del dominio efector de MARCKS con la maquinaria de fusión son reguladas por su estado de fosforilación ya que la forma fosforilada de MARCKS fue incapaz de inhibir la exocitosis acrosomal, mientras que la forma no fosforilada inhibió este proceso exocítico.

Para corroborar estos resultados diseñamos dos mutantes del dominio efector de MARCKS. Un dominio mutante no fosforilable (ED4A) donde los cuatro residuos de serina de la posición 152, 156, 160 y 163 fueron mutados por alanina, y un segundo dominio mutante denominado fosfomimético (ED4D) donde los mismos residuos fueron mutados por aspártico, que imitan las cargas negativas introducidas por los grupos fosfatos (Fig. 26A). Los plásmidos mutantes pGEX3X ED4A y ED4D fueron secuenciados confirmando que ambos plásmidos fueron mutados. Al igual que el dominio efector de MARCKS, los dominios mutantes fueron expresados y purificados en bacterias como proteínas de fusión a GST (Fig. 27A). Cuando estos dominios fueron utilizados en ensayos de exocitosis acrosomal sólo la mutante no fosforilable ED4A fue capaz de inhibir la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA (Fig. 26B; IC_{50} , $0,5 \pm 0,07 \mu\text{M}$), mientras que la mutante fosfomimética no mostró efecto inhibitorio sobre la exocitosis acrosomal aún en concentraciones de $2 \mu\text{M}$ (Fig. 26B). Estos resultados confirman que el estado de fosforilación de MARCKS regula la participación de esta proteína en la exocitosis acrosomal y que la fosforilación de los residuos de serina 152, 156, 160 y 163 son los responsables de la pérdida de actividad del dominio efector de MARCKS.

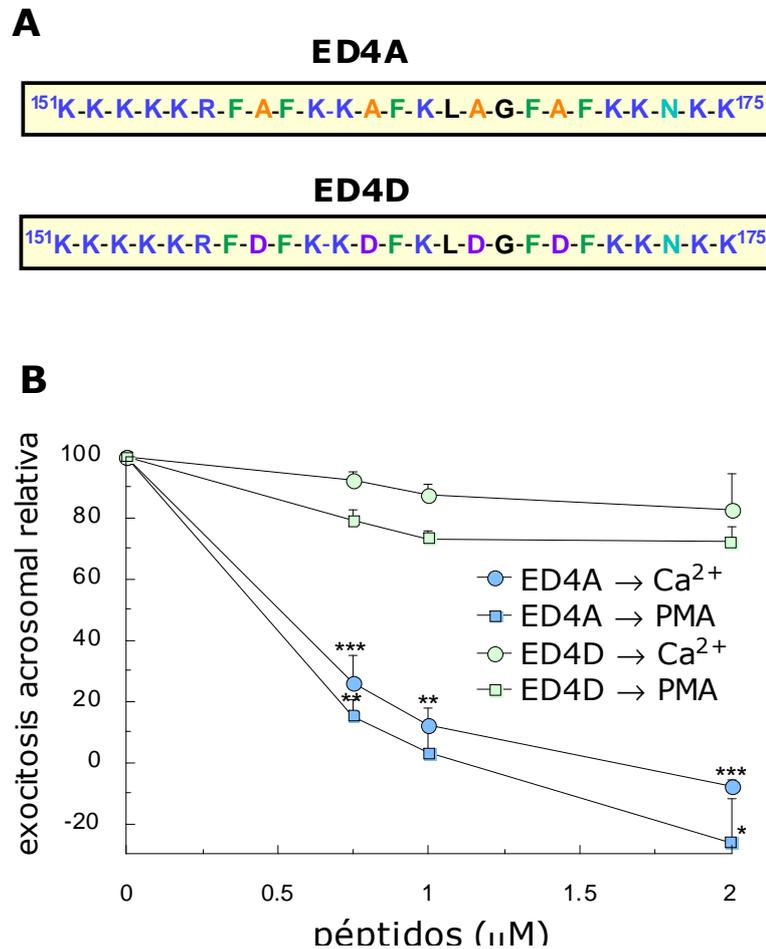


Figura 26: El estado de fosforilación del dominio efector de MARCKS regula su participación en la exocitosis acrosomal. (A) Esquema de las mutantes del dominio efector MARCKS. En la mutante ED4A las serinas fueron reemplazadas por alaninas (A en naranja) mientras que en la mutante ED4D, las serinas fueron reemplazadas por ácido aspártico (D en violeta). **(B)** Espermatozoides permeabilizados fueron incubados durante 15 minutos a 37°C con concentraciones crecientes de los dominio mutante no fosforilable (ED4A, símbolos celestes) y fosfomimético (ED4D, símbolos verdes), luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM de Ca²⁺ libre (círculos) o 200 nM de PMA (cuadrados). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C y el acrosoma fue evaluado mediante la unión de la lectina *Pisum sativum* aglutinina conjugada con FITC como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media ± E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca²⁺ (***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05).

Los dominios mutantes ED4A y ED4D también fueron incubados en condiciones fosforilantes, sin embargo ninguno de estos dominios incorporó $\gamma^{32}\text{P}$, indicando que dominios ED4A y ED4D no son fosforilados por PKC βII (Fig. 25C). Este resultado fue corroborado mediante ensayos de Dot blot utilizando el anticuerpo anti-fosfo MARCKS. Como se observa en la figura 25D ninguno de los dominios mutantes fue reconocido por el anticuerpo anti-fosfo MARCKS.

La falta de efecto del dominio efector fosforilado y de la mutante fosfomimética en los ensayos de exocitosis acrosomal podría deberse en parte a que las cargas negativas impidieran a estos dominios atravesar la membrana plasmática de los espermatozoides por los poros generados por la SLO. Para descartar esta posibilidad, espermatozoides permeabilizados fueron incubados con los diferentes dominios recombinantes y luego se determinó el ingreso de los diferentes dominios por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo que reconoce GST en los diferentes dominios recombinantes (Fig. 27A). Como se muestra en la figura 27B, los espermatozoides permeabilizados incubados con los diferentes dominios recombinantes presentan marca intracelular, y la intensidad de la marca es similar entre los diferentes dominios (Fig. 27C). Por lo tanto, la falta de efecto del dominio efector de MARCKS fosforilado y del dominio mutante ED4D no se debe a un defecto en el ingreso de estos dominios a la célula permeabilizada.

Con estos resultados podemos concluir que sólo la forma no fosforilada del dominio efector de MARCKS (ED y ED4A) inhibe el proceso de exocitosis acrosomal. Esto podría deberse a su capacidad de interactuar con la maquinaria de fusión involucrada durante las vías de señales que producen la secreción del gránulo acrosomal. Además podemos concluir que el estado de fosforilación de MARCKS regula su participación durante la exocitosis acrosomal ya que ni el dominio efector fosforilado ni la mutante fosfomimética fueron capaces de inhibir la exocitosis acrosomal.

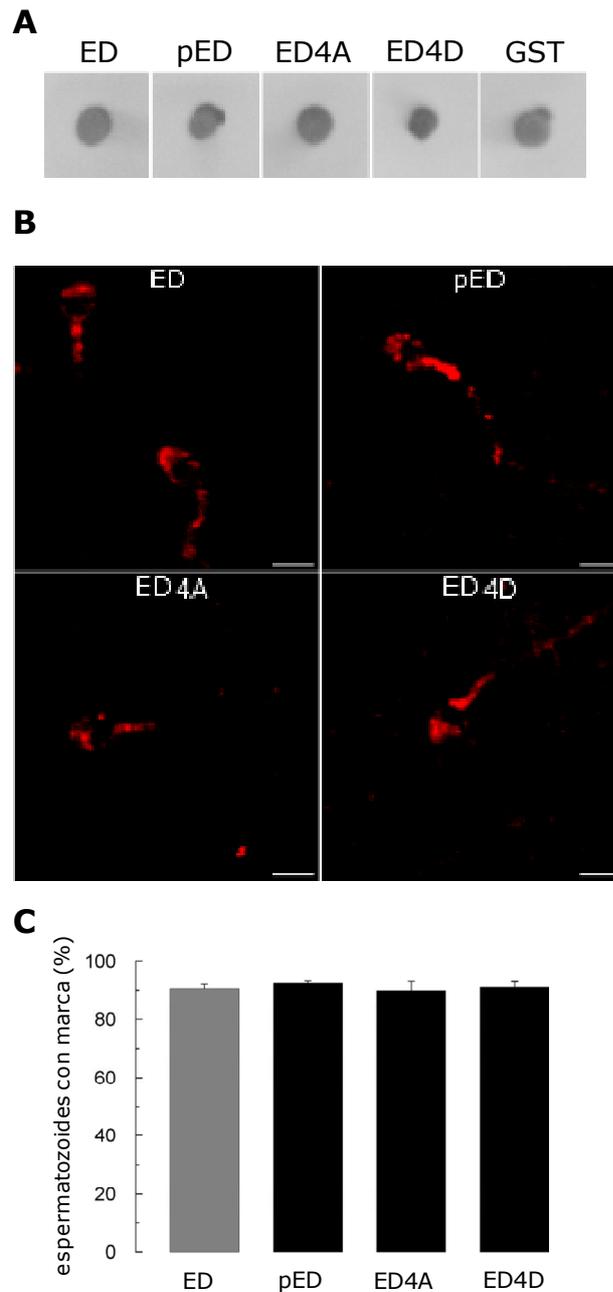


Figura 27: Los dominios recombinantes de MARCKS difunden al interior de los espermatozoides permeabilizados en igual cantidad. (A) Ensayo de Dot blot en donde el dominio efector de MARCKS (ED), el dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro* (pED), la mutante no fosforilable (ED4A), la mutante fosfomimética (ED4D) y glutation s-transferasa (GST) fueron inmobilizadas en membranas de PVDF y a continuación fueron incubadas con un anticuerpo que reconoce GST. **(B)** Espermatozoides humanos, capacitados y permeabilizados fueron incubados por 30 minutos a 37°C con 1 μ M de los dominios ED, pED, ED4A y ED4D. A continuación los espermatozoides fueron lavados, fijados e inmunomarcados con el anticuerpo anti-GST y su presencia fue revelada mediante el uso de un anticuerpo anti-rabbit acoplado al fluoróforo Cy3. **(C)** Cuantificación de tres experimentos independientes que se muestran en B. Las barras representan la media \pm E.S. Barra= 5 μ m.

El efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS es revertido por PIP₂ y por adenofostina

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que MARCKS es necesaria para la exocitosis del acrosoma y que el dominio efector de MARCKS no fosforilado inhibe la exocitosis acrosomal. Esto nos llevó a preguntarnos ¿Cuál es el mecanismo por el cual el dominio efector de MARCKS no fosforilado inhibe la exocitosis acrosomal?

Se conoce que el dominio efector de MARCKS se une a las membranas celulares por medio de interacciones electrostáticas, principalmente con PIP₂. Por esto varios autores sugieren que MARCKS actúa como una *pipmodulina* regulando las concentraciones locales de PIP₂ en la membrana (Glaser M., et al 1996; Laux T., et al 2000; McLaughlin S. and Murray D. 2005).

A pesar de que PIP₂ constituye aproximadamente sólo el 1 % de los lípidos presentes en la membrana plasmática tiene un papel importante en diferentes vías de señalización ya que es precursor de varios segundos mensajeros, además este fosfolípido es capaz de regular la función de proteínas citosólicas y de membrana (van den Bogaart G., et al 2011). Se conoce que PIP₂ tiene un papel fundamental en varias etapas durante los procesos exocíticos (Hay J. C., et al 1995; Milosevic I., et al 2005; Wen P.J., et al 2011; Koch M. and Holt M. 2012) y con respecto a la exocitosis acrosomal, López y colaboradores han propuesto que PIP₂ se produce continuamente durante este proceso exocítico (Lopez C.I., et al 2012).

De acuerdo con estos antecedentes, nosotros hipotetizamos que MARCKS actúa como una *pipmodulina* y que el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos se debe al secuestro de PIP₂ en las membranas de los espermatozoides, por lo que el efecto inhibitorio de MARCKS podría ser revertido agregando a nuestro ensayo PIP₂.

Para ello, espermatozoides permeabilizados fueron incubados con una dosis inhibitoria del dominio efector de MARCKS (1 µM), luego se les adicionó 50 µM de PIP₂ y se estimuló la exocitosis acrosomal. De acuerdo a lo predicho, la adición de PIP₂ revirtió el efecto inhibitorio del dominio

efector de MARCKS durante la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA (Fig. 28A y B). Este resultado sugiere que el dominio efector de MARCKS secuestra PIP_2 en las membranas de los espermatozoides durante la exocitosis acrosomal.

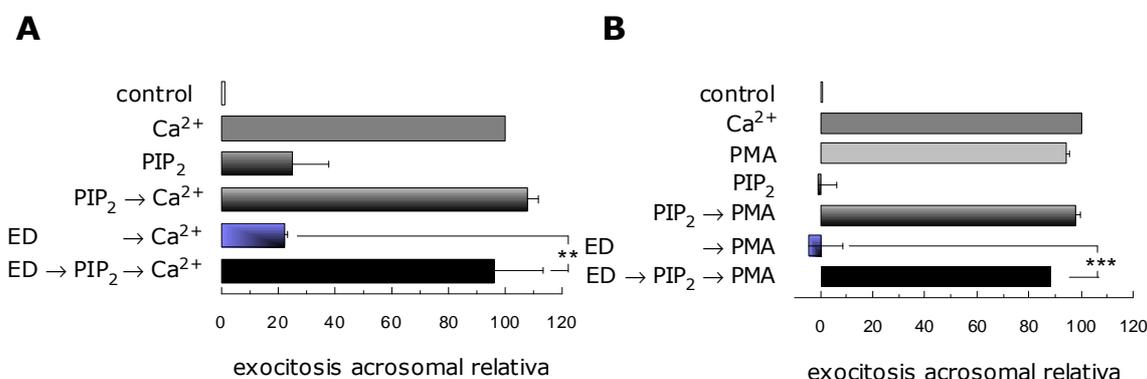


Figura 28: PIP_2 revierte el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en la exocitosis acrosomal. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados por 15 minutos a 37°C con $1\ \mu\text{M}$ del dominio efector de MARCKS (ED), posteriormente los espermatozoides se incubaron con $50\ \text{mM}$ de PIP_2 durante 15 minutos a 37°C y se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre (A) o $200\ \text{nM}$ de PMA (B). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C (barras negras). Condiciones de control experimental (barras grises) incluyen: espermatozoides no estimulados (control) y espermatozoides estimulados con $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre (Ca^{2+}) o $200\ \text{nM}$ de PMA (PMA), la ausencia de efecto de PIP_2 con y sin estimular la exocitosis acrosomal. En las barras azules se observa el efecto del dominio efector de MARCKS (ED) durante la exocitosis acrosomal estimulada con Ca^{2+} o PMA. En A y B el porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca^{2+} o PMA sin PIP_2 (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, para que se lleve a cabo la fusión de las membranas durante la exocitosis acrosomal, se requiere un eflujo de Ca^{2+} desde el acrosoma (De Blas G., et al 2002). Este movimiento de Ca^{2+} se debe a un aumento en los niveles de IP_3 , el cual activa canales de Ca^{2+} presentes en el acrosoma (Branham M.T. et al 2009). En este contexto cabe plantearse que el secuestro de PIP_2 por el dominio efector de MARCKS podría inhibir la exocitosis acrosomal debido a un bloqueo en la producción de IP_3 , lo cual llevaría a una inhibición de la salida del Ca^{2+} desde el acrosoma. Para testear esta hipótesis, mimetizamos los efectos de IP_3 promoviendo la liberación de Ca^{2+} intracrosomal utilizando adenofostina (un agonista de canales de Ca^{2+} sensibles a IP_3) en

espermatozoides tratados con el dominio efector de MARCKS no fosforilado. Como se muestra en la figura 29A y B, la adición de adenofostina fue capaz de revertir el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en la exocitosis acrosomal estimulada por Ca^{2+} o PMA.

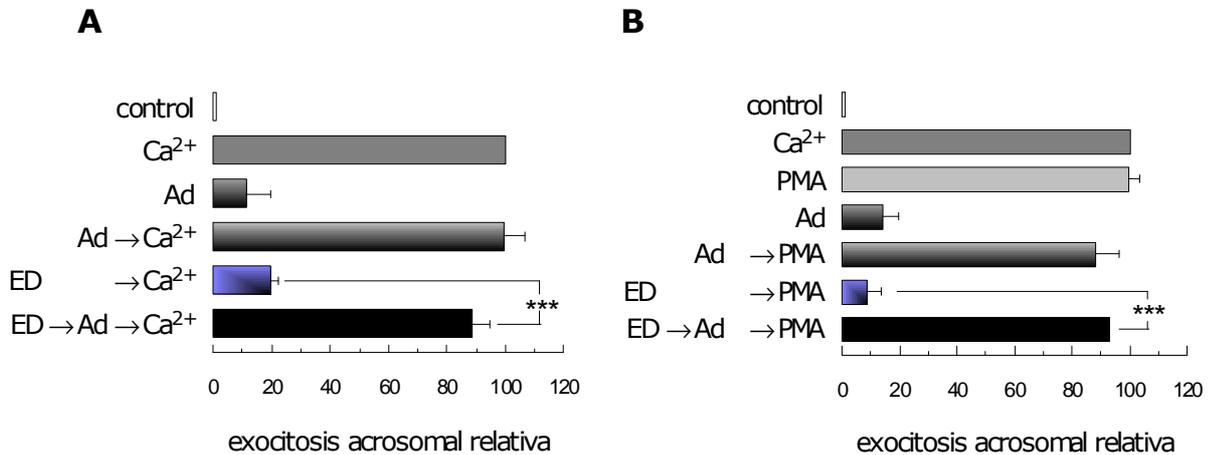


Figura 29: Adenofostina revierte el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en la exocitosis acrosomal. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados por 15 minutos a 37°C con 1 μM del dominio efector de MARCKS (ED), posteriormente los espermatozoides se incubaron con 5 μM de adenofostina (Ad) durante 15 minutos a 37°C y se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM de Ca^{2+} libre (**A**) o 200 nM de PMA (**B**). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C (barras negras). Condiciones de control experimental (barras grises) incluyen: espermatozoides no estimulados (control) y espermatozoides estimulados con 10 μM de Ca^{2+} libre (Ca^{2+}) o 200 nM de PMA (PMA), la ausencia de efecto de adenofostina con y sin estimular la exocitosis acrosomal. En las barras azules se observa el efecto del dominio efector de MARCKS (ED) durante la exocitosis acrosomal estimulada con Ca^{2+} o PMA. En A y B el porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con Ca^{2+} o PMA sin adenofostina (***, $p < 0,001$).

Estos resultados muestran que PIP_2 y adenofostina son capaces de revertir el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos, sugiriendo que el dominio efector de MARCKS secuestra PIP_2 en las membranas de los espermatozoides, lo que impediría la producción de IP_3 y el consecuente eflujo de Ca^{2+} desde el acrosoma.

CONCLUSIÓN DEL OBJETIVO UNO

Durante esta etapa de trabajo se demostró mediante Western blot y haciendo uso de diferentes anticuerpos que MARCKS está presente en espermatozoides humanos. Además se determinó por medio de inmunofluorescencia indirecta que MARCKS localiza en la cola, región post-acrosomal y región acrosomal en espermatozoides humanos. Haciendo uso de un modelo de espermatozoides humanos permeabilizados, logramos bloquear la proteína endógena utilizando anticuerpos que reconocen específicamente la región N-terminal y el dominio efector de MARCKS, lo cual se vio reflejado en una inhibición de la exocitosis acrosomal. Además el bloqueo de la forma fosforilada de la proteína por el anticuerpo anti-fosfo MARCKS no fue capaz de inhibir la exocitosis acrosomal.

Por otro lado, determinamos que el dominio efector de MARCKS es capaz de interactuar con la maquinaria de fusión de membranas y que estas interacciones son reguladas por el estado de fosforilación de la proteína, como se determinó en los ensayos de exocitosis acrosomal en espermatozoides tratados con el dominio efector fosforilado *in vitro* y la mutante ED4D. Asimismo podemos concluir que la forma fosforilada de MARCKS, al igual que en otros modelos celulares sería la forma inactiva de la proteína y no interactuaría con la maquinaria de fusión que se activa durante la exocitosis acrosomal.

El hecho de que PIP₂ rescatara el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS sobre la exocitosis acrosomal nos lleva a postular que MARCKS podría actuar como una *pipmodulina* durante la exocitosis acrosomal, es decir que MARCKS regularía los niveles disponibles de PIP₂ en la membrana de los espermatozoides humanos. De acuerdo con esta hipótesis, adenofostina también fue capaz de rescatar la exocitosis acrosomal de espermatozoides en presencia del dominio efector de MARCKS. Esto nos lleva a proponer que el dominio efector de MARCKS secuestra PIP₂, inhibiendo la formación de IP₃, requerido para la salida de Ca²⁺ acrosomal siendo un paso esencial durante la exocitosis acrosomal. De esta manera MARCKS sería capaz de regular las movilizaciones de Ca²⁺ intracelular requeridos para la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos.

OBJETIVO ESPECÍFICO DOS:

Estudiar si MARCKS regula los movimientos de Ca^{2+} que ocurren durante la exocitosis acrosomal y si su estado de fosforilación varía durante la exocitosis acrosomal y la capacitación en espermatozoides humanos intactos.

Los resultados mostrados hasta el momento fueron obtenidos en un modelo de espermatozoides permeabilizados. Si bien este modelo nos ha permitido entender el mecanismo molecular por el cual el dominio efector de MARCKS inhibe la exocitosis acrosomal, presenta varias desventajas, como pérdida de la motilidad, pérdida de los gradientes de membranas y la incapacidad de estas células a responder a agonistas naturales como progesterona. Este objetivo propone utilizar espermatozoides intactos para obtener un panorama más fisiológico de la participación de MARCKS en los movimientos de Ca^{2+} durante la exocitosis acrosomal y en la capacitación.

El péptido que posee la secuencia aminoacídica 154-165 del dominio efector de MARCKS es permeable a membrana

Una desventaja que presenta el modelo de espermatozoides humanos es la de ser una célula transcripcionalmente inactiva (Ward W. S. and Coffey D. S. 1991). Esta característica no permite que se puedan utilizar herramientas tales como transfección y/o RNA de interferencia para el estudio de la función de las proteínas.

Para abordar el estudio de la función de MARCKS en espermatozoides humanos intactos se utilizó el péptido KRFSFKKSFKL, el cual corresponde a la secuencia aminoacídica 154-165 del dominio efector de MARCKS ($\text{ED}_{154-165}$ -TMR). Este péptido mantiene dos de los cuatro residuos de serina del dominio efector de MARCKS y además se encuentra acoplado al fluoróforo tetrametilrodamina (TMR) (Fig. 29A). Este péptido es extremadamente básico y se ha demostrado que péptidos con un alto número de cargas positivas tienen la propiedad de translocarse a través de las membranas (Futaki S., et al 2001; Futaki S. 2005; López C.I. et al, 2007; Futaki S., et

al 2007; Garnier-Lhomme M., et al 2009). Esta particularidad nos permitió estudiar la función de MARCKS durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos, sin tener que recurrir a procedimientos como la permeabilización.

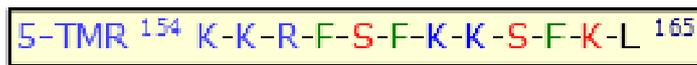
Lo primero que determinamos fue si el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR era capaz de atravesar la membrana plasmática de espermatozoides humanos intactos. Para ello, espermatozoides humanos intactos fueron incubados con 4 µM del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR durante una hora a 37°C, luego las células fueron lavadas para eliminar el exceso del péptido y fijadas para ser observadas por microscopía confocal. En la figura 30B y C se observa que el 94 % de las células incubadas con el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR presentan marca roja y que la misma se localiza principalmente en la cabeza de los espermatozoides. Este resultado muestra que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR podría ser permeable a la membrana de los espermatozoides.

Dado el pequeño tamaño del espermatozoide, no fue posible diferenciar por microscopía confocal si el péptido realmente ingresó a las células o si se encuentra unido externamente a la membrana plasmática. Además hay reportes que indican que el ingreso de péptidos cargados positivamente a través de la membrana se debe a un artificio técnico, ya que la fijación podría ingresar las proteínas que están unidas externamente a la membrana plasmática (Richard, J. P., et al 2003).

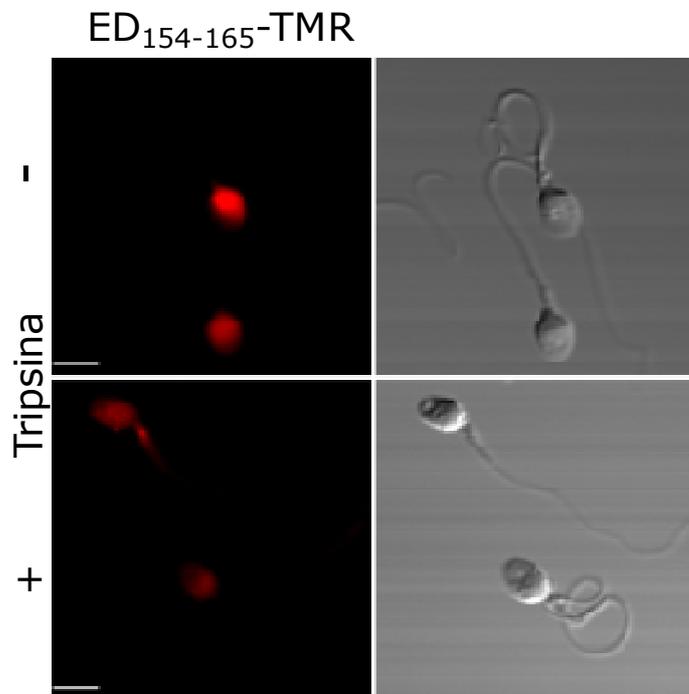
Para corroborar que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR es capaz de ingresar en los espermatozoides humanos intactos y que esto no se debe a la unión del péptido a la cara externa de la membrana plasmática o por un artificio de la fijación, realizamos ensayos de digestión con tripsina, enzima capaz de digerir péptidos que presentan residuos aminoácidos cargados positivamente en sus extremos. Luego de incubar los espermatozoides con el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR, las células fueron tratadas con 0,5 mg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C y la reacción se frenó con 1mg/ml de inhibidor de tripsina. De esta manera, los péptidos que se encontraran por fuera de las células serían degradados y los que ingresan estarían protegidos por la membrana plasmática. Luego de este tratamiento las células fueron lavadas, fijadas y evaluadas por microscopía confocal. En la figura 30B y C se puede observar que a pesar del tratamiento con tripsina los espermatozoides conservan la marca fluorescente del péptido en el 77

% de las células, indicando que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR es permeable a la membrana plasmática de espermatozoides intactos y que la marca observada no se debe a un artificio de la fijación, ni a la presencia de péptidos unidos externamente a la membrana plasmática. Estos resultados confirman que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR es permeable a membrana, lo que nos permitió estudiar la función de MARCKS en espermatozoides intactos.

A



B



C

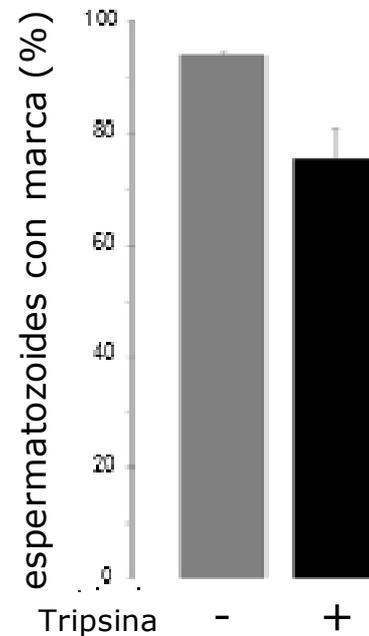


Figura 30: El péptido que posee la secuencia aminoacídica 154-165 del dominio efector de MARCKS es permeable a membrana. (A) Secuencia aminoacídica del péptido permeable (residuos 154-165) acoplado al fluoróforo tetrametilrodamina (TMR) (ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR). **(B)** Espermatozoides intactos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con 4 μ M del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR y posteriormente fueron tratados con (+) o sin (-) tripsina por 30 minutos a 37°C. Luego las células fueron fijadas y montadas como se describe en Materiales y Métodos. **(C)** Cuantificación de espermatozoides marcados con TMR. Como mínimo se evaluaron 300 células. Las barras representan la media \pm E.S. de cuatro ensayos independientes. DIC, las células fueron observadas con contraste por interferencia diferencial. Barra= 5 μ m.

El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos intactos

Una vez que se corroboró que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR es permeable a membranas, evaluamos el efecto biológico de este péptido en la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos intactos. Para ello, espermatozoides humanos intactos fueron incubados con concentraciones crecientes del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con inductores farmacológicos PMA o con el ionóforo de Ca²⁺ A23187. Al igual que el dominio efector de MARCKS recombinante en espermatozoides permeabilizados, el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR inhibió la exocitosis de manera dosis dependiente en espermatozoides humanos intactos (Fig. 31A). Cuando la exocitosis acrosomal fue estimulada con PMA, el IC₅₀ para el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR fue $1 \pm 0,11 \mu\text{M}$ mientras que cuando se estimuló con A23187 el IC₅₀ para el péptido fue $1,77 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (Fig. 31A).

A diferencia del modelo de espermatozoides permeabilizados, los espermatozoides intactos son capaces de responder a agonistas naturales como progesterona, lo que nos permite evaluar el efecto de MARCKS durante la exocitosis acrosomal en condiciones más cercanas a las fisiológicas. Para ello, espermatozoides humanos intactos fueron incubados con concentraciones crecientes del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con progesterona. Como se observa en la figura 31B, el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR también inhibió la exocitosis acrosomal estimulada con progesterona (IC₅₀: $1,35 \pm 0,04 \mu\text{M}$) de manera dosis dependiente, tal como se observó con PMA y A23187.

Estos resultados muestran que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR es permeable a membrana y se transloca eficientemente al interior del espermatozoide. Además mediante ensayos de exocitosis acrosomal en espermatozoides intactos determinamos que el péptido que posee la secuencia 154-165 correspondiente al dominio efector de MARCKS es capaz de inhibir la exocitosis acrosomal estimulada por inductores farmacológicos (PMA y A23187), o por progesterona un agonista fisiológico de la exocitosis

acrosomal. Los resultados obtenidos con el péptido permeable en espermatozoides humanos intactos son similares a los obtenidos con el dominio efector de MARCKS recombinante y el dominio mutante ED4A en espermatozoides permeabilizados (comparar Fig. 25B, 26B y 31B).

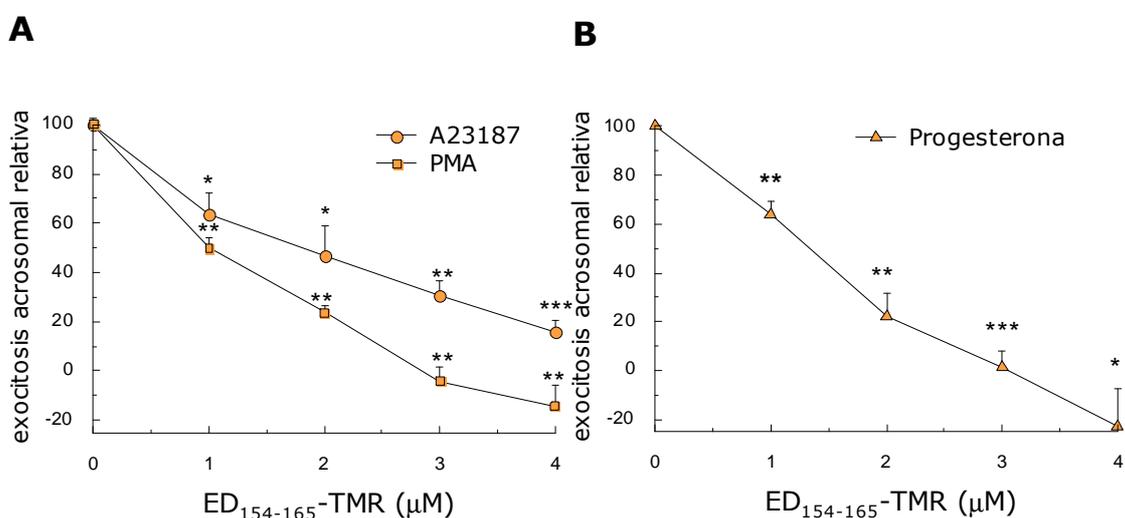


Figura 31: El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos intactos. (A) Espermatozoides humanos no permeabilizados fueron incubados por 30 minutos a 37°C en presencia del péptido permeable acoplado al fluoróforo tetrametilrodamina (TMR) (ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR). Luego se estimuló la exocitosis acrosomal por la adición de 10 μM del ionóforo de Ca²⁺ A23187 (círculos) o 200 nM de PMA (cuadrados). Ambas condiciones fueron incubadas por 15 minutos a 37°C y el acrosoma fue evaluado mediante la unión de la lectina *Pisum sativum* aglutinina conjugada con FITC como se describe en Materiales y Métodos. **(B)** Igual que en A excepto que se estimula la exocitosis acrosomal con 15 mM de progesterona. En A y B el porcentaje de los espermatozoides reaccionados fue normalizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la media ± E.S. de al menos tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con A23187 (***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05).

El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe los movimientos de Ca²⁺ durante la exocitosis acrosomal

Las señales de Ca²⁺ en el espermatozoide tienen un rol fundamental ya que regulan importantes fenómenos como la capacitación, la motilidad hiperactivada y la exocitosis acrosomal. Como se ha mencionado previamente la exocitosis acrosomal es una exocitosis regulada dependiente de Ca²⁺, por lo que esta vía de señalización ha sido ampliamente estudiada durante este proceso secretorio. En espermatozoides humanos tanto ZP como progesterona producen un aumento bifásico en la concentración de

Ca²⁺ citoplasmático (Kirkman-Brown J. C., et al 2000; Kirkman-Brown J. C., 2002; Harper C. V., et al 2006). En una primera fase se observa un incremento transiente de Ca²⁺ que ocurre en escala de segundos y luego es seguido por un segundo aumento de Ca²⁺ más lento y sostenido que dura varios minutos (Fig. 12).

A pesar de que durante mucho tiempo se creía que los canales de Ca²⁺ activados por bajo voltaje de tipo T eran los responsables del aumento de Ca²⁺ transitorio, recientemente se ha demostrado que estos canales no están presentes en espermatozoides de ratón, por lo que se postula que los canales CatSper serían los responsables del incremento transiente de Ca²⁺ inducido por ZP3 y progesterona (Xia J. and Ren D. 2009).

Por otro lado el ingreso de Ca²⁺ sostenido es mediado por la apertura de canales de Ca²⁺ operados por reservorios intracelulares (store operated Ca²⁺ channels: SOCCs) (Jungnickel M. K., et al 2001; O'Toole C.M., et al 2003;). Durante esta fase PIP₂ tiene un papel primordial ya que a partir de este fosfolípido y mediante la acción de la enzima PLC δ 4 se produce IP₃. El incremento en la concentración de IP₃ activaría los canales de Ca²⁺ dependientes de IP₃ presentes en el acrosoma en espermatozoides de ratón y humanos (Walensky L.D. and Snyder S.H. 1995; Kuroda Y. et al. 1999) produciendo la liberación del Ca²⁺ acrosomal. El eflujo de Ca²⁺ a partir del acrosoma sería el responsable de la apertura de los canales SOCCs presentes en la membrana plasmática, generando un ingreso masivo de Ca²⁺ desde el medio extracelular y desencadenando la exocitosis acrosomal (Ikawa K. et al 2010).

Mediante el uso del modelo de espermatozoides humanos permeabilizados nuestro grupo de trabajo ha demostrado que para que se produzca la fusión de las membranas, hace falta una segunda salida de Ca²⁺ desde el acrosoma posterior a la apertura de los SOCCs (De Blas G., et al 2002) (Fig. 13). Por lo que podemos concluir que el eflujo de Ca²⁺ a partir de los canales de Ca²⁺ dependiente de IP₃ se requiere en dos fases de la exocitosis acrosomal una, para la apertura de los SOCC y otra para el paso final de este proceso secretorio.

Previamente demostramos que el efecto inhibitorio que ejerce el dominio efector de MARCKS durante la exocitosis acrosomal puede ser revertido por la adición de PIP₂ y adenosina. Estos resultados nos

llevaron a hipotetizar que el dominio efector de MARCKS secuestra PIP_2 en las membranas, inhibiendo la producción de IP_3 y, en consecuencia, el eflujo de Ca^{2+} mediante los canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 .

Para probar esta hipótesis, realizamos mediciones de Ca^{2+} en espermatozoides intactos incubados con el péptido permeable $\text{ED}_{154-165}$ -TMR antes de ser estimulados con progesterona. Para realizar las mediciones de Ca^{2+} utilizamos la sonda fluorescente Fluo 3-AM que atraviesa la membrana y se acumula en el citosol. El grupo AM (aceto-metoxi) es quien le confiere la permeabilidad a las membranas y una vez que ha ingresado a la célula es degradado por esterasas celulares, de manera que permanece en el interior celular. Ante un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , se observa un aumento en la fluorescencia, el cual es detectado utilizando un espectrofluorómetro.

En la figura 32A se observa que la adición de progesterona (aproximadamente a los 110 segundos) a espermatozoides incubados con Fluo -3AM, presentan un aumento en la intensidad de fluorescencia, lo que se relaciona con un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo este efecto se ve disminuido cuando los espermatozoides son preincubados con el péptido $\text{ED}_{154-165}$ -TMR (Fig. 32B). En la figura 32C se observa que la intensidad de la fluorescencia disminuye aproximadamente un 70 % en los espermatozoides humanos preincubados con el $\text{ED}_{154-165}$ -TMR con respecto a los espermatozoides control.

Como se observa en la figura 32 A y B la adición de Tritón X-100 a los espermatozoides produce un aumento en la intensidad de la señal que es similar en la condición control, como en la condición tratada con el péptido $\text{ED}_{154-165}$ -TMR, por lo que la cantidad de Fluo 3-AM es similar en ambas condiciones. Estos resultados validan nuestra hipótesis de que MARCKS regula las movilizaciones de Ca^{2+} intracelular cuando se estimula la exocitosis acrosomal con progesterona en espermatozoides humanos intactos.

Los resultados obtenidos conjuntamente en el modelo de espermatozoides permeabilizados y en el modelo de espermatozoides intactos sugieren que la proteína MARCKS actúa como una *pipmodulina*

regulando la concentración de PIP₂ en las membranas y de esta manera regula las movilizaciones de Ca²⁺ que se desencadenan durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos.

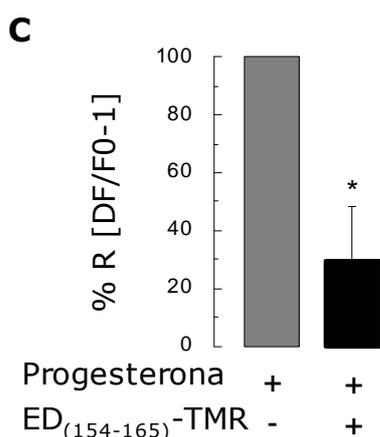
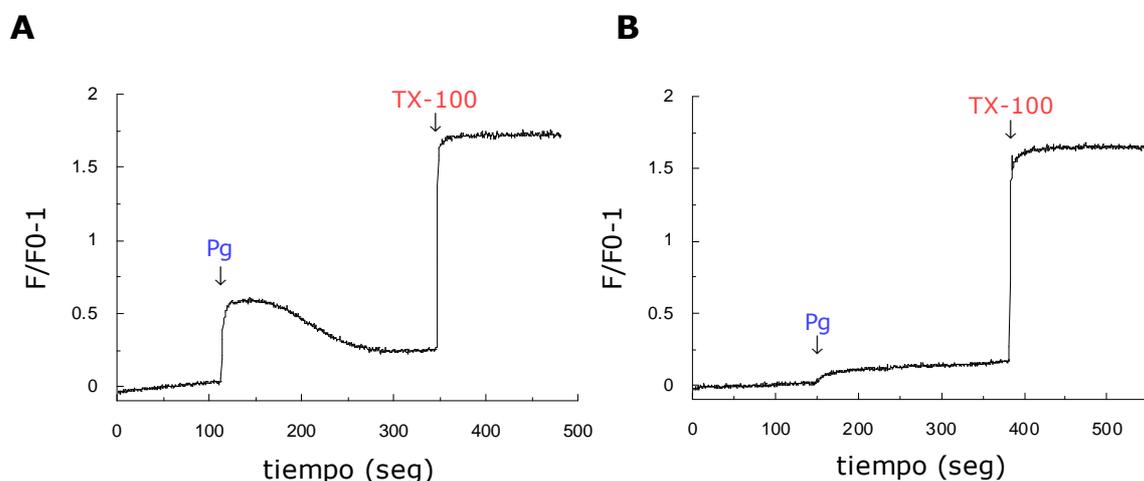


Figura 32: El péptido permeable del dominio efector de MARCKS inhibe los movimientos de Ca²⁺ durante la exocitosis acrosomal. **(A)** Espermatozoides humanos intactos fueron incubados durante 30 min a 37°C con 2 μM de Fluo-3-AM. Al tiempo indicado (flecha) se adicionó 15 μM de progesterona (Pg). La respuesta máxima de movilización de calcio se calibró con 0,1% Tritón X-100 al final del período de incubación. El aumento en la fluorescencia se expresa como (F/F0)-1[máxima intensidad de fluorescencia /fluorescencia inicial]-1] vs tiempo en segundos. **(B)** Igual que en A, pero los espermatozoides fueron preincubados con 4 μM del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-IMR durante 30 min a 37° antes de adicionar progesterona (flecha). **(C)** Cuantificación de tres ensayos diferentes. Las barras representan la media ± E.S. de tres ensayos independientes; los datos fueron normalizados respecto de la fluorescencia obtenida luego de la adición de progesterona en ausencia del péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto a la condición estimulada con progesterona (*, p < 0,05; test de Student).

MARCKS se fosforila durante la exocitosis acrosomal

Los datos bibliográficos muestran que durante las vías de señales que conducen a la exocitosis en diferentes modelos celulares, se produce la fosforilación y translocación de MARCKS desde las membranas al citosol celular (Goodall A.R., et al 1997; Salli U., et al 2000; Rosé S.D., et al 2001;

Li Y., et al 2001; Eliyahu E., et al 2006), por lo que cabe plantear que MARCKS podría ser fosforilada durante la exocitosis acrosomal.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la forma no fosforilada de MARCKS inhibe la exocitosis acrosomal cuando es estimulada por diferentes inductores, ya sea en espermatozoides permeabilizados como en intactos. Asimismo, la forma fosforilada de MARCKS no inhibe la exocitosis acrosomal por lo que consideramos que es la forma inactiva en espermatozoides humanos.

Si bien, se determinó la presencia de fosfo MARCKS en espermatozoides humanos no capacitados mediante ensayos de Western blot (Fig. 21), desconocemos hasta el momento la localización intracelular de la proteína fosforilada.

La localización intracelular de fosfo MARCKS se determinó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides humanos no capacitados. Para ello las células una vez fijadas y permeabilizadas, fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS. La presencia de la fosfo proteína fue revelada haciendo uso de un anticuerpo secundario anti-rabbit Cy3. Como se observa en la figura 33A fosfo MARCKS se localiza en la cola y en la región acrosomal. Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-fosfo MARCKS, éste fue preincubado con el dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro*. Este pretratamiento atenuó la señal de fosfo MARCKS en la cola y en la región acrosomal, indicando que esta tinción es específica, mientras que la tinción persistente en la pieza media del flagelo sugiere una marca inespecífica (Fig. 33B). Además se evaluó una posible marca inespecífica del anticuerpo secundario incubando los espermatozoides sólo con el anticuerpo secundario. Como se observa en la figura 33C el anticuerpo secundario sólo no presenta fluorescencia. También mediante el uso de la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC (PSA-FITC) se evaluó el estado del acrosoma. Esta lectina al igual que la lectina LCA es capaz de unirse específicamente al gránulo acrosomal (Kallajoki M., et al 1985) (Fig. 33A, B y C).

Estos resultados indican que una fracción de MARCKS se encuentra fosforilada en espermatozoides humanos no capacitados y que se localizaría principalmente en la pieza principal y final de la cola, pero no en la pieza

media de esta estructura. Además se determinó que fosfo MARCKS se localiza en la región acrosomal.

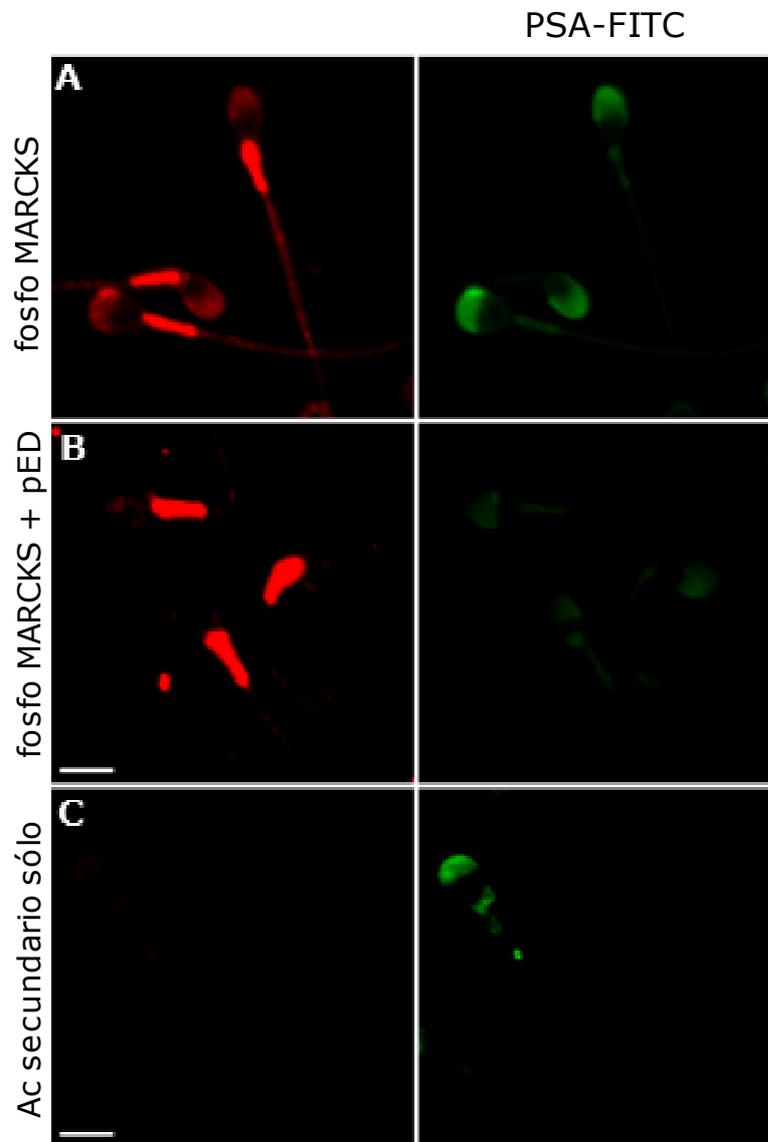


Figura 33: Fosfo MARCKS localiza en la cola y en la región acrosomal en espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos fijados y permeabilizados fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS (A) o con el mismo anticuerpo preincubado con un exceso (1:10) del dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro* (fosfo MARCKS + pED) (B). Luego los espermatozoides fueron incubados con un anticuerpo anti-rabbit acoplado al fluoróforo Cy3. Los acrosomas fueron teñidos con la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC (PSA-FITC). Para determinar la especificidad del anticuerpo secundario, los espermatozoides sólo fueron incubados con el anticuerpo anti-rabbit acoplado al fluoróforo Cy3 (Ac secundario sólo) (C). Barra= 5 μ m.

Se mencionó previamente que la forma fosforilada de MARCKS es la forma inactiva de la proteína (Garrett A.M., et al. 2012). Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos mediante ensayos de exocitosis acrosomal donde se demostró que la forma fosforilada de MARCKS es incapaz de inhibir la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos permeabilizados. Estos resultados sumados a datos bibliográficos donde se ha demostrado que se requiere de la fosforilación y translocación de la proteína MARCKS en varios procesos exocíticos (Goodall A.R., et al 1997; Salli U., et al 2000; Rosé S.D., et al 2001; Li Y., et al 2001; Eliyahu E., et al 2006), nos llevaron a plantear que MARCKS podría ser fosforilada durante la exocitosis acrosomal, lo que llevaría a la inactivación de la proteína.

Una de las características distintivas de la exocitosis acrosomal es la liberación de vesículas híbridas y parte del citosol celular al medio extracelular (Yanagimachi R. 1994) (Fig. 7). Para evitar la pérdida de estos componentes celulares durante la exocitosis acrosomal, previo a ser estimulado este proceso exocítico los espermatozoides fueron incubados con 100 μ M de 2-amino-etoxidifenilborato (2-APB), un inhibidor de los canales de Ca^{2+} sensible a IP_3 . Este inhibidor permite que la exocitosis acrosomal transcurra pero sólo hasta el punto donde la membrana acrosomal externa se encuentra aposicionada con la membrana plasmática (Zanetti N. and Mayorga L.S. 2009), impidiendo la formación de vesículas híbridas y de esta manera evitando la pérdida de las membranas y del citosol celular.

Para estudiar el estado de fosforilación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal se realizaron ensayos de Western blot haciendo uso del anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de MARCKS. Como se muestra en la figura 34A, la fosforilación de MARCKS se incrementó significativamente cuando se estimuló la exocitosis acrosomal con A23187, PMA y progesterona en un 50%, 60% y 40% respectivamente. Estos porcentajes fueron obtenidos normalizando los datos contra β tubulina (Fig. 34B). Resultados similares se obtuvieron cuando se normalizó contra la cantidad total de MARCKS. Estos resultados indican que fosfo MARCKS se incrementan durante la exocitosis acrosomal mientras que los niveles totales de la proteína MARCKS no varían (Fig. 34C y D). Por lo tanto podemos concluir que las vías de señales desencadenadas durante la exocitosis acrosomal producen un aumento en la fosforilación de MARCKS.

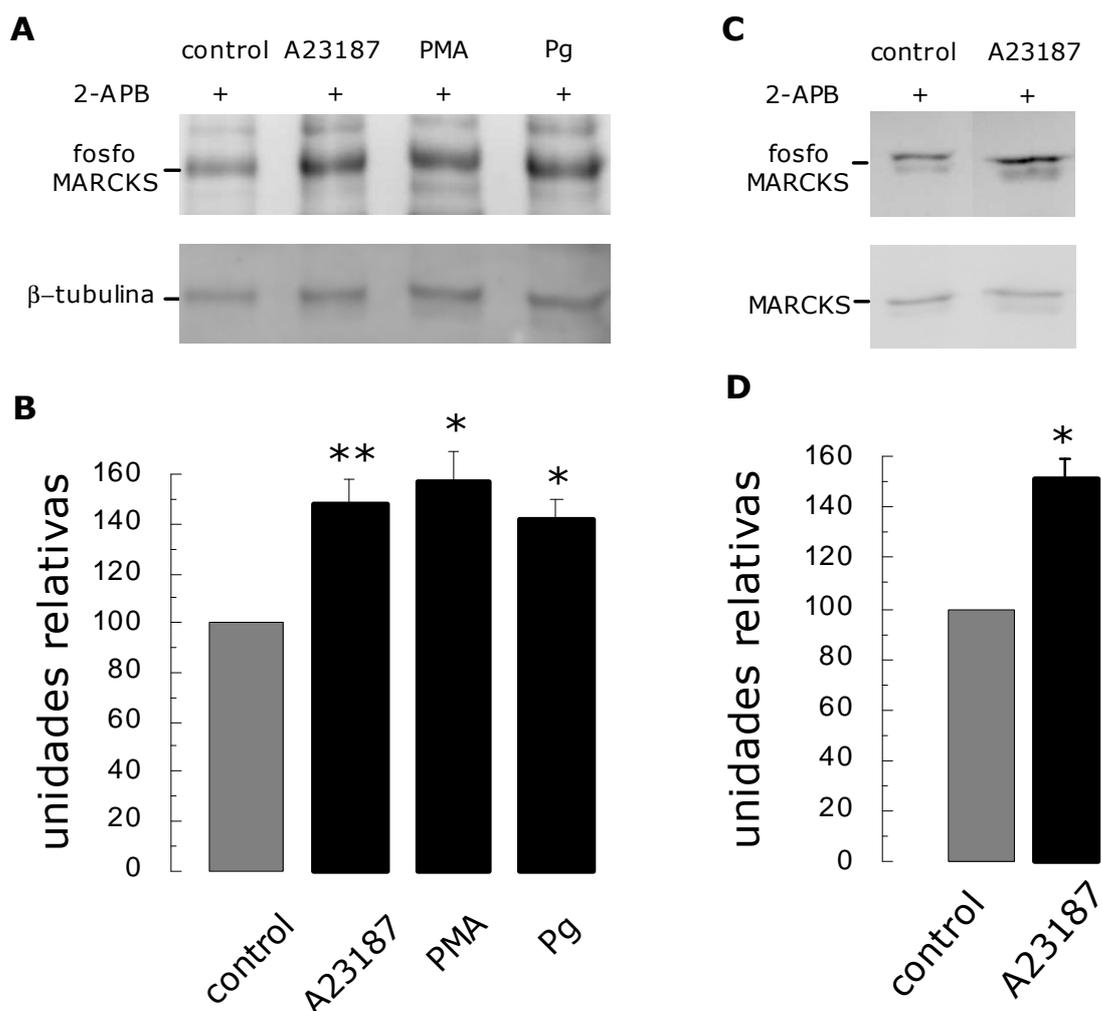


Figura 34: MARCKS se fosforila durante la exocitosis acrosomal. (A) Espermatozoides intactos fueron incubados con 100 μ M de 2-APB (control) y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con 10 μ M de A23187, 200 nM de PMA o 15 μ M de progesterona durante 15 min a 37°C. Después se obtuvieron las proteínas de cada condición (5×10^6 espermatozoides) y fueron resueltas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para determinar el estado de fosforilación de MARCKS se utilizó el anticuerpo anti-fosfo MARCKS y como control de carga se determinó β -tubulina. **(B)** Cuantificación de tres ensayos independientes en A. Las barras representan la media \pm E.S.; los datos fueron normalizados contra la señal de β -tubulina. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). **(C)** Espermatozoides intactos fueron incubados durante 15 min a 37°C con 100 μ M de 2-APB (control) y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con 10 μ M de A23187. Después del tratamiento las proteínas de 5×10^6 espermatozoides fueron resueltas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se determinó el estado de fosforilación de MARCKS mediante el uso del anticuerpo anti-fosfo MARCKS. El anticuerpo anti-ED se utilizó para detectar la cantidad total de MARCKS y fue utilizado como control de carga. **(D)** Cuantificación de tres ensayos independientes en C. Las barras representan la media \pm E.S.; los datos fueron normalizados contra la señal de MARCKS. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control (*, $p < 0,05$).

MARCKS se transloca desde las membranas al citosol celular durante la exocitosis acrosomal

El dogma establece que la forma no fosforilada de MARCKS permanece unida a las membranas celulares y una vez que ésta es fosforilada se produce la translocación de la proteína al citosol celular. Sin embargo Satoh y colaboradores (Satoh k. et al. 2009) demostraron que a pesar de que el tratamiento con isoproterenol induce la fosforilación de MARCKS en células acinares de la glándula parótida, un alto porcentaje de fosfo MARCKS permaneció unida a las membranas de estas células. Mediante el uso de microscopía confocal demostramos que fosfo MARCKS localiza en la cola y en la región acrosomal de los espermatozoides humanos no capacitados. Sin embargo debido al pequeño tamaño de los espermatozoides no pudimos determinar si fosfo MARCKS se encuentra en las membranas o en el citosol celular.

Dado estos resultados nos propusimos determinar la localización ultraestructural de fosfo MARCKS en espermatozoides humanos mediante crioultrainmunomarcado. Para ello, crioultracortes de espermatozoides humanos no capacitados de aproximadamente 60 nm fueron incubados con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS y su presencia fue revelada utilizando un anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado con partículas de oro de 6 nm. En la figura 35A se observa que fosfo MARCKS se encuentra en el citosol de la región acrosomal. Para descartar una marca inespecífica del anticuerpo secundario las muestras con espermatozoides humanos no capacitados fueron incubadas solamente con el anticuerpo secundario en ausencia del anticuerpo anti-fosfo MARCKS, no observándose inmunomarcación (Fig. 35B). Este resultado demuestra que la forma fosforilada de MARCKS localiza en el citosol celular de la región acrosomal en espermatozoides humanos no capacitados.

Dado que la forma fosforilada de MARCKS se localiza en el citosol celular en espermatozoides humanos no capacitados y que durante la exocitosis acrosomal se produce la fosforilación de MARCKS nos preguntamos si este aumento en la fosforilación de MARCKS, produciría la translocación de la proteína desde las membranas al citosol celular.

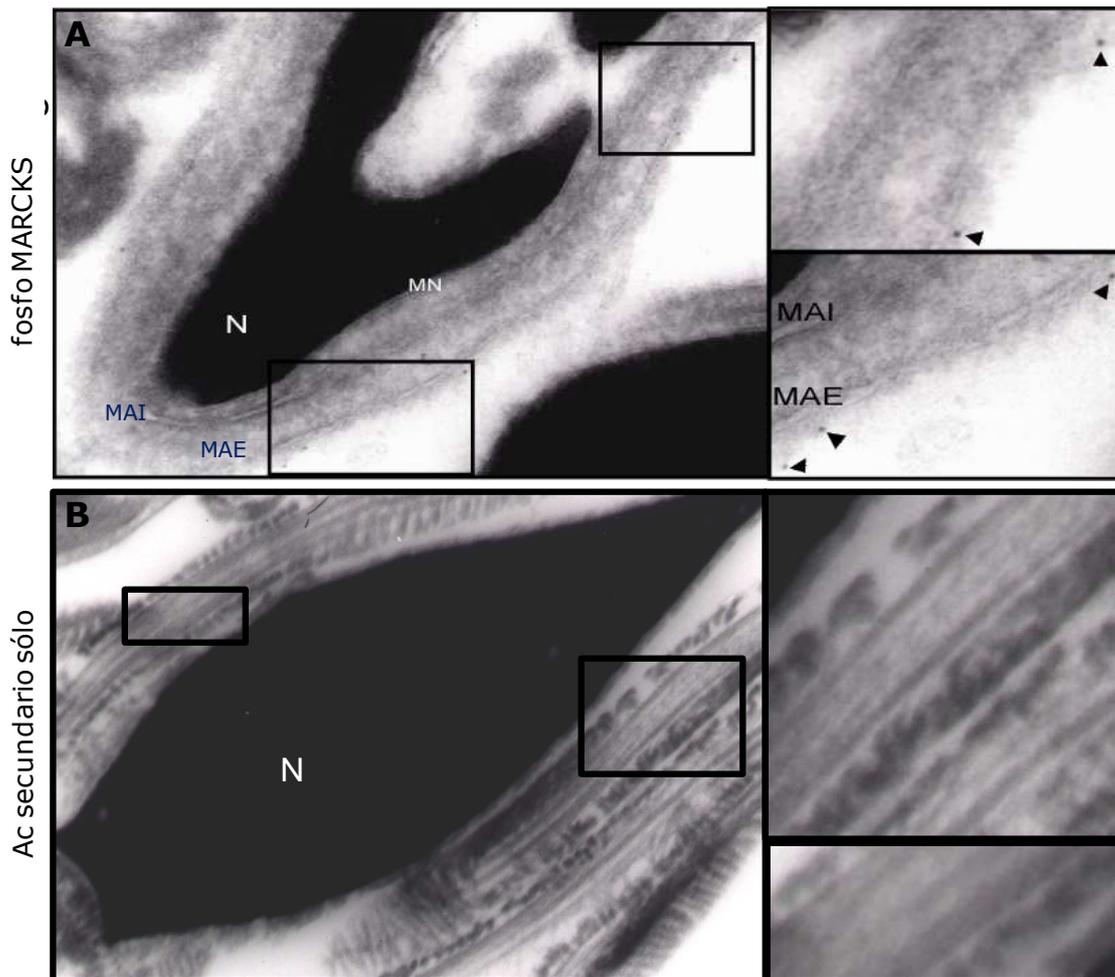


Figura 35: Fosfo MARCKS se localiza en citosol celular de la región acrosomal en espermatozoides humanos. (A) Crioultracortes de aproximadamente 60 nm de espermatozoides humanos fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS y su presencia fue revelada utilizando un anticuerpo anti-rabbit acoplado con oro coloidal de 6 nm para su visualización por microscopía electrónica. Las puntas de flechas muestran la localización del oro coloidal. **(B)** Para determinar la especificidad del anticuerpo secundario, los crioultracortes fueron incubados sólo con el anticuerpo anti-rabbit acoplado con oro coloidal (Ac secundario sólo). N, Núcleo; MAI, Membrana Acrosomal Interna; MAE, Membrana Acrosomal Externa.

Para determinar si MARCKS se transloca durante la exocitosis acrosomal se determinó la presencia de MARCKS en las membranas de espermatozoides humanos estimulados con A23187 y PMA mediante ensayos de Western blot y haciendo uso del anticuerpo N-66. Para evitar la pérdida de las membranas y del citosol que ocurre durante la exocitosis acrosomal los espermatozoides fueron preincubados con 2-APB. Una vez obtenidas las membranas mediante el protocolo descrito por Tomes y

colaboradores (Tomes C.N., et al 2005), las muestras fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a una membrana de PVDF y luego fueron incubadas con el anticuerpo N-66. Como se muestra en la figura 36A, la presencia de MARCKS en las membranas de espermatozoides humanos disminuye significativamente cuando se estimuló la exocitosis acrosomal con A23187 y PMA en un 50 % y 40 % respectivamente. Estos porcentajes fueron obtenidos normalizando los datos contra su respectivo control de carga. Para estos ensayos se utilizó como control de carga sinaptotagmina VI ya que es una proteína transmembrana. Mediante esta estrategia se demostró que MARCKS se transloca desde las membranas de los espermatozoides al citosol celular una vez que se estimula la exocitosis acrosomal con A23187 y PMA (Fig. 36B).

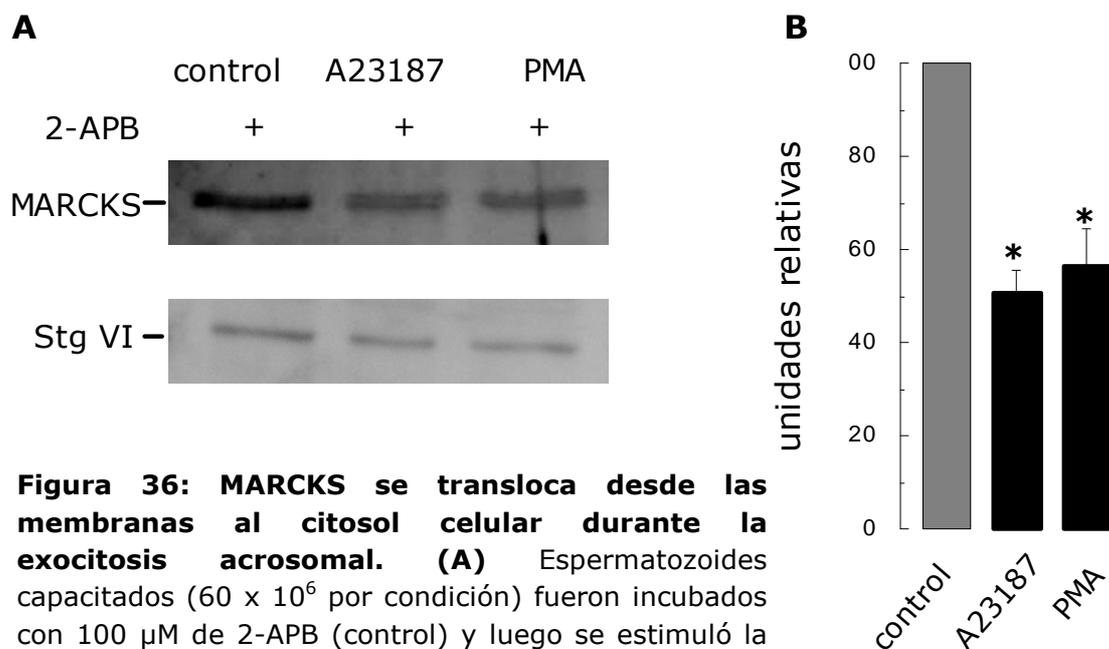


Figura 36: MARCKS se transloca desde las membranas al citosol celular durante la exocitosis acrosomal. (A) Espermatozoides capacitados (60×10^6 por condición) fueron incubados con $100 \mu\text{M}$ de 2-APB (control) y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con $10 \mu\text{M}$ de A23187 o 200 nM de PMA durante 15 min a 37°C . Luego las muestras fueron sometidas a fraccionamiento subcelular, mediante el uso de un buffer hipoosmótico como se describe en materiales y métodos. Las proteínas de la fracción de membrana fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas a membranas de PVDF. Luego las membranas fueron incubadas con el anticuerpo que reconoce la región N-terminal de MARCKS, N-66. **(B)** Cuantificación de dos ensayos independientes en A. Las barras representan la media \pm E.S.; los datos fueron normalizados contra la señal de sinaptotagmina VI (Stg VI). Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control (*, $p < 0,05$).

Las PKC clásicas son activadas durante la exocitosis acrosomal

Previamente demostramos que MARCKS es fosforilada y se transloca desde las membranas al citosol celular durante la exocitosis acrosomal. Por otro lado, MARCKS es el principal sustrato de PKC en varios tipos celulares (Aderem A. 1992; Blackshear P.J. 1993) y se ha documentado que PKC participa durante la exocitosis acrosomal (Breitbart H., et al 1992; Breitbart H. and Naor Z. 1999; López C.I., et al 2012). Por lo tanto, nos preguntamos si PKC podría fosforilar a MARCKS durante este proceso.

Para estudiar si PKC estaba involucrada en la fosforilación de MARCKS utilizamos queleritrina un inhibidor general de la actividad catalítica de PKC. Por lo que espermatozoides humanos preincubados con 2-APB; fueron tratados con queleritrina y luego se estimulo la exocitosis acrosomal con PMA. Mediante Western blot se determinó el estado de fosforilación de MARCKS. Como se muestra en la figura 37 el tratamiento con PMA produce un aumento en la fosforilación de MARCKS, mientras que el pretratamiento de los espermatozoides con queleritrina inhibe significativamente la fosforilación de MARCKS cuando se estimuló la exocitosis acrosomal con PMA.

Dado que queleritrina es un inhibidor general de la familia de las PKC nos propusimos estudiar qué isoforma/s de la familia de las PKC se activan durante la exocitosis acrosomal.

Hasta el momento se han identificado diez isoformas de la familia de las PKC y se las clasifica en 1) PKCs clásicas: α , β I, β II y γ , que responden a señales de Ca^{2+} y DAG), 2) PKCs noveles: γ , ϵ , η y θ , las cuales responden sólo a señales de DAG, y 3) PKCs atípicas: ζ y ι/λ , que no responden a señales de Ca^{2+} ni a DAG. Además de estas regulaciones alostéricas, las PKC deben ser fosforiladas en tres motivos de fosforilación. Esto constituye un requisito ya que sin estas fosforilaciones la quinasa es catalíticamente inactiva (Newton A.C. 2003).

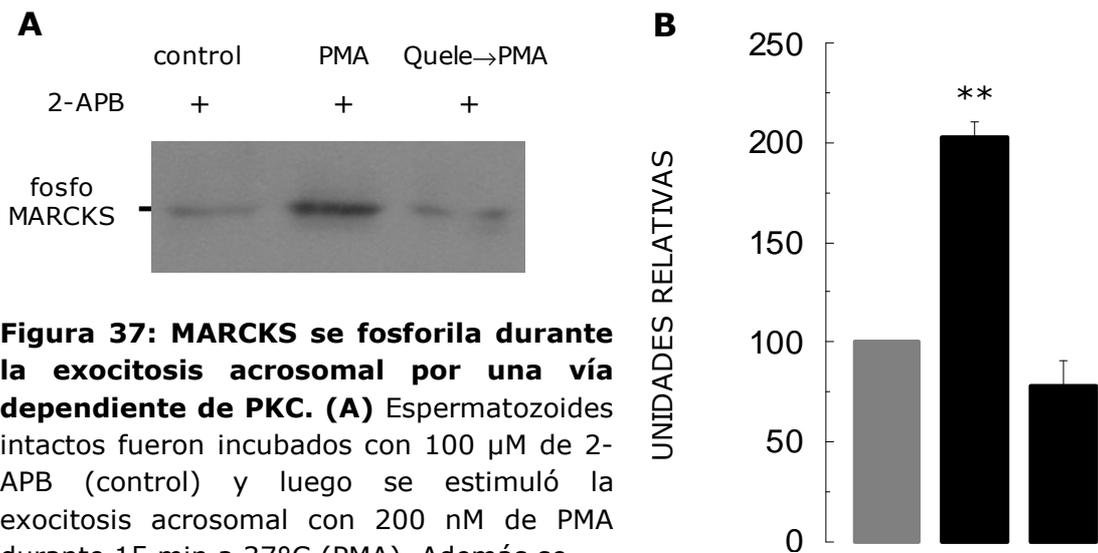


Figura 37: MARCKS se fosforila durante la exocitosis acrosomal por una vía dependiente de PKC. (A)

Espermatozoides intactos fueron incubados con 100 μ M de 2-APB (control) y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con 200 nM de PMA durante 15 min a 37°C (PMA). Además se

se estimuló la exocitosis acrosomal con PMA en presencia de queleritina (Quele→PMA). A continuación se obtuvieron las proteínas de cada condición (5×10^6 espermatozoides) y fueron resueltas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para determinar el estado de fosforilación de MARCKS se utilizó el anticuerpo anti-fosfo MARCKS. **(B)** Cuantificación de dos ensayos independientes en A. Las barras representan la media \pm E.S. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto a la condición control (**, $p < 0,01$).

Dado que el estado de fosforilación determina el estado de activación de las isoformas de las PKC, estudiamos mediante Western blot el estado de fosforilación de las diferentes isoformas de PKC durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides estimulados con A23187 previamente incubados con 2-APB. Durante este ensayo se evaluó el estado de fosforilación de las PKC haciendo uso de dos anticuerpos. Uno, el anticuerpo anti-fosfo PKC α/β II (Thr 638/641) que reconoce el residuo fosforilado de treonina 638 de la PKC α y el residuo de treonina fosforilado 641 de la PKC β II. El otro anticuerpo utilizado fue el anti-fosfo PKC δ/θ (Ser643/676) que reconoce el residuo de serina fosforilado 643 de la PKC δ y el residuo de serina fosforilado 676 de la PKC θ .

Como se muestra en la figura 38A el estado de fosforilación en los residuos de treonina 638/641 de la PKC α/β II respectivamente aumentó un 40 % durante la exocitosis acrosomal estimulada con A23187 en espermatozoides humanos en relación a la condición de espermatozoides capacitados (Fig. 38B). Además se determinó que el estado de fosforilación

de los residuos de serina 643/676 de la PKC δ/θ respectivamente no varió cuando se estimuló la exocitosis acrosomal con A23187 en relación a la condición de espermatozoides capacitados (Fig. 38C y B). A partir de este resultado podemos concluir que las isoformas clásicas α y β II son fosforiladas en los residuos de treonina 638 y 641 respectivamente, por lo que se activarían durante la exocitosis acrosomal estimulada con el ionóforo de Ca^{2+} A23187, mientras que para las isoformas δ y θ no se observa un cambio en el estado de fosforilación en los residuos de serina 643/676 respectivamente, por lo que no se activarían cuando la exocitosis acrosomal es estimulada con el ionóforo de Ca^{2+} .

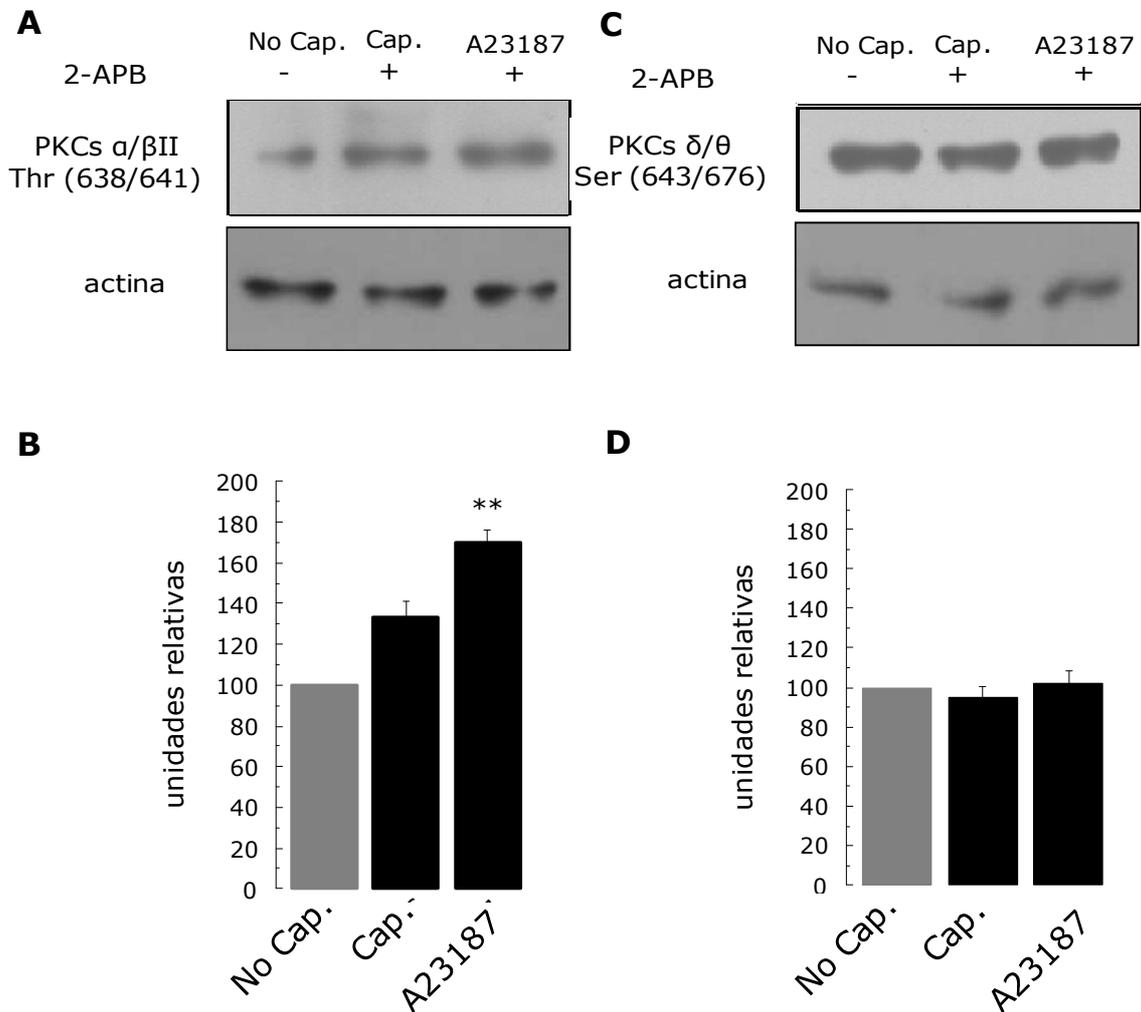


Figura 38: Las PKC clásicas son activadas durante la exocitosis acrosomal. **(A)** Espermatozoides no capacitados (5×10^6 espermatozoides por condición) fueron incubados en un medio capacitante durante 3 horas (capacitados). Posteriormente los espermatozoides fueron incubados durante 15 min a 37°C con 100 μ M de 2-APB se estimuló la exocitosis acrosomal con 10 μ M de A23187 durante 15 min a 37°C. Luego se obtuvieron las proteínas de cada condición y fueron resueltas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Mediante el uso del anticuerpo PKCs α/β II treonina 638/641 se determinó el estado de fosforilación de las isoformas α/β II de las PKC clásicas. Como control de carga se utilizó actina. **(B)** Cuantificación de dos ensayos independientes en A. Las barras representan la media \pm E.S.; los datos fueron normalizados contra la señal de actina. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto a la condición de espermatozoides capacitados (*, $p < 0,01$). **(C)** Los espermatozoides fueron procesados de la misma forma que en A, pero se utilizó el anticuerpo PKCs δ/θ serina 643/676 para determinar el estado de fosforilación de las isoformas δ/θ de las PKC noveles. **(D)** Cuantificación de dos ensayos independientes en C. Las barras representan la media \pm E.S.; los datos fueron normalizados contra la señal de actina.

MARCKS es desfosforilada durante la capacitación

Previamente se demostró que MARCKS se encuentra presente en espermatozoides humanos no capacitados y que una fracción de la misma se encuentra fosforilada y se localiza en el citosol celular. Haciendo uso del modelo de espermatozoides humanos permeabilizados determinamos que el estado de fosforilación de MARCKS regula su participación durante la exocitosis acrosomal. Asimismo demostramos que durante el proceso de exocitosis acrosomal el nivel de fosforilación de MARCKS aumenta significativamente provocando la translocación de la proteína desde las membranas al citosol celular. Por lo que el estado de fosforilación de MARCKS determina la localización intracelular de la proteína y regula la participación de la proteína durante la exocitosis acrosomal. Sin embargo, para que los espermatozoides puedan exocitar el gránulo acrosomal éstos previamente deben ser capacitados.

Durante la capacitación los espermatozoides sufren una serie de cambios bioquímicos y biofísicos los cuales le van a permitir a los espermatozoides llevar a cabo el proceso de exocitosis acrosomal y fecundar al ovocito. A su vez durante la capacitación deben activarse mecanismos que coordinen espacial y temporalmente el proceso de exocitosis acrosomal ya que este proceso secretorio ocurre una sola vez en

la vida del espermatozoide y es un proceso irreversible. Es por esto que varios autores han considerado a la capacitación como un mecanismo regulador de la exocitosis acrosomal (Tsai P.S., et al 2010; Buffone M.G., et al 2012; Gadella B.M., 2012). Uno de los cambios característicos que se producen durante la capacitación espermática es la fosforilación de proteínas tanto en tirosina como en serina/treonina (Visconti P. E., et al 1994; Flesch F. M., et al 1999; Visconti P. E., et al 2002). Además recientemente se demostró que durante la capacitación se produce la desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina en espermatozoides de cerdo (Alnagar F.A., et al 2010). Es por esto y dado que el estado de fosforilación de MARCKS regula su localización intracelular y sus interacciones, nos propusimos estudiar el estado de fosforilación de MARCKS durante la capacitación. Para ello, espermatozoides móviles obtenidos por la técnica de swim up fueron capacitados *in vitro* durante 3, 6 y 9 horas. Luego, se realizaron extractos de proteínas, las cuales fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 10 % y transferidas a una membrana de PVDF. Finalmente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS. Como se observa en la figura 39 la incubación de espermatozoides humanos en medio capacitante durante tres horas produjo la desfosforilación de MARCKS en un 40 % en relación a la condición de espermatozoides no capacitados (0 hs). Además se observa que a medida que a las seis horas y nueve horas el estado de fosforilación de MARCKS disminuyó un 60 % y 80 % con respecto a la condición de espermatozoides no capacitados (Fig 39A y B). Estos resultados muestran que la proteína MARCKS se desfosforila durante la capacitación.

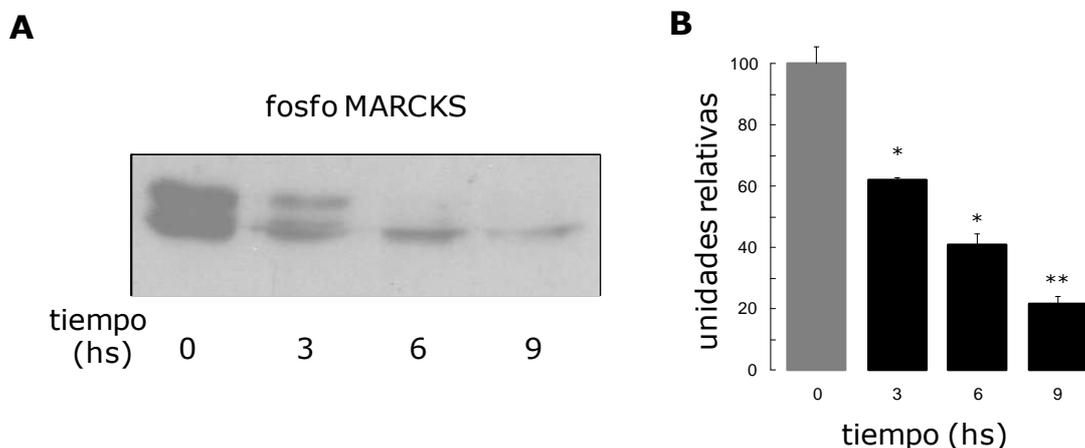


Figura 39: MARCKS es desfosforilada durante la capacitación. (A) Espermatozoides humanos móviles y desprovisto de plasma seminal, fueron incubados en condiciones capacitantes por 3, 6 y 9 hs. Posteriormente se obtuvieron las proteínas de las diferentes condiciones y se resolvieron (5×10^6 espermatozoides por condición) en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para determinar el estado de fosforilación de MARCKS se utilizó el anticuerpo anti-fosfo MARCKS y como control de carga se determinó actina. **(B)** Cuantificación de dos ensayos independientes en A. Las barras representan la media \pm E.S. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

CONCLUSIÓN DEL OBJETIVO DOS

Durante este objetivo se demostró que el péptido correspondiente a la secuencia aminoacídica 154-165 del dominio efector de MARCKS es permeable a membrana. Esta característica nos permitió determinar que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR inhibe la exocitosis acrosomal estimulada por A23187 y PMA en espermatozoides humanos intactos, corroborando los resultados obtenidos en espermatozoides permeabilizados. Además se demostró que el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR inhibió la exocitosis acrosomal estimulada por progesterona, un agonista fisiológico de este proceso, en espermatozoides humanos intactos. Una ventaja de utilizar el modelo de espermatozoides intactos es que nos permitió medir concentraciones de Ca²⁺ intracelular. Utilizando este modelo se observó que la preincubación de espermatozoides humanos intactos con el péptido ED₁₅₄₋₁₆₅-TMR inhibió las movilizaciones de Ca²⁺ intracelular inducidas por progesterona.

Además mediante ensayos de Western blot y utilizando el anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de MARCKS demostramos que durante la exocitosis acrosomal se produce un aumento en la fosforilación MARCKS, produciendo la translocación de la proteína desde las membranas de los espermatozoides al citosol celular, lo que a su vez aumentaría la disponibilidad de PIP₂ para producir IP₃.

También evaluamos las isoformas de la familia de las PKC que podrían fosforilar a MARCKS durante la exocitosis acrosomal. Mediante Western blot y utilizando anticuerpos que reconocen el estado de fosforilación de diferentes isoformas de la familia de las PKC se identificó

que las PKC α / β II son fosforiladas en los residuos de treonina 638, 641 respectivamente mientras que las PKC noveles (δ / θ), no mostraron un cambio en el estado de fosforilación en los residuos de serina 643/676 respectivamente, cuando se estimula la exocitosis acrosomal con A23187. Estos resultados sugieren que las PKC clásicas α / β II se activarían durante la exocitosis acrosomal estimulada por A23187, sugiriendo que las PKC clásicas podrían fosforilar la proteína MARCKS durante la exocitosis acrosomal.

Finalmente, mediante la técnica de Western blot y utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de MARCKS, se determinó que la proteína MARCKS es desfosforilada durante la capacitación. Este cambio en el estado de fosforilación le permitiría a la proteína interactuar y regular la maquinaria que participa durante la exocitosis acrosomal.

DISCUSIÓN

La exocitosis acrosomal es un prerrequisito fundamental para que el espermatozoide fecunde el ovocito (Yanagimachi R. 1994). Sólo aquellos espermatozoides que han sufrido la exocitosis acrosomal pueden atravesar la ZP y luego fusionarse con el oolema (Avella M.A. and Dean J. 2011). Dado que la exocitosis acrosomal es un evento irreversible y ocurre una única vez en la vida del espermatozoide, es un evento altamente regulado. Además de la acción sincronizada de varios iones y proteínas durante la secreción del granulo acrosomal, también se ha descrito la participación de fosfolípidos como PIP₂ y, si bien hoy contamos con numerosas evidencias sobre el mecanismo molecular de la exocitosis acrosomal, todavía queda por dilucidar como se relacionas la vía de señales desencadenadas en la exocitosis acrosomal.

La proteína MARCKS es conocida como el principal sustrato de PKC en numerosos modelos celulares (Hartwig J.H., et al 1992; Arbuzova A., et al 2002) y ha sido clasificada como una *pipmodulina* ya que esta proteína es capaz de regular los niveles disponibles de PIP₂ en las membranas (Laux T., et al 2000; McLaughlin S. and Murray D. 2005), además ha sido involucrada en varios procesos exocíticos (Li Y., et al 2001; Rosé S.D., et al 2001; Sasaki Y. 2003; Eliyahu E., et al 2006; Gadi D., et al 2011), pero aun su presencia en espermatozoides humanos no ha sido demostrada. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar la presencia y localización de MARCKS en espermatozoides humanos y su función durante la exocitosis acrosomal. Para ello hicimos uso de dos modelos complementarios: espermatozoides permeabilizados e intactos.

Mediante ensayos de Western blot y haciendo uso de dos anticuerpos que reconocen la región N-terminal de MARCKS y un anticuerpo que reconoce el dominio efector de MARCKS se demostró que MARCKS se encuentra presente en espermatozoides humanos. Además en nuestras condiciones experimentales se determinó que el peso molecular aparente al que migra MARCKS en espermatozoides humanos es de 73 kDa (fig. 20A y B). A su vez, dado que se observa una única banda en los ensayos de Western blot podemos afirmar que MARCKS en espermatozoides humanos no es clivada por proteasas como se ha visto en otros modelos celulares (Dulong S., et al 2004; Lampe W.R., et al 2012). Estos resultados plantean

la controversia de la presencia de MARCKS en espermatozoides humanos ya que Mosevitsky y Silicheva (Mosevitsky M. and Silicheva I. 2011) demostraron por inmunohistoquímica que MARCKS se encuentra presente en todos los estadios durante la espermatogénesis, pero no en espermatozoides maduros de rata. Esta discrepancia podría deberse principalmente al modelo utilizado ya que estos autores utilizaron testículo de rata, mientras que en este trabajo de tesis se utilizó solamente espermatozoides humanos. Además los autores utilizaron un anticuerpo obtenido en su laboratorio, mientras que nosotros utilizamos diferentes anticuerpos comerciales en donde dos reconoce diferentes regiones de la región N-terminal, otro reconoce la secuencia próxima al residuo de serina 162 del dominio efector y un cuarto anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de MARCKS.

Además mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de MARCKS, fuimos capaces de determinar que una fracción de MARCKS se encuentra fosforilada en espermatozoides no capacitados (Fig. 22) y que durante la capacitación MARCKS es desfosforilada (Fig. 39). Este cambio en el estado de fosforilación de la proteína produciría un cambio en la función de la misma ya que una vez desfosforilada esta podría interactuar con PIP_2 , actina o calmodulina.

Mediante inmunofluorescencia indirecta determinamos que MARCKS localiza en la cola, en la región postacrosomal y en la región acrosomal en espermatozoides humanos no capacitados (Fig. 20). La localización de MARCKS en la cola podría deberse a que esta proteína cumpla alguna función en la motilidad del flagelo, ya que esta proteína ha sido involucrada en migración celular y en motilidad celular (Sheetz M.P., et al 2006; Kalwa H. and Michel T. 2011). A modo de ejemplo se ha demostrado que la inyección del dominio efector de MARCKS en el *Paramecium tetraurelia* altera la motilidad de este protozoo (Hinrichsen R.D. and Blackshear P.J. 1993).

En la región acrosomal pudimos observar que la localización de MARCKS presenta un patrón punteado. Este patrón punteado ha sido

previamente descrito en neuronas (McLaughlin S. and Aderem A. 1995; Wiederkehr A., et al 1997) y si bien se desconoce la naturaleza de estas estructuras, varios autores han sugerido que estas estructuras serían las responsables de eventos locales en la superficie celular como exocitosis, fagocitosis y regulación de la motilidad celular. El hecho que MARCKS presenta una gran afinidad por PIP₂ y una gran capacidad de unión a este fosfolípido, estas estructuras punteadas podrían ser microdominios ricos en PIP₂.

La ausencia de transcripción y traducción en el espermatozoide restringe las estrategias para estudiar el mecanismo molecular de MARCKS durante la exocitosis acrosomal. Por esto se utilizó el modelo de espermatozoides permeabilizados con SLO (Diaz A., et al 1996; Yunes R., et al 2000), lo que nos permite introducir reactivos y proteínas al sistema. Haciendo uso de este modelo y mediante la incubación con el anticuerpo N-19 el cual reconoce la región N-terminal de MARCKS bloqueamos la proteína endógena, lo cual inhibió la exocitosis acrosomal estimulada por Ca²⁺ y PMA (Fig. 23). Ott y colaboradores (Ott L.E., et al 2013) mediante el uso de un péptido que posee los primeros 24 aminoácidos de la región N-terminal de MARCKS, demostraron que esta región tiene una importante función en la migración de fibroblastos. Además este mismo péptido inhibe la secreción de los gránulos de mucina y la degranulación de leucocitos humanos, por lo que esta región también podría tener una importante función durante la exocitosis acrosomal; no obstante el mecanismo molecular de la región N-terminal de MARCKS en los procesos secretorios se desconoce hasta el momento.

El otro anticuerpo que se utilizó para estudiar la función de MARCKS durante la exocitosis acrosomal, reconoce específicamente el dominio efector de MARCKS. Este dominio ejerce la mayoría de las funciones de MARCKS y además ha sido estudiado en varios procesos secretorios. El bloqueo del dominio efector de MARCKS por parte del anticuerpo anti-ED inhibió la exocitosis acrosomal (Fig. 24) y este efecto podría deberse a que una vez que se produce el bloqueo de la proteína por parte del anticuerpo, MARCKS sería incapaz de interactuar con importantes moléculas involucradas en varias vías de señales intracelulares como son PIP₂, CaM y

PKC. Por ejemplo el anticuerpo anti-ED podría inhibir la fosforilación de MARCKS, por lo que esta proteína quedaría retenida en las membranas celulares, secuestrando permanentemente PIP₂. Estos resultados, nos llevan a concluir que MARCKS participa en las vías de señales durante la exocitosis acrosomal.

A diferencia de los anticuerpos que reconocen la región N-terminal y el dominio efector de MARCKS (los cuales son capaces de inhibir la exocitosis acrosomal), el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de la proteína no inhibió la exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados (Fig. 24). Se ha propuesto que la forma fosforilada de MARCKS es la forma inactiva de la proteína (Garrett A.M., et al. 2012) ya que una vez fosforilada, ésta no interacciona con los fosfolípidos ácidos de las membranas, con calmodulina y con el citoesqueleto de actina (Hartwig J.H., et al 1992; Gallant C., et al 2005). En otras palabras, y al igual que en otros modelos celulares, fosfo MARCKS no interaccionaría con la maquinaria de fusión involucrada en la exocitosis acrosomal.

Mediante el uso del dominio efector de MARCKS recombinante se demostró que este dominio inhibe la vía de señal que conduce a la exocitosis acrosomal (Fig. 25) y esto podría deberse a que este dominio interacciona y/o bloquea componentes de la maquinaria de fusión necesarios para el proceso de exocitosis acrosomal. Estudios en levadura han demostrado que el dominio efector de MARCKS inhibe las etapas tardías durante la fusión de membrana y esto se debe a que el secuestro de PIP₂ por parte del dominio efector de MARCKS altera la formación de una estructura conocida como "vertex-ring" que se localiza en la periferia de las membranas a fusionarse y se encuentra enriquecida en componentes involucrados en la fusión de membrana como proteínas Rab y SNAREs (Fratti R.A., et al 2004; Schwartz M.L. and Merz A.J. 2009). Asimismo el dominio efector de MARCKS tiene la capacidad de reconocer y unirse con gran afinidad a las membranas altamente curvadas (Morton L.A., et al 2013). Se ha descrito que durante la exocitosis acrosomal se produce el hinchamiento del acrosoma lo que produce grandes invaginaciones en la membrana acrosomal externa (Zanetti N. and Mayorga L.S. 2009), por lo

que el dominio efector podría unirse a esta membrana bloqueando la fusión de las membranas.

Además se determinó que el estado de fosforilación del dominio efector de MARCKS regula su participación en la exocitosis acrosomal ya que el dominio efector fosforilado *in vitro* y la mutante fosfomimética ED4D son incapaces de inhibir la exocitosis acrosomal (Fig. 25 y 26). Estos resultados corroboran el resultado obtenido con el anticuerpo anti-fosfo MARCKS, por lo que la forma fosforilada de MARCKS sería la forma inactiva de la proteína durante la exocitosis acrosomal. Datos no publicados de nuestro Laboratorios demuestran que se requiere de la polimerización como la despolimerización de los filamentos de actina para la exocitosis acrosomal. A su vez la polimerización de los filamentos es requerida sólo en una fase temprana de la exocitosis, concordante con el acercamiento de la membrana acrosomal externa a la membrana plasmática para el ensamble de los complejos SNAREs en configuración *trans*. Una vez ensamblados en esta configuración la polimerización de los filamentos de actina no sería necesaria. MARCKS podría coordinar el ensamblaje de los filamentos de actina en puntos específicos donde se ensamblarían los complejos SNAREs y una vez que se produce la fosforilación de MARCKS se desensamblarían los filamentos de actina para que se lleve a cabo la fusión de las membranas. Esto concuerda con lo que sucede en otros procesos exocíticos como la liberación de noradrenalina por las células cromafines (Trifaró J.M., et al. 2000; Rosé S.D., et al 2001). Más estudios se requieren para establecer con mayor precisión si MARCKS regula el citoesqueleto de actina durante la exocitosis acrosomal.

La fosforilación/desfosforilación de proteínas es el principal mecanismo de control intracelular en las células eucariotas y sumado a que la síntesis de proteínas en los espermatozoides humanos es casi nula (Ward W. S. and Coffey D. S. 1991), podemos decir que esta modificación postraduccional es una de las principales vías para regular la actividad de varias proteínas durante la exocitosis acrosomal. Nuestro Laboratorio ha demostrado que el estado de fosforilación regula la actividad de varias proteínas durante la exocitosis acrosomal. Por ejemplo se ha demostrado que sinaptotagmina VI, una proteína que actúa como sensor de Ca^{2+}

durante la exocitosis acrosomal, se encuentra fosforilada en espermatozoides en reposo y una vez que se desencadena la exocitosis acrosomal se produce la desfosforilación de esta proteína, proceso mediado por calcineurina (Castillo Bennett J., et al 2010). También se ha documentado que la proteína NSF es desfosforilada durante la exocitosis acrosomal para que junto con α SNAP desensamblen los complejos SNAREs cuando se encuentran en configuración *cis* (Zarelli V., et al 2009). El cambio en el estado de fosforilación de las proteínas permite un rápido y preciso mecanismo de activación y desactivación de las proteínas, es por ello que es una de las principales vías de regulación de actividad durante la exocitosis acrosomal. MARCKS es un candidato ideal para regular las vías de señales involucradas durante la exocitosis acrosomal ya que interacciona con varias moléculas involucradas en las vías de señales desencadenadas durante la exocitosis acrosomal como PIP_2 y calmodulina y a su vez esta interacción es regulada por su estado de fosforilación.

Mediante los ensayos de reversión con PIP_2 y adenofostina (Fig. 28 y 29) y debido a que el dominio efector presenta una gran capacidad y afinidad por PIP_2 , nosotros proponemos a PIP_2 como un posible blanco celular durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados. La concentración disponible de PIP_2 es regulada por su síntesis y su degradación, pero a su vez un tercer mecanismo es capaz de regular la concentración de PIP_2 en las membranas celulares. Este mecanismo se basa en la captura reversible de este fosfolípido (Laux T., et al 2000; McLaughlin S. and Murray D. 2005). MARCKS sería capaz de regular la concentración de PIP_2 durante la exocitosis acrosomal ya que una vez que se desencadena la exocitosis acrosomal ya sea por inductores farmacológicos o fisiológicos se produce un aumento en el estado de fosforilación de MARCKS (Fig. 34). El aumento en la fosforilación de MARCKS produce la translocación de MARCKS desde las membranas celulares al citosol como se observa en la figura 36. Hay que tener en cuenta que la relación estequiométrica teórica es una molécula de MARCKS por tres de PIP_2 , por lo que por cada molécula de MARCKS que se fosforile se liberan tres moléculas de PIP_2 , las que son capaces de interactuar con otras enzimas. Por lo que una vez que se produce la fosforilación de

MARCKS aumenta de manera considerable la concentración disponible de PIP₂ en las membranas. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en otros modelos celulares en donde se demuestra que se requiere la fosforilación de MARCKS en los procesos exocíticos (Trifaró J.M., et al. 2000; Salli U., et al. 2000; Rosé S.D., et al 2001; Salli U., et al 2003), sin embargo este es primer reporte donde se demuestra como el estado de fosforilación de MARCKS puede regular la concentración disponible de PIP₂ en los procesos de fusión de membranas.

Además por crioultrainmunomarcado se corroboró que la proteína fosforilada se encuentra en el citosol celular (Fig. 35), a diferencia de la forma no fosforilada de MARCKS que se encuentra en membrana como demostraron Singer y colaboradores (Singer M., et al 2004). Lo que corrobora que el estado de fosforilación de MARCKS regula su localización intracelular y la afinidad de la proteína por los lípidos de las membranas. Otra proteína que el estado de fosforilación regula su afinidad por los lípidos de las membranas y además ha sido involucrada en la exocitosis acrosomal es sinaptotagmina VI. Se ha demostrado que el dominio C2B de sinaptotagmina VI presenta la capacidad de interactuar con los fosfolípidos de membranas en presencia o ausencia de Ca²⁺. En ausencia de Ca²⁺ la interacción es electrostática por las cargas positivas de la región polibásica del dominio C2B, mientras que en presencia de Ca²⁺, los sitios de unión al ión se introducen en la membrana (Kuo W., et al. 2009). Una vez que ocurre la fosforilación del dominio C2B se incorpora un grupo fosfato y las cargas negativas bloquean la unión a Ca²⁺ y a las membranas.

Si bien MARCKS puede ser fosforilada por varias quinasas (Sasaki Y. 2003), en este trabajo de tesis mostramos que PKC podría ser la quinasa responsable de la fosforilación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal es (Fig. 37). La actividad de las PKC es regulada en forma alostérica, de esta manera las PKC clásicas son reguladas por Ca²⁺ y DAG, las PKC noveles sólo por DAG y las PKC atípicas no responden ni a Ca²⁺ ni a DAG. Previo a estas regulaciones alostéricas las PKC deben ser fosforiladas en el *loop* de activación, en el motivo hidrofóbico y en el motivo *turn* de esta enzima. La fosforilación de estos tres motivos altamente conservados entre las diferentes isoformas de las PKC es un mecanismo fundamental para

regular la actividad de estas quinasas ya que controla interacciones intra e intermoleculares. Por ejemplo la fosforilación en el motivo *turn* es crítica ya que estabiliza el sitio de unión al sustrato y a ATP. Sin estas modificaciones postraduccionales las quinasas son inactivas (Newton A.C. 2003). Haciendo uso de un anticuerpos que reconocen los residuos de treonina 638/641 fosforilado localizados en el motivo *turn* de las PKC α/β II respectivamente, demostramos que las isoformas α/β II se activan durante la exocitosis acrosomal estimulada con A23187 (Fig. 38A y B). Además se determinó que el estado de fosforilación de los residuos de serina 643/676 que se localiza en el motivo *turn* de la PKC δ/θ respectivamente no varió cuando se estimuló la exocitosis acrosomal con A23187 (Fig 38C y D). Dado que existen diez isoformas de la familia de las PKC y que además estas isoformas comparten varios sustratos se requieren de más estudios para poder identificar las isoformas que se activan durante la exocitosis acrosomal. Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con los resultados obtenidos por Lax y colaboradores (Lax Y., et al 1999) donde demostraron que en espermatozoides de bovinos se expresan las PKC clásicas α y β I y que una vez que los espermatozoides son tratados con Ca^{2+} y 2-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), se produciría la activación de las mismas ya que se produce una rápida asociación de estas isoformas con la membrana plasmática de los espermatozoides.

Otro modelo que utilizamos para conocer con más detalles la función de MARCKS durante la exocitosis acrosomal fue el modelo de espermatozoides intactos. Durante esta etapa de la tesis usamos la propiedad de que los péptidos cargados positivamente son permeables a membrana. Existe mucha bibliografía sobre los péptidos cargados positivamente y sus posibles mecanismos para atravesar la membrana plasmática (Futaki S., et al 2001; Futaki S. 2005; Futaki S., et al 2007); sin embargo hasta el momento el mecanismo preciso de internalización de estos péptidos se desconoce. A su vez existen numerosos estudios que utilizan estos péptidos para transportar proteínas al citoplasma y estudiar su efecto biológico (Kardinal C., et al 2000; López C.I. et al, 2007). Más específicamente se ha demostrado que el péptido que posee la secuencia del dominio efector de MARCKS es permeable a la membrana plasmática de

espermatozoides en erizo de mar y se ha utilizado como una sonda para detectar la localización intracelular de PIP_2 (Garnier-Lhomme M., et al 2009).

Todos los experimentos planteados durante esta tesis demostraron que efectivamente el péptido que posee la secuencia del dominio efector de MARCKS 154-165, ingresa al espermatozoide a través de la membrana plasmática y pueden utilizarse en experimentos con espermatozoides intactos (Fig. 30B y C). Esta característica por un lado nos ayuda a corroborar los resultados obtenidos con el dominio efector recombinante en espermatozoides permeabilizados (Fig. 25B), ya que el péptido $\text{ED}_{154-165}$ -TMR también inhibió la exocitosis acrosomal estimulada por A23187 o por PMA en forma dosis dependiente (Fig. 31A). A su vez el uso del modelo de espermatozoides intacto nos permitió determinar que el péptido $\text{ED}_{154-165}$ -TMR inhibe la exocitosis acrosomal estimulada por un inductor fisiológico como progesterona (Fig. 31B) brindándonos un panorama más fisiológico de la exocitosis acrosomal.

El uso del péptido permeable del dominio efector también nos permitió estudiar los movimientos de Ca^{2+} que ocurren durante la exocitosis acrosomal. Mediante ensayos de medición de Ca^{2+} demostramos que el péptido $\text{ED}_{154-165}$ -TMR inhibe los movimientos de Ca^{2+} que se inducen durante la exocitosis acrosomal cuando se estimula este proceso con progesterona (Fig. 32B). Una vez que se une progesterona a su receptor se desencadenan las vías de señales lo que genera un aumento en la concentración de IP_3 lo que lleva a un eflujo de Ca^{2+} desde el acrosoma, lo que desencadena un ingreso masivo de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los SOCCs (Kirkman-Brown J. C., et al 2000; Kirkman-Brown J. C., 2002; Harper C. V., et al 2006; Xia J. and Ren D. 2009). En el caso de los espermatozoides incubados con el péptido permeable $\text{ED}_{154-165}$ -TMR la inhibición de los movimientos de Ca^{2+} , podría deberse a que este péptido es capaz de unir y secuestrar PIP_2 , esto evitaría que se genere IP_3 , inhibiendo el eflujo de Ca^{2+} desde el acrosoma y el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los SOCCs. Nosotros proponemos que el blanco celular del dominio efector de MARCKS que opera durante las etapas de la exocitosis acrosomal, ubicadas entre el ingreso transiente de Ca^{2+} y la

apertura de los SOCCs es PIP₂ en espermatozoides intactos. Además dado que PIP₂ y adenofostina son capaces de revertir el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en espermatozoides permeabilizados (Fig. 28 y 29), el dominio efector de MARCKS también regularía la segunda salida de Ca²⁺ desde el acrosoma luego de la apertura de los SOCCs regulando los niveles disponibles de PIP₂.

El hecho de que PIP₂ y adenofostina por sí sólo no inducen la exocitosis acrosomal se relaciona con resultados aportados por nuestro Laboratorio en donde se ha demostrado que la exocitosis acrosomal no sólo requiere la liberación de Ca²⁺ a partir de los reservorios intracelulares, sino que también requiere la activación de una compleja maquinaria de fusión que incluye Rab3A, NSF, SNAREs, complexina y sinaptotagmina VI (Fig. 14). Es decir, durante este evento secretorio se requiere de la interacción proteína-proteína, proteína-lípidos y de la movilización de Ca²⁺ a partir de reservorios internos y desde el medio extracelular. En este trabajo de tesis identificamos como MARCKS interacciona con PIP₂ y a su vez esta interacción es regulada por las isoformas de las PKC clásicas α/β II. Asimismo PIP₂ estaría involucrado en los movimientos de Ca²⁺ producidos durante la exocitosis acrosomal ya que a partir de este fosfolípido se genera IP₃, paso indispensable para generar un aumento en la concentración de Ca²⁺ durante la exocitosis acrosomal.

Cabe mencionar que a partir de PIP₂ también se generan otras importantes moléculas involucradas en las vías de señales como DAG y PIP₃, por lo que una vez que se produce la fosforilación de MARCKS durante la exocitosis acrosomal también se podría generar DAG y PIP₃ a partir de PIP₂. Se ha demostrado que se produce un aumento en la concentración de DAG cuando se estimula la exocitosis acrosomal con progesterona en espermatozoides humanos (O'Toole C.M., et al 1996). Este lípido a su vez es capaz de estimular a PKC y activar a Rab3A, una pequeña GTPasa monomérica que tiene un importante rol durante el acercamiento de las membranas en la exocitosis acrosomal (Yunes R., et al 2000; Belmonte S. A., et al 2005).

Por otro lado, dado que DAG presenta una estructura de curvatura negativa capaz de inducir la fusión de membrana en membranas sintéticas (Villar A.V., et al 2001; Dumas F., et al 2010), no se puede descartar que este lípido afecte la curvatura de la membrana ya sea de la membrana acrosomal externa y membrana plasmática. Como se mencionó previamente durante la exocitosis acrosomal la membrana acrosomal externa sufre grandes invaginaciones, estas invaginaciones podrían deberse a cambios en la composición lipídica.

Por otro lado PIP₂ podría tener un papel durante la fusión de membranas ya que este fosfolípido reclutaría proteínas involucradas en la fusión de membranas y de esta manera se generarían microdominios enriquecidos en proteínas de fusión de membranas. Además se ha descrito que PIP₂ es capaz de incrementar la afinidad de sinaptotagmina I por Ca²⁺ unas cuarentas veces lo que aumentaría la velocidad de fusión de las membranas (van den Bogaart G., et al 2012).

En este trabajo de tesis se demostró que MARCKS es desfosforilada durante la capacitación (Fig 39). Se ha reportado que MARCKS puede ser desfosforilada por proteína fosfatasa 1, proteína fosfatasa 2A o por calcineurina (CaN) una fosfatasa activada por Ca²⁺ (Seki K., et al 1995). Recientemente nuestro Laboratorio demostró que CaN está presente en espermatozoides humanos y que participa en la exocitosis acrosomal desfosforilando a sinaptotagmina VI (Castillo Bennett J., et al 2010), por lo que esta enzima podría desfosforilar a MARCKS durante la capacitación. Sin embargo se requiere de más estudios para determinar la enzima involucrada en la desfosforilación de MARCKS durante la capacitación y si la localización intracelular de MARCKS varía durante la capacitación y la función de MARCKS en la capacitación.

Varios autores han propuesto que durante la capacitación se producen cambios, los que permiten al espermatozoide secretar el gránulo acrosomal frente a un estímulo adecuado (Tsai P.S., et al 2010; Buffone M.G., et al 2012; Gadella B.M., 2012;). Se ha descrito que durante la capacitación de espermatozoides de bovinos se produce la activación de fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K), enzima implicada en la producción de PIP₂ (Etkovitz N., et al 2007), por lo que la desfosforilación de MARCKS

durante la capacitación permitiría concentrar este fosfolípido y formar probablemente microdominios enriquecidos con PIP₂, que participarían en la exocitosis acrosomal.

Se ha demostrado que un incremento en la síntesis de PIP₂ aumenta la polimerización de actina y el desarrollo de la motilidad hiperactivada durante la capacitación (Finkelstein M., et al 2013). Una posible función de MARCKS durante la capacitación es que permitiría la polimerización de actina requerida para la motilidad hiperactivada.

MARCKS, a pesar de no tener ninguna actividad enzimática, participa en varias vías de señales y esto se debe a que interacciona con moléculas como PIP₂, PKC y CaM. MARCKS presenta una estructura naturalmente desplegada (natively unfolded) y se ha evidenciado la presencia de más de 100 proteínas pertenecientes a este grupo. La persistencia evolutiva de este grupo de proteínas representa una fuerte evidencia a favor de la importancia en procesos biológicos. Además el hecho de que sólo por su cambio de estado de fosforilación MARCKS pueda regular varias moléculas de PIP₂ la convierten en una proteína ideal para regular este fosfolípido que se encuentra inmerso en una fase fluida como son las membranas biológicas.

Integrando los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, con el modelo del Laboratorio (Fig. 14) y en relación a otros datos publicados en la bibliografía, proponemos el siguiente modelo (Fig. 40). En espermatozoides no capacitados una fracción de MARCKS se encuentra fosforilada, por lo tanto se encuentra en el citosol celular y en un estado inactivo. Al iniciarse la capacitación se activarían vías de señales que llevan a la desfosforilación de la proteína MARCKS. La proteína MARCKS desfosforilada se asociaría a las membranas generando microdominios enriquecidos en PIP₂. Cuando la exocitosis acrosomal es desencadenada se produciría un incremento en la concentración del Ca²⁺ intracelular, lo que activaría varias proteínas, entre ellas las isoformas α/β II de las PKC clásicas las que producirían la fosforilación del dominio efector de MARCKS. Esta modificación postraduccional produciría la translocación de la proteína desde las membranas celulares al citosol celular, lo que incrementaría la concentración disponible de PIP₂. Finalmente, PIP₂ sería hidrolizado por la

enzima PLC generando IP₃ y DAG. IP₃ se uniría a sus receptores presentes en la membrana acrosomal externa, lo que produciría un eflujo de Ca²⁺, lo que desencadenaría las etapas finales de la exocitosis acrosomal.

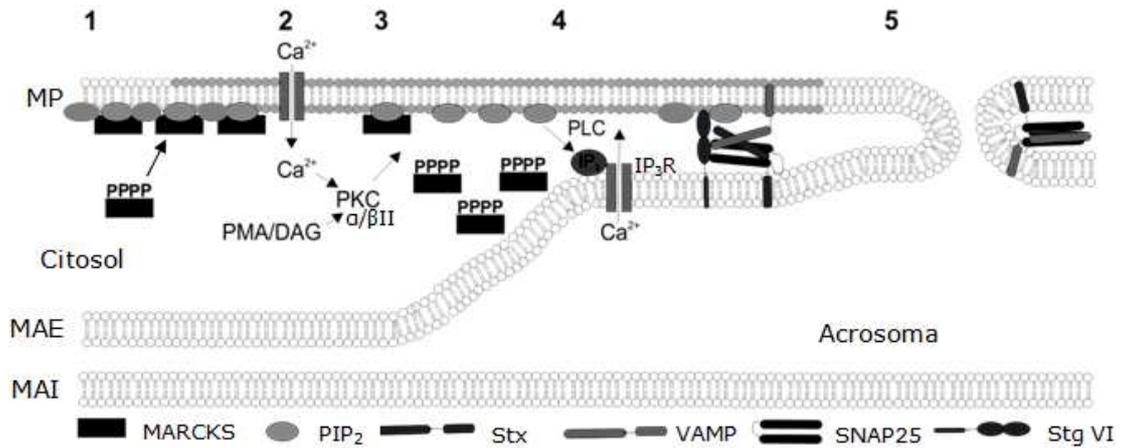


Figura 40: Modelo de la participación de MARCKS durante la capacitación y la exocitosis acrosomal. En espermatozoides no capacitados una fracción de MARCKS se encuentra fosforilada. Cuando los espermatozoides son incubados en condiciones capacitantes MARCKS es desfosforilada, por lo que se transloca desde el citosol a las membranas, permitiéndole regular la concentración disponible de PIP₂ (1). Una vez que se inicia la exocitosis acrosomal, se produce un aumento en la concentración de Ca²⁺ citosólico (2), lo que produce la activación de las PKC clásicas α/βII. Estas quinasas serían las responsables de la fosforilación del dominio efector de MARCKS durante la exocitosis acrosomal. La fosforilación de MARCKS produce la translocación de la proteína al citosol celular (3), lo que aumenta la concentración disponible de PIP₂ y le permite interactuar con PLC, enzima que hidroliza a PIP₂ generando dos importantes segundos mensajeros IP₃ y DAG. El aumento de IP₃ activa los canales presentes en el acrosoma produciendo un eflujo de Ca²⁺ desde el acrosoma, paso fundamental para la exocitosis acrosomal (4). A su vez PIP₂ interactúa con proteínas SNAREs y con sinaptotagmina (Stg) lo que lleva a la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática. Stx, syntaxina; VAMP, proteína de membrana asociada a vesícula; SNAP-25, proteína 25 asociada a membrana; IP₃R, receptores de IP₃; MAE, membrana acrosomal externa; MAI, membrana acrosomal interna; MP, membrana plasmática.

RESUMEN

La exocitosis acrosomal (EA) es un proceso secretorio regulado por Ca^{2+} fundamental para que el espermatozoide fecunde el ovocito. Sólo aquellos espermatozoides que han sufrido la EA pueden atravesar la ZP y luego fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

A partir de datos aportados por nuestro grupo de trabajo y otros laboratorios se ha logrado dilucidar, la maquinaria proteica que se activa durante la EA. Si bien los lípidos tienen un papel fundamental durante la fusión de membranas ya sea actuando como plataformas que permiten la unión de proteínas a las membranas o actuando en las vías de señales, hasta el momento se desconoce la función de los lípidos en la EA y como estos son regulados en este proceso secretorio.

La proteína MARCKS es conocida como el principal sustrato de PKC en numerosos modelos celulares y ha sido clasificada como una *pipmodulina* ya que esta proteína es capaz de regular los niveles disponibles de PIP_2 en las membranas. MARCKS ha sido involucrada en varios procesos exocíticos pero aun su presencia en espermatozoides humanos no ha sido demostrada.

Durante este trabajo de tesis y mediante el uso de diferentes anticuerpos, capaces de reconocer diferente regiones de la proteína, se demostró que MARCKS se encuentra en espermatozoides humanos y que la misma localiza en la cola, región postacrosomal y en la región acrosomal en espermatozoides humanos.

Mediante el uso del modelo de espermatozoides permeabilizados con estreptolisina O en donde se generan poros sólo en la membrana plasmática de los espermatozoides y utilizando un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de MARCKS y otro anticuerpo que reconoce el dominio efector de MARCKS se demostró que MARCKS participa en la vías de señales que conducen a la EA.

Debido a que el dominio efector de MARCKS es el responsable de casi todas las funciones de MARCKS, se evaluó su efecto en la EA. Evidencias presentadas en este trabajo de tesis demostraron que el dominio efector es

capaz de inhibir la EA ya sea cuando se estimula con Ca^{2+} o PMA (un conocido inductor de la EA), por lo que este dominio se une y bloquea componentes involucrados en las vías de señales que conduce a la EA.

Mediante el uso del dominio efector de MARCKS fosforilado *in vitro* y un dominio mutante fosfomimético, se demostró que el estado de fosforilación de MARCKS regula su participación en la EA. Asimismo un anticuerpo que reconoce los residuos de serina fosforilados del dominio efector de MARCKS fue incapaz de inhibir la EA, por lo que la forma fosforilada de MARCKS es la forma inactiva de la proteína durante la EA.

Uno de los posibles blancos celulares del dominio efector de MARCKS durante la EA sería PIP_2 ya que se ha demostrado que MARCKS en su forma no fosforilada secuestra PIP_2 en las membranas y una vez que es fosforilada la proteínas se transloca al citosol celular dejando disponible a este fosfolípido para que interaccione con otras proteínas. En nuestro modelo de espermatozoides permeabilizados la adición de PIP_2 a espermatozoides preincubados con el dominio efector de MARCKS revirtió el efecto inhibitorio de este dominio sobre la EA. A su vez demostramos que una vez que se produce el secuestro de PIP_2 por el dominio efector de MARCKS, se bloquea la producción de IP_3 , lo que impide los movimientos de Ca^{2+} que ocurren en la EA. Esto se comprobó ya que el uso de adenofostina un agonista de canales de Ca^{2+} sensibles a IP_3 , revirtió el efecto inhibitorio del dominio efector de MARCKS en espermatozoides permeabilizados.

Para determinar si el dominio efector de MARCKS inhibe los movimientos de Ca^{2+} que ocurren durante la EA utilizamos un péptido que posee la secuencia aminoacídica del dominio efector de MARCKS y dado a su alto número de residuos cargados positivamente es permeable a membrana como se demostró en esta tesis. Cuando espermatozoides intactos fueron preincubados con el péptido permeable del dominio efector este inhibió lo movimientos de Ca^{2+} que ocurren en la EA cuando se estimula con progesterona, un inductor fisiológico de este proceso secretorio.

En este trabajo de tesis se mostró que MARCKS es fosforilada y que se produce su translocación desde las membranas celulares al citosol celular

cuando se estimula la EA con diferentes inductores. Además este cambio en el estado de fosforilación podría estar mediado por las PKC clásicas α/β II. De esta manera determinamos que una vez de que se desencadenan las vías de señales que conducen a la EA MARCKS es fosforilada, por lo que se transloca al citosol celular, dejando disponible a PIP_2 . Asimismo en este trabajo de tesis se demostró que MARCKS es desfosforilada durante la capacitación, pero hasta el momento se desconoce la localización intracelular y la función de MARCKS durante la capacitación.

Mediante los resultados de tesis podemos concluir que una vez que se desencadena la EA se produce la fosforilación y translocación de MARCKS desde las membranas al citosol celular, lo que incrementaría la concentración disponible de PIP_2 . Finalmente, PIP_2 sería hidrolizado por la enzima PLC generando IP_3 y DAG. IP_3 se uniría a sus receptores presentes en la membrana acrosomal externa, lo que produciría un eflujo de Ca^{2+} , lo que desencadenaría la exocitosis acrosomal. Estos resultados nos permiten plantear que MARCKS es un componente importante en las vías de transducción de señales durante la exocitosis acrosomal.

BIBLIOGRAFÍA

Aderem A. (1992) The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell*. 71(5):713-6.

Albert A.P. (2011) Gating mechanisms of canonical transient receptor potential channel proteins: role of phosphoinositols and diacylglycerol. *Adv Exp Med Biol*. 704:391-411.

Alnagar F.A., Brennan P., Brewis I.A. (2010) Bicarbonate-dependent serine/threonine protein dephosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *J Androl*. 31(4):393-405.

Arbuzova A., Schmitz A.A., Vergères G. (2002) Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J*. 362(Pt 1):1-12.

Arnoult C., Kazam I. G., Visconti P. E., Kopf G. S., Villaz M., and Florman H. M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc.Natl.Acad.Sci* 96, 6757-6762.

Austin C. R. (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 4:581-596.

Avella M.A. and Dean J. (2011) Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(50):19843-4.

Avenarius M.R., Hildebrand M.S., Zhang Y., Meyer N.C., Smith LL.H., Kahrizi K., Najmabadi H., Smith R.J. (2009). Humanmale infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 84:505-510.

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*. 16;269 (50):31845-9.

Bedu-Addo K., Costello S., Harper C., Machado-Oliveira G., Lefievre L., Ford C., Barratt C., Publicover S. (2008). Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm – a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int. J. Dev. Biol*. 52: 615-626.

Belmonte S. A., Lopez C. I., Roggero C. M., De Blas G. A., Tomes C. N. and Mayorga, L. S. (2005) Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. *Developmental Biology* 285, 393-408.

Blackshear P.J. (1993) The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol Chem.* 268(3):1501-4.

Boerke A., Dieleman S. J., and Gadella B. M. (2007) A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68, S147-S155.

Bohring C. and Krause W. (1999) The characterization of human spermatozoa membrane proteins--surface antigens and immunological infertility. *Electrophoresis.* 20(4-5):971-6.

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

Branham MT, Bustos MA, De Blas GA, Rehmann H, Zarelli VE, Treviño CL, Darszon A, Mayorga LS, Tomes CN. (2009) Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem.* 284(37):24825-39.

Breitbart H., Lax J., Rotem R., Naor Z. (1992) Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J.* 281 (Pt 2):473-6.

Breitbart H. and Naor Z. (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod.* 4(3):151-9.

Brenker C., Goodwin N., Weyand I., Kashikar N.D., Naruse M., Krähling M., Müller A., Kaupp U.B., Strünker T. (2012) The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* 31(7):1654-65.

Buffone M.G., Ijiri T.W., Cao W., Merdiushev T., Aghahanian H.K. and Gerton G.L. (2012) Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility.

Burgos M. H. and Fawcett D. W. (1955) Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). *J Biophys.Biochem.Cytol.* 1, 287-300.

Caballero J., Frenette G., Sullivan R. (2010) Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int.* 2011:757194.

Castellano L. E., Trevino C. L., Rodríguez D., Serrano C. J., Pacheco J., Tsutsumi V., Felix, R. and Darszon A. (2003) Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Letters* 541, 69-74.

Castillo Bennett J., Roggero C. M., Mancifesta F. E. y Mayorga L. S. (2010) Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 2010 Aug 20;285(34):26269-78.

Chang M. C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.

Chiarini-Garcia H. and Russell L. D. (2002) Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* 123, 567-577.

Costello S., Michelangeli F., Nash K., Lefievre L., Morris J., Machado-Oliveira G., Barratt C., Kirkman-Brown J., Publicover S. (2009) Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction.* 138(3):425-37.

Cross N. L. (1998) Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.

Darszon A., Acevedo J.J., Galindo B.E., Hernández-González E.O., Nishigaki T, Treviño C.L., Wood C., Beltrán C. (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* 131(6):977-88.

De Blas G., Michaut M., Trevino C. L., Tomes C. N., Yunes R., Darszon A., and Mayorga, L. S. (2002) The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 277, 49326-49331.

De Blas G. A., Roggero C. M., Tomes C. N. and Mayorga, L. S. (2005) Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* 3 (10), e323.

De Rooij D. G. and Russell L. D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776-798.

Di Paolo G. and De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. 443(7112):651-7.

Diaz A., Dominguez L., Fornes M. W., Burgos M. H. and Mayorga L. S. (1996) Acrosome content release in streptolysin O permeabilized mouse spermatozoa. *Andrologia* 28, 21-26.

Dietrich U., Krüger P., Gutberlet T., Käs J.A. (2009) Interaction of the MARCKS peptide with PIP₂ in phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1788(7):1474-81.

Dulong S., Goudenege S., Vuillier-Devillers K., Manenti S., Poussard S., Cottin P. (2004) Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase Calpha and calpain proteolytic cleavage. *Biochem J*. 382(Pt 3):1015-23.

Duman J. G. and Forte J. G. (2003) What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am.J Physiol Cell Physiol* 285, C237-C249.

Dumas F., Byrne R.D., Vincent B., Hobday T.M., Poccia D.L., Larijani B. (2010) Spatial regulation of membrane fusion controlled by modification of phosphoinositides. *PLoS One*. 5(8):e12208.

Ebinu J.O., Bottorff D.A., Chan E.Y., Stang S.L., Dunn R.J., Stone J.C. (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*. 280(5366):1082-6.

Eddy E. M. and O'Brien D. A. (1995) The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction* (Knobil E. and Neill J.D., ed) Raven Press, New York.

Eddy E. M., Toshimori K., and O'Brien D. A. (2003) Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc.Res.Tech*. 61, 103-115.

Eddy E. M. (2007) The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc.Reprod Fertil.Suppl* 65, 45-62.

Eliyahu E., Tsaadon A., Shtraizent N., Shalgi R. (2005) The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat. *Reproduction*. 129(2):161-70.

Eliyahu E., Shtraizent N., Tsaadon A., Shalgi R. (2006) Association between myristoylated alanin-rich C kinase substrate (MARCKS) translocation and cortical granule exocytosis in rat eggs. *Reproduction*. 131(2):221-31.

Ellerman D.A., Pei J., Gupta S., Snell W.J., Myles D., Primakoff P. (2009) Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Mol Reprod Dev*. 76(12):1188-99.

Etkovitz N., Rubinstein S., Daniel L. and Breitbart, H. (2007) Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 77, 263-273.

Finkelstein M., Megnagi B., Ickowicz D., Breitbart H. (2013) Regulation of sperm motility by PIP2(4,5) and actin polymerization. *Dev Biol*. 381(1):62-72.

Flesch F. M., Colenbrander B., van Golde L. M., and Gadella B. M. (1999) Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 262, 787-792.

Flesch F. M. and Gadella B. M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim.Biophys.Acta* 1469, 197-235.

Flesch F. M., Brouwers J. F., Nievelstein P. F., Verkleij A. J., van Golde L. M., Colenbrander B., and Gadella B. M. (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114, 3543-3555.

Florman H.M. and Storey B.T. (1982) Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol.* 91(1):121-30.

Florman H.M., Jungnickel M.K., Sutton K.A. (2008) Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol.* 52(5-6):503-10.

Fraser L.R. (2010) The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev.* 77(3):197-208.

Fratti R.A., Jun Y., Merz A.J., Margolis N., Wickner W. (2004) Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles. *J Cell Biol.* 167(6):1087-98.

Fukami K., Nakao K., Inoue T., Kataoka Y., Kurokawa M., Fissore R.A., Nakamura K., Katsuki M., Mikoshiba K., Yoshida N., Takenawa T. (2001) Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science.* 292(5518):920-3.

Fukami K., Yoshida M., Inoue T., Kurokawa M., Fissore R.A., Yoshida N., Mikoshiba K., Takenawa T. (2003) Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol.* 161(1):79-88.

Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K. and Sugiura Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem.* 276, 5836-5840.

Futaki S. (2005) Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 547-558.

Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T. and Jones A. T. (2007) Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 784-787.

Gadella B. M., Gadella T. W. Jr., Colenbrander, B., van Golde L. M., and Lopes-Cardozo, M. (1994) Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon. *J Cell Sci* 107 (8), 2151-2163.

Gadella, B. M., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L. M., Colenbrander, B., and Gadella, T. W., Jr. (1995) Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci* 108 (3), 935-946.

Gadella B.M. (2012) Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod Fertil Dev.* 2012;25(1):26-37.

Gadi D., Wagenknecht-Wiesner A., Holowka D., Baird B. (2011) Sequestration of phosphoinositides by mutated MARCKS effector domain inhibits stimulated Ca(2+) mobilization and degranulation in mast cells. *Mol Biol Cell.* 22(24):4908-17.

Gallant C., You J.Y., Sasaki Y., Grabarek Z., Morgan K.G. (2005) MARCKS is a major PKC-dependent regulator of calmodulin targeting in smooth muscle. *J Cell Sci.* 118(Pt 16):3595-605.

Gambhir A., Hangyás-Mihályiné G., Zaitseva I., Cafiso D.S., Wang J., Murray D., Pentylala S.N., Smith S.O., McLaughlin S. (2004) Electrostatic sequestration of PIP₂ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys J.* 86(4):2188-207.

Ganguly A., Bansal P., Gupta T., Gupta S.K. (2010) 'ZP domain' of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 8:110.

Garnier-Lhomme M., Byrne R.D., Hobday T.M., Gschmeissner S., Woscholski R., Poccia D.L., Dufourc E.J., Larijani B. (2009) Nuclear envelope remnants: fluid membranes enriched in sterols and polyphosphoinositides. *PLoS One.* 4(1):e4255.

Garrett A.M., Schreiner D., Lobas M.A., Weiner J.A. (2012) γ -protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway. *Neuron*. 74(2):269-76.

Glaser M., Wanaski S., Buser C.A., Boguslavsky V., Rashidzade W., Morris A., Rebecchi M., Scarlata S.F., Runnels L.W., Prestwich G.D., Chen J., Aderem A., Ahn J., McLaughlin S. (1996) Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) produces reversible inhibition of phospholipase C by sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lateral domains.

Goodall A.R., Turner N.A., Walker J.H., Ball S.G., Vaughan P.F. (1997) Activation of protein kinase C- α and translocation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate correlate with phorbol ester-enhanced noradrenaline release from SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 68(1):392-401.

Gupta S. K., Chakravarty S., Suraj K., Bansal P., Ganguly A., Jain M. K., and Bhandari B. (2007) Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc.Reprod Fertil.Suppl* 63, 203-216.

Gur Y. and Breitbart H. (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*. 20, 411-416.

Harper C. V., Barratt C. L., Publicover S. J., and Kirkman-Brown J. C. (2006) Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biol Reprod* 75, 933-939.

Harper C.V., Cummeron J.A., White M.R., Publicover S.J., Johnson P.M. (2010) Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci*. 121(Pt 13):2130-5.

Harrison R. A. and Gadella B. M. (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351

Hartwig J.H., Thelen M., Rosen A., Janmey P.A., Nairn A.C., Aderem A. (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*. 356(6370):618-22.

Hasuwa H., Muro Y., Ikawa M., Kato N., Tsujimoto Y., Okabe M. (2010) Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. *Exp Anim.* 59(1):105-7.

Hay J. C., Fiset P. L., Jenkins G.H., Fukami K., Takenawa T., Anderson R.A., Martin T.F. (1995) ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion. *Nature.* 374(6518):173-7.

Herrick S. B., Schweissinger D. L., Kim S. W., Bayan K. R., Mann S., and Cardullo R. A. (2005) The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202, 663-671.

Hinrichsen R.D. and Blackshear P.J. (1993) Regulation of peptide-calmodulin complexes by protein kinase C in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(4):1585-9.

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

Hong S.J., Chiu P.C., Lee K.F., Tse J.Y., Ho P.C., Yeung W.S. (2009) Cumulus cells and their extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass. *Fertil Steril.* 92(3):971-8.

Ikawa M., Inoue N., Benham A.M., Okabe M. (2010) Fertilization: a sperm's journey to an interaction with the oocyte. *J Clin Invest.* 4: 984-994.

Inoue N., Ikawa M., Isotani A., Okabe M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434(7030):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(50):20008-11.

Jha K. N., Shumilin I. A., Digilio L. C., Chertihin O., Zheng H., Schmitz G., Visconti P. E., Flickinger C. J., Minor W., and Herr J. C. (2008) Biochemical And Structural Characterization Of Apolipoprotein A-I Binding Protein, A

Novel Phosphoprotein With A Potential Role In Sperm Capacitation. *Endocrinology* 149 (5), 2108-2120.

Jin M., Fujiwara E., Kakiuchi Y., Okabe M., Satouh Y., Baba S.A., 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.* 22;108(12):4892-6.

Jungnickel M. K., Marrero H., Birnbaumer L., Lemos J. R., and Florman H. M. (2001) Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3, 499-502.

Jungnickel M.K., Sutton K.A., Wang Y., Florman H.M. (2007) Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. *Dev Biol.* 304(1):116-26.

Kalwa H. and Michel T. (2011) The MARCKS protein plays a critical role in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism and directed cell movement in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 286(3):2320-30.

Kallajoki M, Malmi R, Virtanen I, Suominen J. (1995) Glycoconjugates of human sperm surface. A study with fluorescent lectin conjugates and lens culinaris agglutinin affinity chromatography. *Cell Biol Int Rep.* 9(2):151-64.

Kardinal C., Konkol B., Schulz A., Posern G., Lin H., Adermann K., Eulitz M., Estrov Z., Talpaz M., Arlinghaus R. B. and Feller S. M. (2000) Cell-penetrating SH3 domain blocker peptides inhibit proliferation of primary blast cells from CML patients. *FASEB J* 14, 1529-1538.

Kirkman-Brown J. C., Bray C., Stewart P. M., Barratt C. L., and Publicover, S. J. (2000) Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev.Biol* 222, 326-335.

Kirkman-Brown J. C., Punt E. L., Barratt C. L., and Publicover S. J. (2002) Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23, 306-315.

Koch M. and Holt M. (2012) Coupling exo- and endocytosis: an essential role for PIP_2 at the synapse. *Biochim Biophys Acta.* 1821(8):1114-32.

Kuo W., Herrick D.Z., Ellena J.F., Cafiso D.S. (2009) The calcium-dependent and calcium-independent membrane binding of synaptotagmin 1: two modes of C2B binding. *J Mol Biol.* 387(2):284-94.

Kuroda Y., Kaneko S., Yoshimura Y., Nozawa S. and Mikoshiba K. (1999) Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptors in human sperm? *Life Sci* 65: 135-143.

Lampe W.R., Park J., Fang S., Crews A.L., Adler KB. (2012) Calpain and MARCKS protein regulation of airway mucin secretion. *Pulm Pharmacol Ther.* 25(6):427-31.

Laux T., Fukami K., Thelen M., Golub T., Frey D., Caroni P. (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol.* 149(7):1455-72. *J Biol Chem.* 271(42):26187-93.

Lax Y., Rubinstein S. and Breitbart H. (1997) Subcellular distribution of protein kinase C alpha and betaI in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol Reprod.* 56(2):454-9.

Leypold B. G., Yu C. R., Leinders-Zufall T., Kim M. M., Zufall F., Axel R. (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):6376-81.

Li Y., Martin L.D., Spizz G., Adler K.B. (2001) MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 276: 40982-40990.

Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 17;471(7338):387-91.

Lishko P.V., Kirichok Y., Ren D., Navarro B., Chung J.J., Clapham D.E. (2011) The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol.* 74:453-75.

Lopez C.I., Belmonte S.A., De Blas G.A., Mayorga L.S. (2007) Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. *FASEB J.* 21(14):4121-30.

López C.I., Pelletán L.E., Suhaiman L., De Blas G.A., Vitale N., Mayorga L.S., Belmonte S.A. (2012) Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1821(9):1186-99.

Marquez B. and Suarez S.S. (2007) Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biol Reprod.* 76(4):660-5.

Martínez-López P., Santi C.M., Treviño C.L., Ocampo-Gutiérrez A.Y., Acevedo J.J., Alisio A., Salkoff L.B., Darszon A. 2009 Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 381:204–209.

Matsubara M., Titani K., Taniguchi H., Hayashi N. (2003) Direct involvement of protein myristoylation in myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)-calmodulin interaction. *J Biol Chem.* 278(49):48898-902.

Mayorga L.S., Tomes C.N., Belmonte S.A. (2007) Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59: 286–292.

McLaughlin S. and Aderem A. (1995) The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci.* 1995 Jul;20(7):272-6.

McLaughlin S. and Murray D. (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature.* 438(7068):605-11.

Michaut M. A, Tomes C. N., De Blas G., Yunes R. and Mayorga, L. S. (2000) Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc.Natl.Acad.Sci* 97, 9996-10001.

Michaut M.A., De Blas G., Tomes C. N., Yunes R., Fukuda M. and Mayorga, L. S. (2001) Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. *Dev.Biol* 235, 521-529.

Michaut M.A., Williams C.J., Schultz R.M. (2005) Phosphorylated MARCKS: a novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol.* 280(1):26-37.

Milosevic I., Sørensen J.B., Lang T., Krauss M., Nagy G., Haucke V., Jahn R., Neher E. (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci.* 25(10):2557-65.

Morton L.A., Yang H., Saludes J.P., Fiorini Z., Beninson L., Chapman E.R., Fleshner M., Xue D., Yin H. (2013) MARCKS-ED peptide as a curvature and lipid sensor. *ACS Chem Biol.* 2013 Jan 18;8(1):218-25.

Mosevitsky M and Silicheva I. (2011) Subcellular and regional location of "brain" proteins BASP1 and MARCKS in kidney and testis. *Acta Histochem.* 2011 Jan;113(1):13-8.

Netzel-Arnett S., Bugge T. H., Hess R. A., Carnes K., Stringer B. W., Scarman A. L., Hooper J. D., Tonks I. D., Kay G. F., and Antalis T. M. (2009) The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Serine Protease PRSS21 (Testisin) Imparts Murine Epididymal Sperm Cell Maturation and Fertilizing Ability. *Biol Reprod.*;81(5):921-32.

Newton A.C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 370(Pt 2):361-71.

Ni Y., Li K., Xu W., Song L., Yao K., Zhang X., Huang H., Zhang Y., and Shi Q. X. (2007) Acrosome Reaction Induced by Recombinant Human Zona Pellucida 3 Peptides rhuZP3a22-176 and rhuZP3b177-348 and Their Mechanism. *Journal of Andrology* 28, 381-388.

Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., and Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19: 426-436.

Osman R.A., Andria M.L., Jones A.D., Meizel S. (1989) Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833.

O'Toole C.M., Roldan E.R., Hampton P., Fraser L.R. (1996) A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod.* 2(5):317-26.

O'Toole C.M., Arnoult C., Darszon A., Steinhardt R.A., Florman HM. (2000) Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11(5):1571-84.

Ott L.E., Sung E.J., Melvin A.T., Sheats M.K., Haugh J.M., Adler K.B., Jones S.L. (2013) Fibroblast Migration Is Regulated by Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) Protein. *PLoS One.* 8(6):e66512.

Reid A.T., Redgrove K., Aitken R.J., Nixon B. (2011) Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl.* 13(1):88-96.

Ren D., and Xia J. (2010) Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda).* 25(3):165-75.

Rhee J.S., Betz A., Pyott S., Reim K., Varoqueaux F., Augustin I., Hesse D., Südhof T.C., Takahashi M., Rosenmund C., Brose N. (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell.* 108(1):121-33.

Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L. V., and Lebleu B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem.* 278, 585-590.

Roggero C.M., De Blas G.A., Dai H., Tomes C.N., Rizo J., Mayorga L.S. (2007). Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 282(36):26335-43.

Roldan E.R. and Fragio C. (1994) Diacylglycerols stimulate phospholipase A2 and subsequent exocytosis in ram spermatozoa. Evidence that the effect is not mediated via protein kinase C. *Biochem J.* 297 (Pt 1):225-32.

Roldan E.R. and Shi Q.X. (2007) Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* 12:89-104.

Rosé S.D., Lejen T., Zhang L., Trifaró J.M. (2001) Chromaffin cell F-actin disassembly and potentiation of catecholamine release in response to protein kinase C activation by phorbol esters is mediated through myristoylated alanine-rich C kinase substrate. *J Biol Chem* 276: 36757–36763.

Sabeur K., Cherr G.N., Yudin A.I., Overstreet J.W. (1998) Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote*. 6(2):103-11.

Salli U., Supancic S., Stormshak F. (2000) Phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein is associated with bovine luteal oxytocin exocytosis. *Biol Reprod*. 63(1):12-20.

Salli U., Saito N., Stormshak F. (2003) Spatiotemporal interactions of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein with the actin cytoskeleton and exocytosis of oxytocin upon prostaglandin F₂ α stimulation of bovine luteal cells. *Biol Reprod* 69: 2053–2058.

Santi C.M., Martínez-López P., de la Vega-Beltrán J.L., Butler A., Alisio A., Darszon A., Salkoff L. (2010) The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 584:1041–1046.

Sasaki Y. (2003) New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: Rho-kinase-dependent myristoylated alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation and regulation of neurofilament structure in neuronal cells. *J Pharmacol Sci*. 93(1):35-40.

Satoh K., Matsuki-Fukushima M., Qi B., Guo M.Y., Narita T., Fujita-Yoshigaki J., Sugiya H. (2009) Phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is involved in the cAMP-dependent amylase release in parotid acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296(6):G1382-90.

Schwartz M.L. and Merz A.J. (2009) Capture and release of partially zipped trans-SNARE complexes on intact organelles. *J Cell Biol*. 185(3):535-49.

Seki K., Chen H.C., Huang K.P. (1995) Dephosphorylation of protein kinase C substrates, neurogranin, neuromodulin, and MARCKS, by calcineurin and protein phosphatases 1 and 2A. *Arch Biochem Biophys*. 316(2):673-9.

Sheetz M.P., Sable J.E., Döbereiner H.G. (2006) Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:417-34.

Singer M., Martin L.D., Vargaftig B.B., Park J., Gruber A.D., Li Y., Adler KB. (2004) A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nat Med.* 10(2):193-6.

Soh J.W., Lee E.H., Prywes R., Weinstein I.B. (1999) Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol.* 19(2):1313-24.

Stowers L., Holy T.E., Meister M., Dulac C., Koentges G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 295(5559):1493-500.

Suarez S. S. (2008) Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update.* 14(6):647-57.

Sullivan R., Frenette G., Girouard J. (2007) Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 9(4):483-91.

Sundaram M., Cook H.W., Byers D.M. (2004) The MARCKS family of phospholipid binding proteins: regulation of phospholipase D and other cellular components. *Biochem Cell Biol.* 82(1):191-200.

Thelen M., Rosen A., Nairn A.C., Aderem A. (1991) Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature.* 351(6324):320-2.

Thérien I., Bousquet D., and Manjunath P. (2001) Effect of Seminal Phospholipid-Binding Proteins and Follicular Fluid on Bovine Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 65, 41-51.

Thérien I. and Manjunath P. (2003) Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 69:1408–1415.

Tomes C.N., Michaut M., De B.G., Visconti P., Matti U. and Mayorga L.S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 243: 326-338.

Tomes C.N., De Blas G.A., Michaut M.A., Farre E.V., Cherhitin O., Visconti P.E. and Mayorga L.S. (2005) alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 11: 43-51.

Tomes C.N. (2007) Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65:275-91.

Travis A. and Kopf G.S. (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* 110(6):731-736.

Trifaró J.M., Rosé S.D., Lejen T., Elzagallaai A. (2000) Two pathway control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* 82: 339-352.

Tsai P.S., Garcia-Gil N., van Haefen T., Gadella B.M. (2010) How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. *PLoS One.* 5(6):e11204.

van den Bogaart G., Meyenberg K., Diederichsen U., Jahn R. (2012) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca²⁺ affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. *J Biol Chem.* 2012 May 11;287(20):16447-53.

van den Bogaart G., Meyenberg K., Risselada H.J., Amin H., Willig K.I., Hubrich B.E., Dier M., Hell S.W., Grubmüller H., Diederichsen U., Jahn R. (2011) Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature.* 2011 Oct 23;479(7374):552-5.

Vannier B., Peyton M., Boulay G., Brown D., Qin N., Jiang M., Zhu X., Birnbaumer L. (1999) Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):2060-4.

Vazquez J.M. and Roldan E.R. (1997) Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca²⁺-dependent exocytosis in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 48(1):95-105.

Villar A.V., Goñi F.M., Alonso A. (2001) Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion. *FEBS Lett.* 494(1-2):117-20.

Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P., and Kopf G. S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.

Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Leclerc P., Connors S. A., Pan D., Olds-Clarke P., and Kopf G. S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-1150.

Visconti P.E., Galantino-Homer H., Moore G.D., Bailey J.L., Ning X., Fornes M., Kopf G.S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl.* 19(2):242-8.

Visconti P.E., Westbrook V.A., Chertihin O., Demarco I., Sleight S., Diekman A.B. (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53(1-2):133-50.

Visconti P.E. (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(3):667-8.

Visconti P.E., Krapf D., de la Vega-Beltrán J.L., Acevedo J.J., Darszon A. (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13(3):395-405.

Walensky L.D. and Snyder S.H. (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130: 857–869.

Wang J., Gambhir A., Hangyás-Mihályné G., Murray D., Golebiewska U., McLaughlin S. (2002) Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions.

Ward W. S. and Coffey D. S. (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44, 569-574.

Wen P.J., Osborne S.L., Zanin M., Low P.C., Wang H.T., Schoenwaelder S.M., Jackson S.P., Wedlich-Söldner R., Vanhaesebroeck B., Keating D.J., Meunier F.A. (2011) Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun.* 2:491.

Wiederkehr A., Staple J., Caroni P. (1997) The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Exp Cell Res.* 236(1):103-16.

Xia J., Ren D. (2009) Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod.* 80(6):1092-8.

Xiao X. and Yang W. X. (2007) Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B* 8, 498-506.

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(4):317-30.

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

Yang W. X., and Sperry A. O. (2003) C-Terminal Kinesin Motor KIFC1 Participates in Acrosome Biogenesis and Vesicle Transport. *Biol Reprod* 69, 1719-1729.

Yunes R., Michaut M., Tomes C. and Mayorga L. S. (2000) Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod* 62, 1084-1089.

Yunes R., Tomes C., Michaut M., De Blas G., Rodriguez F., Regazzi R. and Mayorga L. S. (2002) Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS Lett.* 525, 126-130.

Zanetti N. and Mayorga LS. (2009) Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod.* 81(2):396-405.

Zeng X-H., Yang C., Kim S.T., Lingle C.J., Xia X-M. (2011) Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci* 108:5879–5884.

Zeng Y., Clark E. N., and Florman H. M. (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev.Biol* 171, 554-563.

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.* 2012;58 (3):330-7.

TRABAJO PUBLICADO