



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

Relevancia de las proteínas de la familia CRISP para la fertilidad: estudios sobre modelos de animales “knockout”

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

Lic. Nicolás Gastón Brukman

Director de tesis: Dra. Patricia S. Cuasnicú

Director Asistente: Dra. Vanina G. Da Ros

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

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

Buenos Aires, 12 de Marzo de 2018

Relevancia de las proteínas de la familia CRISP para la fertilidad: estudios sobre modelos de animales “knockout”

Las proteínas CRISP1-4 (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*) se expresan en el tracto reproductor masculino de mamíferos y participan en el proceso de fertilización. El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la relevancia de las mismas para la fertilidad. En primer lugar, sabiendo que la proteína espermática CRISP2 participa en el proceso de fusión de gametas, nos propusimos estudiar su relevancia para la fertilidad a través del empleo de animales *knockout* (KO). Si bien los machos KO resultaron fértiles, los mismos exhibían deficiencias en la fertilización *in vivo*. Asimismo, estudios de fertilización *in vitro* revelaron que los espermatozoides KO presentaban defectos en su capacidad para penetrar las envolturas del ovocito y fusionarse con el mismo. Consistentemente, estos espermatozoides mostraban menores niveles de hiperactividad así como un aumento exacerbado de los niveles de Ca^{2+} intracelular durante la capacitación. En conjunto, estos resultados apoyan la relevancia de CRISP2 no solo para la fertilización sino también para la fertilidad de un individuo. Por otro lado, teniendo en cuenta que se han encontrado menores niveles de CRISP2 en pacientes infértiles con problemas en la motilidad espermática, el segundo objetivo consistió en estudiar si dichos defectos en la motilidad están asociados a una desregulación del Ca^{2+} . Apoyando los resultados correspondientes al primer objetivo, observamos una asociación negativa entre la expresión de CRISP2 y el aumento de Ca^{2+} intracelular que ocurre durante la capacitación, indicando que CRISP2 cumpliría un rol en la regulación de Ca^{2+} en el espermatozoide humano. Asimismo, observamos que la entrada de Ca^{2+} que ocurre a través de CatSper podía prevenirse inhibiendo la fosforilación de proteínas en tirosina que se observa durante la capacitación, sugiriendo que la modulación de esta vía podría utilizarse como estrategia terapéutica en espermatozoides con niveles alterados de Ca^{2+} . Finalmente, teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia y la redundancia funcional entre las proteínas CRISP, como tercer objetivo evaluamos el fenotipo reproductivo de animales deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente. Si bien la fertilidad de los animales doble KO para *Crisp2* y *Crisp4* fue normal, los ratones deficientes en tres o en las cuatro proteínas CRISP presentaron severos defectos de fertilidad asociados a fallas en la fertilización observadas tanto *in vivo* como *in vitro*, confirmando no solo la relevancia de estas proteínas para la fertilidad sino también la existencia de mecanismos de cooperación funcional entre miembros de la familia. En conjunto, estos estudios contribuirán a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso de fertilización contribuyendo al desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad así como de regulación de la fertilidad.

Palabras clave: espermatozoide, fertilidad, fertilización, capacitación, CRISP, *knockout*

Relevance of proteins from CRISP family for fertility: studies on knockout animal models

The Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP1-4) are expressed in the mammalian male reproductive tract and participate in the fertilization process. The main aim of this Thesis has been to study the relevance of CRISP proteins for fertility. In first place, based on the proposed role of the sperm protein CRISP2 in gamete fusion in both rodents and humans, and the evidence in humans showing that aberrant expression of this protein is associated with male infertility, we evaluated the relevance of CRISP2 for fertility by studying the phenotype of *Crisp2* knockout (KO) mice. Our results showed that while mutant males presented normal fertility, they exhibited clear defects in *in vivo* fertilization. In addition, *in vitro* fertilization studies revealed that CRISP2-deficient sperm exhibited deficiencies to penetrate the egg vestments and to fuse with the egg. Consistent with this, KO sperm showed lower levels of hyperactivation as well as an exacerbated increase in intracellular Ca^{2+} levels during capacitation. Together, these results support the relevance of CRISP2 for both fertilization and fertility. Secondly, considering that lower levels of CRISP2 were detected in infertile patients with sperm motility problems, the second objective of this work was to investigate if those motility defects could be associated with a dysregulation in intracellular Ca^{2+} levels. Supporting our previous results, we observed a negative correlation between the intracellular Ca^{2+} increase during capacitation and CRISP2 expression, suggesting that, as in rodents, CRISP2 plays a role in the regulation of Ca^{2+} in human sperm. Moreover, we observed that Ca^{2+} entry through CatSper could be prevented by inhibiting the proteins tyrosine phosphorylation that occurs during capacitation, suggesting that the modulation of this signaling cascade could be used as a therapeutic strategy in sperm with altered levels of Ca^{2+} . Finally, taking into account the high sequence similarity and the functional redundancy between the CRISP proteins, we next evaluated the reproductive phenotype of mice lacking more than one CRISP protein simultaneously. Although the fertility of *Crisp2* and *Crisp4* double KO mice was normal, the animals lacking three or the four CRISP proteins exhibited severe defects in their fertility associated with deficiencies in *in vivo* and *in vitro* fertilization, confirming not only the relevance of these proteins for fertility but also the existence of a functional cooperation among CRISP family members. Altogether, we consider that these studies will contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the fertilization process, as well as to the development of new methods of diagnosis and treatment of infertility and fertility regulation.

Key words: sperm, fertility, fertilization, capacitation, CRISP, knockout

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral cierra una etapa de mucho trabajo y no pudo haberse logrado sin el aporte de muchas personas a las cuales me gustaría agradecer...

A Paty, mi Directora de Tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de este gran equipo, por transmitirme la pasión por el campo de las gametas y por sus innumerables enseñanzas.

A Vani, Directora Asistente de esta Tesis, por enseñarme tanto valorando mis opiniones, y por compartir los entusiasmos, las sorpresas y las frustraciones que dejaban los experimentos.

A todos los miembros presentes y pasados del laboratorio de Mecanismos Moleculares de la Fertilización: Deb, Gus, Agus, Marian, Mati, Guille, Ludmi, Estefi, Nico V, Tom. Por la ayuda, las charlas, la amistad, el compañerismo y el aguante! Sin dudas, son lo mejor de esta etapa.

Al Dr. Juan Carlos Calvo, que desde su posición de Consejero de Estudios, supo guiarme y asesorarme en las diferentes etapas de la Tesis. También al Comité de Seguimiento, integrado por los Dres. Juan Carlos Calvo, Marta Tesone y Pablo Cética, por sus valiosos aportes.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA), a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a la Fundación A.J. Roemmers y al Programa Latinoamericano de Investigación en Salud Sexual y Reproductiva (PLISSER) por dar el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

A todos los miembros del IBYME (becarios, investigadores, técnicos, directorio, administración, biblioteca, bioterio, limpieza, recepción, comunicación, seguridad) por la ayuda de todos los días y por hacerme sentir como en casa. Al coro por ser un espacio de distensión muy necesario. A los hombres del instituto que permitieron la realización de los estudios relacionados a CRISP2 en humanos. A los integrantes de los seminarios de gametas por tantas cosas aprendidas y tantas golosinas comidas!

Al Dr. Alberto Darszon y su grupo (IBT-UNAM, México), por recibirme en su laboratorio en donde me sentí muy cómodo y aprendí mucho. Especialmente a Pau, Joseph, Gaby A, Gaby C por la amistad y a Cin (IBR, Rosario) por ser la mejor compañera de viaje.

A todos los colaboradores que aportaron a los resultados de esta Tesis. A la Dra. Livia Lustig (INBIOMED, UBA) por su ayuda con los análisis histológicos de los órganos de ratón. Al Dr. Julio Caramelo (Instituto Leloir) por los experimentos de medición de calcio en espermatozoides de ratón por fluorimetría. Al Dr. Daniel Lombardo y a Pablo Torres (INITRA-FVET, UBA) por el servicio de CASA utilizado para los experimentos de motilidad de los espermatozoides de ratón. A los Dres. Masaru Okabe y Masahito Ikawa (Universidad de Osaka, Japón) por la generación de los ratones *knockout* para *Crisp2* y *Crisp4*. Al Dr. Marcelo Rubinstein y a Daniela Rojo (INGEBI) por la enorme ayuda con la generación de los animales múltiples knockout por CRISPR/Cas9. Al Dr. Omar Pignataro y Elba (IBYME) por las mediciones de cAMP por radioinmunoensayo. Al Dr. Cristian Álvarez Sedó y a toda la Clínica CEGYR, por facilitarnos las muestras de paciente y de donantes. A Sol Nuñez (IBYME) por las tardes compartidas entre charlas y pasando muestras por el citómetro. Un agradecimiento especial para el Dr. Mariano Buffone (IBYME) y la gente de su laboratorio (Clari, Guille, Ani, Lis, Flor, Pau) por las colaboraciones, los congresos y la buena onda de siempre!

A toda la Sede Cerviño del Método DeRose, por ayudarme a superarme y desarrollar una mejor versión de mí mismo.

A mis amigos, los de siempre, los de la facu, los del IBYME, los de la vida... porque las cosas compartidas se disfrutan mucho más.

A Javi por las aventuras que pasaron y por las que se vienen.

A mis hermanos y cuñadas por el aguante de siempre y, sobre todo, por mis sobrinos, que son el regalo más lindo.

A mis papas por enseñarme a ser la persona que soy y porque les debo todo.

A mis papás

"There's far too much to take in here,

More to find than can ever be found"

Circle of Life, Elton John

Índice

Introducción	7
La gameta femenina	8
La gameta masculina	13
Maduración epididimaria	18
Eyaculación y transporte de espermatozoides	20
Capacitación	22
El proceso de fertilización	45
Familia de proteínas CRISP	59
Animales genéticamente modificados	78
Objetivos	82
Materiales y Métodos	84
Resultados	98
Capítulo 1	99
Capítulo 2	118
Capítulo 3	135
Discusión	148
Capítulo 1	149
Capítulo 2	157
Capítulo 3	166
Conclusión	173
Abreviaturas	177
Bibliografía	179

Introducción



La fertilización es el proceso mediante el cual el espermatozoide, la gameta masculina, y el ovocito, la gameta femenina, se unen para formar una descendencia cuya composición genética es diferente a la de los padres. Este proceso involucra una secuencia ordenada y precisa de eventos que aún no es del todo conocida. En este sentido, el estudio de los mecanismos subyacentes a la fertilización resulta de sumo interés ya que contribuye a una mejor comprensión de la biología reproductiva como así también al desarrollo de nuevos métodos tanto de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad como de regulación de la fertilidad (Florman y Fissore 2015).

La gameta femenina

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

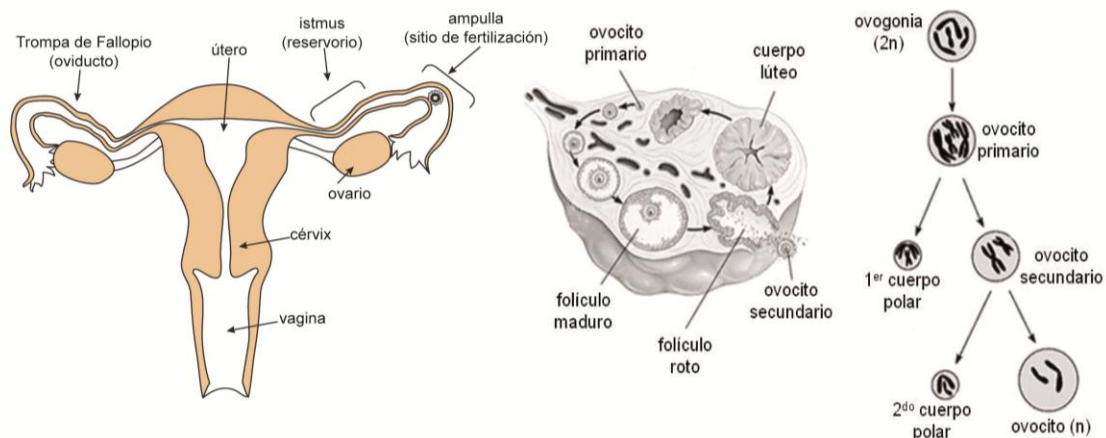


Figura 1. La ovogénesis y el tracto reproductor femenino. A la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor femenino (Darszon et al., 2011). En el centro, se esquematiza un corte transversal de un ovario, resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis. A la derecha, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis femenina.

Los ovarios son estructuras anatómicas pares que, tanto en roedores como en humanos, se encuentran adosadas a la pared posterior de la cavidad abdominal, compuestos por una zona periférica o corteza donde se encuentran las estructuras que

contienen a los ovocitos, y una zona central o médula, formada básicamente por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Los ovarios están en estrecho contacto con el útero a través de los oviductos en roedores y de las trompas de *Fallopio* en el humano. La región del oviducto proximal al ovario, denominada *ampulla*, es el sitio donde se produce la fertilización, en tanto que la región distal, el *isthmus*, actúa como reservorio de espermatozoides. El útero es el lugar donde se implanta y desarrolla el embrión y, a diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, es una estructura única en primates (Fig. 1), y bicornio en la mayoría de los mamíferos.

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

haber completado la meiosis (Fig. 1). De esta manera, la meiosis femenina se inicia en la etapa fetal, se prolonga hasta la edad madura de la hembra y, sólo se completa durante el proceso de fertilización.

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

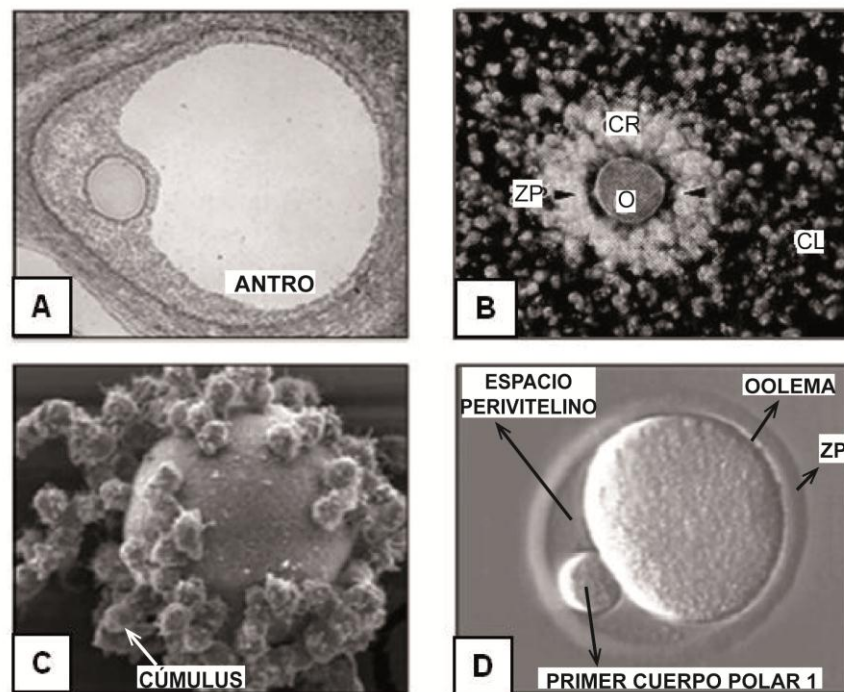


Figura 2. La gameta femenina. **(A)** Microfotografía de un folículo de Graaf donde puede verse el ovocito rodeado de varias capas de células de la granulosa desplazado del centro del folículo por el antro. **(B)** Microfotografía de un complejo cúmulus-ovocito ya ovulado. O: ovocito. CR: *corona radiata*.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

El ovocito se encuentra rodeado por el oolema, cuya característica particular radica en la presencia de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área libre de microvellosidades que coincide con la región que recubre al huso meiótico y a través de la cual raramente ocurre la fusión del espermatozoide (Johnson et al, 1975). En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana (Ducibella, 1991), cuya aparición se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito (Ducibella et al, 1994). El papel de los gránulos corticales es importante para el desarrollo de un embrión viable, ya que su liberación luego de la fertilización asegura la entrada de un único espermatozoide dentro del ovocito (Yanagimachi, 1994).

La ZP es una matriz glicoproteica cuyos componentes, sintetizados por el ovocito (Wassarman, 1988b), se depositan alrededor del mismo durante su crecimiento (Philpott et al, 1987; Roller et al, 1989). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúan en contacto con el ovocito a través de uniones estrechas de tipo *gap* entre el oolema y extensiones de las células del cúmulus (Austin, 1972, Florman y Fissore 2015), las cuales tendrían importancia en el mantenimiento de las funciones nutricionales y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito. La ZP está compuesta, principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias según la especie (Wassarman, 1988b, Lefievre et al, 2004). Gran parte de la información sobre la naturaleza bioquímica, estructura, y función de la ZP provienen de los laboratorios de los Dres. Paul Wassarman y Jurrien Dean, quienes han utilizado al ratón como modelo para la mayoría de sus estudios (Wassarman, 1988b, Wassarman y Litscher, 2001, Hoodbhoy y Dean, 2004). En esta especie, tres proteínas altamente glicosiladas conforman la ZP: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes.

La relevancia de cada una de las proteínas de la ZP y sus funciones durante la fertilización y el desarrollo fue demostrada mediante el estudio de ratones genéticamente modificados carentes de ZP1, ZP2 o ZP3. Los ratones *knockout* (KO) para ZP3 presentan los defectos más drásticos ya que los ovocitos provenientes de estas hembras carecen de ZP y los animales son completamente infértiles (Rankin et al., 1996). En el caso de las hembras KO para ZP1, las mismas presentan una ZP compuesta por ZP2 y ZP3, más frágil que la normal, que no afecta la producción ni la fertilización de los ovocitos pero produce una reducción de la fertilidad del 50%, atribuida al *hatching* prematuro de los

embriones (Rankin et al., 1999). Según estos resultados, la ZP1 sería una proteína minoritaria de la matriz, con un rol estructural no indispensable para el desarrollo del ovocito ni para la fertilización. Por último, el fenotipo de los animales KO para ZP2 fue diferente al de los dos anteriores ya que los ovocitos forman una ZP delgada (similar a la de los ratones deficientes para ZP1), que se pierde previo a la ovulación, resultando en la esterilidad de las hembras (Rankin et al, 2001). Funcionalmente, la ZP cumple un rol crítico ya que sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia, y proteger al ovocito y embrión de daños físicos, especialmente durante el clivaje tal como evitar que se separen los blastómeros, asegurando la individualidad.

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

La gameta masculina

El espermatozoide, la gameta masculina, se produce en los testículos como consecuencia de un proceso conocido como espermatogénesis (Austin, 1972). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las células germinales (espermatogonias) durante la vida embrionaria, y requiere de la división meiótica para la producción de gametas haploides (Fig. 3). Sin embargo, en tanto que las gametas femeninas son grandes, poco numerosas, con una abundante reserva de nutrientes e inmóviles, las gametas masculinas son muy pequeñas, numerosas, con pocos nutrientes y muy móviles. La gran diferencia con la hembra radica en que mientras que en la ovogénesis todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario y fetal, en el macho existe una población de células germinales capaces de multiplicarse por mitosis durante toda la vida adulta a partir de la pubertad. De este modo, en la hembra existe un número finito de gametas al principio de la vida fértil y, en cambio, en el macho la producción de espermatozoides es constante.

Los testículos consisten en una serie de lóbulos que contienen en su interior los túbulos seminíferos, dentro de los cuales se produce la espermatogénesis, separados por tejido intersticial. Los túbulos se unen entre sí en la *rete testis* que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo. Este órgano se continúa con el *vas deferens* el cual, durante la eyaculación, recoge las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y conduce a los espermatozoides hasta la uretra (Fig. 3). Dentro de los túbulos seminíferos, además de la línea germinal, se encuentran las células de Sertoli cuya principal función es crear y mantener un microambiente apropiado para el correcto desarrollo de los espermatozoides. Su forma es única debido a que se apoyan en la membrana basal y llegan hasta el lumen del epitelio seminífero, extendiéndose entre las células germinales. La presencia de uniones estrechas entre las células de Sertoli permite la formación de una barrera que limita el pasaje de moléculas de gran tamaño entre las distintas células. Esta permeabilidad reducida es parte de lo que se conoce como barrera hemato-testicular, y determina que las células haploides se encuentren aisladas del sistema inmune.

En la espermatogénesis, en tanto que una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis, algunas espermatogonias se diferencian en espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis generando espermatocitos secundarios. Éstos entran a una interfase intermeiótica de poca duración para pasar luego a la segunda

división meiótica que da origen a las células llamadas espermátides. En una segunda etapa, estas células redondas se diferencian morfológicamente para dar origen a los espermatozoides a través de un proceso denominado espermiogénesis, caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta. Como consecuencia de la pérdida casi completa del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, síntesis y degradación de lípidos, y transporte vesicular. Finalmente, se produce la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por un proceso denominado espermiación (Fig. 3).

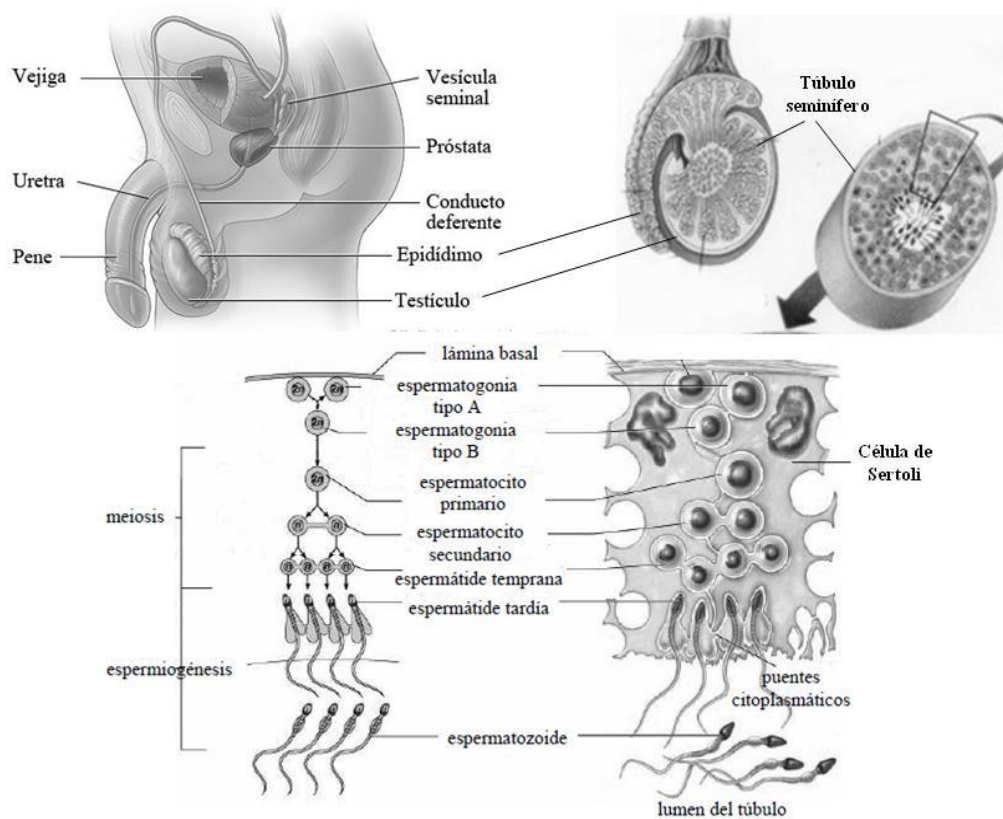


Figura 3. Tracto reproductor masculino y espermatogénesis. Arriba y a la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor masculino. Arriba y a la derecha, se muestra una representación de un corte transversal de un testículo y de un túbulo seminífero. Abajo y a la derecha, se esquematizan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

El espermatozoide es una célula altamente especializada, con capacidad para transportarse hasta el sitio de fertilización en el tracto femenino y fertilizar al ovocito. A pesar de que la forma y el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de los mamíferos son variables, los mismos comparten una estructura general similar. Básicamente, el espermatozoide posee dos componentes morfológicos distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (Eddy, 1994, Darszon et al., 2011) (Fig. 4A). La cabeza del espermatozoide contiene dos elementos fundamentales, un núcleo compacto debido a la presencia de cromatina altamente condensada, y el acrosoma, estructura cuyos contenidos son importantes para la fertilización (Eddy, 1994). El núcleo del espermatozoide es de un tamaño significativamente menor al del resto de los tipos celulares, debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas básicas de bajo peso molecular llamadas protaminas, que permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina que las histonas presentes en las células somáticas. El núcleo se encuentra rodeado por una envoltura nuclear bastante inusual, caracterizada por la cercanía entre las dos membranas que la conforman y la escasez de poros nucleares. Por su parte, el acrosoma es una estructura membranosa que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, originada en el aparato de Golgi. La forma y el tamaño del acrosoma es variable en las diferentes especies, relacionándose generalmente a la forma de la cabeza. Si bien la membrana que rodea al acrosoma es única y continua, se ha definido como membrana acrosomal interna a aquella que envuelve a la membrana nuclear externa, y como membrana acrosomal externa a la que se encuentra por debajo de la membrana plasmática. El acrosoma, a su vez, está constituido por dos regiones denominadas capuchón acrosomal y segmento ecuatorial, definidos principalmente por diferencias funcionales entre ellos tal como se detallará más adelante. En cuanto a la composición del acrosoma, el mismo contiene en su interior varias moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. Sin embargo, estudios de microscopía y extracción diferencial de proteínas han sugerido que esta organela no sería simplemente un reservorio de enzimas solubles sino que existiría una organización funcional de moléculas dada por la presencia de una matriz intra-acrosomal (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988, Kim y Gerton, 2003). Las dos enzimas mejor caracterizadas del acrosoma son Acrosina, una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas, y Hialuronidasa, ambas con expresión específica en las células espermátogénicas (Diaz-Perez et al., 1988, Diaz-Perez y Meizel, 1992, Takano, 1993). Si bien por su estructura y

contenidos, el acrosoma se ha descrito como un lisosoma especializado, esta organela tendría, además, algunas características de una vesícula de secreción ya que libera sus contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales propias durante la capacitación y externas durante la interacción del espermatozoide con el tracto femenino y el ovocito.

En la cabeza del espermatozoide se encuentran también estructuras de citoesqueleto que se distribuyen en dos regiones: el citoesqueleto sub-acrosomal o *perforatorium*, localizado entre el acrosoma y el núcleo, el cual está compuesto principalmente por material denso, y el citoesqueleto post-acrosomal, que se localiza entre el núcleo y la membrana plasmática de la región post-acrosomal del espermatozoide (Courtens et al., 1976, Bellvé, 1983, Fouquet y Kann, 1994). En la mayoría de los mamíferos, incluidos el hombre y gran parte de los animales domésticos, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada en la que el núcleo y el acrosoma son estructuras simétricas, de forma aplanada en el sentido longitudinal de la célula (Fig. 4B). En otras especies, como el hámster y el cobayo, existe una protrusión del acrosoma, perpendicular al plano aplanado de la cabeza. En la mayoría de los roedores, la cabeza es falciforme, con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo.

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (Figura 4A y C) (Eddy, 1994, Darson et al., 2011). El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de nueve pares de microtúbulos siguiendo la disposición característica de "9+2". Rodeando al axonema desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo, que envuelven a la cola en forma helicoidal y que cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para modular el plano de batido de la cola del

espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural.

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

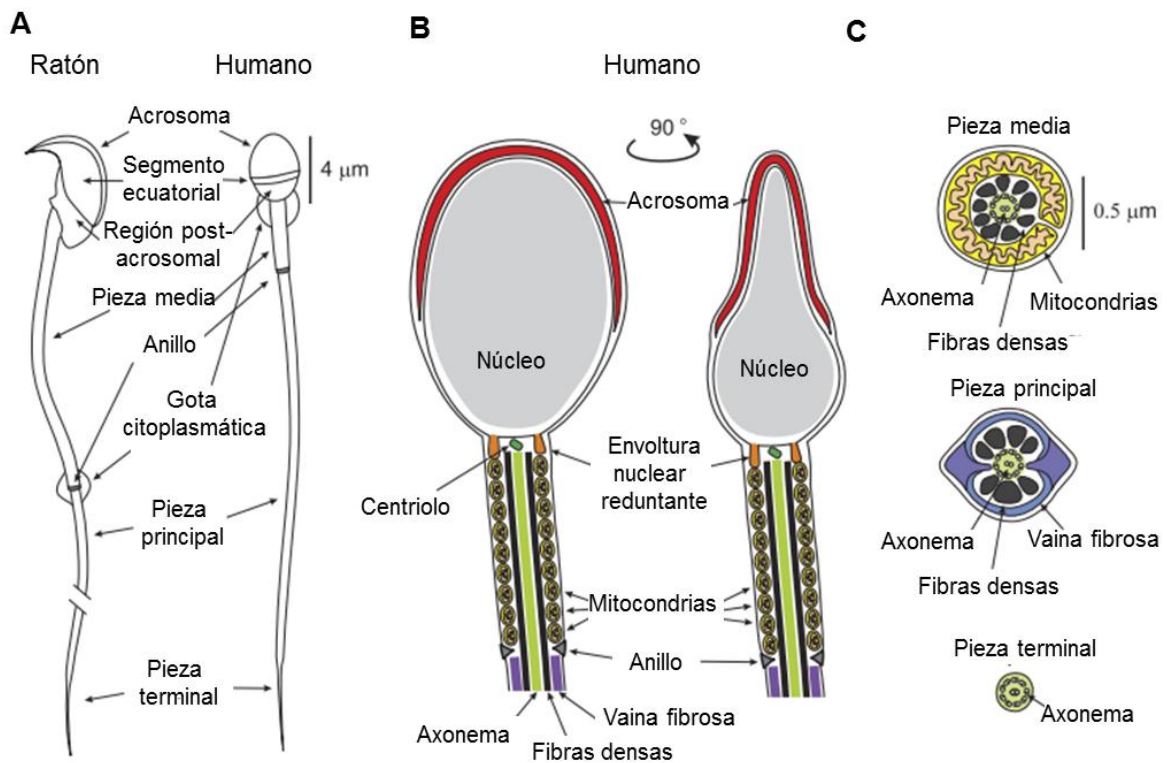


Figura 4. La gameta masculina. **(A)** Esquema de un espermatozoide de ratón y otro de humano en el que se muestran las diferentes estructuras, notándose sobre todo las diferencias entre una cabeza falciforme y una espatulada. **(B)** Estructuras generales de la cabeza y pieza media de un espermatozoide humano visto de frente y de costado. **(C)** Cortes transversales del flagelo en las diferentes secciones. Darszon et al., 2011.

Maduración epididimaria

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

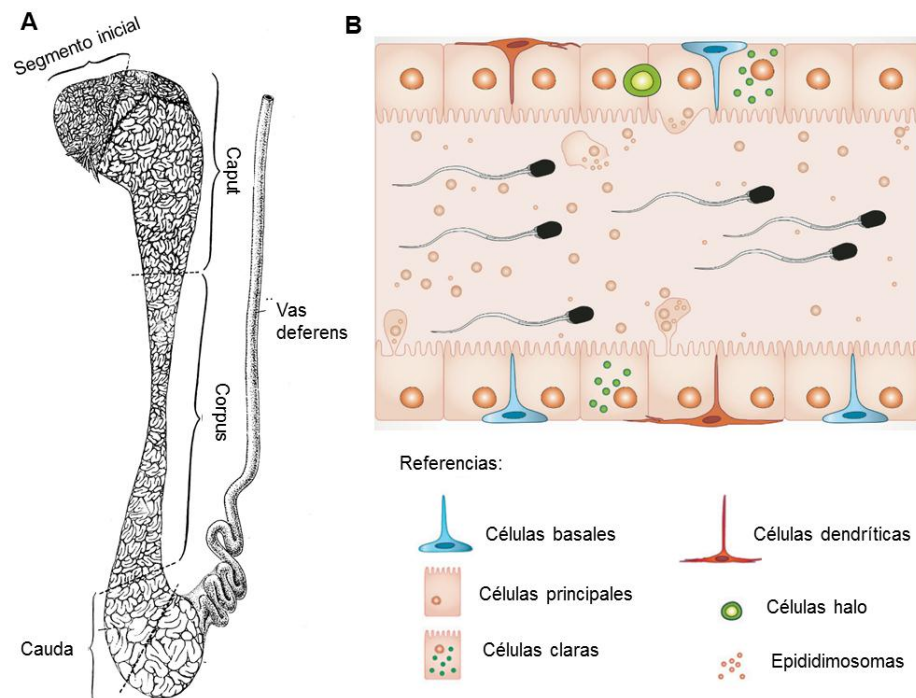


Figura 5. El epidídimo. **(A)** Esquema que muestra las diferentes regiones del epidídimo (Robaire y Hermo, 1988). **(B)** Representación de las diferentes poblaciones de células que conforman el epitelio del epidídimo (Belleannée, 2015).

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

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Blaquier et al., 1972) y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento del consumo de oxígeno, siendo importante de mencionar que la mayor parte de los cambios ocurren al nivel de la membrana plasmática. Dichos cambios moleculares y bioquímicos incluyen alteraciones en la carga de superficie, en las propiedades de unión de lectinas, en el contenido lipídico, en los carbohidratos de superficie y en la composición proteica (Eddy, 1994), y surgen como consecuencia de la adquisición de nuevos componentes a la membrana del espermatozoide y de la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la superficie de la gameta. Es generalmente aceptado que todos los cambios producidos durante esta etapa de maduración son tendientes a estabilizar la membrana del espermatozoide.

Mediante la utilización de distintas estrategias experimentales, se han estudiado los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas de origen epididimario como así también su unión o integración a diferentes dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Cuasnicu et al., 2001). De este modo, se ha descrito que la gran mayoría de las nuevas proteínas adquiridas por los espermatozoides son proteínas de superficie que se unen a la membrana de los espermatozoides a través de interacciones electrostáticas (Cooper, 1998). Sin embargo, también existen evidencias que indican que algunas proteínas adquiridas durante la maduración se comportan como proteínas integrales de membrana (Kirchhoff y Hale, 1996, Legare et al., 1999, Cohen et al., 2000a) y muchas de las mismas se encuentran ancladas a la membrana mediante uniones GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Legare et al., 1999, Frenette y Sullivan, 2001, Zhang y Martin-Deleon, 2003). Sin embargo, según la vía clásica de secreción de proteínas, una proteína anclada por GPI a la membrana de una célula tiene que transitar por el retículo endoplasmático, luego por el aparato de Golgi, y finalmente, por las vesículas secretoras

hasta alcanzar la superficie celular. De acuerdo con este mecanismo de secreción, el espermatozoide no podría adquirir proteínas unidas a GPI durante su pasaje por el epidídimo. Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo alternativo por el cual estas proteínas epididimarias se secretarían y se unirían a los espermatozoides. En este sentido, Yanagimachi y colaboradores (1985) describieron, por primera vez, mediante microscopía electrónica de cortes de epidídimos de hámster, la existencia de pequeñas vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides (Yanagimachi et al., 1985). Luego de varios años de esta primera observación, el laboratorio del Dr. Sullivan describió la participación de dichas vesículas membranosas en la transferencia de proteínas epididimarias a la superficie de los espermatozoides durante la maduración (Legare et al., 1999, Frenette y Sullivan, 2001, Frenette et al., 2002). Estas vesículas han sido denominadas epididimosomas (Fig. 5B), y han sido descritas de distintos mamíferos, tales como la rata (Fornes et al., 1991), el toro (Frenette y Sullivan, 2001), el ratón (Griffiths et al., 2008), e inclusive el humano (Frenette et al., 2005). En cuanto al origen de los epididimosomas, se ha sugerido un mecanismo de secreción apócrina que implicaría la formación de vesículas citoplasmáticas en el polo apical de las células epiteliales secretoras, las cuales se desprenderían de las células y, una vez en el lumen del órgano, se desintegrarían liberando así su contenido (Aumuller et al., 1997, Hermo y Jacks, 2002). Estas vesículas citoplasmáticas contendrían a los epididimosomas en su interior.

Mientras que algunas de las proteínas epididimarias mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicu et al., 2001), otras, que reciben el nombre de factores decapacitantes, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia prematura del proceso de capacitación (Fraser, 2010).

Eyaculación y transporte de los espermatozoides

Los espermatozoides son almacenados en la región del *cauda* epididimario hasta la eyaculación, durante la cual se liberan los espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales), en respuesta a señales sensitivas que desencadenan la eyaculación. El eyaculado o semen está formado por un componente celular (espermatozoides) y otro líquido denominado plasma seminal (secreciones de las glándulas accesorias). El plasma seminal contiene sustratos gelificantes tales como el fibrinógeno o semenogelina, que coagulan temporalmente el

semen, evitando la expulsión vaginal de los espermatozoides y protegiéndolos del pH vaginal. Tras pasar unos minutos, por acción de la fibrinolisisina, se produce la licuefacción del semen, permitiendo la liberación de los espermatozoides. En algunas especies como el ratón, el coágulo es tan denso que forma lo que se conoce como tapón vaginal que, si no se forma tal como sucede en el modelo de ratones KO para SVS2, produce severos defectos en la fertilidad (Kawano et al., 2014). El plasma seminal suele ser alcalino, como en el humano, con valores comprendidos entre 7,2 - 7,8 que favorece la motilidad y viabilidad de las células.

En la mayoría de las especies (humanos, bovinos, caninos, felinos, caprinos, entre otras) el sitio de deposición del semen es la vagina, mientras en que otras, la deposición ocurre en el cérvix (porcinos) o directamente en el útero (equinos y muchos roedores) (Coy et al., 2012). En el momento de la deposición, los espermatozoides son inmóviles, o poseen una motilidad muy reducida. Numerosas evidencias indican que los movimientos peristálticos del útero favorecen la llegada de los espermatozoides al oviducto tanto en las especies con deposición vaginal como en las que tienen deposición uterina (Suarez y Pacey, 2006). Por su parte, el semen juega un papel fundamental en la iniciación de estas contracciones. Al respecto, se ha observado que las contracciones uterinas en la rata son significativamente menores cuando se colocan en apareo con machos vasectomizados, sugiriendo que tanto los espermatozoides como los componentes del plasma seminal serían capaces de estimular las contracciones (Peitz y Olds-Clarke, 1986). Por otra parte, en el ratón, se ha sugerido que las glándulas sexuales masculinas también podrían jugar algún rol en este proceso ya que la remoción de las vesículas seminales disminuye significativamente la tasa de preñez por disminución de las contracciones uterinas (Crane y Martin, 1991).

Independientemente de en donde se produzca la deposición del semen, en todas las especies los espermatozoides deben atravesar el útero y entrar al oviducto, en donde se encuentra el sitio de fertilización. Sin embargo, solo una pequeña proporción de los espermatozoides eyaculados logra alcanzar el oviducto. En este sentido, cada vez son más las evidencias que apoyan la hipótesis de que el tracto reproductivo tiene mecanismos de selección altamente sofisticados que permite que solo aquellos espermatozoides de alta calidad lleguen al sitio de fertilización (Holt y Fazzeli, 2015, Sakkas et al., 2015, Suarez, 2016). En relación a esto, se sugiere que el paso limitante para la mayoría de los espermatozoides es el tránsito a través de la unión utero-tubaria

(Coy et al., 2012), siendo los ratones con espermatozoides que presentan deficiencias para atravesar esta barrera infértiles, tal como los animales KO para Ace, Adam1a, Adam2, Adam3, Calr3, Clgn, Tpst2 y PDILT (revisión en Okabe et al., 2015). Si bien aún no se conocen en profundidad los mecanismos de selección existentes a nivel del tránsito por la unión utero-tubaria, se cree que los espermatozoides para alcanzar el oviducto deben presentar una morfología normal, un determinado tipo de motilidad, así como marcas bioquímicas específicas en su superficie (Holt y Fazzeli, 2015, Sakkas et al., 2015, Suarez, 2016).

Capacitación

Luego de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de reconocer ni fertilizar al ovocito, pues la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter potencial (Yanagimachi, 1994). De esta manera, los espermatozoides eyaculados, deben permanecer en el tracto femenino durante cierto tiempo para poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración y, finalmente, penetrar al ovocito. Es durante el trayecto hacia el sitio de fertilización que los espermatozoides sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que, en su conjunto, se denominan capacitación (Austin, 1951, 1952, Chang, 1951). Entre dichos cambios se encuentran la remoción del colesterol de la membrana, la pérdida de los factores decapacitantes, la redistribución de antígenos de superficie, el ingreso de bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}), el aumento del pH intracelular, la hiperpolarización de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr), por mecanismos moleculares aún no del todo conocidos (Visconti et al., 2011). Dado que el espermatozoide carece de transcripción y traducción, las modificaciones de las concentraciones de mensajeros intracelulares tales como AMP cíclico (cAMP) y Ca^{2+} , los flujos de iones a través de la membrana plasmática y las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación/defosforilación de proteínas, podrían ser los mecanismos regulatorios responsables de generar dichos cambios durante la capacitación y modular la fisiología del espermatozoide (Visconti et al., 1995a, Visconti et al., 1995b). Mientras que alguno de estos cambios se inician ni bien el espermatozoide entra en contacto con el tracto femenino, otros ocurren luego de un cierto período de incubación (Visconti, 2009, Battistone et al., 2013). Si bien el lugar exacto donde se inicia este proceso aún se desconoce, existiendo variaciones según la especie y

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

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

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

Colesterol y microdominios de membrana

Uno de los mayores cambios que ocurren durante el proceso de capacitación implica la desestabilización de la membrana plasmática. En diversas especies, se ha demostrado que la membrana de los espermatozoides muestra una distribución asimétrica de lípidos (Muller et al., 1994, Gadella et al., 1999), la cual sería distorsionada por acción del ion HCO_3^- durante la capacitación (Gadella y Harrison, 2000, Baumber y Meyers, 2006). Se cree que el mayor efecto de la reorganización de los lípidos sería el de facilitar la

remoción del colesterol de ciertos dominios de la membrana plasmática (Flesch et al., 2001). Aunque el eflujo de colesterol está involucrado en el proceso de capacitación, se desconoce el mecanismo por el cual modula la fisiología del espermatozoide. La albúmina, presente en el tracto femenino, fue propuesta como uno de los agentes removedores del colesterol (Go y Wolf, 1985, Cross, 1998, Visconti et al., 1999). Sin embargo, posteriormente, se demostró que la albúmina remueve colesterol sólo luego de la reorganización de los lípidos, evento inducido por el HCO_3^- (Flesch et al., 2001). A su vez, el bajo contenido de colesterol tiene efectos importantes sobre los microdominios de la membrana denominados *lipid rafts*, complejos dinámicos compuestos por colesterol y esfingolípidos. Se postula que los *rafts* estarían involucrados en la transducción de señales intracelulares ya que en los mismos se agrupan ciertos tipos de proteínas intrínsecas de membrana (Simons y Toomre, 2000, van Gestel et al., 2016). Evidencias obtenidas en el cerdo muestran que dos marcadores de *rafts* se redistribuyen a la región apical de la membrana del espermatozoide como consecuencia de la acción del HCO_3^- y de la albúmina presentes en la capacitación (van Gestel et al., 2005).

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

Ingreso de HCO_3^- , producción de cAMP y activación de PKA

Las células utilizan una porción significativa de sus fuentes de energía para regular el flujo y el gradiente intracelular de iones a través de bombas y transportadores iónicos de membrana, modificando así el potencial eléctrico de la célula y las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros (Visconti et al., 2011, Miller et al., 2015). Evidencias en la bibliografía sugieren que el flujo de ciertos iones a través de la membrana del espermatozoide cumple un importante rol tanto en el proceso de capacitación como en la HA y la RA (Visconti et al., 2002, Darszon et al., 2006, Miller et al., 2015). En este sentido, durante el tránsito por el tracto reproductor masculino y femenino, los espermatozoides están expuestos a distintas concentraciones de iones. Mientras que los espermatozoides del *cauda* epididimario se almacenan en un entorno que contiene niveles altos de K^+ y bajos de Na^+ y HCO_3^- , en el tracto genital femenino las concentraciones de estos iones cambian significativamente, y el espermatozoide se encuentra en un medio con bajos niveles de K^+ y altos de Na^+ y HCO_3^- (Visconti et al., 2002, Stival et al., 2016). Estos cambios en las concentraciones extracelulares de iones producen variaciones en las concentraciones intracelulares de los mismos y de otros iones tales como el Ca^{2+} . Aunque el papel exacto de estas moléculas continúa en estudio, existen evidencias que muestran que tanto HCO_3^- como Ca^{2+} juegan un rol central en la regulación de la capacitación modulando diferentes cascadas de señales intracelulares (Visconti et al., 1995a, Visconti et al., 1995b, Visconti et al., 2011).

La entrada de HCO_3^- sería a través de diferentes mecanismos que podrían variar según la especie y que incluyen al co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) acoplado al intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de la familia SLC26 acoplados al canal de Cl^- CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel*), todos ellos localizados en la pieza principal del espermatozoide (Demarco et al., 2003, Wang et al., 2003, Quill et al., 2006, Hernandez-Gonzalez et al., 2006, Nishigaki et al., 2014, Puga Molina et al., 2017). Además, el CO_2 que permea pasivamente a través de la membrana es interconvertido a HCO_3^- por acción de las anhidrasas carbónicas (Nishigaki et al., 2014). Numerosos estudios en diferentes especies han mostrado que la entrada de HCO_3^- durante la capacitación es necesaria para la activación de la proteína adenilato ciclasa soluble (sAC) llevando a un aumento en los niveles de cAMP y la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA) (Fig. 6). De este modo, PKA

fosforila diversas proteínas en residuos Ser y Thr para, finalmente, activar una cascada de señalización conducente al aumento de pTyr en los espermatozoides (Visconti, 2009) (Fig. 6). En las células de mamíferos, se han identificado diez tipos de AC, nueve de las cuales están asociadas a la membrana (tmACs) y a la proteína G (Hanoune y Defer, 2001, Sunahara y Taussig, 2002, Wertheimer et al., 2013), mientras que la restante AC no se asocia a la proteína G, se la denomina soluble o sAC, y se encuentra en el citoplasma del flagelo del espermatozoide, activándose por HCO_3^- y Ca^{2+} (Buck et al., 1999, Chen et al., 2000, Hess et al., 2005, Kamenetsky et al., 2006). Los animales KO para sAC son infértiles debido a alteraciones en la motilidad de sus espermatozoides, los cuales no exhiben el aumento en pTyr asociado a la capacitación (Esposito et al., 2004, Hess et al., 2005, Xie et al., 2006). Sin embargo, el espermatozoide también presenta tmACs en la cabeza (isoformas 2, 3 y 8) (Baxendale y Fraser, 2003), postulándose la participación de las mismas en la RA (Wertheimer et al., 2013). En este sentido, los espermatozoides provenientes de ratones KO para la AC3 no mostraron defectos en la pTyr pero presentaron alteraciones en la RA inducida y en la capacidad fertilizante *in vitro* (Livera et al., 2005).

La concentración de cAMP es el resultado del balance entre la síntesis a través de la acción de sAC y la degradación del mismo por las fosfodiesterasas (PDEs), generando 5'AMP (Fig. 6). Se han descrito un total de seis enzimas PDEs (1, 4, 6, 8, 10 y 11) tanto en el flagelo como en la cabeza de los espermatozoides, las cuales difieren en su estructura, preferencia de sustrato y respuesta a los inhibidores (Soderling y Beavo, 2000, Baxendale y Fraser, 2003). Varios reportes proponen a las PDEs como moléculas fundamentales del proceso de capacitación ya que regularían los niveles de cAMP, siendo importantes no sólo para el aumento de pTyr sino también para los eventos posteriores tales como la HA y la RA (Lefievre et al., 2002, Baxendale y Fraser, 2003).

Tal como se mencionó anteriormente, el espermatozoide, a diferencia de otros tipos celulares, depende fuertemente de la fosforilación de proteínas y de otras modificaciones post-traduccionales ya que el mismo es transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar proteínas. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de fosforilación tiene importancia no sólo para el diagnóstico o tratamiento de pacientes infértiles sino también para el desarrollo de reguladores de la fertilidad. Las proteínas quinasas son las enzimas encargadas de catalizar la transferencia del grupo fosfato del adenosin trifosfato (ATP) a los grupos hidroxilo de los aminoácidos Ser, Thr o

Tyr de diversas proteínas. Según el aminoácido al cual transfieren el grupo fosfato, estas enzimas se clasifican en: Ser/Thr quinasas o Tyr quinasas. La Ser/Thr quinasa PKA constituye un mediador central en la señalización intracelular dada su capacidad de regular varios eventos del proceso de capacitación (Buffone et al., 2014). En su estado inactivo, PKA existe como un complejo tetramérico formado por dos subunidades regulatorias que presentan alta afinidad por el cAMP, y dos subunidades catalíticas unidas de forma no covalente. El mecanismo de activación de PKA involucra la unión de dos moléculas de cAMP a los sitios en cada subunidad regulatoria, generando un cambio conformacional y la disociación del dímero de subunidades regulatorias de los dos monómeros de las catalíticas. Las subunidades catalíticas, que en dicho estado son activas, fosforilan a sus sustratos específicos en residuos de Ser y Thr (Alberts et al., 2002).

Se han caracterizado varias isoformas de subunidades catalíticas (C α , C β , C α 2 o C γ) que se expresan diferencialmente en distintos tejidos y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA (Taylor et al., 2012). El espermatozoide presenta una variante de *splicing* específica de testículo de la subunidad catalítica C α 2 (Desseyn et al., 2000), cuya ausencia produce animales infértiles por defectos tanto en la fosforilación de proteínas en Tyr asociada a la capacitación como en la HA (Nolan et al., 2004), tal como el fenotipo de los animales carentes de sAC (Esposito et al., 2004, Hess et al., 2005, Xie et al., 2006). Por otro lado, las subunidades regulatorias se dividen en R1 α , R11 α y R1 β que son de expresión ubicua (Smith y Scott, 2006, Jarnaess y Tasken, 2007) y R11 β que se expresa en el testículo y está presente en el espermatozoide (Jarnaess y Tasken, 2007). Los animales KO para esta subunidad son fértiles y sus espermatozoides no muestran defectos en el proceso de capacitación, indicando que las otras variantes de esta subunidad pueden reemplazar esta función. De forma particular, las isoformas R11 pueden asociarse con proteínas de anclaje llamadas AKAPs (*A-Kinase Anchoring Proteins*) que permiten localizar a PKA en diferentes compartimentos subcelulares para fosforilar distintos sustratos según el estímulo (Muratori et al., 2011), contribuyendo de esta forma no sólo a aumentar la especificidad y versatilidad de la transducción de señales, sino también a acotar espacio-temporalmente la actividad de PKA (Jarnaess y Tasken, 2007). En la vía cAMP /PKA asociada a la capacitación, la proteína AKAP4 es la que participaría en la correcta ubicación tanto de PKA como de sus sustratos (Fulcher et al., 1995, Carrera et al., 1996, Vijayaraghavan et al., 1999). A su vez, existen otras Ser/Thr quinasas en el espermatozoide tales como: PKC (Lax et al., 1997, Rotman et al., 2010), Erk1/2 (Luconi et

al., 1998, de Lamirande y Gagnon, 2002), GSK3 (Aquila et al., 2005), CaMKIV (Marin-Briggiler et al., 2003) y la quinasa caseína II, miembro de la familia de Ser quinasas específicas de testículo (Li et al., 2011). Sin embargo, no se conocen los mecanismos en por los cuales las mismas participan en el proceso de capacitación.

Asimismo, evidencias obtenidas tanto en humanos como en roedores señalan que los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA se encuentran regulados por la acción de las Tyr quinasas de la familia Src (SFK, *Src kinase family*), que a su vez inactivan a Ser/Thr fosfatasas (Krapf et al., 2010, Battistone et al., 2013) (Fig. 6). La fosforilación de sustratos de PKA en respuesta al aumento de cAMP y a la activación de SFKs suele ser rápida (Visconti, 2009, Battistone et al., 2013) y es importante para diferentes aspectos del proceso de capacitación, incluyendo el aumento del pH intracelular (Wang et al., 2003, 2007, Zeng et al., 1996), el incremento de Ca^{2+} (Tateno et al, 2013), la hiperpolarización (Demarco et al., 2003) y la inducción de la vía de pTyr (Visconti et al., 1995).

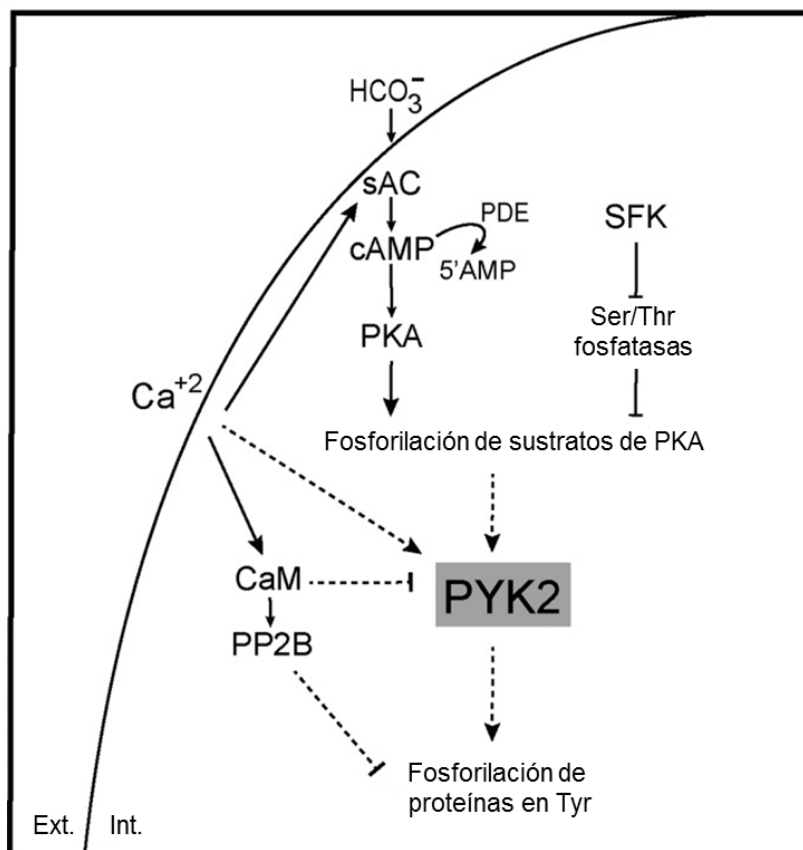


Figura 6. Capacitación espermática. Esquema de las cascadas de señalización involucradas en la capacitación, incluyendo las vías de cAMP/PKA y de las SFK conducentes a la fosforilación de proteínas en tirosina, y la modulación de las mismas por Ca^{2+} (Battistone et al., 2014).

Fosforilación de proteínas en tirosina

Como se mencionara anteriormente, uno de los eventos moleculares que ocurre durante la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro*, es un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr) (Visconti et al., 2002, Visconti, 2009), el cual regularía la actividad de las moléculas requeridas para los eventos posteriores a dicho proceso. La localización de las proteínas fosforiladas en Tyr es en las piezas media y principal del flagelo de ratón (Urner et al., 2001), mono (Mahony y Gwathmey, 1999), hámster (Si y Okuno, 1999) y humano (Naz et al., 1991, Carrera et al., 1996, Leclerc et al., 1997, Matamoros-Volante et al., 2017). Más recientemente, Chung y colaboradores, utilizando una técnica de microscopía con resolución nanométrica, confirmaron que las proteínas fosforiladas en Tyr se localizan dentro de la pieza principal del flagelo de los espermatozoides de ratón y demostraron, por primera vez, que estas proteínas se encontrarían principalmente en íntimo contacto con el axonema y, en menor medida, en la membrana plasmática (Chung et al., 2014) (Fig. 7).

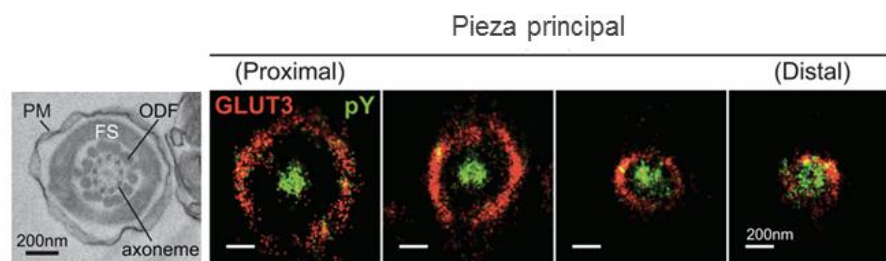


Figura 7. Estructuras del flagelo espermatozoide analizadas por la tecnología 3D STORM. Izquierda: imagen de un corte transversal de la pieza principal obtenida mediante la técnica de microscopía de transmisión de electrones (TEM). ODF: fibras densas externas, PM: membrana plasmática. Derecha: Imágenes de STORM en verde corresponde a la fosforilación en Tyr (pY) y en rojo a GLUT3 de cortes transversales de los ejes y-z de las regiones proximales y distales de la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014).

La vía de pTyr en el flagelo estaría relacionada con el desarrollo de la HA del espermatozoide (Mahony y Gwathmey, 1999, Nassar et al., 1999, Si y Okuno, 1999), requerida para la penetración del cúmulus y la ZP. En este sentido, una de las primeras proteínas fosforiladas identificadas en el espermatozoide humano fue la proteína AKAP4 (Carrera et al., 1996), la cual, al interaccionar con varias proteínas, participaría de la correcta regulación de la HA. Además, varias de las proteínas fosforiladas en Tyr tales como aldolasa específica de espermatozoide, glutatión S- transferasa, la NADH

deshidrogenasa y la subunidad α de la piruvato deshidrogenasa, estarían regulando la glicólisis, esencial para el desarrollo del movimiento vigoroso del flagelo. Asimismo, se reportó que la proteína del citoesqueleto β -tubulina se fosforila en Tyr durante la capacitación, regulando también el movimiento de la cola del espermatozoide (Arcelay et al., 2008).

Las proteínas fosforiladas en el flagelo también serían necesarias para la fusión de gametas ya que se ha reportado que los espermatozoides de ratón unidos al oolema mantienen la fosforilación en el flagelo (Urner y Sakkas, 2003). Más aún, Naz y colaboradores (1991) demostraron que un anticuerpo que reconoce proteínas con pTyr inhibe la unión del espermatozoide humano a la ZP y la penetración de ovocitos de hámsters sin ZP (Naz et al., 1991). Por otro lado, se han descrito proteínas fosforiladas en Tyr en la cabeza del espermatozoide (Urner et al., 2001, Asquith et al., 2004), a las cuales se les atribuyó roles en la RA y en la interacción del espermatozoide con el ovocito. A pesar de que muchos grupos demostraron el incremento en la fosforilación de proteínas en Tyr asociado a la capacitación espermática de diversas especies (Visconti et al., 1995a, Leclerc et al., 1996, Galantino-Homer et al., 1997, Osheroff et al., 1999, Visconti et al., 1999, Da Ros et al., 2004, Battistone et al., 2013), todavía es muy limitado el conocimiento de la identidad y la función de una gran cantidad de proteínas que sufren esta modificación post-traducciona durante la capacitación. Resultados recientes de proteómica de proteínas fosforiladas en Tyr purificadas de espermatozoides de ratón revelaron 62 motivos diferentes de fosforilación en Tyr. Entre las proteínas identificadas se encuentran las de la estructura flagelar (27%), las involucradas en vías de señalización (21%), las que participan en el metabolismo (13%), y las que se localizan en la cabeza (9%) y en la mitocondria (4%) (Fig. 8). Además, dicho análisis confirmó que los espermatozoides no capacitados presentan niveles bajos de pTyr y reveló que las proteínas fosforiladas en dichos espermatozoides se localizan en su mayoría en la cabeza (Chung et al., 2014).

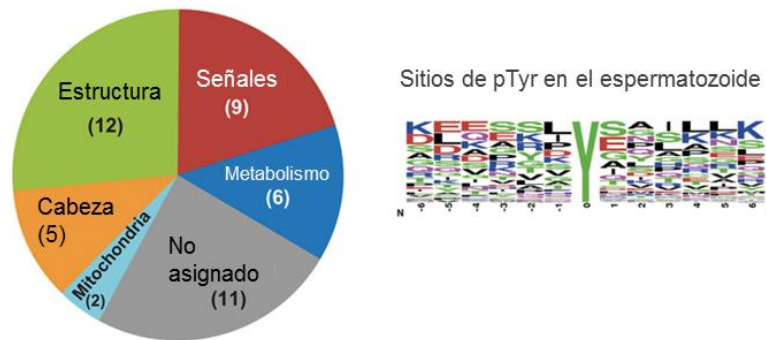


Figura 8. Porcentaje de abundancia de proteínas identificadas en el análisis de fosfoproteómica de espermatozoides capacitados de ratón (izquierda). Frecuencia de aminoácidos en la cercanía del sitio de fosforilación en Tyr de los 62 motivos identificados en el espermatozoide capacitado de ratón, utilizando el software (WebLogo) (Chung et al., 2014).

Más recientemente, en nuestro laboratorio se identificó a la Tyr quinasa PYK2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) como un posible mediador entre la actividad de PKA y el aumento de pTyr (Battistone et al., 2014) (Fig. 6), lo cual era consistente con observaciones previas hechas en el modelo equino (Gonzalez-Fernandez et al., 2013). Al exponer a los espermatozoides humanos a un inhibidor de esta quinasa (PF431396 o PF) durante la capacitación, se vieron afectados la motilidad, la RA y la habilidad de penetrar la matriz del cúmulus de ratón y ovocitos sin ZP de hamster (Battistone et al., 2014). Posteriormente, en colaboración con el grupo del Dr. Visconti, determinamos que el PF también era capaz de inhibir la pTyr en espermatozoides murinos sin afectar la actividad de PKA (Alvau et al. 2016). Si bien los espermatozoides de ratones deficientes en PYK2 exhiben niveles normales de pTyr, los de ratones KO para otra quinasa sensible al PF, la variante testicular de FER (*feline sarcoma-related protein*), llamada FERT, no presentan aumento en pTyr (Alvau et al. 2016). Además, si bien estos ratones son fértiles, sus espermatozoides muestran una menor capacidad fertilizante *in vitro* (Alvau et al. 2016). Más recientemente, se ha identificado a la quinasa FERT en espermatozoides humanos (Matamoros-Volante et al, 2017). Sin embargo, aún resta dilucidar su relevancia en la vía de pTyr en esta especie.

En resumen, la vía de pTyr regularía la mayoría de los procesos dependientes de la capacitación modulando, en consecuencia, el proceso de fertilización (Visconti et al., 1995ab, Galantino-Homer et al., 1997, Visconti et al., 1999, Osheroff et al., 1999,

Kulanand y Shivaji, 2001, Tardif et al., 2001, Pommer et al., 2003, Sidhu et al., 2004, Battistone et al., 2014).

El aumento de los niveles de pTyr implicaría un *cross-talk* entre la vía de PKA y la señalización por Ca^{2+} intracelular, sin embargo, los mecanismos involucrados en esta regulación cruzada aún no son del todo conocidos. En este sentido, si bien el aumento inicial de cAMP sería dependiente de la activación de la sAC por Ca^{2+} , los espermatozoides humanos incubados en medio capacitante sin el agregado de Ca^{2+} presentan niveles altos de pTyr (Luconi et al., 1996, Carrera et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003, Baker et al., 2004, Battistone et al., 2014), indicando la complejidad de la vía de señalización que involucra al Ca^{2+} en dicho proceso. La principal molécula que sensa la concentración de Ca^{2+} es la calmodulina (CaM), una pequeña proteína ubicua que sirve como receptor intracelular de Ca^{2+} (Means et al., 1982), se localiza en el acrosoma y en la pieza principal flagelar, específicamente dentro de la vaina fibrosa (Schlingmann et al., 2007, Chung et al., 2014), y se encuentra implicada en múltiples eventos que incluyen la capacitación, la motilidad y la RA (Jones et al., 1980, Si y Olds-Clarke, 2000, Bendahmane et al., 2001). En el espermatozoide, CaM regula algunas proteínas tales como la Ser/Thr quinasa dependiente de CaM (CaMK), la quinasa Yes (miembro de la familia SFKs), la PDE1 (dependiente de CaM) y la fosfatasa PP2B (Wasco y Orr, 1984, Tash et al., 1988, Carrera et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003). Ésta última, también conocida como calcineurina, además de ser dependiente de CaM, se activa directamente por Ca^{2+} , está asociada a los procesos de HA y RA (Tash et al., 1988) e inhibe la vía de pTyr sin afectar la fosforilación de sustratos de PKA (Fig. 6). Además, la misma PYK2 posee dominios de unión a Ca^{2+} (*EF-hands*) por lo que podría haber una regulación directa de la actividad de esta quinasa por las concentraciones de este ion (Battistone et al., 2014) (Fig. 6).

Por otro lado, en espermatozoides de ratón se propone la existencia de regulaciones negativas y positivas de Ca^{2+} intracelular sobre la cascada de pTyr (Navarrete et al., 2015). Por un lado, al estimular a CaM, el Ca^{2+} aumentaría la actividad de PDEs dependientes de CaM y, por ende, la degradación del cAMP (regulación negativa). Por el otro lado, el Ca^{2+} también estimularía a sAC, generando aumento de cAMP (modulación positiva) (Navarrete et al., 2015). A pesar de que estas evidencias sugieren que la regulación por Ca^{2+} sobre las cascadas conducentes a pTyr tendría características especie-específicas, tanto en espermatozoides humanos como de ratón, la ausencia total

de Ca^{2+} en el medio de capacitación por el agregado de EGTA, induce un aumento exacerbado de los niveles de pTyr en ambas especies (Navarrete et al., 2015, Battistone et al., 2014).

Alcalinización del citoplasma

Luego de abandonar el ambiente ácido de la vagina ($\text{pH}\approx 5$) y mientras transita por el tracto femenino, el espermatozoide se enfrenta a niveles crecientes de pH que llegan a alcanzar un valor de 8 (Suarez y Pacey, 2006). Este cambio de pH extracelular promovería la alcalinización del citoplasma del espermatozoide (Hamamah y Gatti 1998). Sin embargo, también se ha observado la alcalinización intracelular en espermatozoides capacitados *in vitro* pese a que el pH del medio se mantiene constante (Nishigaki et al., 2014). Se han reportado diferentes sistemas que controlan el pH intracelular en los espermatozoides. En primer lugar, tal como se mencionara anteriormente, existe un ingreso de HCO_3^- durante la capacitación que, además de estimular a la sAC, produce un aumento del pH debido a que es una base débil (Demarco et al., 2003) (Fig. 9). Una vez dentro de la célula, el equilibrio entre el HCO_3^- y el CO_2 se encuentra modulado por la presencia de anhidrasas carbónicas del espermatozoide que catalizan la interconversión de estas dos moléculas. En espermatozoides murinos, las anhidrasas carbónicas II y IV contribuyen con casi toda la actividad anhidrasa carbónica detectada y los ratones deficientes en ambas proteínas simultáneamente presentan disminuida su fertilidad (Wandernoth et al., 2015).

Otro mecanismo de regulación del pH intracelular fue descrito en el modelo murino, basado en que los ratones deficientes en el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) son infértiles debido a defectos en la capacidad fertilizante de sus espermatozoides (Wang et al., 2007) (Fig. 9). En respuesta al ya mencionado aumento de Na^+ extracelular al que se enfrenta el espermatozoide luego de la eyaculación, se produciría un ingreso de Na^+ a través del sNHE, intercambiándose por protones. De forma interesante, la proteína sNHE presenta un dominio de unión a nucleótidos cíclicos que sugiere que la misma podría responder al incremento de cAMP producido al inicio de la capacitación (Stival et al., 2016). En este sentido, los espermatozoides de ratones KO para sNHE exhiben una disminución en los niveles de sAC (Wang et al., 2003) y, además, menores niveles de pTyr que son restaurados mediante el agregado de análogos

permeables del cAMP (Wang et al., 2007), indica la existencia de mecanismos de *cross-talk* entre la síntesis de cAMP y la regulación del pH intracelular.

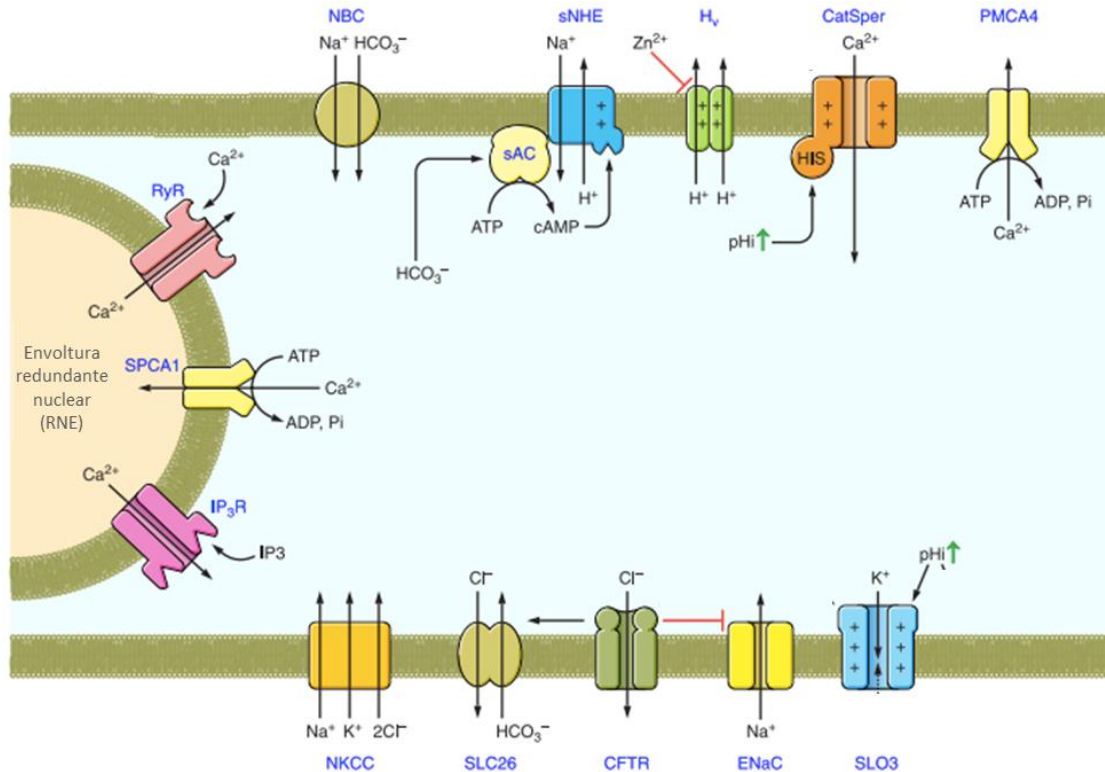


Figura 9. Flujo de iones durante la capacitación (Darszon et al., 2011).

Por otra parte, en espermatozoides humanos, se han detectado mediante ensayos electrofisiológicos, corrientes correspondientes al canal de H⁺ voltaje dependiente Hv1 (Lishko et al., 2010) (Fig. 9). Este canal, que se ubica en el flagelo del espermatozoide humano, promueve la extrusión de protones a través de la membrana plasmática y es inhibido por Zn²⁺, el cual es muy abundante en el plasma seminal (Lishko et al., 2010, Lishko y Kirichok, 2010). Por lo tanto, se ha propuesto que el Zn²⁺ del plasma seminal actuaría como factor decapacitante al mantener cerrado el canal hasta que se diluya en el tracto femenino (Miller et al., 2015). Además de la remoción del Zn²⁺, la capacitación y la exposición al endocanabinoide anandamida lograría la activación de Hv1 (Lishko et al., 2010). A diferencia de lo que ocurriría en el humano, en el espermatozoide murino no se ha detectado Hv1 y los ratones deficientes en este canal son fértiles (Ramsey et al.,

2009), sugiriendo que este mecanismo de regulación del pH intracelular estaría ausente en los espermatozoides de esta especie.

Pese a que son amplias las evidencias que apoyan la existencia de una alcalinización del citoplasma asociada a la capacitación, aún no se conoce en profundidad cómo el pH puede regular parámetros funcionales del espermatozoide tales como la HA o la RA. De todas formas, tal como se explicará a continuación, se sabe que Slo3 y CatSper, dos canales específicos del espermatozoide, son sensibles a cambios del pH.

Incremento del Ca^{2+} intracelular

Durante la capacitación, ocurre un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Ruknudin y Silver, 1990, Baldi et al., 1991). La concentración de Ca^{2+} en el citoplasma del espermatozoide sería la resultante de los flujos existentes con el exterior de la célula y con los reservorios intracelulares (Darszon et al., 2011). El influjo de calcio a través de la membrana plasmática ocurre a través de CatSper (*cation channel of sperm*), el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide, el cual se ha demostrado que es esencial para la fertilidad no sólo utilizando modelos de ratones KO sino también analizando pacientes que carecen de este canal debido a mutaciones del gen correspondiente (Ren et al., 2001, Hildebrand et al., 2010, Smith et al., 2013). Pese a que la activación de CatSper es fundamental para el desarrollo de la HA (Ren, et al., 2001, Carlson et al., 2003), este tipo de motilidad requeriría, además, de la salida de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Alasmari et al., 2013, Chang y Suarez, 2011). CatSper está compuesto por cuatro subunidades principales (CatSper1–4), además de cinco subunidades auxiliares (β , γ , δ , ϵ , y ζ), que forman un canal sumamente complejo (Liu et al., 2007, Wang et al., 2009, Ren, 2010, Chung et al., 2017) localizado en la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014, Chung et al., 2017) (Fig. 10). CatSper1, el primer miembro descrito de este canal, presenta un gran dominio N-terminal del lado citosólico, el cual es rico en residuos His y que actuaría como un sensor de pH (Ren et al., 2001, Lishko y Kirichok, 2010). En este sentido, CatSper es activado fuertemente por la alcalinización del citoplasma producida por Hv1 o sNHE, en espermatozoides humanos y murinos, respectivamente, los cuales se ubican en la misma región del flagelo (Lishko y Kirichok et al., 2010) (Fig. 11). Por otro lado, estudios electrofisiológicos permitieron determinar que CatSper es débilmente sensible al voltaje, activándose más en condiciones de despolarización, siendo en humano más marcada esta dependencia que en el ratón (Kirichok et al., 2006, Lishko et

al., 2010). Además, este canal es regulado fuertemente por unión de ligandos como la albúmina o la proteína CRISP1 en ratón (Xia y Ren, 2009, Ernesto et al., 2015). A diferencia de lo que ocurren en los espermatozoides de ratón, en humanos se ha observado que CatSper se activa fuertemente por progesterona (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011) por un mecanismo que involucraría la degradación del 2AG (2-*araquidonilglicerol*), un inhibidor endógeno de CatSper, por acción de la enzima ABHD2 (*α/β hydrolase domain-containing protein 2*) (Miller et al., 2016). Más recientemente se ha demostrado que la actividad de CatSper en espermatozoides humanos puede ser modulada por otros esteroides endógenos tales como la testosterona o la pregnenolona, como así también por triterpenoides vegetales (Mannowetz et al., 2017).

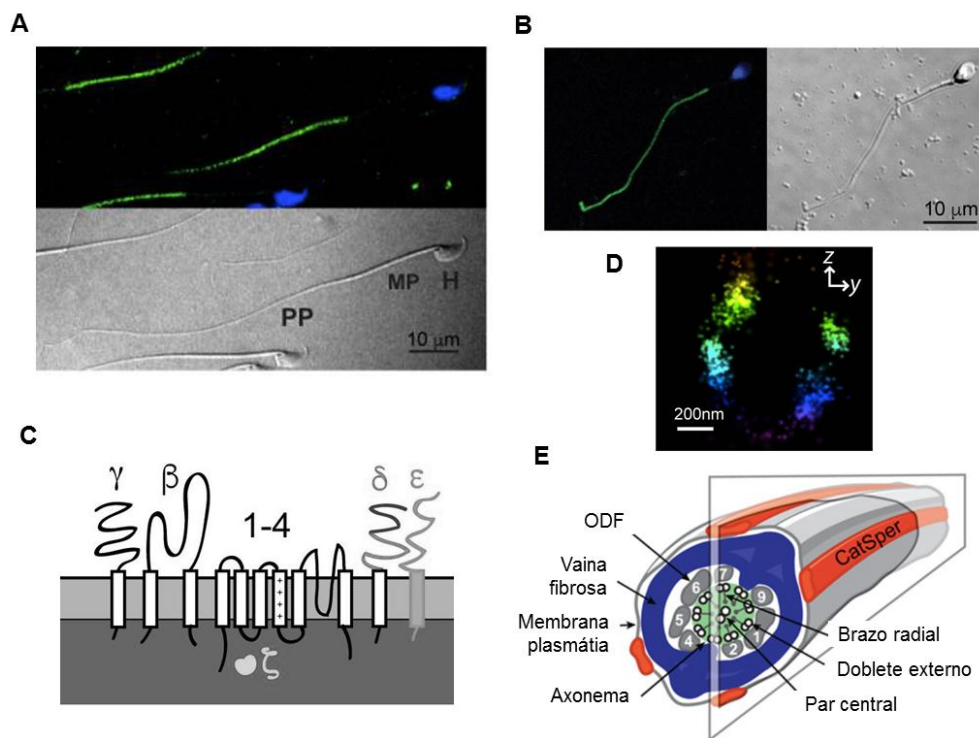


Figura 10. CatSper, principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide, se ubica en la pieza principal (PP) del flagelo de espermatozoides murinos (A) y humanos (B), tal como se ve por inmunofluorescencia (verde). Los núcleos fueron teñidos en azul. MP: pieza media, H: Cabeza (C) Complejo formado por 4 subunidades que conforman el poro (1-4) y 5 subunidades regulatorias. (D) Corte transversal del flagelo de espermatozoides murinos analizado por la técnica de microscopía de ultra-resolución (STORM) mostrando la distribución del complejo en cuadro costillas a lo largo del flagelo. (E) Esquema de la pieza principal en el que se ve la distribución de CatSper en la membrana plasmática de la pieza principal (Chung et al., 2017).

Además del influjo por CatSper, el Ca^{2+} podría ingresar en menor medida a la célula por canales operados por calcio (*store operated calcium entry*), tal como ORAI, intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o canales TRP (*transient receptor potential channels*) tal como TRPM8 (Darszon et al., 2011) (Fig. 9). En cuanto a este último, sus corrientes son sensibles a diferencias de voltaje y a temperaturas menores a 25 °C. Si bien los animales KO para dicho canal son fértiles, sus espermatozoides presentan deficiencias en la RA, en concordancia con su localización en la cabeza (Martinez-Lopez et al., 2011). Más aún, este canal se encuentra también en el flagelo, postulándose su participación en el desarrollo de la HA. Teniendo en cuenta que no se ha detectado corriente iónica a través de TRPM8 en espermatozoides epididimarios (Lishko et al., 2012, Zheng et al., 2013) en la actualidad se cuestiona la relevancia funcional de este canal en el espermatozoide maduro.

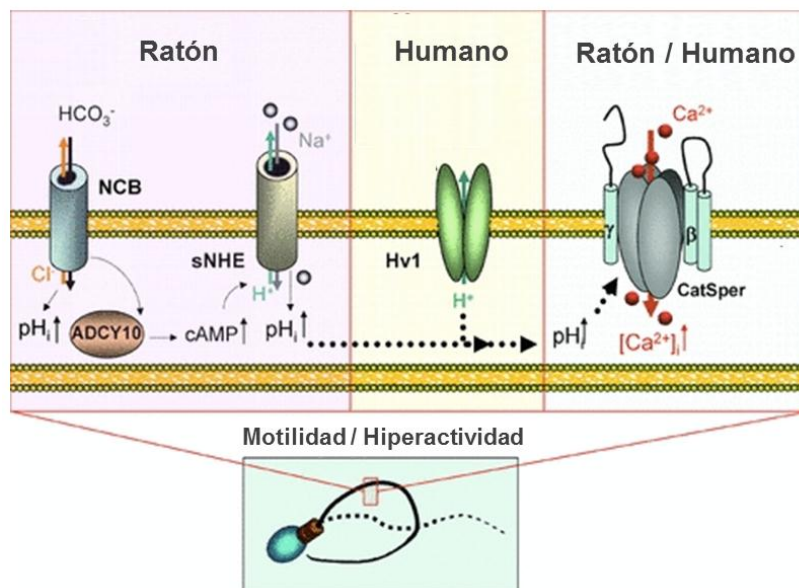


Figura 11. Regulación del influjo de Ca^{2+} por pH. Esquema que representa la activación de CatSper por la alcalinización del citoplasma mediada por Hv1 en humano o NBC y sNHE en ratón (Lishko y Kirichok et al., 2010).

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

homeostasis de Ca^{2+} para la fertilidad de los machos (Okunade et al., 2004, Schuh et al., 2004).

Los espermatozoides no sólo regularían el Ca^{2+} citosólico a través de canales y bombas en la membrana plasmática, sino que, además, poseen reservorios intracelulares, presentes en la cabeza (acrosoma) y el cuello (envoltura redundante nuclear o RNE) que mediarían la homeostasis del Ca^{2+} (Fig. 9). Estos reservorios poseen canales de salida de Ca^{2+} tales como el receptor de inositol trifosfato (iP_3) y los canales rianodínicos (RyR), en tanto que la entrada hacia los mismos estaría mediada por la bomba Ca^{2+} -ATPasa retículo sarco/endoplasmática (SERCA o SPCA) (Darszon et al., 2011). Si bien aún resta dilucidar la relevancia de los reservorios intracelulares en la funcionalidad espermática, se sabe que existe una estrecha relación entre la regulación del Ca^{2+} mediada por los reservorios y por la membrana plasmática. Por un lado, el Ca^{2+} que entra desde el exterior de la célula puede inducir la activación de los canales RyR por un mecanismo conocido por CICR (*calcium induced calcium release*). Por otro lado, una bajada en los niveles de Ca^{2+} dentro de los reservorios sería sensada por la proteína STIM (*stromal interaction molecule*), la cual es capaz de inducir la apertura de canales en la membrana plasmática tales como ORAI, induciendo la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. A este último mecanismo se lo llama entrada de Ca^{2+} inducida por los reservorios o SOCE (*store operated calcium entry*) (Darszon et al., 2011) (Fig. 9).

Hiperpolarización

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

Si bien aún no es clara la regulación del potencial de membrana del espermatozoide durante la capacitación, existen diversas evidencias que sugieren que la hiperpolarización ocurriría debido a un aumento en la permeabilidad al K^+ . La salida de K^+ a través de canales rectificadores sería responsable, en parte, de la hiperpolarización de la membrana asociada a la capacitación (Munoz-Garay et al., 2001, Acevedo et al., 2006) (Fig. 9). Resultados obtenidos en el modelo del ratón KO para el canal de K^+ Slo3, indicaron que el mismo sería esencial para la ocurrencia de la hiperpolarización (Santi et al., 2010) y, a su vez, regularía la actividad de CatSper (Chavez et al., 2014). En humanos, aún es controversial cual es el canal de K^+ responsable de la hiperpolarización, habiéndose postulado que sería tanto Slo3 (Sánchez-Carranza et al., 2015) como Slo1 (Mannowetz et al., 2013). Esta controversia se basa en que la corriente de K^+ detectada en espermatozoides humanos es sensible al pH, como Slo3, y al Ca^{2+} , como Slo1. Por otro lado, es posible que se formen canales heterotetrámeros entre ambas proteínas que le confieran esta naturaleza dual (Miller et al., 2015). Más recientemente, se ha propuesto que Slo3 humana habría evolucionado adquiriendo sensibilidad al Ca^{2+} así como al pH (Geng et al., 2017). Si bien la relevancia hiperpolarización para la HA es aún poco claro, la dependencia del voltaje de canales críticos para la capacitación tales como CatSper o Hv1, sugiere que la misma tendría un rol importante en este proceso. Por otro lado, se ha reportado que la hiperpolarización es esencial y suficiente para la ocurrencia de la RA (De La Vega-Beltran et al., 2012).

Reacción Acrosomal

La RA es un evento excitotico que permite la liberación regulada del contenido acrosomal del espermatozoide (Fig. 12) y tiene dos consecuencias que resultan fundamentales para la fertilización. Una de ellas es la exposición de moléculas intra-acrosomales que permiten al espermatozoide penetrar las envolturas que rodean al ovocito, mientras que la segunda y no menos importante, es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial.

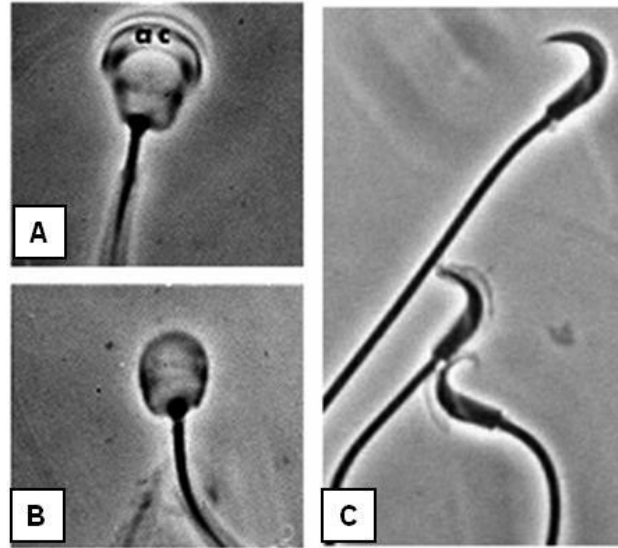


Figura 12. Reacción acrosomal. **(A-B)** Microfotografías de un espermatozoide de cobayo sin reaccionar (A) y reaccionado (B). ac: acrosoma. **(C)** Microfotografía de espermatozoides de hámster. Los dos espermatozoides ubicados en la porción inferior de la foto ya han comenzado la RA. Nótese la forma diferente de la cabeza de los espermatozoides de las dos especies (Yanagimachi 1994).

La RA consiste en la vesiculización del capuchón acrosomal del espermatozoide, mediante un mecanismo similar al proceso de exocitosis observado en otras células del organismo. El proceso comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del segmento ecuatorial. En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas mixtas que se desprenden en un fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del capuchón acrosomal". Entre las vesículas se crean poros por los que se libera el contenido del acrosoma. Al final de la RA, la membrana acrosomal interna se encuentra expuesta al medio extracelular, y adquiere continuidad con la membrana plasmática del segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994). Se denomina *intacto* a aquel acrosoma que no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, *modificado* a aquel que presenta alteraciones morfológicas tales como hinchamiento o rugosidades, y *reaccionado* a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal (Fig. 13).

A nivel molecular, los eventos que desencadenan la RA involucran a múltiples receptores presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado, los cuales reconocen a su ligando complementario (entre ellos, ZP3 y progesterona)

desencadenando la transducción de señales que produce el aumento del Ca^{2+} intracelular y de otros mensajeros secundarios tales como el cAMP. Como consecuencia de ello, se produce una serie de señales finamente reguladas que incluyen la activación de la cascada cAMP/EPAC, la acción de GTPasas Rab y Rap, la salida de Ca^{2+} del acrosoma y, finalmente, culmina con el ensamblado de la maquinaria de fusión (complejo SNARE) (Tomes, 2015, Belmonte et al., 2016) Asimismo, recientes evidencias señalan que el aumento del pH intra-acrosomal previo a la RA sería uno de los responsables tanto de la liberación de Ca^{2+} del acrosoma como de la activación de las proteasas sensibles a la alcalinización (Nakanishi et al., 2001, Chavez et al., 2017).

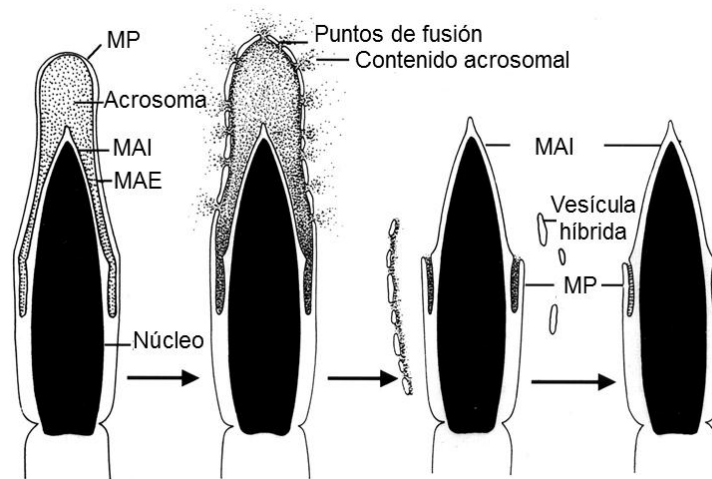


Figura 13. Progresión de la RA. Se muestra un diagrama representando las etapas de la RA en la cabeza del espermatozoide de ratón. El de la izquierda representa un espermatozoide intacto y el resto, espermatozoides en diferentes estados de la RA. MP: membrana plasmática, MAI: membrana acrosomal interna, MAE: membrana acrosomal externa (Yanagimachi, 1994).

Tradicionalmente, se pensaba que las enzimas contenidas dentro del acrosoma eran las encargadas de digerir tanto a la matriz extracelular de las células del cúmulo como a la ZP durante la RA, y permitir al espermatozoide abrirse camino hasta el ovocito (Yanagimachi, 1994). Esta hipótesis se vio modificada por evidencias demostrando que, al menos en el ratón, la RA ocurría, principalmente, cuando el espermatozoide contacta con la ZP (Saling y Storey, 1979, Wassarman et al., 1985), y que los espermatozoides reaccionados eran incapaces de penetrar el cúmulo (Talbot, 1985). Unos años más tarde, se confirmó que sólo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. De acuerdo a este modelo, una vez unidos a la ZP, los espermatozoides sufrirían la RA,

produciéndose la liberación de los contenidos del acrosoma, los cuales serían importantes para la penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994). Posteriormente, los Dres. Kim y Gerton (2003) propusieron un modelo denominado “de exocitosis acrosomal”, en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito (Kim y Gerton, 2003). Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma. Según este modelo, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP. A favor de esta teoría, más recientemente, se demostró que la mayoría de los espermatozoides que fertilizan a los ovocitos, comenzarían a reaccionar en el cúmulus o antes de ingresar a esta matriz y no sobre la ZP (Jin et al., 2011). Esta idea fue apoyada por el hecho de que los espermatozoides perivitelinos, ya reaccionados y sin capuchón acrosomal, son capaces de fertilizar ovocitos con cúmulus y ZP *in vitro* (Inoue et al., 2011). Más aún, tres grupos, independientemente, han observado que la gran mayoría de los espermatozoides de ratón que llegan al sitio de fertilización *in vivo* ya perdieron el acrosoma (La Spina et al., 2016, Muro et al., 2016, Hino et al., 2016).

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

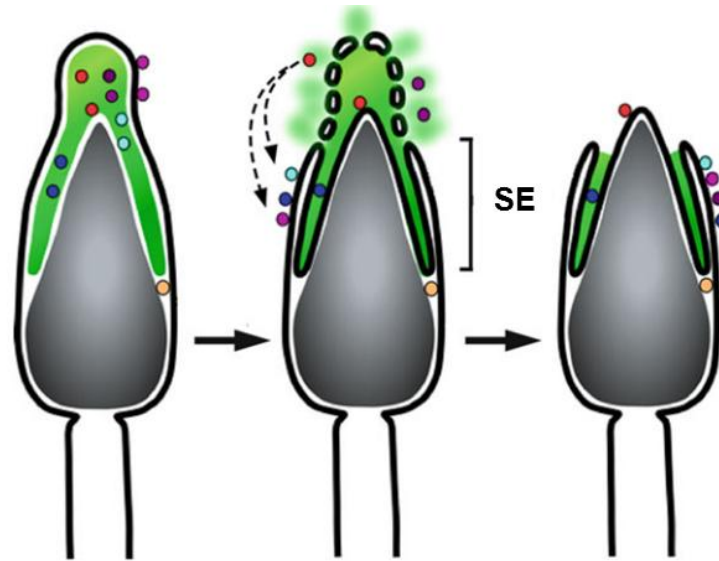


Figura 14. Adquisición de la fusogenicidad del segmento ecuatorial (SE) durante la RA. Diagrama que representa diferentes proteínas del espermatozoide que estarían involucradas en la adquisición de la fusogenicidad del SE por alterar el citoesqueleto (como TSSK6, en naranja); o por modificar proteínas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

Hiperactivación

La HA es un patrón de motilidad característico descrito por primera vez en el hámster (Yanagimachi, 1969), que consiste en un movimiento flagelar vigoroso y observado tanto *in vivo*, en el sitio de la fertilización, como *in vitro*, en todas las especies estudiadas (Yanagimachi, 1994). El movimiento hiperactivado se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución en la linealidad, y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, sumados a movimientos del flagelo similares a latigazos en medios de baja viscosidad (Suarez et al., 1992, Suarez, 1996). El patrón de motilidad durante la HA es variable en las diferentes especies de mamíferos estudiadas (Fig. 15) y, en algunas de ellas, se observa a la cabeza de los espermatozoides trazar una figura que se asemeja a un ocho durante el estado hiperactivado (Yanagimachi, 1994).

Se han sugerido varios roles potenciales para este tipo de motilidad. Por un lado, el espermatozoide hiperactivado penetra más eficientemente las sustancias visco-elásticas (Suarez, 1996). En ese sentido, hay que considerar que los espermatozoides deben penetrar el medio ambiente viscoso del fluido oviductal y, posteriormente, durante la

interacción con el ovocito, deben secuencialmente moverse a través de la matriz extracelular del *cumulus oophorus* y de la ZP. Por otro lado, la HA podría ayudar a los espermatozoides a ascender desde el oviducto al sitio de fertilización, permitiéndoles disociarse de la adhesión transitoria que establecen con el epitelio oviductal (Yanagimachi, 1994, Suarez, 1996). Además, debido a la mayor amplitud del movimiento, la HA aumentaría la probabilidad de encuentro entre los espermatozoides y el ovocito dentro de la *ampulla* (Yanagimachi, 1994).

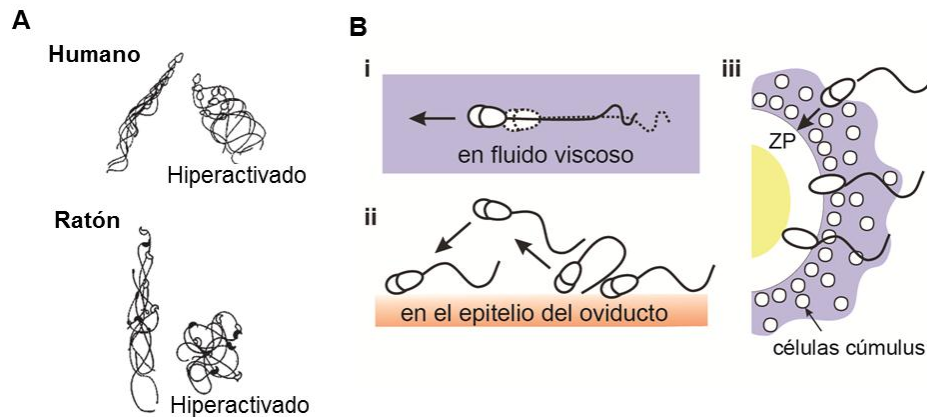


Figura 15. Hiperactivación. **(A)** Se representan los patrones de movimiento de un espermatozoide humano (Arriba) o de ratón (Abajo) progresivo o hiperactivado en un medio de baja viscosidad (Yanagimachi, 1994). **(B)** La HA sería relevante **i.** para avanzar en un medio viscoso como el tracto reproductor femenino, **ii.** para liberarse del epitelio del oviducto y avanzar por la *ampulla* (sitio de fertilización), y **iii.** para la penetración del cúmulus y la ZP (Darszon et al., 2011).

Si bien se supone que la HA podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino en el momento de la fertilización, aún hoy no hay consenso respecto a la identidad de dichos factores. Asimismo, las cascadas de señales que regulan la HA tampoco han sido completamente descritas, aunque se sabe que la alcalinización de los espermatozoides, el cAMP y el Ca^{2+} serían fundamentales para desencadenar dicho proceso. Por otra parte, se han descrito varias enzimas y canales que podrían estar involucrados en este proceso a juzgar por el hecho de que los ratones mutantes para dichos factores son incapaces de desencadenar el movimiento de HA tales como el canal CatSper y la enzima glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (Ho et al., 2009, Kota et al., 2010, Buffone et al., 2012). En este sentido, en el espermatozoide humano, se ha postulado que la progesterona, y otros factores como prostaglandinas, estimularían a CatSper a medida que transita el tracto femenino (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011).

El proceso de fertilización

Una vez que el espermatozoide se encuentra con el ovocito, se desencadena el proceso de fertilización, el cual, en mamíferos, ocurre generalmente en la *ampulla* del oviducto (Fig. 16A). El espermatozoide capacitado deberá atravesar las diferentes envolturas que rodean al ovocito (*cumulus oophorus* y ZP) para contactarse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Dicho proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-*cumulus oophorus* y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culmina con la fusión de las membranas (Fig. 16B) que desencadena la activación del ovocito. Luego, comienza la formación de los pronúcleos masculino y femenino y la singamia para dar lugar al desarrollo del nuevo embrión.

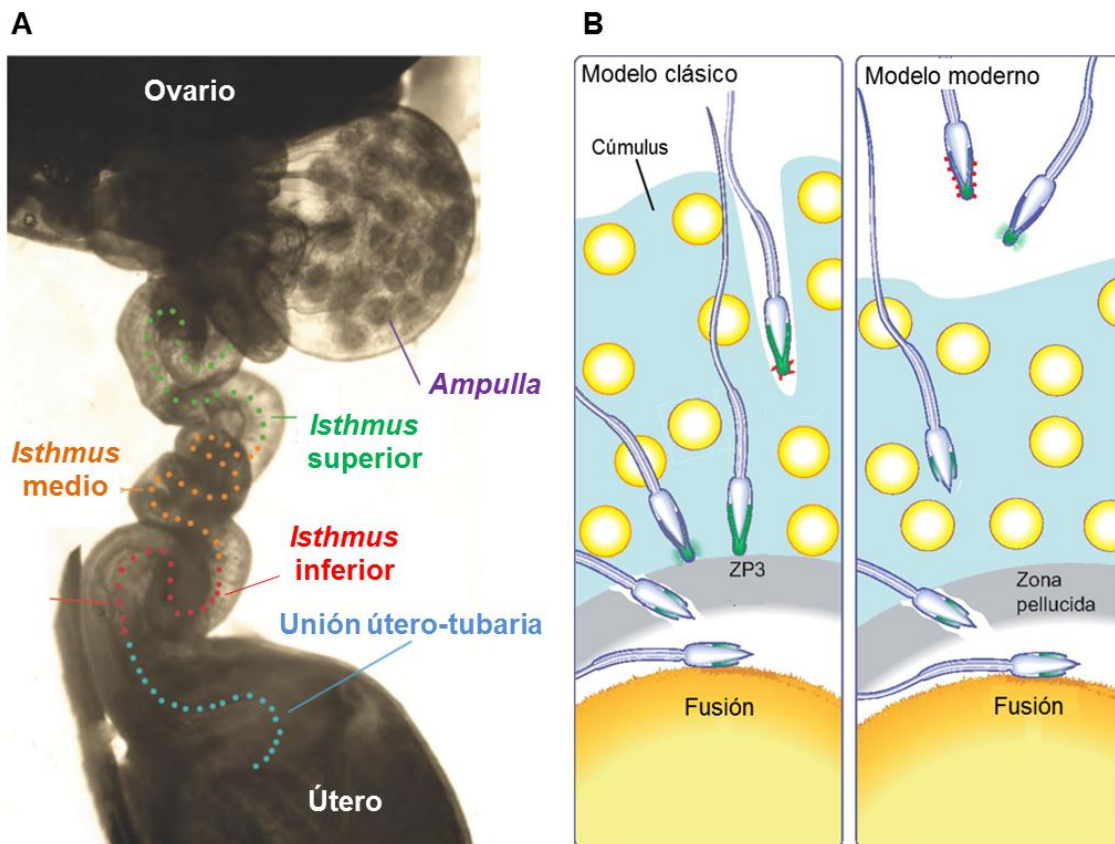


Figura 16. Fertilización **(A)** Se muestra un detalle del tracto femenino murino, indicándose las diferentes regiones del oviducto. Nótese los COC a través de la pared de *ampulla* (La Spina et al., 2016) **(B)** Dos modelos sobre la ocurrencia la RA. De todos modos, la fertilización involucra la penetración del cúmulus, la unión y posterior penetración de la ZP y, finalmente, la fusión de gametas (Okabe, 2013).

En la mayoría de las especies, el espermatozoide, una vez que atraviesa la unión útero-tubaria, se almacena en el *isthmus* hasta el momento de la ovulación. El epitelio del *isthmus* genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un período de tiempo hasta que se desencadena la ovulación. Cuando esta última ocurre, ciertos factores femeninos estimulan la liberación del espermatozoide del reservorio. Este proceso ayuda a reducir el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fertilización (la *ampulla*). Por otra parte, se han reportado evidencias de que los COC liberan sustancias quimioattractantes, como la progesterona, que ayudan al espermatozoide a movilizarse hacia la *ampulla* y localizar al ovocito (Guidobaldi et al., 2012).

Penetración del *cumulus oophorus*

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

Aún existe controversia respecto a los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la penetración del cúmulus. Algunas evidencias han sugerido que los espermatozoides poseerían hialuronidasas asociadas a la superficie de los mismos, y que estas enzimas serían las que ayudarían al pasaje a través del cúmulus (Talbot, 1985). En este sentido, se ha descrito que SPAM1 (*sperm adhesion molecule 1*, originalmente denominada PH-20), de origen testicular, presenta actividad de hialuronidasa en las diferentes especies en las que ha sido detectada (Primakoff et al., 1985, Gmachl et al., 1993, Lin et al., 1994, Cherr et al., 1996). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada en vista de que los ratones KO para SPAM1 son fértiles a pesar de sufrir un retardo en la dispersión del cúmulus respecto de los animales controles (Baba et al., 2002). En ese trabajo, se reveló la presencia de otra proteína con actividad hialuronidasa denominada HYAL5, presente en las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios de ratón. Los autores postulan la existencia de una redundancia en cuanto a la función de SPAM1 y HYAL5, por la cual HYAL5 estaría compensando la función de SPAM1 en los animales KO antes descritos (Kim et al., 2005). Más aún, la reciente generación de ratones doble KO para SPAM1 y las

serin-proteasas TESP5 o ACR (acrosina) sugieren que ambas proteínas actuarían cooperativamente junto a SPAM1 en la penetración del al cúmulus (Zhou et al., 2012). Por otra parte, el modelo de exocitosis acrosomal descrito anteriormente postula que, durante el avance de los espermatozoides hacia el ovocito, se produciría una liberación parcial de enzimas acrosomales, previa a la vesiculización completa del acrosoma, que sería responsable de degradar la matriz y permitir al espermatozoide avanzar entre las células del cúmulus.

Por otra parte, si bien aún no se ha esclarecido, la HA, tal como se mencionara anteriormente, sería importante para que los espermatozoides puedan moverse a través de la matriz extracelular del cúmulus y lograr penetrarlo hasta, finalmente, llegar al ovocito.

Interacción espermatozoide-ZP

Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP a la cual se une por la interacción entre moléculas presentes tanto en la superficie del espermatozoide como en la ZP (Fig. 17A).

Actualmente, existe controversia en lo que respecta a la penetración de la ZP. Basándose en evidencias provenientes de estudios en el ratón, se ha propuesto un modelo de adhesión entre el espermatozoide y la ZP que consta de dos etapas (Wassarman, 1988): 1) una unión primaria del espermatozoide intacto con la ZP, más específicamente con carbohidratos de ZP3, desencadenando así la RA, y 2) una unión secundaria del espermatozoide reaccionado, a través de ZP2. Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado por otros autores que proponen un nuevo mecanismo de interacción entre el espermatozoide y una estructura supramolecular compuesta por ZP2 y ZP3, en lugar de la interacción con una única glicoproteína en particular (Rankin et al., 2003, Hoodbhoy y Dean, 2004). Observaciones más recientes muestran que sólo el estado de la ZP2 sería importante para penetrar la ZP. De esta manera, una ZP2 procesada impediría el paso del espermatozoide a través de la ZP, mientras que una ZP2 intacta facilitaría el paso (Avella et al., 2013, Avella et al., 2014). Más aún, tal como se mencionara anteriormente, las evidencias actuales apoyan la idea de que el espermatozoide llegaría reaccionado a interactuar con la ZP.

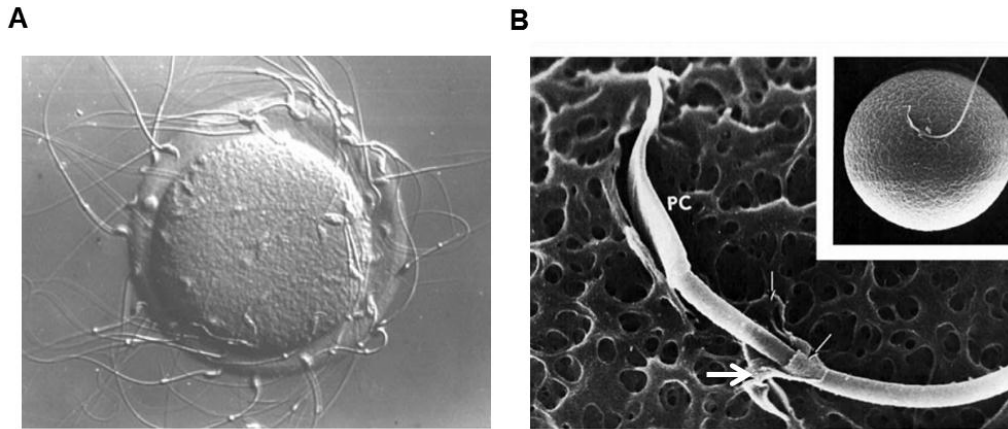


Figura 17. Interacción espermatozoide-ZP. **(A)** Microfotografía de espermatozoides unidos a la ZP de un ovocito de ratón (Wassarman, 2008). **(B)** Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de la cabeza de un espermatozoide de hámster penetrando la ZP. PC: canal de paso del espermatozoide. Nótese los restos del capuchón acrosomal señalados con una flecha blanca (Yanagimachi y Philips, 1984).

En cuanto a las moléculas del espermatozoide responsables de la unión con la ZP, se han sugerido algunas proteínas tales como SPAM1 (Myles y Primakoff, 1997, Yudin et al., 1999) y proacrosina/acrosina (Lea et al., 1996, Crosby et al., 1998, Furlong et al., 2000). Los machos KO para SPAM1 resultaron fértiles (Baba et al., 2002) probablemente, por redundancia funcional con HYAL5 (Kim et al., 2005). En el caso de acrosina, estudios con animales KO han replanteado el papel de esta enzima en el proceso de fertilización ya que los machos carentes de esta proteína son fértiles (Baba et al., 1994). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis que la interacción proacrosina/acrosina con ZP2 sería importante para la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, postulando la existencia de otras proteasas que pudieran reemplazar a proacrosina/acrosina en los animales KO (Howes et al., 2001).

La familia de proteínas denominada ADAM (*a disintegrin and a metalloprotease domain*), compuesta por alrededor de 40 miembros (Kim et al., 2006), posee tres miembros que habían sido originalmente postulados como mediadores del proceso de fusión espermatozoide-ovocito: fertilina α /ADAM1 (formado por 2 subunidades: α y β), fertilina β /ADAM2 y cirtestina/ADAM3 (Evans, 1999, Okabe, 2013). A pesar de que el análisis de la fertilidad de ratones KO deficientes para ADAM1a (sólo presente en células germinales testiculares) ó ADAM2 indicó que los machos son infértiles (Cho et al., 1998, Nishimura et al., 2004), el fenotipo de los ratones fue inesperado y complejo. En ambos

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

La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP (Fig. 17B) para la cual se han propuesto dos hipótesis (Yanagimachi, 1994). Una de ellas, la hipótesis “enzimática”, sostiene que el pasaje a través de la ZP sería dependiente de la acción de enzimas presentes en el acrosoma. Según esta teoría, la mayoría de dichas enzimas serían liberadas sobre la superficie de la ZP durante la RA, provocando la hidrólisis de la porción de la ZP que rodea al espermatozoide y haciendo más permeable a la misma. Otras enzimas permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de procesar a las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se haya unido, permitiendo así el avance a través de la ZP. La segunda hipótesis, denominada “mecánica”, propone que la ZP permitiría la exposición del *perforatorium*, una estructura rígida que cortaría la ZP y que, conjuntamente la fuerza mecánica aportada por la HA, permitiría la penetración de la ZP. Esta hipótesis ha sido respaldada fuertemente por las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos euterianos, incluyendo la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil filoso del *perforatorium* y la rigidez de la membrana acrosomal interna

(Bedford, 2004). Por otra parte, O'Rand y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis que involucraría ambos mecanismos. En primer lugar, el espermatozoide se asociaría a la ZP a través de una unión de alta afinidad (O'Rand et al., 1986), se produciría entonces la degradación de las moléculas de la ZP involucradas en esa interacción, dejando libres a las proteínas del espermatozoide que quedarían disponibles para interactuar con nuevas moléculas de la ZP. En este punto, jugaría un papel importante la motilidad, ya que si el espermatozoide no se moviera en forma progresiva, la probabilidad de encontrar nuevas moléculas para interactuar sería muy baja y la penetración no se produciría. En este sentido, el grupo de Dean y colaboradores propuso que el espermatozoide intacto reaccionaría al atravesar la ZP por un efecto mecánico de los poros de la misma (Baibakov et al., 2007). Sin embargo, nuevamente, esta teoría no tiene tanta aceptación actualmente debido a las nuevas evidencias que apoyan que la RA ocurriría previo a la llegada a la ZP.

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

Fusión del espermatozoide con el ovocito

Una vez que el espermatozoide ha penetrado la ZP, rápidamente atraviesa el espacio perivitelino microambiente que contiene vesículas membranosas secretadas por el ovocito que serían capaces de interactuar con el espermatozoide y favorecerían su capacidad fusogénica (Miyado et al., 2008). A continuación, tiene lugar la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito. Sólo luego de la ocurrencia de esta fusión, un ovocito puede considerarse fertilizado. La fusión del espermatozoide con el ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión, y una segunda de fusión, propiamente dicha. Este proceso comienza con la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito y, luego de un breve período que varía según la especie, se produce la fusión del segmento ecuatorial y una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi y Phillips, 1980). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (Fig. 18 y 19).

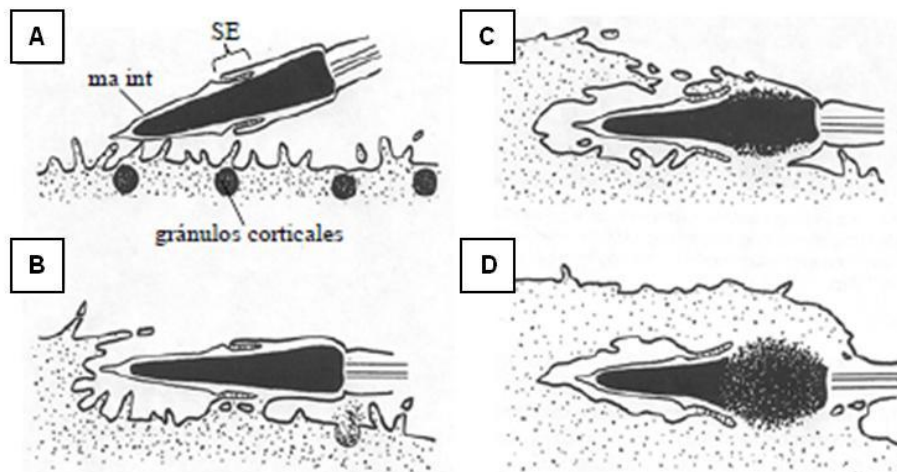


Figura 18. Fusión espermatozoide-ovocito. Se muestra un esquema de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. **(A)** Inicio de la interacción entre el segmento ecuatorial y el oolema, **(B)** Fusión de algunos puntos, **(C)** la membrana del ovocito rodea la parte anterior de la cabeza, **(D)** se incorpora el espermatozoide al ooplasma mediante fusión de la parte posterior de cabeza y la cola, y fagocitosis de la parte anterior. ma int: membrana acrosomal interna, SE: segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994).

Los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambas células ya que no toda la membrana plasmática de las gametas es fusogénica. El ovocito de roedores se encuentra recubierto de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área que coincide con la región que recubre al huso meiótico (Ebensperger y Barros, 1984) y a través de la cual, raramente, ocurre la fusión del espermatozoide (Johnson et al., 1975, Ebensperger y Barros, 1984). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y se libera por esta región luego de la fertilización, por lo cual el espermatozoide podría interferir con la correcta liberación del corpúsculo, o bien ser eliminado durante el proceso de extrusión. Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford, 1978). En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial (SE) es la que primero se fusiona con el ovocito (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988, Arts et al., 1993). La motilidad parecería no ser un requisito absoluto para la ocurrencia de la fusión ya que se ha demostrado que espermatozoides inmóviles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito. Sin embargo, recientemente, se ha propuesto que un tipo de motilidad sutil sería necesaria para estimular la fusión de las membranas (Ravaux et al., 2016). Por otro lado, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión ya que solo luego de dicha reacción el segmento ecuatorial adquiere propiedades fusogénicas de modo que los espermatozoides no reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).

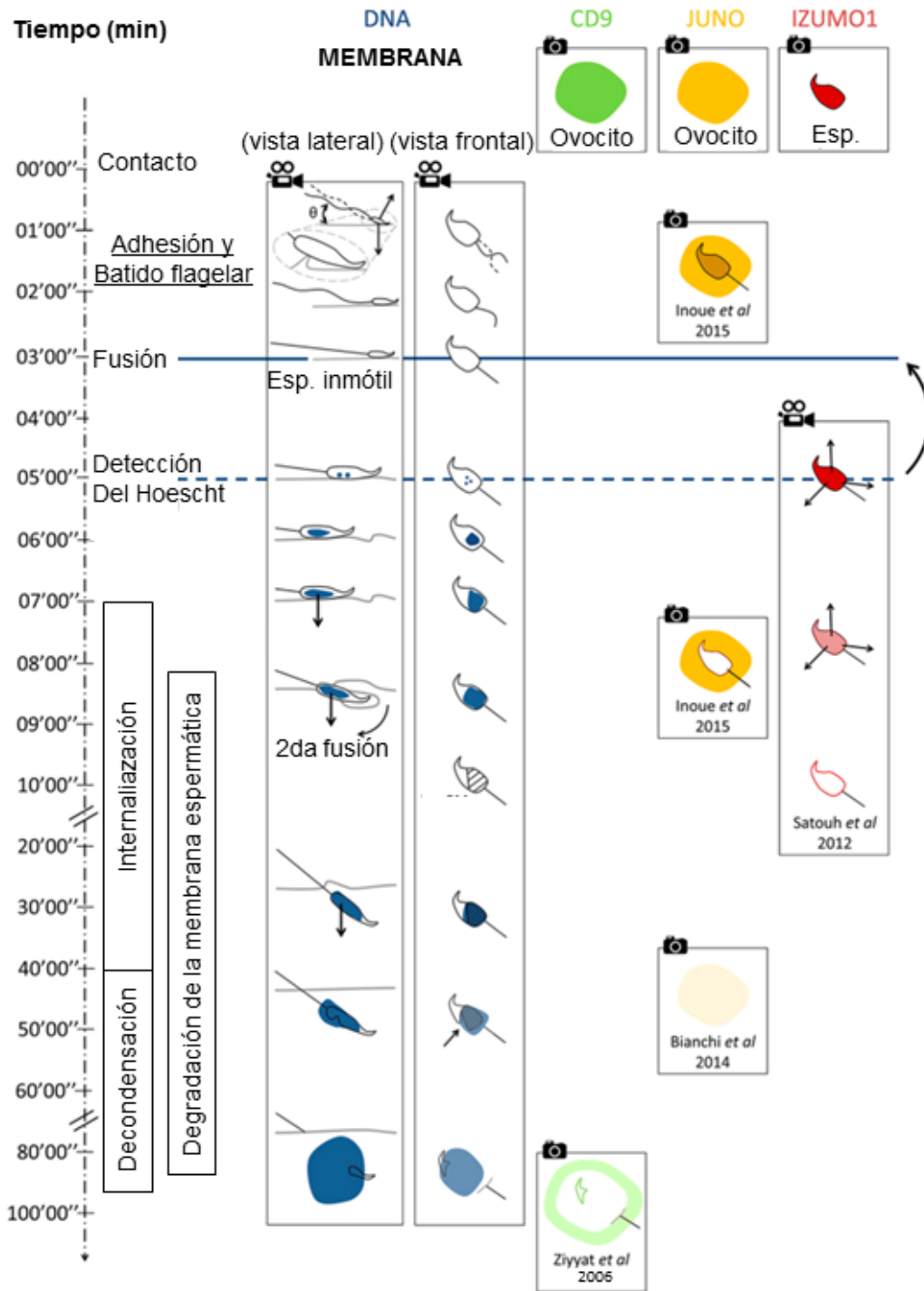


Figura 19. Fusión espermatozoide-ovocito. Se muestra un esquema temporal de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. En particular se muestran los cambios que suceden a nivel de las membranas de las gametas, del núcleo del espermatozoide y de las proteínas esenciales para la fusión. Las cámaras de foto y las de video indican si las observaciones correspondientes fueron hechas por microscopía en un momento dado o en tiempo real, respectivamente (Ravaux et al., 2016).

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

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

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

moléculas del ovocito responsable del proceso de fusión entre el espermatozoide y el ovocito. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fusión de gametas y para la fertilidad femenina. Resultados más recientes indicaron que CD9 generaría sitios específicos de adhesión que regularían la fusión espermatozoide-ovocito, acercando y reuniendo a todos los intermediarios de este proceso (Jegou et al., 2011), y que la porción C-terminal de esta molécula estaría involucrada en la formación de dichos complejos y sitios de adhesión (Wang et al., 2011). Además, se ha descrito que la proteína CD9 estaría presente en las vesículas membranosas secretadas por el ovocito y presentes en el espacio perivitelino las cuales serían capaces de interactuar con el espermatozoide y participarían en la fusión de gametas (Miyado et al., 2008). Luego de la fertilización, se observó que CD9 se desplaza de la zona por la cual se incorporó el espermatozoide (Ziyyat et al., 2006) (Fig. 19).

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

Respecto a las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión existen estudios de proteínas que son relevantes para este proceso tales como las proteínas CRISP, sin embargo, hasta el momento solo IZUMO1 resultó ser completamente esencial para la fusión. La proteína IZUMO1, corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide (Inoue et al., 2005). La relevancia de esta proteína para la fertilidad y su rol en el proceso de fusión fueron confirmados mediante el análisis de los animales KO para IZUMO. Los machos mutantes son estériles debido a que tienen comprometida la capacidad fusogénica de sus

espermatozoides (Inoue et al., 2005). En este sentido, resultados utilizando ratones KO para *Tssk6* (*testis-specific serine kinase 6*) mostraron que sus espermatozoides eran incapaces de fusionarse con el ovocito debido a que la proteína IZUMO no se redistribuía correctamente (Sosnik et al., 2009). Recientemente, se logró identificar a la proteína JUNO, que actúa como receptor de IZUMO1 en la membrana del ovocito (Bianchi et al., 2014) y sería esencial para la fertilización. Asimismo, la unión IZUMO1-JUNO estaría conservada en distintas especies de mamíferos tales como humano y cerdo. La interacción entre IZUMO1-JUNO sería de baja afinidad y ocurriría en los primeros pasos del proceso de fusión (pre-fusión, unos pocos segundos), que iniciaría la formación de un agregado molecular o *clustering* de alta afinidad y robusto entre ambas membranas formado por CD9 e IZUMO1. Por lo tanto, la correcta interacción entre las moléculas JUNO-IZUMO estaría fortalecida por la tetrasparina CD9 (Chalbi et al., 2014), la cual fue propuesta previamente como organizadora de las microdominios implicados en la fusión de membranas (Hemler, 2005). Más aún, recientemente, se ha demostrado que la proteína IZUMO de espermatozoides humanos tiene la capacidad de interactuar con la molécula JUNO presente en ovocitos de hámsters, siendo éste el posible mecanismo por el cual los ovocitos de dicha especie pueden ser penetrados y fusionarse con espermatozoides humanos (Bianchi y Wright, 2015). Luego de ocurrida la fusión, se observa una pérdida progresiva de la marca correspondiente a IZUMO1 (Satouh et al., 2012) (Fig. 19).

Finalmente, la participación de las proteínas CRISP en el proceso de fertilización será desarrollada en profundidad en una sección posterior de la introducción.

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

En la Figura 20 se resumen los eventos más relevantes que ocurren en el tracto reproductor femenino desde la eyaculación hasta la fertilización del ovocito (Aitken y Nixon, 2013).

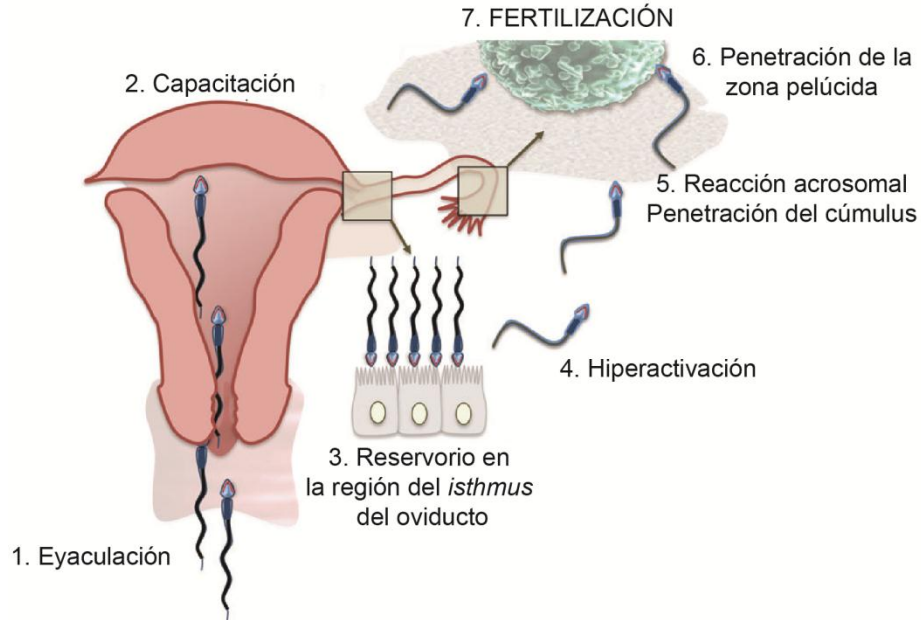


Figura 20. Los distintos eventos en el tracto femenino **1.** Durante la eyacuación, los espermatozoides se liberan en el tracto genital femenino, las células se mueven progresivamente pero no están capacitadas. **2.** Los espermatozoides transitan por el útero, iniciando la capacitación. **3.** Los espermatozoides continúan con la capacitación hasta su llegada al oviducto, donde se genera un reservorio en la región del *isthmus*. Los espermatozoides se unen al epitelio del oviducto permaneciendo quiescentes hasta la llegada de la señal de la ovulación. **4.** La cual genera nuevamente distintos cambios para finalizar el proceso de capacitación y desarrollar la HA, los espermatozoides se liberan del epitelio y finalmente, migran hacia la *ampulla*, el sitio de la fertilización. **5 y 6.** Las células sufren la RA y penetran la matriz del cúmulus y la ZP. **7.** El último paso involucra la fertilización del ovocito (Aitken y Nixon, 2013).

Activación del ovocito

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, y formación de un nuevo individuo, denominado activación ovocitaria. Este proceso incluye eventos tempranos como la exocitosis de gránulos corticales, involucrada en la prevención de polispermia, y la reasunción de la meiosis; y eventos tardíos, entre los que se encuentran la extrusión del segundo corpúsculo polar, la descondensación de la cabeza espermática y el reclutamiento de mRNA (Yanagimachi, 1994, Raz y Shalgi, 1998). En mamíferos, el espermatozoide desencadena la activación del ovocito al gatillar una serie de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Sanders y Swann, 2016). El factor que aporta el espermatozoide

responsable de inducir la activación del ovocito sería la fosfolipasa C zeta (PLC ζ) (Nozawa et al., 2018) (Fig. 21).

En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas que contienen mucopolisacáridos y diversas enzimas (Ducibella, 1996). Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% del contenido de los gránulos corticales ha sido liberado por exocitosis hacia el espacio perivitelino (Ducibella, 1991, Hoodbhoy y Talbot, 1994, Ducibella, 1996). Su función es modificar la ZP, como así también el oolema de forma tal de prevenir la polispermia. En este sentido, más recientemente, se describió que la proteína ovastacina presente en estos gránulos, estaría involucrada en el clivaje de ZP2, generando en consecuencia, la modificación en la ZP (Burkart et al., 2012).

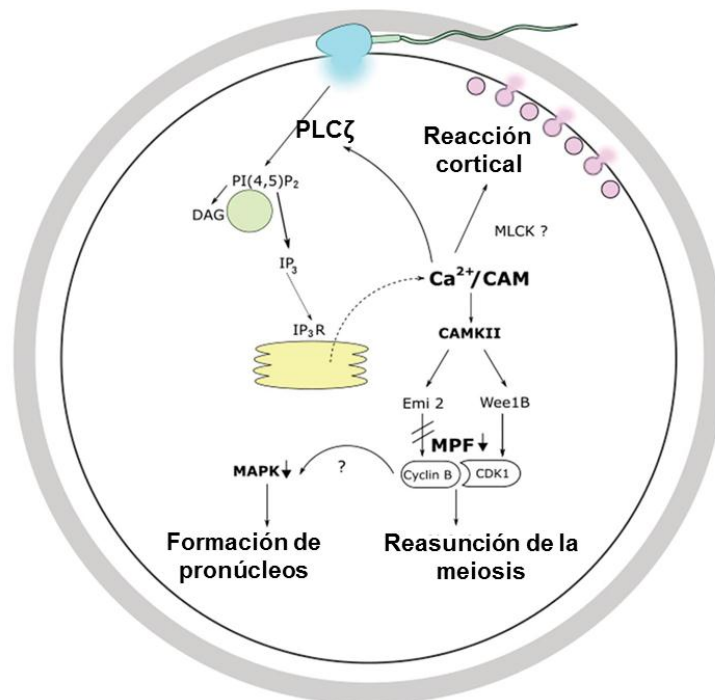


Figura 21. Activación del ovocito. Representación de las cascadas de señalización gatilladas por la fusión del espermatozoide que llevan a la exocitosis de los gránulos corticales (reacción cortical), la reanudación de la meiosis y la formación de los pronúcleos (Sanders y Swann, 2016).

Luego de la fusión, se reinicia la meiosis, con la posterior liberación del segundo corpúsculo polar y transformación del complemento haploide en el pronúcleo femenino.

En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica.

Familia de proteínas CRISP

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

Las CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*), como su nombre lo indica, son proteínas secretorias ricas en cisteínas que se caracterizan por tener 16 cisteínas conservadas, 10 de las cuales se encuentran en el dominio C-terminal de la molécula llamado CRD (*Cysteine Rich Domain*) (Gibbs et al., 2008). Estudios de cristalografía indican que todos los miembros de la familia presentan una estructura general caracterizada por la presencia de dos dominios definidos: el ya mencionado CRD, de aproximadamente 6 kDa, y el N-terminal llamado *Pathogenesis Related 1* (PR-1) o dominio CAP de aproximadamente 21 kDa (Guo et al., 2005; Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2008). El CRD, a su vez, está compuesto por dos regiones el *Hinge* y el ICR (*Ion channel regulator*). De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento, se ha sugerido que cada uno de estos dominios tendría funciones biológicas independientes. Mientras se ha encontrado que el dominio CRD de varias proteínas CRISP, a través de su región ICR, presentaría la capacidad de regular canales iónicos (Guo et al., 2005, Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2011, Ernesto et al., 2015), las evidencias indican que el dominio N-terminal participaría en la interacción entre membranas (Maeda et al., 1999, Ellerman et al., 2006). Por otra parte, el dominio CRD se conecta a través del *Hinge* con el PR-1, no existiendo ningún otro contacto ente el PR-1 y el ICR (Gibbs et al., 2008) (Fig. 22).

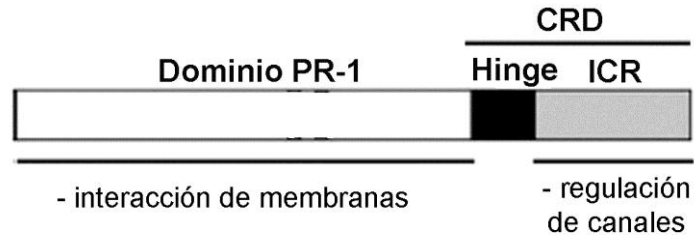


Figura 22. Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas de la familia CRISP y su relación con las funciones propuestas (Ellerman et al., 2006).

Las proteínas CRISP pertenecen a su vez a una superfamilia denominada CAP (*CRISP, Antigen 5, and Pathogenesis-Related*) cuyos miembros están presentes desde procariontes hasta eucariotes y tienen en común al dominio CAP (Gibbs et al., 2008, Abraham y Chandler, 2017). Las proteínas CAP cumple funciones muy diversas incluyendo roles en reproducción, en defensa contra patógenos y toxicidad (Gibbs et al., 2008). Sin embargo, a pesar de estar presentes en tan diversos organismos (Fig. 23), muy pocos miembros de la superfamilia han sido estudiados en relación a su función biológica. En este sentido, nuestro laboratorio ha llevado a cabo numerosos estudios para determinar la función de las proteínas CRISP de mamíferos durante el proceso de fertilización en distintas especies (revisión en Cohen et al., 2008, Da Ros et al., 2015).

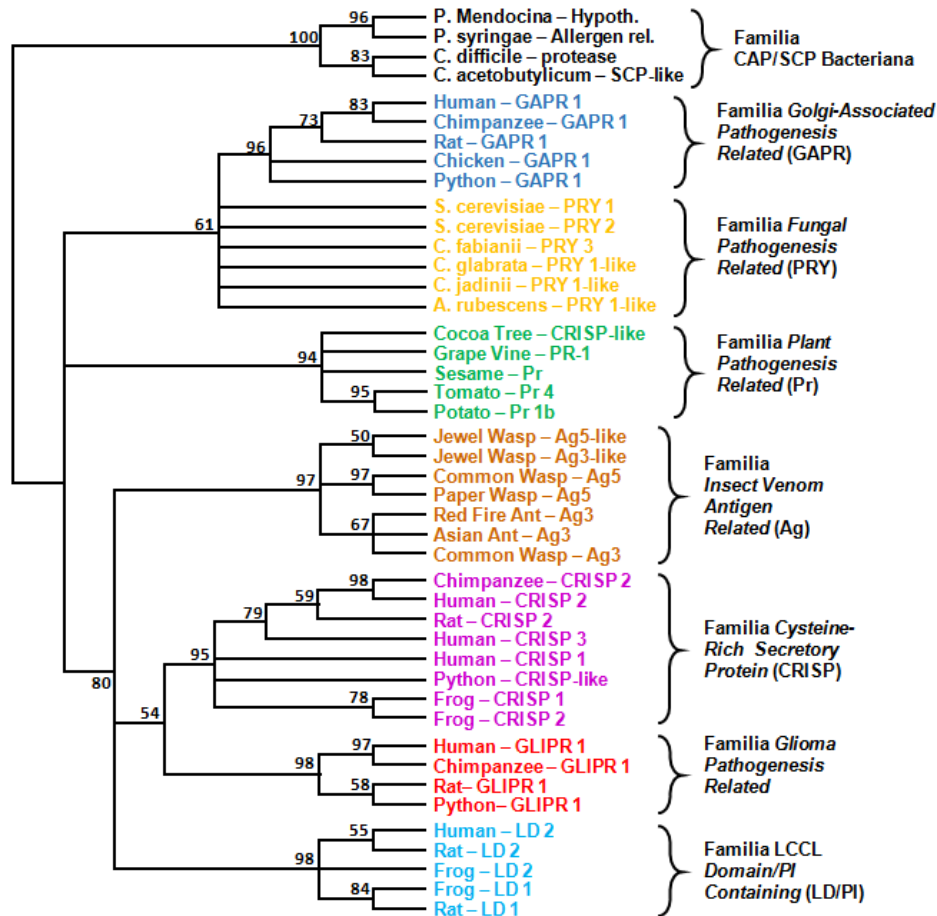


Figura 23. Árbol filogenético demostrando la diversidad de las proteínas de la superfamilia CAP (Abraham y Chandler, 2017).

La familia de proteínas CRISP surgió a partir de la adición del Hinge y del ICR al dominio CAP ancestral y se encuentra presente en algunos invertebrados tales como los insectos, y en toda clase de vertebrados (Abraham y Chandler, 2017). Hasta el momento, las especies de mamíferos que han sido estudiadas presentan entre 3 y 4 genes distintos que codifican para proteínas CRISP. Dichos genes presentan un alto grado de conservación entre ellos en comparación con sus homólogos de reptiles (Sunagar et al., 2012). Si bien las relaciones evolutivas entre las CRISP de mamíferos aún se encuentran en debate, en un proyecto del Dr. Eduardo Roldán (Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), España), con el que nos encontramos actualmente colaborando, se estableció parte de la historia evolutiva de la familia (Fig. 24).

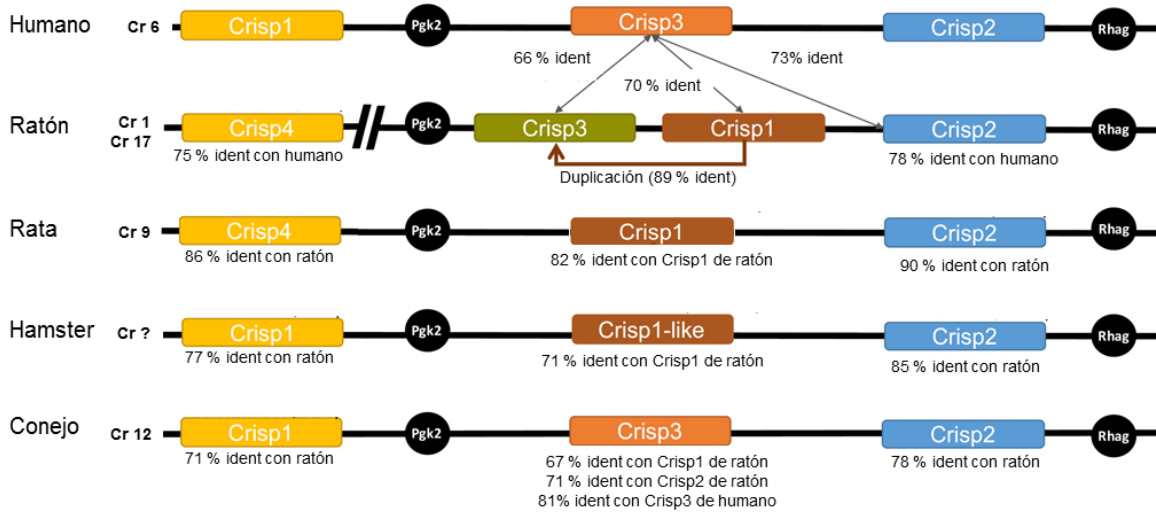


Figura 24. Esquema que indica la presencia de genes *Crisp* en diferentes especies de mamíferos, su localización en el genoma y porcentajes de identidad entre algunas de ellos. Los diferentes colores señalan los ortólogos directos (Arévalo et al., en revisión).

Tal como se muestra en la Figura 24, únicamente en el ratón se encuentran presentes 4 genes que codifican para proteínas CRISP (*Crisp1-4*). A continuación se realiza una descripción de cada una de las proteínas, manteniendo la nomenclatura histórica.

Proteína CRISP1

Como se mencionara anteriormente, la proteína CRISP1 ha sido identificada, caracterizada y purificada en nuestro laboratorio (Cameo y Blaquier, 1976, Garberi et al., 1979, Garberi et al., 1982) utilizando, en primer lugar, a la rata como modelo. CRISP1 (32 kDa), es una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo de rata, es sintetizada en forma andrógeno-dependiente (Kohane et al., 1983) y se asocia a los espermatozoides a medida que los mismos transitan por el epidídimo (Kohane et al., 1980b; Kohane et al., 1980a). Resultados posteriores de nuestro grupo indicaron la existencia de dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil, y una fracción minoritaria que se asocia con alta afinidad (Cohen et al., 2000). Recientes resultados permitieron comprender mejor los mecanismos por los cuales las dos poblaciones de CRISP1 se asociarían a la membrana del espermatozoide durante la maduración epididimaria. Tal como se muestra en la Figura 25, en el *caput* epididimario, la proteína CRISP1 fuertemente unida a los espermatozoides provendría de la

trasferencia de la misma desde los epididimosomas (vesículas presentes en el fluido epididimario) (Maldera et al., 2006) (Fig. 25A). A medida que transitan por el epidídimo, los espermatozoides se expondrían a concentraciones cada vez mayores de CRISP1, la cual se uniría débilmente a la gameta por un mecanismo que involucra la formación de complejos entre la proteína y el zinc (Maldera et al., 2011) (Fig. 25B). De esta manera, el espermatozoide maduro presentaría ambas poblaciones de CRISP1 en su superficie (Fig. 25C).

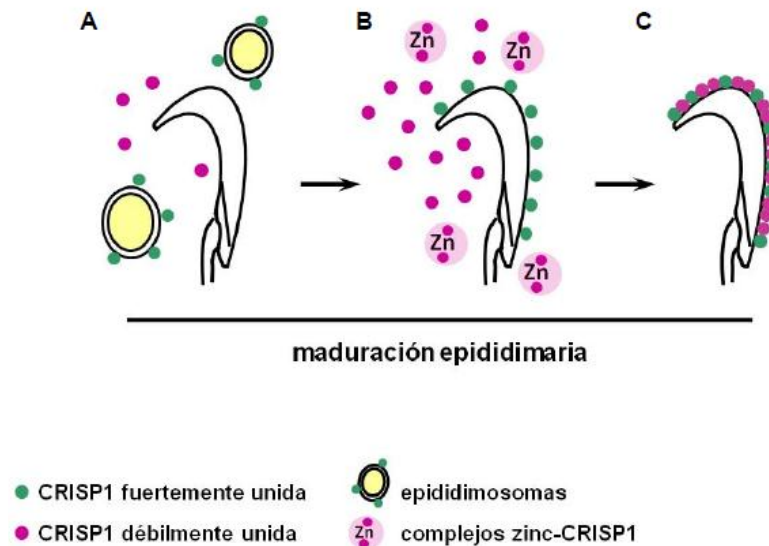


Figura 25. Esquema de los mecanismos involucrados en la asociación de las dos poblaciones de CRISP1 al espermatozoide durante la maduración epididimaria.

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

Si bien una proporción de CRISP1 se libera durante la capacitación, estudios de microscopía electrónica detectaron la permanencia de una población de la misma en espermatozoides reaccionados (Cohen et al., 2000). Posteriormente, se observó que, luego de la capacitación tanto *in vitro* como *in vivo*, la proteína CRISP1 migra de la región dorsal de la cabeza del espermatozoide hacia el segmento ecuatorial (Rochwerger and

Cuasnicu, 1992, Fig. 26A). Considerando que sólo las proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación y/o RA pueden estar involucradas en la interacción con el ovocito, en nuestro laboratorio se realizaron diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP1 en la interacción de gametas. La exposición de espermatozoides de rata a anticuerpos anti-CRISP1 previo a la inseminación intrauterina produjo una disminución significativa en los porcentajes de ovocitos fertilizados (Cuasnicu et al., 1984). Este resultado constituyó la primera evidencia de la posible participación de CRISP1 en el proceso de fertilización. Estudios posteriores demostraron que la presencia de CRISP1 purificada durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados. La presencia de CRISP1 no afectó, sin embargo, la unión inicial de los espermatozoides al oolema, indicando que la proteína participaría en un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a la fusión de las membranas (Rochwerger and Cuasnicu, 1992). Estos resultados sugerían la existencia de sitios de unión para CRISP1 en la membrana del ovocito, los cuales fueron detectados mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta en toda la superficie del ovocito, exceptuando un área negativa correspondiente a la membrana plasmática que recubre el huso meiótico y por la cual, raramente, ocurre la fusión (Figura 26B).

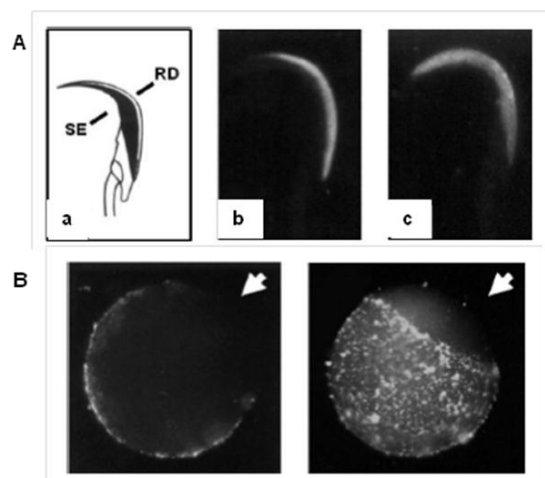


Figura 26. Localización de la proteína CRISP1 sobre el espermatozoide y de sus sitios complementarios en el ovocito. **(A)** Esquema de la cabeza de un espermatozoide de rata en donde se distinguen la región dorsal (RD) y el segmento ecuatorial (SE) (a). Microfotografía de la cabeza de un espermatozoide de rata con marca fluorescente para CRISP1 en la región dorsal (b), y el segmento ecuatorial (c). **(B)** Microfotografías de un ovocito de rata sin ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión para CRISP1. Se muestran dos planos focales del mismo ovocito. La flecha indica el área negativa (Rochwerger and Cuasnicu, 1992).

Estudios posteriores, utilizando la proteína CRISP1 nativa deglicosilada, la proteína recombinante expresada en un sistema procariótico una serie de fragmentos recombinantes, indicaron no sólo que los carbohidratos no serían esenciales para el rol de la proteína en fusión (Ellerman et al., 2002) sino también que la región comprendida entre los aminoácidos 114-158 del dominio PR-1 mantendría la actividad biológica de la proteína completa. Un hallazgo muy interesante fue el hecho de que esta secuencia de 45 aminoácidos contuviera los dos motivos característicos de la familia CRISP, denominados *Signature1* y *Signature2* (Fig. 27). El uso de péptidos sintéticos correspondientes a estos dominios (P1 y P2, respectivamente) en ensayos de IFI y de fertilización *in vitro* indicó que P2, pero no así P1, era capaz de unirse a la superficie del ovocito e interferir con la fusión de gametas. En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos altamente conservada de la familia CRISP, correspondiente al *Signature2* (Ellerman et al., 2006). Según nuestro conocimiento, ésta fue la primera vez que se describió un rol funcional para un motivo de la familia CRISP, y que se logró delimitar la actividad de una proteína CRISP a una región tan pequeña.

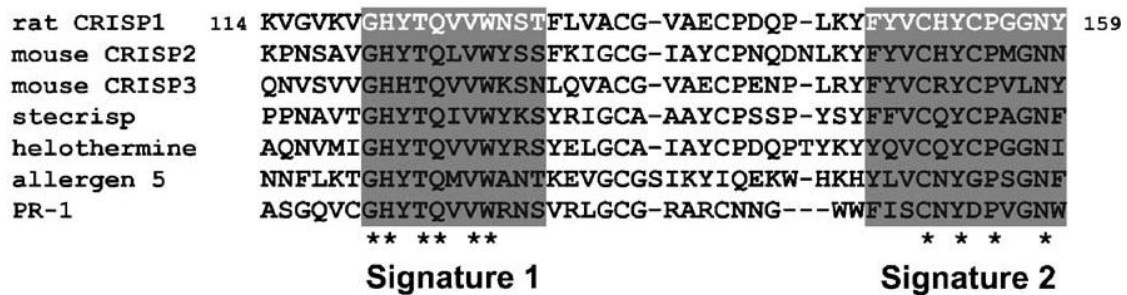


Figura 27. *Signatures* 1 y 2 de la familia de proteínas CRISP. Se muestran las secuencias de los *Signatures* de las proteínas CRISP1 de rata (rat CRISP1), CRISP2 y CRISP3 de ratón (mouse CRISP2-3), stecrisp de levaduras, helotermine de anfibios, Ag5 de insectos (Allergen 5) y PR-1 de plantas. Los asteriscos marcan los aminoácidos idénticos en todas las secuencias (Ellerman et al., 2006).

Tal como se mostrara en la Figura 24, la proteína CRISP1 de rata presenta alta homología con la proteína CRISP1 de ratón (Mizuki y Kasahara, 1992, Haendler et al., 1993). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que CRISP1 murina se encuentra presente en la superficie del espermatozoide y también participa en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito (Cohen et al., 2000, Da Ros et al., 2008). Más aún, ensayos de IFI mostraron la existencia de sitios complementarios para la proteína en la

región fusogénica del ovocito murino, tal como previamente se había observado para la rata (Cohen et al., 2000). Más allá de la participación de CRISP1 en la etapa de fusión de gametas, estudios posteriores realizados tanto en rata como en ratón, demostraron que la co-incubación de espermatozoides y ovocitos rodeados de ZP en presencia ya sea de anti-CRISP1 o de proteína CRISP1 nativa, produjo una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Busso et al., 2007a). Ensayos posteriores en los cuales se evaluó el efecto de anti-CRISP1 y CRISP1 en el número de espermatozoides unidos por ovocito indicaron que la proteína participaría en el paso inicial de unión del espermatozoide a la ZP. Por otro lado, si bien la presencia de la proteína CRISP1 recombinante también inhibió significativamente la fertilización, en este caso se produjo un aumento en el número de espermatozoides perivitelinos, indicando que existía un bloqueo a nivel del oolema sin efectos sobre la etapa de interacción con la ZP. Ensayos de IFI indicaron que mientras CRISP1 nativa era capaz de unirse al oolema y a la ZP (Fig. 28), la proteína recombinante sólo se unía al oolema, sugiriendo que la glicosilación y/o la conformación de CRISP1 serían importantes para su unión a ZP. En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 cumpliría una doble función en la interacción de gametas, participando tanto en la etapa de fusión como de la interacción espermatozoide-ZP (Busso et al., 2007a).

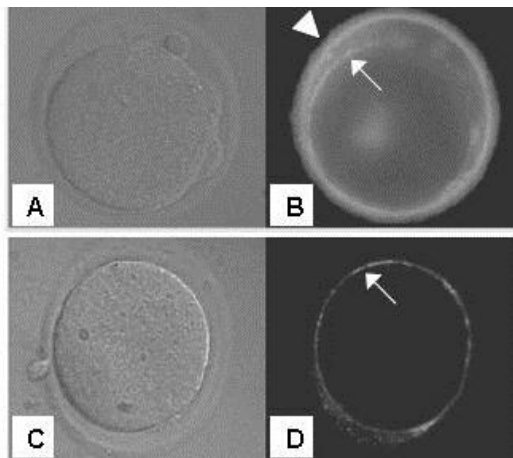


Figura 28. Localización de los sitios complementarios a CRISP1 en el ovocito. Microfotografías de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP1 nativa (A y B) y de CRISP1 recombinante (C y D) tanto en la ZP (punta de flecha) como en el oolema (flecha) (Busso et al., 2007a).

Por otro lado, se ha descrito una proteína humana denominada ARP o hCRISP1 (Kratzschmar et al., 1996, Hayashi et al., 1996) con altos niveles de homología con CRISP1 de rata. hCRISP1 también se encuentra unida al espermatozoide humano y participa en la unión del mismo a la ZP y en la fusión de gametas (Cohen et al., 2001, Maldera et al., 2014). Pese a que hCRISP1 sería en realidad el ortólogo directo de CRISP4 de ratón y de rata (ver Fig. 24), al momento de nombrar a la proteína humana no se había identificado a CRISP4 de roedores. De todos modos, las evidencias sugieren que hCRISP1 cumpliría el papel de homólogo funcional tanto de CRISP1 como de CRISP4 de roedores.

Además de su participación en el proceso de fertilización, CRISP1 resultó relevante para la fertilidad a juzgar por experimentos indicando que la inmunización activa de ratas hembras y machos con CRISP1 era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Cuasnicú et al., 1990, Perez Martinez et al., 1995). Estudios posteriores indicaron que dicho efecto ocurriría a través de un mecanismo específico que involucra la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, su asociación a los espermatozoides, y la posterior inhibición de su capacidad fertilizante sin provocar efectos patológicos (Ellerman et al., 1998). Posteriormente, se demostró que la proteína CRISP1 recombinante también era capaz de generar una respuesta inmune en ratas tanto machos como hembras, resultando en una disminución significativa de la fertilidad de los animales (Ellerman et al., 2008). Estos resultados confirmaron la relevancia de CRISP1 para la fertilidad de un individuo como así también el potencial uso de esta proteína para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad. En este sentido, en nuestro grupo también evaluamos si la inmunización con hCRISP1 recombinante generaba una respuesta inmune específica en primates no humanos, observándose una respuesta inmune específica en monos de ambos sexos. Los sueros inmunes fueron capaces de reconocer a la proteína nativa de mono (mARP) tanto en extractos proteicos de espermatozoides por *western blot*, como sobre espermatozoides frescos por IFI. Además, ensayos de ELISA e IFI indicaron que los anticuerpos anti-hCRISP1 no sólo se encontraban presentes en el plasma seminal sino también unidos a los espermatozoides provenientes de animales inmunizados con hCRISP1, sin observarse efectos sobre el número, morfología y motilidad de dichos espermatozoides, excluyendo así posibles efectos deletéreos de la inmunización (Ellerman et al., 2010). Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-hCRISP1 estarían involucrados en inmuno-infertilidad abriendo la posibilidad de utilizar a

la proteína hCRISP1 para el desarrollo de métodos de regulación y diagnóstico de la fertilidad.

Con el fin de investigar más profundamente la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, en el laboratorio se generó una línea de ratones KO para dicha proteína. La estrategia utilizada fue interrumpir el gen *Crisp1* murino mediante recombinación homóloga (para más información ver sección “Animales genéticamente modificados” de la introducción). De esta manera, se logró establecer una colonia de animales KO con un fondo genético mixto (129/SvEvxC57B/6) que constituyen los primeros animales KO producidos para una proteína de la familia CRISP.

El fenotipo de los animales carentes de CRISP1 mostró que los mismos eran normales en cuanto a su viabilidad y crecimiento, y no presentaban diferencias en su fertilidad respecto a los animales control. Sin embargo, el análisis de diversos parámetros funcionales de los espermatozoides reveló que si bien los mismos presentaban una motilidad, viabilidad y RA normal, exhibían una marcada disminución en el nivel de pTyr, evento clave dentro del proceso de capacitación (Da Ros et al., 2008) así como en los porcentajes de HA (Weigel Muñoz et al., en revisión). Además, los machos de una nueva colonia KO para *Crisp1* con fondo genético homogéneo C57BL/6 presentaron defectos en otros parámetros tales como la motilidad y la RA acrosomal inducida (Weigel Muñoz, 2013).

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

en que, si la presencia de la proteína CRISP soluble inhibía aún más la capacidad fusogénica del espermatozoide KO, dicho espermatozoide se estaría uniendo, probablemente, al mismo sitio complementario de CRISP1 en el oolema, pero a través de otra proteína del espermatozoide. El hallazgo de que las proteínas CRISP1 y CRISP2 pero no así la proteína hCRISP1, redujeran significativamente aún más la capacidad fusogénica de los espermatozoides KO, apoyó la idea de que otra proteína homóloga a CRISP1, y con un S2 muy similar (Fig. 27), tal como CRISP2 estaría involucrada en la fusión de gametas, cooperando funcionalmente con CRISP1. Tampoco se puede descartar que CRISP3 o CRISP4 se encontraran también compensando la falta de CRISP1.

Por último, recientes resultados obtenidos mediante registros electrofisiológicos en espermatozoides de ratón indican claramente que la proteína CRISP1 sería capaz de regular canales TRPM8 así como a CatSper (Ernesto et al., 2015), siendo de esta forma CRISP1 el primer inhibidor fisiológico descrito para el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide. Más aún, se observaron menores niveles de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides expuestos a CRISP1 a través de mediciones de microscopía en tiempo real utilizando una sonda sensible a dicho ion (Ernesto et al., 2015), consistente con las evidencias previas indicando que las CRISP de venenos de reptiles son capaces de regular una amplia variedad de canales iónicos (Gibbs et al, 2008). En conjunto, los resultados nos han llevado a proponer que mientras la población de CRISP1 fuertemente unida al espermatozoide participaría en la interacción con el ovocito a través del dominio PR-1, la proteína CRISP1 débilmente unida al espermatozoide que se libera durante la capacitación cumpliría un rol como factor decapacitante regulando canales de Ca^{2+} TRPM8 y CatSper, muy probablemente, a través del dominio CRD. Incluso, esta actividad reguladora de canales podría estar modulando la orientación del espermatozoide en las cercanías del ovocito ya que se ha detectado expresión de CRISP1 en diferentes tejidos del tracto femenino e incluso en las células del cúmulus (Ernesto et al., 2015).

Proteína CRISP2

En el año 1987, se reportó la identificación de una secuencia en el cromosoma 17 de ratón de expresión testicular (Kasahara et al., 1987), cuyo producto resultó tener una alta homología con la proteína de rata CRISP1 (Kasahara et al., 1989). La secuencia codificante predecía una proteína secretoria rica en residuos Cys en su porción C-

terminal, a la que se denominó *Testicular Protein 1* (Tpx-1). Dada la similitud de Tpx-1 con CRISP1, posteriormente se propuso denominarla CRISP2 (Haendler et al., 1993). A lo largo de los años, la proteína ha sido identificada en varias especies y con un alto grado de conservación de secuencia aminoacídica entre ellas (Hardy et al., 1988, Maeda et al., 1998, O'Bryan et al., 1998, Kasahara et al., 1989, Giese et al., 2002). Más aún, se ha demostrado que CRISP2 es la única CRISP que se expresa, mayoritariamente, en el testículo, no está glicosilada y cuya expresión no se encuentra regulada por andrógenos (Gibbs et al., 2008).

Casi en forma simultánea a la identificación del gen *Crisp2*, se identificó a una proteína en cobayo que, posteriormente, resultó corresponder al homólogo de CRISP2 en esa especie (Hardy et al., 1988; Foster y Gerton, 1996; Kasahara et al., 1989). Los resultados de ese trabajo postulaban que dicha proteína, denominada AA1 (autoantígeno 1) (25 kDa), se encontraba localizada en el acrosoma y estaba involucrada en la aparición de autoanticuerpos contra el espermatozoide en un modelo de orquitis experimental, por lo que se postuló que la misma sería un agente causante de orquitis autoinmune (Hardy et al., 1988; Foster and Gerton, 1996). Si bien los autores reportaron que la presencia de anticuerpos anti-AA1 no afectaba los porcentajes de fertilización *in vitro* de cobayo, se sugirió que la especificidad y abundancia de AA1 indicaban que la proteína debería ser funcionalmente importante para el espermatozoide. En un trabajo posterior, se confirmó, por microscopía electrónica, la localización de AA1 en el interior del acrosoma del espermatozoide maduro de cobayo (Hardy et al., 1991). Como fuera mencionado anteriormente, casi diez años después del primer trabajo en el que se describe a AA1, su clonado y secuenciación permitieron determinar que la misma correspondía al homólogo de la proteína testicular CRISP2 cuyo gen había sido ya descrito en ratón y humano (Foster y Gerton, 1996; Kasahara et al., 1989). En ese trabajo, además de mostrar que AA1 correspondía a CRISP2 de cobayo, se determinó su expresión en células espermatogénicas (Foster y Gerton, 1996; Hardy et al., 1988).

Aproximadamente en la misma época que se postulaba a CRISP2 como uno de los componentes mayoritarios del acrosoma en el cobayo, un trabajo proveniente de otro laboratorio la proponía como una de las proteínas estructurales de las fibras densas de la cola en la rata (O'Bryan et al., 1998). En ese trabajo, se aisló a CRISP2 de una biblioteca de expresión de testículo de rata mediante un anticuerpo generado contra proteínas totales de las fibras densas, por lo que se propuso que la misma correspondería a una de

las proteínas mayoritarias de dicha estructura. En un trabajo publicado posteriormente, los mismos autores detectaron a CRISP2 en el acrosoma y la cola de rata por microscopía electrónica, y sugirieron que la proteína podría estar involucrada en la conformación y la función de ambas estructuras (O'Bryan et al., 2001). Por otra parte, CRISP2 fue localizada en la superficie de las células espermatozoides en el testículo (Maeda et al., 1998), postulándose su participación en la interacción de dichas células con las de Sertoli (Maeda et al., 1999) a través de su dominio PR-1. Experimentos de hibridación *in situ* en ratón, determinaron que CRISP2 se expresaba, al igual que en el cobayo, en células espermatozoides haploides (Mizuki et al., 1992). Los autores de ese trabajo sugirieron que CRISP2 se encontraba localizada en el acrosoma ya que, si bien la proteína tenía un péptido señal característico de las proteínas secretorias, el hecho de que se expresara en células incapaces de realizar procesos secretorios como lo son las espermátides, indicaba que la misma sería transportada a la vesícula acrosomal en ese tipo celular.

Muchos años después, se demostró que la región ICR del dominio CRD de la proteína CRISP2 recombinante era capaz de regular el flujo de Ca^{2+} *in vitro* a través de la modulación de canales rianodínicos de células musculares (Gibbs et al., 2006) en forma análoga a otras CRISP aisladas del veneno de ciertos reptiles (Yamazaki and Morita, 2004). El mismo grupo, en los últimos años, ha descrito varias proteínas capaces de interactuar con CRISP2 en diferentes compartimentos del espermatozoide, incluyendo el flagelo, entre las cuales se encuentran SHTAP (*sperm head and tail associated protein*), MAP311 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11*) y GGN1 (*gametogenetin 1*) (Gibbs et al., 2007; Jamsai et al., 2008; Jamsai et al., 2010). Si bien se ha demostrado que la unión de CRISP2 a estos ligandos es estabilizada por la región denominada Hinge del dominio CRD, hasta el momento se desconoce la relevancia de dichas interacciones. Además, tal como se mencionara, se ha descrito que CRISP2 es capaz de interactuar con estructuras del citoesqueleto tal como las fibras densas de la cola en el espermatozoide de rata (O'Bryan et al., 2001)

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo ha realizado diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP2 en la interacción de gametas. Mediante ensayos de extracción proteica y de inmunofluorescencia indirecta, se observó que tanto en el ratón como en el humano, CRISP2 es una proteína acrosomal que se mantiene asociada al segmento ecuatorial del espermatozoide luego de la RA (Busso et al., 2005, Nimlamool et al., 2013) (Fig. 29A). Asimismo, demostramos que la presencia de

anticuerpos anti-CRISP2 durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de ratón con ZP, provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados con un aumento en el número de espermatozoides perivitelinos, sugiriendo que CRISP2 participaría en la etapa de fusión de gametas en el ratón pero no así en la etapa previa de interacción con la ZP. En concordancia con dicho resultado, la proteína CRISP2 recombinante purificada fue capaz de unirse específicamente al oolema de los ovocitos de ratón (Fig. 29B) (Busso et al., 2007b). En el caso de CRISP2 humana, observamos que los anticuerpos específicos contra esta proteína eran capaces de inhibir la penetración de ovocitos de hámster por espermatozoides humanos (Busso et al., 2005).

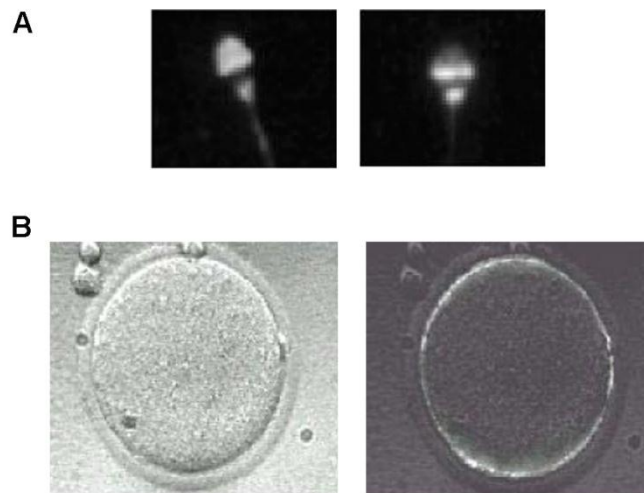


Figura 29. Localización de la proteína CRISP2 en los espermatozoides y de sus sitios complementarios en el ovocito. **(A)** Microfotografías de la cabeza de un espermatozoide humano con marca fluorescente para CRISP2 en la región acrosomal de un espermatozoide fresco (panel izquierdo), y en el segmento ecuatorial de un espermatozoide reaccionado (panel derecho). Nótese además la marca en la región del cuello y la cola. (Busso et al., 2005). **(B)** Microfotografías de campo claro (panel izquierdo) y de fluorescencia (panel derecho) de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP2 en el oolema (Busso et al., 2007b).

La localización similar para los sitios de unión de CRISP1 y CRISP2 en la superficie de los ovocitos de roedor nos llevó a estudiar si cada proteína tenía un sitio de unión particular o si ambas compartían un único sitio en el oolema. Los resultados de estos ensayos indicaron que, en condiciones *in vitro*, CRISP1 y CRISP2 compiten por los mismos sitios en el ovocito (Busso et al., 2007b). Si bien estos resultados podrían deberse a la utilización de las proteínas en solución, lo cual tal vez no refleje la situación real de

cada proteína sobre el espermatozoide en cuanto a cantidad, localización y afinidad por el sitio, también abren la posibilidad de que la unión de CRISP1 y CRISP2 al mismo receptor tenga una relevancia fisiológica para la fusión. En este sentido, la comparación de las secuencias de CRISP1 y CRISP2 reveló que estas proteínas comparten 10 de los 12 aminoácidos del S2, dominio en el que, tal como se mencionara anteriormente, se encontraría el sitio activo de CRISP1 para su rol en fusión (Ellerman et al., 2006). Más aún, como ya fuera mencionado, los estudios de fertilización *in vitro* realizados en el modelo de animales KO para *Crisp1* mostraron que la presencia de CRISP2 durante la co-incubación de gametas disminuye significativamente la penetración de ovocitos sin ZP por dichos espermatozoides (Da Ros et al., 2008), apoyando la existencia de mecanismos de compensación entre estas proteínas. En el caso de la rata, los estudios realizados utilizando la proteína recombinante de ratón indicaron que CRISP2 es capaz de unirse al oolema de ovocitos de rata, y que esa asociación sería funcional ya que fue capaz de impedir la fusión de los espermatozoides a los ovocitos (Weigel Muñoz et al., 2012).

Más allá de su participación en la interacción de gametas, CRISP2 parecería ser relevante para la fertilidad de un individuo a juzgar por el hecho de que se han detectado anticuerpos anti-CRISP2 en pacientes inmuno-infértiles con anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal (Domagala et al., 2007). Sin embargo, ensayos de inmunización de ratas con CRISP2 realizados en nuestro laboratorio demostraron que la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 en circulación no sería suficiente para producir un defecto en la fertilidad (Weigel-Muñoz et al., 2012), posiblemente debido a la naturaleza intracelular de CRISP2, lo cual iría en contra de las evidencias en los pacientes inmuno-infértiles. Por otro lado, se han encontrado rearrreglos cromosómicos en la región donde se ubica el gen de *Crisp2* asociados con infertilidad en tres hermanos y en otros tres hombres no relacionados (Paoloni-Giacobino et al., 2000; Olesen et al., 2001). Más aún, se hallaron menores niveles de la proteína CRISP2 y alteraciones en su localización en hombres infértiles con azoospermia o oligoastenoteratozoospermia (Du et al., 2006) o astenozoospermia (Jing et al., 2011). Más recientemente, un estudio retrospectivo demostró que una disminución en la expresión de CRISP2 correlacionaba con una menor motilidad progresiva y una mala morfología de los espermatozoides (Zhou et al., 2015). Estas evidencias sugieren que los defectos en fertilidad de los pacientes con expresión aberrante de CRISP2 podrían ser consecuencia de una menor funcionalidad de los espermatozoides.

Proteína CRISP3

El tercer miembro de la familia CRISP fue originalmente identificado en la glándula salival del ratón, donde se observó que el promotor del gen presentaba dos elementos de respuesta a andrógenos (Schwidetzky et al., 1995). A continuación, describieron la expresión del mensajero de CRISP3 en las células linfoides pre-B en el ratón (Pfisterer et al., 1996), y más recientemente, detectaron su expresión en diversos órganos, incluyendo órganos reproductivos (como la próstata y el útero) e inmunológicos (como el timo y el bazo) (Reddy et al., 2008, Evans et al., 2015). Posteriormente, se identificó una glicoproteína de aproximadamente 28 kDa homóloga a CRISP2 en la matriz de los gránulos de los neutrófilos humanos. Casi simultáneamente, se caracterizó la expresión y distribución de los mensajeros que codifican para CRISP1, CRISP2 y CRISP3 en los tejidos humanos observando que CRISP3 presentaba la más amplia distribución en su expresión, encontrándose predominantemente en glándula salival, páncreas y próstata, y en menor proporción en el epidídimo, ovario, timo y colon (Kratzschmar et al., 1996). A pesar de que las nuevas evidencias indican que CRISP3 humana sería más cercana a CRISP1 de ratón (Fig. 24), el hecho de que CRISP3 de ambas especies compartieran un patrón de expresión más amplio, que involucra órganos del sistema inmunológico, llevó a considerarlas homólogas funcionales.

En el caballo, CRISP3 originalmente denominada HSP-3, es una proteína abundante del plasma seminal (aproximadamente 1 mg/ml) que se produce, principalmente, en la ampolla del conducto deferente y en las vesículas seminales (Magdaleno et al., 1997). CRISP3 equina no se encuentra glicosilada y se mantiene unida a la región post-acrosomal y pieza media de los espermatozoides (Magdaleno et al., 1997). Al respecto, en un análisis de SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleótido único) del gen de CRISP3 equina, los autores identificaron tres polimorfismos asociados a infertilidad en los machos, no encontrándose ninguna asociación entre la fertilidad y los polimorfismos de los genes de CRISP1 y de CRISP2 (Hamann et al., 2007). En el humano, CRISP3 se encuentra en altas concentraciones en saliva y plasma seminal, y en menor medida en plasma sanguíneo y sudor. En todos los fluidos, se encuentran dos formas de la proteína madura, una N-glicosilada que presenta un peso molecular aparente de entre 29-31 KDa, y otra no glicosilada con un peso molecular aparente de entre 27-29 KDa (Udby et al., 2002). Se ha observado que tanto en plasma sanguíneo como en el plasma seminal, CRISP3 se encuentra formando un complejo con las proteínas $\alpha 1\beta$ -

glicoprotein y MSP (β -*microseminoprotein*), respectivamente (Udby et al., 2004, Udby et al., 2005). Si bien la importancia de dichas interacciones se desconoce, se ha observado la existencia de una interacción específica de alta afinidad entre MSP y el dominio PR-1 de la proteína CRISP3 (Gibbs et al., 2008). Por otra parte, se ha descrito la expresión de CRISP3 en el epitelio secretor de todo el tracto reproductor masculino, desde el testículo hasta la próstata. De forma curiosa, si bien se detectó una altísima expresión en el *cauda* epididimario, no encontraron diferencias en la concentración de CRISP3 en el plasma seminal de los pacientes vasectomizados respecto a los controles. En base a ello, los autores sugieren que la mayor fuente de CRISP3 en el plasma seminal serían los órganos que se encuentran posteriores al epidídimo (Udby et al., 2005). Recientes evidencias aportadas por nuestro laboratorio indican que CRISP3 se encuentra presente en los espermatozoides eyaculados y se mantiene unido a los mismos incluso después de la reacción acrosomal (Da Ros et al., 2015). Pese a que estas evidencias sugieren que la proteína CRISP3 también podría estar participando en el proceso de fertilización, no se ha logrado inhibir la fusión de gametas al incubar a los espermatozoides humanos con un anticuerpo anti-CRISP3 (Da Ros et al., 2015). Por otro lado, el rol de CRISP3 en la unión de los espermatozoides con la ZP aún no fue estudiado y, en este sentido es interesante mencionar que se ha propuesto que la proteína MSP, que interactúa con CRISP3, participaría en esta etapa de la fertilización (Anahi et al., 2008, Manaskova-Postlerova et al., 2011).

Proteína CRISP4

Al igual que CRISP1, la proteína epididimaria CRISP4 se une a los espermatozoides de rata y ratón durante la maduración epididimaria (Jalkanen et al., 2005; Nolan et al., 2006) y es capaz de inhibir canales de Ca^{2+} del tipo TRPM8 (Gibbs et al., 2011). Las primeras evidencias sobre la relevancia funcional de CRISP4 surgieron cuando dos grupos de investigadores en forma independiente desarrollaron animales KO para esta proteína (Gibbs et al., 2011; Turunen., et al. 2012). El análisis fenotípico de los machos KO para *Crisp4* mostró que los mismos producían espermatozoides con una deficiente capacidad para unirse a la ZP y sufrir la RA en respuesta a progesterona (Gibbs et al., 2011; Turunen et al., 2012). Además, el agregado de CRISP4 recombinante a espermatozoides *wild type* (WT) es capaz de revertir el efecto inhibitorio del mentol, inductor del canal TRMP8, sobre la RA inducida por progesterona (Gibbs et al., 2011).

Actualmente, nuestro laboratorio cuenta con una tercera línea de ratones KO para CRISP4 desarrollada en un fondo genético diferente a las dos colonias anteriores. El análisis del fenotipo de esta nueva colonia en nuestro laboratorio confirmó que los espermatozoides carentes de CRISP4 son incapaces de sufrir la RA inducida por progesterona y reveló nuevos roles de la proteína tanto en la regulación de la fosforilación de proteínas en tirosina como en la etapa de fusión de gametas (Carvajal et al, 2015). Sin embargo, al igual que los animales KO para CRISP1, los animales KO para CRISP4 de las tres colonias desarrolladas resultaron fértiles, apoyando una vez más nuestra hipótesis de la existencia de mecanismos de compensación entre proteínas CRISP homólogas durante el proceso de fertilización.

La familia CRISP en el proceso de fertilización

Por todo lo expuesto hasta aquí, se sabe que las proteínas CRISP escoltan a los espermatozoides durante su tránsito por el tracto reproductivo del macho y de la hembra (Fig. 30). Al salir del testículo, los espermatozoides contienen CRISP2 dentro del acrosoma y en la cola. Durante el tránsito epididimario CRISP1, CRISP3 y CRISP4 se asocian a la superficie de los mismos. CRISP3 incluso puede unirse durante la eyaculación. En el tracto femenino, la población débilmente unida de las proteínas se liberan parcialmente, en tanto que las poblaciones intracelulares o las fuertemente unidas relocalizan al segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados. En cada etapa de la fertilización participa más de una proteína CRISP (Fig. 28) apoyando la existencia de una redundancia funcional y de una cooperación entre ellas para asegurar el éxito de la fertilización.

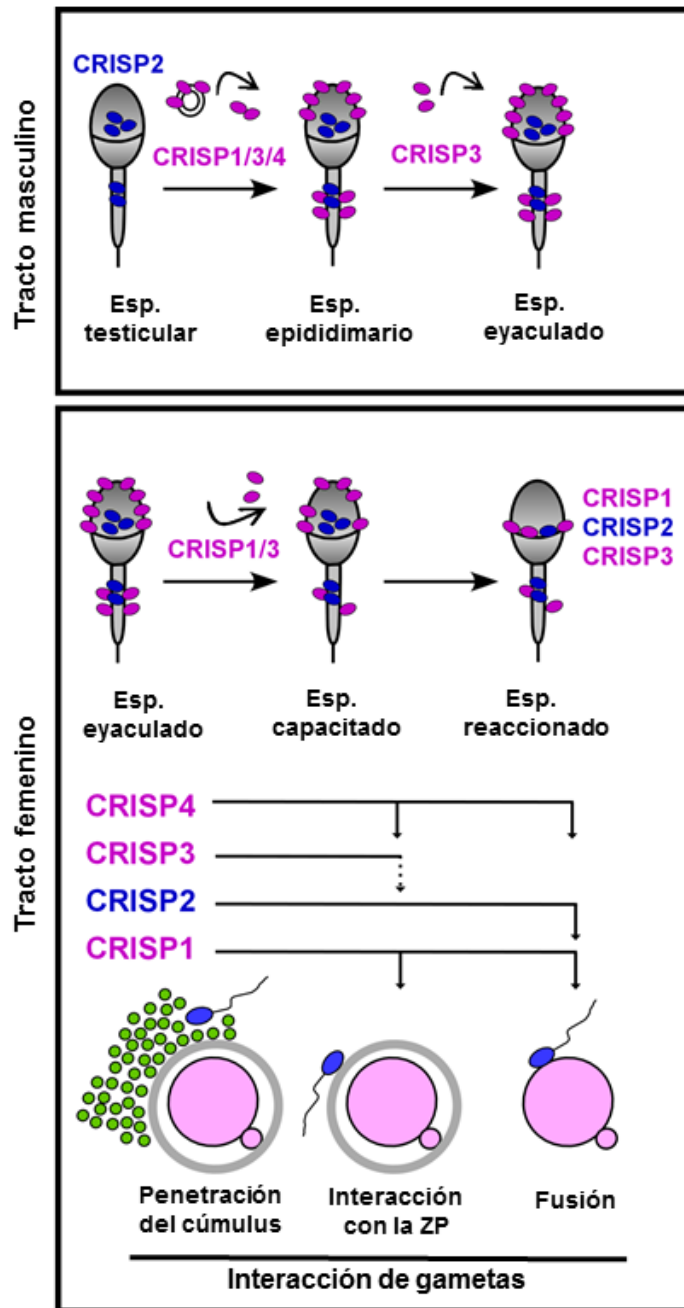


Figura 30. Participación de las proteínas de la familia CRISP en el proceso de fertilización (Da Ros et al., 2015).

Animales genéticamente modificados

La manipulación genética ha jugado un rol clave en el estudio de la reproducción, sobretodo, considerando que la expresión de los genes necesarios para la fertilidad suele ser altamente específica de las gónadas lo cual elimina la necesidad de modelos condicionales (Young et al., 2015). Por otro lado, el uso de animales KO por grupos que investigan en otras áreas de la biología propició el descubrimiento accidental de genes relevantes para la fertilidad (Inoue et al., 2007, Ikawa et al., 2010). En las últimas décadas, se generaron líneas de ratones KO para más de la mitad de los genes de esta especie (Young et al., 2015), y tan solo en 2003 se estimaba que 2,300 genes eran relevantes para la espermatogénesis, sin considerar la maduración espermática, la capacitación ni la fertilización (Schultz et al., 2003).

La generación de ratones KO tuvo auge a partir de la década de 1980, tras haber sido descritas y establecidas las células madre embrionarias pluripotenciales (células ES) de la masa interna del blastocisto (Robertson et al., 1986). A partir de esto, se demostró que un gen de interés puede ser específicamente interrumpido por medio de recombinación homóloga en células ES (Capecchi, 1989, 2005), convirtiéndose así en una herramienta poderosa para el estudio de la función de genes en ratones. Brevemente, esta técnica consiste en transfectar *in vitro* las células ES con un vector que tiene como objetivo dirigirse al gen blanco y producir la mutación deseada en el genoma de la célula ES. Luego, solo aquellas células con la modificación son obtenidas a través del empleo de algún agente de selección y, posteriormente, son inyectadas dentro de blastocistos. Estos últimos son transferidos a hembras receptoras y dan lugar a crías quiméricas, de las cuales, en algunas de ellas, la línea germinal habrá sido originada por las células ES modificadas. Por lo tanto, luego de realizar algunos apareos pertinentes, es posible obtener una colonia de ratones con deficiencia en el gen de interés. Sin embargo, todo este proceso puede llevar varios meses o incluso años.

A principios del 2013, comenzó a utilizarse una revolucionaria técnica biotecnológica denominada CRISPR/Cas9, que permite la modificación del genoma de una forma mucho más rápida y sencilla (Wang et al., 2013), y que es aplicable a diversas especies (Hsu et al., 2014). Este novedoso método es un sistema de edición génica adaptado del sistema de defensa contra patógenos de la bacteria *Streptococcus pyogenes* para poder ser utilizado en células de mamíferos (Gasiunas et al., 2012). CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) funciona en conjunto con una endonucleasa Cas

(*CRISPR-associated 9*) (Young et al., 2015). Si bien están descritos tres sistemas CRISPR diferentes, el más utilizado es el de tipo II ya que se asocia con una sola endonucleasa, la Cas9 (Cong et al., 2013, Jinek et al., 2012, Mali et al., 2013). El sistema adaptado está compuesto por la endonucleasa y un ARN guía (sgARN) que le otorga especificidad de secuencia a la Cas9. Este complejo, entonces, recorre el genoma hasta encontrar un sitio de 20 nucleótidos que debe ser reconocido por el sgARN seguido de una secuencia consenso (NGG) o PAM (*protospacer adjacent motif*) (Mali et al., 2013). Entonces, tanto el sgARN como el mARN correspondiente a la Cas9 son transcritos *in vitro* y microinyectados en el citoplasma de cigotas, en donde reconocen al sitio blanco produciendo una ruptura de la doble hebra del ADN (DSB, *double strand break*) debido a la actividad endonucleasa del complejo (Wang et al, 2013). Este daño es corregido por el sistema NHEJ de reparación endógeno de la célula (*nonhomologous end joining*) que introduce pequeñas inserciones o deleciones (*indels*) al azar, las cuales pueden producir cambios en el marco de lectura del gen y la aparición de codones *stop* prematuros (Ran et al., 2013, Fig. 31). Alternativamente, si un oligonucleótido con homología con el sitio blanco es co-inyectado en las cigotas, entonces ocurre una reparación basada en homología (HDR, *homology directed repair*) que resulta en mutaciones más específicas (Ran et al., 2013, Fig. 31). Finalmente, las cigotas son transferidas a hembras receptoras analizándose el genotipo de las crías. Debido a la eficiencia de la mutagénesis, se pueden obtener animales KO incluso en la primera generación. Sin embargo, dado que los animales obtenidos de la microinyección pueden tener diferentes grados de mosaicismo (Zhu et al., 2014), resulta prudente trabajar con animales de generaciones subsiguientes.

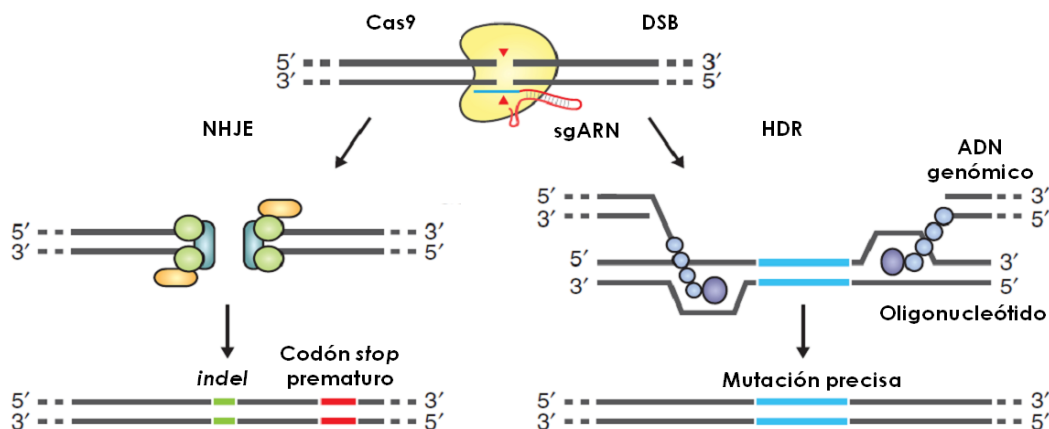


Figura 31. Representación esquemática del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9.

El uso de ratones KO no sólo ha contribuido al mejor conocimiento del proceso de fertilización (Okabe, 2015), sino que ha dejado en evidencia la alta redundancia entre genes relacionados a la reproducción (Klinovska et al., 2014, Young et al., 2015). Esta redundancia funcionales entre podría deberse a que el espermatozoides, tal como se mencionara, carece de maquinaria de síntesis y, por lo tanto, debe valerse únicamente de las proteínas que carga consigo. En este sentido, el uso de animales KO ha brindado numerosas evidencias acerca de la existencia de mecanismos de compensación entre proteínas expresadas en el tracto reproductor masculino. En el año 2010, Kawano y colaboradores (Kawano et al., 2010) publicaron un trabajo mostrando que, en tanto que los KO individuales son fértiles, la falta conjunta de las proteasas acrosomales ACR y PRSS21 produce subfertilidad en los machos debido a deficiencias en la penetración del *cumulus ophorus* y la ZP. Consistentemente, un trabajo posterior mostró que si la falta de la hialuronidasa SPAM1 se combinaba con la de ACR o de PRSS21, se observaba una menor penetración del cúmulus con respecto a los simples KO (Zhou et al., 2012). Por otro lado, ha sido demostrado que los ratones deficientes en nueve proteínas de la familia de las β -defensinas eran infértiles, lo cual estaba asociado a defectos en la motilidad de sus espermatozoides, a pesar de que los simples KO no tenían un fenotipo evidente (Dorin, 2015). Posteriormente, se vio que solo los doble KO (DKO) para dos genes que codifican para proteínas que se unen al citoesqueleto de la cola (ROPN1 y ROPN1L) presentan alteraciones en la motilidad de los espermatozoides (Fiedler et al., 2013). También debido a serios defectos en la motilidad, los ratones deficientes en dos proteínas activadoras del proteasoma, PA28 γ y PA200, son infértiles, a diferencia de los simples KO (Huang et al., 2016). Otro caso interesante es el de los machos DKO para adrenoreceptores- α 1A y purinoreceptores-P2X1 que presentan fallas en el transporte de los espermatozoides durante la eyaculación y, por lo tanto, resultan infértiles (White et al., 2013), no observado en los KO individuales. Más recientemente, se reportó la generación de los KO simples para los factores determinantes del sexo (Zfy1 y Zfy2), siendo los machos fértiles, en tanto que los machos DKO resultaron infértiles por fallas en la espermatogénesis y la fertilización (Nakasuji et al., 2017).

Hasta el desarrollo de la técnica de CRISPR/Cas9, la obtención de animales deficientes en más de una proteína era posible mediante la cruce de los animales simples KO. Sin embargo, esta metodología tiene el impedimento de que si los genes de interés se encuentran muy cercanos en el cromosoma, la frecuencia de recombinación entre ellos será muy baja y, por lo tanto, muy baja la probabilidad de obtener los animales múltiples

KO. Actualmente, es posible mutar más de un gen en simultáneo de forma más sencilla y rápida, mediante CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2013). En resumen, la técnica de CRISPR/Cas9 no solo representa una revolucionaria metodología de generación de ratones KO para el estudio de la función de genes, como así también para establecer la interacción existente entre varios genes.

Objetivos

En base a lo expuesto hasta aquí, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la relevancia de la familia de proteínas CRISP para la fertilización y la fertilidad masculina en mamíferos. Para ello, nos planteamos diferentes objetivos específicos que se detallan a continuación.

Tal como se mencionara anteriormente, la proteína testicular CRISP2 se encuentra presente en espermatozoides y participa en la fertilización en roedores y humanos, más específicamente en la etapa de fusión de gametas. Asimismo, existen evidencias que sugieren una asociación entre los niveles de expresión de esta proteína e infertilidad en humanos. Considerando estos antecedentes, y con el fin de investigar si el rol de CRISP2 en fertilización se encuentra asociado a los defectos en fertilidad de los pacientes, nos planteamos como primer objetivo específico de esta Tesis **estudiar la relevancia de CRISP2 para la fertilidad a través del empleo de ratones knockout para *Crisp2*** (Capítulo 1).

Dado que se encontraron menores niveles de CRISP2 en pacientes con defectos en la motilidad espermática, y teniendo en cuenta que CRISP2 es capaz de regular canales de Ca^{2+} , nos planteamos como segundo objetivo de esta Tesis **dilucidar si la falta de CRISP2 podría ocasionar dichas fallas en la motilidad a través de una desregulación del Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides humanos** (Capítulo 2).

Por último, dada la fertilidad normal de los ratones simples KO para *Crisp1* y *Crisp4* que apoya la existencia de mecanismos de compensación entre los diferentes miembros de la familia, nos planteamos como tercer objetivo de esta Tesis **analizar la fertilidad de animales deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente** (Capítulo 3).

Materiales y Métodos

Animales

Para los ensayos descritos en esta Tesis, se utilizaron ratones de la línea KO para CRISP2 y CRISP4 generados por los Dres. M. Okabe y M. Ikawa (Universidad de Osaka, Japón) en un *background* genético mixto C57BL/6N y DBA/2J (Brukman et al., 2016). A través de apareos entre estos KO se obtuvieron los animales DKO deficientes en CRISP2 y CRISP4 simultáneamente y luego, mediante la técnica CRISPR/Cas9 (ver más adelante), se obtuvieron los animales deficientes en más de 2 miembros de la familia CRISP. Para todos los estudios de fertilidad y fertilización se utilizaron ratones machos adultos de 3 a 12 meses y hembras de entre 21 días y 6 meses. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) con acceso a alimento y agua *ad libitum*. En todos los casos, los experimentos con animales fueron llevados a cabo siguiendo la “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicada por *National Institutes of Health* (NIH, EEUU). Los protocolos empleados cuentan con la aprobación del Comité de Bioética del IBYME.

Materiales específicos

Para los ensayos descritos en esta Tesis se utilizaron los siguientes reactivos:

Inhibidores y drogas: H89 (inhibidor de PKA, Calbiochem), Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N' tetraacetic acid (EGTA, quelante de Ca_{2+} , Sigma), ionóforo de Ca_{2+} (A23187, Sigma), Ionomicina (transportador de Ca_{2+} , Sigma), progesterona (inductor de la RA, Sigma), PF431396 (inhibidor de PYK2, Sigma), tapsigargina (inhibidor de la bomba SERCA, Sigma), HC-056456 (inhibidor de CatSper, VitasMLab), monensina (ionóforo de protones, Sigma), anandamida (activador de Hv1, Sigma), Fluo-4, AM (sensor de Ca_{2+} , Invitrogen), DiSC3(5) (sensor del potencial de membrana, Invitrogen) y BCECF-AM (sensor de pH, Invitrogen).

Anticuerpos: anti- β -tubulina (1/5000, clone D66, Sigma), anti-fosfotirosina (α -pY, 1/4000, clone 4G10, Upstate Biotechnology), anti-CRISP1 (1/1000; #AF4675; R&D), anti-CRISP4 (1/1000; #AF5017; R&D), anti-CRISP2 (1/1000 para *western blot*, 1/100 para 3D STORM #AF2575, Proteintech) y suero anti-CRISP2 (1/50 para inmunofluorescencias, Weigel Muñoz et al., 2012). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories), anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1/4000, Vector Laboratories), anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (1/4000, Santa Cruz), anti-IgG de oveja acoplado a peroxidasa (1/4000, Sigma), anti-IgG de rata acoplado a FITC (1/100, Sigma) y anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 647 (1/1000, Sigma).

Obtención de espermatozoides

Ratón: Para la obtención de espermatozoides epididimarios, los animales adultos fueron sometidos a eutanasia, los epidídimos expuestos a través de un corte efectuado en la región escrotal. Una vez liberados de grasa y sangre el cauda epididimario fue sumergido en medio de capacitación (ver más adelante) obteniéndose los espermatozoides mediante cortes del mismo.

Humano: Los espermatozoides humanos se obtuvieron de muestras de semen de donantes sanos (cuyas características seminales iniciales concordaban con el criterio de normalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) o de pacientes que asistieron a la clínica de reproducción asistida CEGYR. En todos los casos, se solicitó un período de 48 hs de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado.

Capacitación de espermatozoides

Ratón: La obtención y capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser y Drury, 1975), suplementado con 0,3 % m/v BSA (en los experimentos que se realizaron en ausencia de HCO_3Na , se utilizó el medio Whitten con similar composición que el anterior pero con el agregado de 10 mM de HEPES) (Wertheimer et al., 2008). Los *caudas* epididimarios fueron cortados en 3 puntos y colocados en una gota de 300 μl del medio de incubación en una cápsula bajo aceite por un período de 10 min a 37°C y 5 % v/v CO_2 para permitir la dispersión de las células (*swim out*). La capacitación fue llevada a cabo en gotas de 300 μl de medio bajo aceite a una concentración final de 0,1-1,0 x 10⁷ espermatozoides/ml, y las células fueron incubadas por un período de 90 min a 37°C y 5 % v/v CO_2 en una estufa con gaseo automático.

Humano: Los espermatozoides humanos fueron seleccionados mediante las técnicas de *swim-up* o centrifugación en gradiente, según cada caso. Para el *swim-up*, luego de la licuefacción, el semen fue colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW, sin HCO_3Na) (Biggers, 1971) e incubado durante 1 h a 37°C y 5 % v/v CO_2 en una estufa con gaseo automático. Los espermatozoides móviles recuperados de la superficie del medio luego de 1 h. Alternativamente, 1 ml de semen fue colocado sobre una capa de 1 ml de 40 % de densidad (PureCeption®) en un tubo cónico de 15 ml y centrifugado a 300 x g por 20 min, recuperándose los espermatozoides del fondo (Tamburrino et al., 2015). En todos los casos, los espermatozoides fueron lavado y diluidos en BWW (conteniendo o

no 25 mM de HCO_3Na y 0,5 % m/v de BSA) a una concentración final de $0,5-1,0 \times 10^7$ células/ml e incubados por 6 hs a 37°C , en una atmósfera de 5 % v/v CO_2 .

Evaluación de la fertilidad

Cada ratón macho fue colocado al menos dos veces en apareo con 1 o 2 hembras adultas por los tiempos detallados en cada caso, determinándose diferentes parámetros asociados a la fertilidad, tales como el porcentaje de hembras preñadas, el número de crías por camada y el tiempo transcurrido hasta la preñez.

Vasectomía unilateral

Los machos fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de xilacina/ketamina (10:100 mg/kg). De un lado del animal, se realizó una incisión en el abdomen, exponiéndose el vas deferens. Luego de atar el extremo proximal del vas deferens, se removió una porción de 1 cm del mismo, colocándose nuevamente los tejidos en el interior del animal y cerrando la incisión. Los ensayos de fertilidad fueron realizados luego de 2 semanas post-cirugía para permitir la recuperación del animal y antes de las 8 semanas post-cirugía para evitar la producción de anticuerpos anti-espermatozoides (Judd et al., 1997).

Determinación del ciclo estral de las hembras y superovulación

El estadio del ciclo estral en ratones hembra fue determinado cada mañana a través del análisis de extendidos vaginales (Caligioni, 2009). Las células epiteliales de la vagina fueron colectadas en 30 μl de PBS, transferidas a portaobjetos y examinadas bajo microscopio óptico. Los diferentes estadios (proestro, estro, metaestro y diestro) fueron clasificados basados en la proporción de los distintos tipos celulares (leucocitos y células epiteliales cornificadas o nucleadas). Para la estimulación de la ovulación, las hembras adultas fueron tratadas con una inyección de 5 UI de gonadotrofina coriónica equina (PMSG) en el día del proestro (Zhu et al., 2012) (para estudios de fertilización *in vivo*) o en cualquier estadio del ciclo (para estudios *in vitro*), seguida, a las 48-72 hs, por una inyección de 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG). Alternativamente, hembras pre-púberes fueron sujetas al protocolo de superovulación para estudios *in vivo* e *in vitro*, según se especifica en cada caso.

Ensayos de fertilización *in vivo*

Cada ratón macho fue colocado en apareo por 18 hs con una hembra la noche del pro-estro (Nakamura et al., 2011) o con una hembra superovulada luego de la inyección con hCG. En ambos casos, el éxito del apareo fue confirmado por la presencia de tapón vaginal. Los ovocitos fueron recuperados del oviducto (por punción), fijados en paraformaldehído 2 % v/v en PBS, lavados, expuestos a 10 µg/ml de Hoescht 33342, montados en portaobjetos. Los ovocitos fueron considerados fertilizados cuando se observó al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o dos pronúcleos en el citoplasma evaluado bajo microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot (Nikon) (x200). En algunos casos, se evaluó la fertilización por la formación de embriones de dos células luego de una incubación de 18 hs, utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60). El porcentaje de fertilización se calculó como el número de ovocitos fertilizados sobre el total (%).

Obtención de extractos proteicos

Los órganos de los ratones fueron homogeneizados en buffer de lisis frío (5 mM de EDTA, 1 % v/v de IGEPAL CA360, 0,5 % m/v de deoxicolato de sodio, 0,1 % m/v de SDS, 1 % v/v de Tritón X-100, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en PBS, pH 7,2). Luego de 30 min de incubación en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 15000 x g por 20 min a 4°C y una alícuota del sobrenadante diluida en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% v/v glicerol, 2% m/v SDS y azul de bromofenol) (Laemli, 1970). Los espermatozoides de humano y ratón (1-2x10⁶) fueron lavados con PBS y resuspendidos en buffer de siembra (Laemli, 1970). En todos los casos las muestras fueron hervidas y centrifugadas a 5000 xg por 5 minutos para la posterior recuperación del sobrenadante. Para la determinación de la fosforilación de proteínas en tirosina, los sobrenadantes fueron hervidos por segunda vez en presencia de 70 mM de β-mercaptoetanol.

Western blot

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 1,5 mm de espesor al 7,5%-15% m/v según el caso, preparados siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por

Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). La transferencia fue realizada en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % v/v metanol, a voltaje constante durante toda la noche (35 V) a 4°C. Previo al *western blot*, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1 % m/v en ácido acético 5% v/v y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua desionizada. Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de *western blot*, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada 2% m/v en PBS 0,1 % v/v Tween 20 (PBS-Tween), seguida de una incubación con anticuerpo primario en PBS-Tween a la correspondiente dilución. Luego de 3 lavados con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas con anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a peroxidasa y diluido 1/4000 en PBS-Tween. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente, eliminándose luego el Tween 20 mediante 1 lavado adicional con PBS. Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación por un período de 1 h a temperatura ambiente o 18 hs a 4°C. Por último, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL *prime* (GE Healthcare) y G:BOXGENI (Syngene, Synoptics) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de las bandas obtenidas en distintos experimentos fue realizada mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH, EEUU).

Análisis histológicos

Con el fin de realizar un análisis histológico, los ratones fueron sometidos a eutanasia y sus órganos removidos y fijados por inmersión en solución de Boin durante 24 horas. Los órganos fueron luego incluidos en parafina y cortados en micrótopo. Finalmente, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico (x100 y x400).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de espermatozoides

Espermatozoides epididimarios de ratón fueron fijados con paraformaldehído 2 % m/v en PBS por 10 min, lavados y extendidos sobre portaobjetos. Las muestras fueron permeabilizadas mediante la inmersión en soluciones de concentración decreciente de metanol en PBS. El bloqueo se realizó exponiendo a los espermatozoides a 0,4 % m/v de BSA en PBS (PBS-BSA4) por 10 min a 37°C. Luego, los espermatozoides fueron incubados con un suero anti-CRISP2 (1/50 en PBS-BSA4) (Weigel Muñoz., et al., 2012) por 18 hs a 4°C. Finalmente, los espermatozoides fueron lavados, incubados

con un anticuerpo anti-IgG de rata acoplado a FITC (1/100 en PBS) por 1 h a 37°C, lavados y examinados bajo un microscopio de epifluorescencia NIKON Optihot (x1000).

Evaluación del número y la viabilidad de los espermatozoides

El número de espermatozoides fue determinado bajo microscopio óptico utilizando un hemocitómetro. Con el fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides humanos y ratón, alícuotas de 10 µl de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C. A continuación, se agregó un volumen de 0,5 % m/v de eosina en solución fisiológica. Mientras que los espermatozoides vivos excluyen el colorante y no se colorean, los espermatozoides muertos incorporan el colorante y se tiñen de rosa. El porcentaje de viabilidad se evaluó por microscopía óptica (x400) sobre un mínimo de 100 células. Alternativamente, se obtuvieron los datos de viabilidad mediante citometría de flujo (ver más adelante).

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Ratón: Alícuotas de 15 µl de las suspensiones de espermatozoides fueron colocadas entre porta y cubre objetos (22 x 22 mm) para crear una cámara de 30 µm de profundidad, y examinadas a 37°C utilizando el sistema ISASw (*Integrated Semen Analysis System*) v1.2 CASA (*computer-assisted sperm analysis*) system (Proiser R&D, S.L., España). Se analizaron por lo menos 200 células por muestra distribuidas en 20 campos distintos tomándose 30 imágenes a 60 Hz para cada medición. Los parámetros analizados fueron los siguientes: velocidad promedio de la trayectoria (*average path velocity*, VAP, µm/s), velocidad curvilínea (*curvilinear velocity*, VCL, µm/s), velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria (*straight line velocity*, VSL, µm/s), linealidad (*linearity*, LIN, %, VSL/VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (*amplitude of lateral head displacement*, ALH, µm), rectilineidad (*straightness*, STR, %, VSL/VAP) y frecuencia de batido de la cabeza (*beat cross frequency*, BCF, Hz). Los espermatozoides fueron considerados móviles cuando presentaban VCL > 0, y con motilidad hiperactivada cuando mostraban VCL ≥ 271, LIN < 23,6 % y ALH ≥ 5. Estos puntos de corte fueron obtenidos para nuestras condiciones experimentales basados en recomendaciones reportadas previamente (Bray et al., 2005).

Humano: La evaluación del semen fue realizada de forma subjetiva bajo microscopio óptico según las indicaciones de la OMS (OMS, 2010). Para el análisis objetivo de la motilidad, alícuotas de 10 µl de las distintas suspensiones de

espermatozoides fueron colocadas entre porta y cubre objetos (22 x 22 mm) para crear una cámara de 20 µm de profundidad y examinadas a 37°C utilizando el sistema SCA evolution (Microoptic). (Mortimer, 1998). Se analizaron los diferentes parámetros (VAP, VCL, VSL, LIN, ALH, STR y BCF) de al menos 200 células por muestra distribuidas en 20 campos distintos grabándose 30 imágenes cada 60 Hzs para cada medición.

Evaluación de la reacción acrosomal

La inducción de la RA se realizó por exposición de los espermatozoides de ratón a 30 µM progesterona, 15 min antes del final de la capacitación. Los espermatozoides fueron recuperados y fijados en PFA 4 % m/v en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con acetato de amonio 0,1 M pH 9, por centrifugación, y extendidos sobre portaobjetos, los cuales fueron luego lavados por inmersión sucesiva en agua, metanol y agua (5 min en cada uno), y posteriormente incubados durante 5 min en una solución de 0,22 % m/v Coomassie Brilliant Blue en 50% v/v metanol y 10% v/v ácido acético. Luego, los portaobjetos fueron lavados con agua y examinados inmediatamente bajo el microscopio óptico (x400). Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y como reaccionados cuando esa región no presentaba color (Da Ros et al., 2008).

Medición de Ca²⁺ intracelular

En todos los casos, los espermatozoides humanos y de ratón fueron incubados con 2 µM Fluo-4, AM (sonda sensible a Ca²⁺) y 0,05 % v/v ácido plurónico por 30 min y lavados con medio fresco para eliminar el exceso de sonda (Mata-Martinez et al., 2013).

Fluorimetría: La fluorescencia de la sonda Fluo-4, AM fue detectada a través de un espectrofluorímetro equipado con un controlador de temperatura Peltier. Las concentraciones de Ca²⁺ intracelular se obtuvieron de la siguiente ecuación: $[Ca^{2+}] = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$, donde $Kd = 354$ nM. Las fluorescencias F_{max} y F_{min} se determinaron para cada muestra luego del agregado de 1 % v/v de Tritón X-100 o 10 mM de EGTA, respectivamente.

Citometría de flujo: Los espermatozoides humanos y de ratón cargados con la sonda Fluo-4, AM fueron expuestos a 2,5 mg/ml de yoduro de propidio y la fluorescencia evaluada inmediatamente por citometría de flujo utilizando un equipo BD

FACSCanto™ II para ratón y MAQSQuantAnalyzer 10 para humano. Los resultados fueron evaluados utilizando el programa FlowJo v10 (FlowJo LLC, EEUU).

Microscopía en tiempo real: Los espermatozoides humanos cargados con Fluo-4, AM fueron fijados por la cabeza sobre cubreobjetos tratados con laminina (1mg/ml), permitiendo el movimiento del flagelo. Las muestras fueron montadas en una cámara de 500 μ l (Hard Apparatus, EEUU) y puestos en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300 microscope (Nikkon Inc). Las imágenes fueron tomadas cada 500 mseg usando iQ software (Andor Bioimaging) y analizadas mediante el programa ImageJ. Al final de cada medición se realizó un tratamiento con ionomicina 20 μ M seguido de otro con $MnCl_2$ 5 mM para obtener la fluorescencia máxima y mínima, respectivamente. La viabilidad de los espermatozoides fue determinada por la motilidad del flagelo y por la capacidad de responder a ionomicina al final de las mediciones.

Determinación del pH intracelular y potencial de membrana

El pH intracelular y el potencial de membrana en espermatozoides humanos fueron evaluados a través de citometría de flujo utilizando las sondas BCECF-AM y DiSC3(5) (Puga Molina et al., 2017). Para tal fin, los espermatozoides fueron expuestos a 0,5 μ M de BCECF-AM por 10 min, lavados y resuspendidos en medio sin BSA. Antes de la medición, se agregó 50 nM de DiSC3(5) por 3 min a la suspensión de espermatozoides. La fluorescencia de ambas sondas fue evaluada por el equipo de citometría de flujo MAQSQuantAnalyzer 10, analizándose los resultados a través del programa FlowJo v10. Se consideraron células vivas a aquellas con marca positiva para BCECF (Puga Molina et al., 2017).

Análisis de la actividad de CatSper

La determinación de la actividad de CatSper en espermatozoides humanos fue realizada a través de la medición de la depolarización de membrana en respuesta al agregado de EGTA (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2014). Para ello, el potencial de membrana fue evaluado por citometría de flujo utilizando la sonda DiSC3(5) como se describió en el punto anterior. En este caso, la viabilidad de los espermatozoides fue determinada utilizando 2,5 mg/ml de yoduro de propidio. La fluorescencia fue evaluada por citometría de flujo antes y después de un tratamiento con 3,5 mM de EGTA por 3 min utilizando un equipo BD FACSCanto™ II. Los resultados fueron evaluados utilizando el programa FlowJo v10.

Medición de los niveles de cAMP intracelulares

Alícuotas de espermatozoides de ratón capacitados 10 min fueron centrifugadas, lavadas con PBS y, finalmente, resuspendidas en etanol absoluto. A continuación, se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad (5 min a 8000 x g) y el sobrenadante fue recuperado en nuevos tubos, evaporado y luego resuspendidos en buffer 50 mM de acetato de sodio, pH 6,2. Las muestras finalmente fueron sujetas a radioinmunoensayo (RIA) tal como se encuentra descrito previamente (Del Punta et al., 1996). Brevemente, tanto muestras como estándares fueron acetilados durante 10 min a TA por el agregado de 10 µl de una mezcla de anhídrido acético y trietilamina (1:2 v/v). Posteriormente, se agregó a cada tubo 25.000 cpm de TME-cAMP (Sigma) marcado con I125 en 100 µl de buffer acetato, y un anticuerpo anti-cAMP diluido 1/17.500 en 100 µl de buffer acetato, continuando la incubación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó a cada tubo 50 µl de BSA 2 % m/v y 2 ml de etanol frío, y las muestras centrifugadas a 2000 x g durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y la radioactividad del pellet determinada en contador Beckman para rayos gamma.

Ensayos de fertilización *in vitro*

Los ensayos de fertilización *in vitro* se realizaron tal como se describió anteriormente (Da Ros et al., 2008). Los COC de ratón fueron obtenidos de hembras en estro o hembras estimuladas hormonalmente mediante punción de la *ampulla* en medio de capacitación. En algunos casos, los COC fueron tratados con hialuronidasa 0,1 % m/v (*type IV*) a temperatura ambiente para la disociación de las células del cúmulus. Cuando fue necesario, las ZP fueron removidas por tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH=2,5) durante 20 seg. Los COC y los ovocitos sin cúmulus pero con ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados (concentración final: 1–5 × 10⁵ células/ml) y las gametas co-incubadas en medio de capacitación por 3 hs a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5 % v/v en aire. En algunos casos, la co-incubación se realizó en presencia de glutatión reducido 1 mM. Para los ensayos de fusión, ovocitos sin ZP fueron co-incubados con espermatozoides capacitados (concentración final: 1–5 × 10⁴ células/ml) por 1 h. Los ovocitos fueron considerados fertilizados cuando se observó al menos una cabeza de espermatozoide decondensada o dos pronúcleos en el citoplasma del ovocito, tal como se explicara anteriormente. En algunos casos, se evaluó la fertilización por la formación de embriones de dos células luego de una incubación de 18 hs, utilizando una lupa esteresocópica (x20 - x60).

Ensayo de penetración del cúmulus *in vitro*

Los COC de ratón fueron inseminados con espermatozoides de ratón (concentración final en la gota de co-incubación de gametas: 0.3×10^5 células/ml), previamente teñidos con Hoescht 33342 (1 $\mu\text{g/ml}$ concentración final) y las gametas co-incubadas durante 15 min en una estufa a 37°C y CO₂ 5 % v/v. Finalmente, los COC fueron fijados con PFA 2 % m/v, lavados con PBS y observados bajo microscopio de epifluorescencia (x200), determinándose el número total de espermatozoides dentro del cúmulus (Ernesto et al., 2015).

Ensayos de unión a la ZP

Ovocitos de ratón sin cúmulus pero con ZP intacta y embriones de 2 células (utilizados como control) fueron co-incubados con espermatozoides capacitados (concentración final: 1×10^5 células/ml) por 30 min a 37°C en atmósfera CO₂ 5 % v/v. Los embriones y los ovocitos fueron luego lavados hasta que no queden espermatozoides unidos a los embriones y fijados en PFA 4 % m/v. Finalmente, el número de espermatozoides unidos a la ZP fue determinado bajo microscopio óptico (x200) (Cohen et al., 2011).

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (3D STORM)

El análisis por 3D STORM se hizo tal como se describiera previamente (Chung et al., 2014). Para ello, los espermatozoides de ratón fueron adheridos a cubreobjetos por medio de poli-lisina, secados, fijados con PFA 4 % v/v en PBS por 10 min y lavados. Luego, las células fueron permeabilizadas con 0,5 % v/v de Tritón X-100 en PBS por 5 minutos, lavadas, y después de un bloqueo con 3 % m/v BSA en PBS por 1 h, incubadas con el anticuerpo anti-CRISP2 (1/100 en 1 % m/v BSA en PBS) por 18 hs a 4°C. Las células fueron nuevamente lavadas e incubadas con anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 647 (1/1000 en 1 % m/v BSA en PBS) por 1 h. Una vez lavadas, las células fueron montadas con buffer STORM (50 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM NaCl, 0,56 mg/ml glucosa oxidasa, 34 $\mu\text{g/ml}$ catalasa, 10 % m/v glucosa y 1 % v/v β -mercaptoetanol). Las imágenes fueron tomadas con el programa Andor IQ 2.3 y la reconstrucción 3D fue realizada utilizando Thunder STORM (Ovesný et al., 2014).

Genotipificación de ratones KO

Extracción de ADN genómico: Para tal fin, se obtuvieron muestras de orejas de los animales, extrayéndose de las misma el ADN genómico por la técnica HotSHOT (Truett et al., 2000). Brevemente, el tejido fue sumergido en 75 µl de una solución de lisis (25 mM de NaOH, 0,2 mM de EDTA, pH 12) y calentado a 95°C por 30 min, agregándose, luego, 75 µl de una solución de neutralización (40 mM de Tris-HCl, pH=5).

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): El genotipo de los animales fue determinado por la técnica de PCR. La reacción fue realizada en un buffer conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer* específico y 1 U de la polimerasa GoTag (Promega, EEUU) en un volumen final de 20 µl (pH=8,5). Las secuencias de los *primers* utilizados fueron:

- 1) *Crisp2* Fwd: 5'-GTCTTCTGTAAGCATGTGTCAAGC-3'
- 2) *Crisp2* Rvs WT: 5'-CATGTGGGAGATATGCACTTGAATAAGC-3'
- 3) *Crisp2/4* Rvs KO: 5'-CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC-3'
- 4) *Crisp4* Fwd: 5'-ACCCTCACCTATCCTTGCTGGCAG-3'
- 5) *Crisp4* Rvs WT: 5'-CTTTAGAATACCATGATACCCGCA-3'.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 2 min a 94°C, 30 ciclos de, 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 2 min a 72°C y extensión final por 7 min a 72°C. Para ***Crisp2***, se utilizaron los *primers* 1, 2 y 3, obteniéndose una banda de 380 pb para el alelo salvaje y otra de 540 pb para el alelo mutado. Para ***Crisp4***, se utilizaron los *primers* 3, 4 y 5, obteniéndose una banda de 470 pb para el alelo salvaje y otra de 650 pb para el alelo mutado. Para determinar ambos genotipos a la vez, todos los *primers* fueron utilizados en simultáneo obteniéndose las cuatro bandas posibles. En todos los casos, el resultado de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 2 % m/v y tinción con bromuro de etidio (0,02 mg/ml).

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

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

1º tanda: *Crisp1/3* exon 3: 5'-GCACAACCAATTGAGACGAA-3'

2º tanda: *Crisp3* exon 5: 5'-TAATGTCCAACCACACTATC-3' y *Crisp3* exon 5: 5'-GAATCCAAAGGTCTTATATT-3'

3º tanda: *Crisp1/3* exon 2 (I): 5'-CAGCACAAGCATTAAATGCCA-3' y *Crisp1/3* exon 2 (II): GTTATCTTGAAGAAGGGATG-3'

Los oligonucleótidos mencionados se obtuvieron mediante síntesis (Genbiotech, Argentina) clonándose, luego, en el plásmido DR274 (www.addgene.org/42250/). Dichos sgARNs, junto al mRNA que codifica para la endonucleasa Cas9 (contenido en el plásmido MLM3613 (www.addgene.org/42251/)), fueron obtenidos mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit comercial MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del proveedor.

Por otra parte, se colocaron en apareo hembras pre-púberes KO para *Crisp2* y *Crisp4* estimuladas hormonalmente con machos KO para *Crisp2* y HT para *Crisp4*, recuperándose los embriones del oviducto al día siguiente. Se realizó una microinyección de aproximadamente 1 μ l de una solución de 50 ng/ μ l de cada uno de los sgARNs y 50 ng/ μ l del mRNA Cas9 en agua en el citoplasma de las cigotas en estadio de pronúcleos. Para dicha microinyección se utilizaron micropipetas de sujeción y de inyección preparadas a partir de capilares de borosilicato mediante un estirador vertical de micropipetas (Vertical PipettePuller, Model 720, KOPF, David Kopf Instruments, EEUU), y un micromanipulador manual (Leica, Alemania) acoplado a un microscopio con óptica de contraste de interferencia diferencial (FS Labovert, Leica, Alemania). Los embriones microinyectados se mantuvieron en medio M2 a 37 °C y 5 % v/v de CO₂ hasta ser transferidos al oviducto de hembras pseudopreñadas por apareo con machos vasectomizados. La presencia de las mutaciones en los animales obtenidos de las microinyecciones se analizó a través de PCR (ver *primers* en Tabla 1) a partir de ADN genómico obtenido de muestras de orejas, y el producto sometido a electroforesis en gel de agarosa. Alternativamente, el producto de PCR fue incubado a 94°C por 5 min induciendo la desnaturalización del ADN, seguido de una re-naturalización lenta a temperatura ambiente. Luego, la formación de estructuras secundarias en el ADN debido a la presencia de mutaciones fue evaluada por medio de electroforesis en gel de acrilamida 15 % m/v (Zhu et al., 2014). Finalmente, las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación mediante el método Sanger (Macrogen, Corea del Sur).

Una vez establecida la colonia a partir de animales con las mutaciones deseadas, se analizó de forma rutinaria el genotipo de los ratones a través de PCR a partir de ADN genómico, utilizando un juego de *primers* que flanquean al exón 2 de cada gen (Tabla 1). De esta manera, se amplificaron fragmentos para ***Crisp1*** de 612 pb y 451 pb para el alelo salvaje y mutante, respectivamente, y para ***Crisp3*** de 594 pb y 522 pb para el alelo salvaje y mutante, respectivamente.

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

Gen	Exón	Tamaño del producto	<i>Primers Foward</i> (5'-3')	<i>Primers Reverse</i> (5'-3')
<i>Crisp1</i>	3	687 pb	TTCATTCCCTTAACACTTCCTTGC	AATGAGAAAATGAACGTGGGTC
<i>Crisp3</i>	3	643 pb	AGCCTAATTGTGTGGGAATGAC	AGCTCTGATCTTACATGCACG
<i>Crisp1</i>	5	612 pb	TCAGTTCATACCATACGCTGTTT	TTGGTAGGCTCTATTTGACAGTG
		276 pb	CTCTCTATCTCCCACACCCTCTT	TTCAAATAATTTTCTTGCCTCTCA
<i>Crisp3</i>	5	682 pb	TCCCTCACACGTTTTTCACAC	GGCTCTATTTGACAGTGCC
		229 pb	TGCTTTGTATAGCCCCTCCC	CCTGAGTATGATGTCCAACCAC
<i>Crisp1</i>	2	202 pb	TTGTGTTTCTCTGAACCCAATG	GCTCATAACCCTCGTAGCTG
		612 pb	ATGGAAATAACTGGAAGCTATTGG	GCTACAAGTTCTTTTGCCACAAC
<i>Crisp3</i>	2	214 pb	CGTCTCAGAGAATTTGTAGGTGTG	GCCTTCATACCAGCATAAATTG
		594 pb	TGGTAATAACTGGAAGCCCTTG	TGACAAGTTCTTTTGCCACAAC

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

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Prism 4.0 (GraphPad, EEUU). Los resultados de experimentos con dos grupos experimentales, tales como los porcentajes de fertilización entre HT y KO del Capítulo 1 fueron evaluados por la prueba *t* de Student. Para aquellos experimentos que involucraron más de 2 grupos tales como las comparaciones entre los grupos C, NC y C+PF del Capítulo 2, se utilizó la prueba ANOVA de una vía y el post-test de Dunnett para comparar con el control. Al compararse dos factores tal como es el caso de la RA espontánea e inducida en machos HT o KO del Capítulo 1, se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y el post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para el análisis de las correlaciones tales como las realizadas entre los niveles de Ca^{2+} y CRISP2 en el Capítulo 2, se utilizó el análisis de Pearson. Finalmente, el análisis para determinar si la proporción de genotipos obtenidos de los apareos del Capítulo 1 seguía una distribución mendeliana se realizó mediante el test de χ^2 . En todos los casos la significancia estadística se indica en la leyenda de las figuras y un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

Resultados



Capítulo 1

Estudio de la relevancia de CRISP2 para la fertilización y la fertilidad

Tal como se comentara en la introducción, los resultados obtenidos hasta el momento apoyaban un rol para la proteína CRISP2 en la etapa de fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios en la superficie del ovocito (Busso et al, 2005, Busso et al, 2007, Weigel-Muñoz et al, 2012). Asimismo, las observaciones realizadas en humanos sugerían que una expresión aberrante de CRISP2 podía estar relacionada con infertilidad masculina (Paoloni-Giacobino et al, 2000, Olesen et al, 2001, Du et al, 2006, Jing et al, 2011, Zhou et al, 2015). En base a ello, nos planteamos como objetivo generar ratones KO para *Crisp2* y estudiar el fenotipo reproductivo de los mismos como una aproximación al estudio de la relevancia de CRISP2 para la fertilidad.

La generación de la línea KO para *Crisp2* estuvo a cargo del grupo colaborador dirigido por el Dr. Okabe (Universidad de Osaka, Japón), experto en la generación de animales KO para proteínas del espermatozoide. Los animales KO fueron obtenidos por recombinación homóloga (Fig. 1.1) y enviados a nuestro instituto para su estudio.

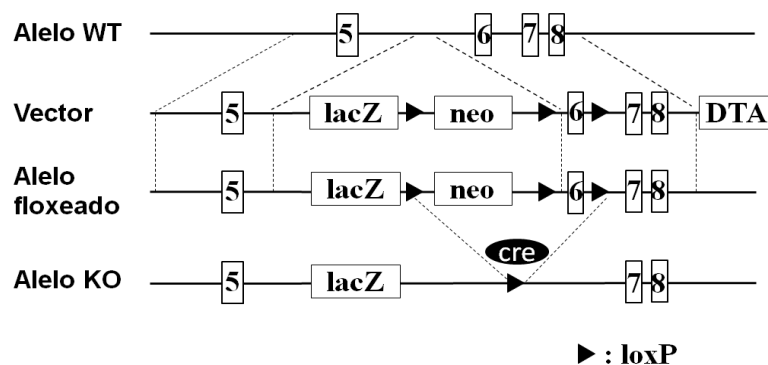


Figura 1.1 Representación esquemática de un fragmento del alelo WT de *Crisp2*, del vector utilizado para la generación de los ratones KO, el alelo *floxeado* con secuencias LoxP flanqueando al exón 6, y el alelo KO generado por recombinación mediada por Cre. Los exones se representan con recuadros blancos numerados. Los triángulos negros señalan la ubicación de las secuencias LoxP. lacZ: gen de β -galactosidasa; neo: *cassette* de resistencia a neomicina; DTA: cadena A de la toxina diftérica.

El establecimiento de la colonia KO se realizó siguiendo el genotipo de los animales mediante PCR a partir de ADN genómico (Fig. 1.2A). Una vez desarrollada la colonia, se obtuvieron los animales KO para *Crisp2* y se confirmó la ausencia de la proteína en los mismos tanto por ensayos de *western blot* de extractos de testículos (Fig 1.2B) y de espermatozoides (Fig. 1.2C) como por inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides (Fig. 1.2D). Dado que los niveles de expresión de CRISP2 no mostraron diferencias entre animales WT y HT, y que los animales HT poseen un alelo mutado, consideramos que estos últimos resultan mejores controles para comparar con los animales KO. Por lo tanto, en esta sección se utilizaron animales HT como control.

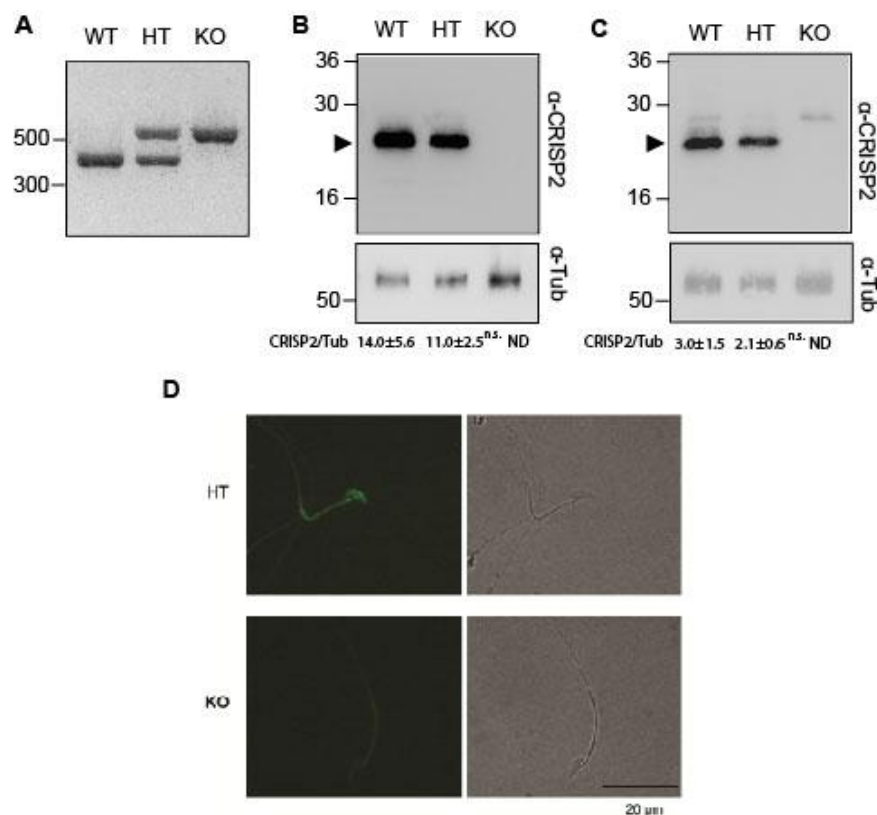


Figura 1.2 (A) El genotipo de los animales fue determinado por PCR genómica obteniendo bandas de 380 bp (WT), 540 bp (KO) o ambas, 380 bp and 540 bp (HT). **(B y C)** La presencia de CRISP2 (punta de flecha negra) en extractos de proteínas de testículos (B) o espermatozoides epididimarios (C) fue evaluada por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-CRISP2. β -tubulina fue utilizado como control de carga (paneles inferiores). El análisis densitométrico (Media \pm SEM) se muestra debajo de cada panel. ND: no detectado; n=5; no significativo (n.s). Se muestran imágenes representativas. n=3. **(D)** La expresión de CRISP2 fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides epididimarios HT o KO utilizando anticuerpos anti-CRISP2. Los paneles de la izquierda y derecha corresponden a la fluorescencia o campo claro, respectivamente. Se muestran imágenes representativas. n=3.

A partir de cruizas entre animales HT, se obtuvo la proporción de ratones de cada genotipo esperada por la frecuencia mendeliana (WT: 25,2 %; HT: 48,6 %; KO: 25,2 %; n = 258; n.s.), indicando que la mutación no es letal embrionaria. Además, no se observaron diferencias entre hermanos con distinto genotipo en cuanto a su desarrollo, comportamiento ni estado general de salud.

Como la expresión de proteínas relacionadas puede estar alterada en los ratones KO (Drabent et al., 2000, Stein et al., 2005), estudiamos la abundancia de las proteínas epididimarias CRISP1 y CRISP4 en espermatozoides KO y HT mediante *western blot* y posterior análisis densitométrico. Tal como se observa en la Fig. 1.3, no se detectaron diferencias entre genotipos en los niveles de expresión de CRISP1 y CRISP4.

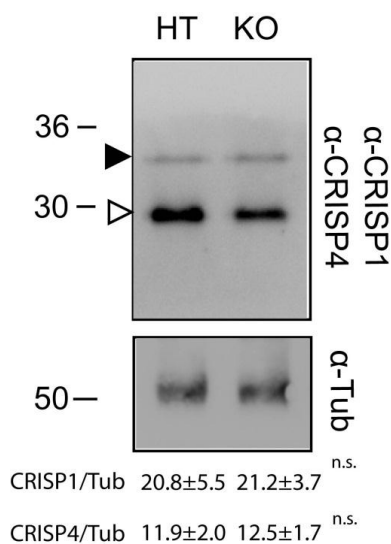


Figura 1.3 La presencia de CRISP1 (flecha blanca) y CRISP4 (flecha negra) en extractos proteicos de espermatozoides fue evaluada en espermatozoides epididimarios mediante *western blot* usando anticuerpos anti-CRISP1 y anti-CRISP4, simultáneamente. β -tubulina fue utilizada como control de carga (panel inferior). El análisis densitométrico (Media \pm SEM) se muestra en la parte inferior. n=5; n.s. Se muestra una imagen de un experimento representativo.

Considerando que CRISP2 se expresa casi exclusivamente en el testículo y habiéndose sugerido un rol para esta proteína en la interacción entre células de Sertoli y las células espermátogénicas (Maeda et al., 1998, 1999), existía la posibilidad de que la falta de CRISP2 produjera alteraciones a nivel del testículo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el peso de los testículos KO con respecto a los controles (Fig. 1.4A), como así

tampoco alteraciones a nivel histológico, observándose túbulos seminíferos con diámetro normal y con abundantes células espermatogénicas y espermatozoides en el lumen (Fig. 1.4B). Este último análisis se realizó en colaboración con la Dra. Livia Lustig (INBIOMED, UBA), quien es experta en el área de la fisiología y patología testicular.

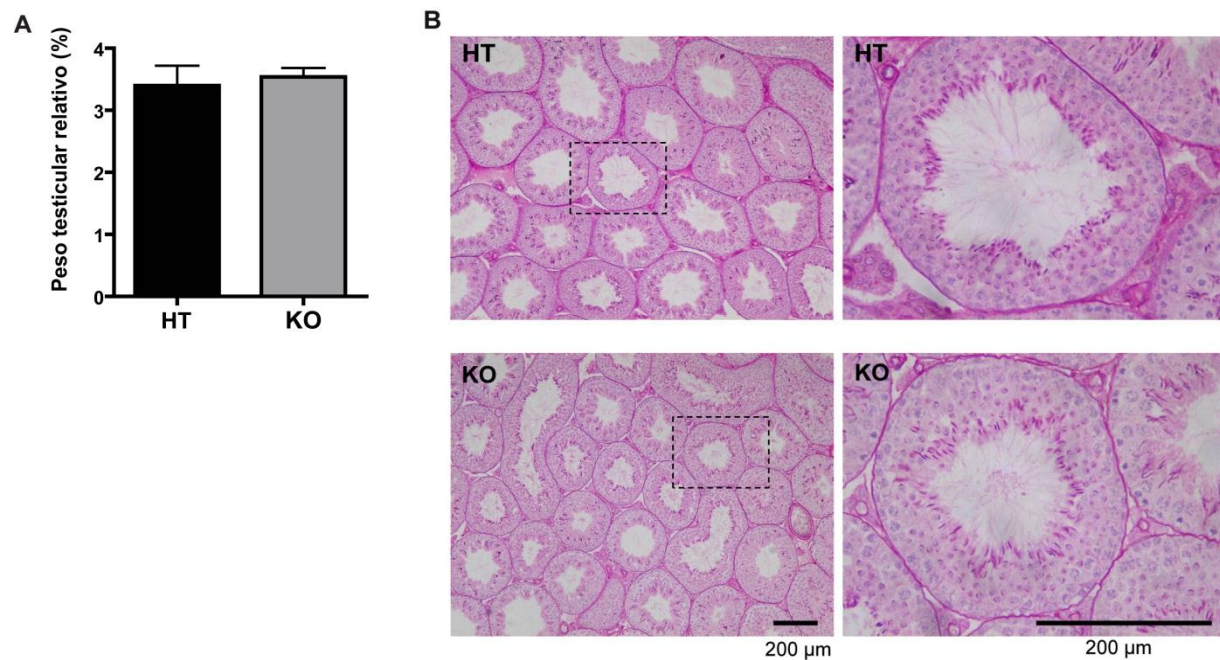


Figura 1.4 (A) Porcentaje del peso testicular relativo al peso corporal de animales HT y KO. Media \pm SEM, $n=14$, n.s. **(B)** Análisis histológico de testículos HT y KO por medio de tinción PAS-hematoxilina. $n=3$. Se muestran imágenes representativas.

Asimismo, para confirmar que la producción de los espermatozoides fuese normal en los animales KO, se recuperaron espermatozoides del cauda epididimario de animales de ambos genotipos y se analizó el número, viabilidad, motilidad y morfología de los mismos, no observándose diferencias entre ambos grupos para ninguno de estos parámetros (Fig. 1.5A-D).

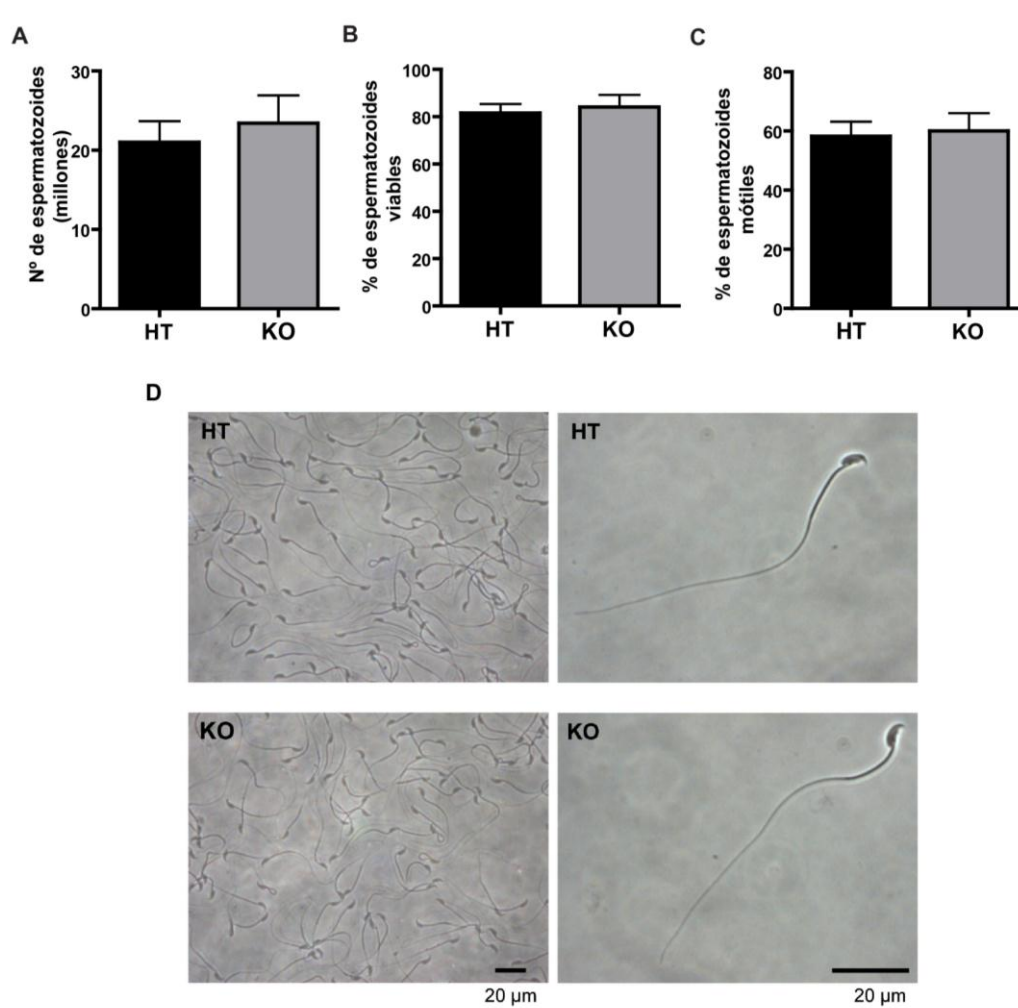


Figura 1.5 (A) Número total de espermatozoides recuperados de epidídimos HT o KO. $n=12$, n.s. **(B)** Porcentaje de espermatozoides epididimarios HT o KO viables evaluado por tinción vital con eosina. $n=5$, n.s. **(C)** Porcentaje de espermatozoides epididimarios HT o KO mótils analizado por medio del sistema CASA. $n=6$, n.s. En todos los casos se muestra la media \pm SEM. **(D)** Evaluación morfológica de espermatozoides epididimarios HT o KO. $n=5$. Se muestran imágenes representativas.

En base a ello, el próximo paso consistió en analizar la fertilidad de los machos carentes de CRISP2. Los resultados indicaron que los machos KO colocados en apareo con dos hembras control no presentaban diferencias significativas respecto a los controles en ninguno de los parámetros de fertilidad estudiados (Fig. 1.6 A-C). Tampoco se detectaron defectos en la fertilidad de las hembras KO, no observándose diferencias para el número de crías por camada (HT: $8,5 \pm 0,7$ vs KO: $9,0 \pm 1,1$, $n=4$, n.s.), el peso promedio de las crías (HT: $1,4 \pm 0,1$ g vs KO:

1,5±0,1 g, n=4, n.s.) o el tiempo desde el comienzo del apareo hasta la parición (HT: 34,5±4,4 días vs KO: 26±4,5 días, n=4, n.s.).

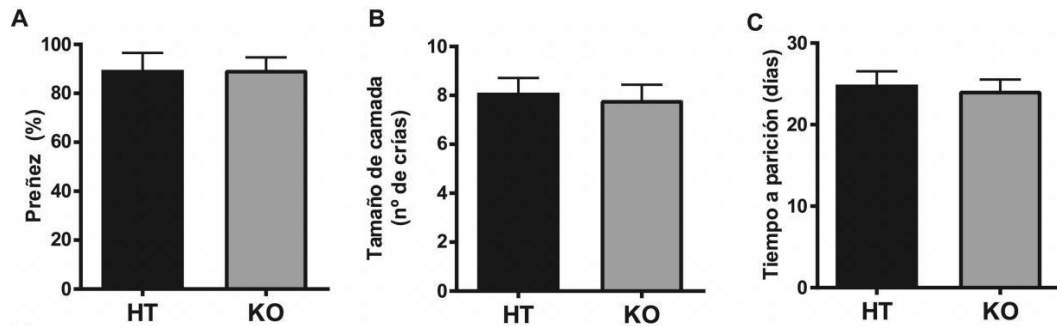


Figura 1.6 Machos HT o KO fueron colocados en apareo por tres semanas con hembras control, determinándose el porcentaje de hembras preñadas (A), tamaño de camada (B) y tiempo hasta parición (C). Media ± SEM, n=8, n.s.

Frente a estos resultados, nos interesó evaluar la fertilidad de machos KO en situaciones más demandantes. Para ello, animales adultos HT y KO fueron sujetos a una vasectomía unilateral para reducir el número de espermatozoides en el eyaculado (tal como se demuestra en Judd et al., 1997), y luego colocados en apareo con dos hembras control. Bajo estas condiciones, los animales control hemi-vasectomizados mostraron comportamiento reproductivo similar al obtenido en condiciones normales. Sin embargo, los machos KO presentaron una disminución significativa no sólo en el porcentaje de hembras preñadas sino también en el número de crías por camada respecto a los machos control (Fig. 1.7 A,B). Para evaluar si la bajada en la fertilidad era consecuencia de un problema en la fertilización, los machos mutantes hemivasectomizados fueron colocados en apareo por una noche con hembras en estro, evaluándose, al día siguiente, el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados de la *ampulla*. El estadio del ciclo estral fue determinado diariamente por citología vaginal. Los resultados de estos ensayos mostraron una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vivo* para los animales KO respecto a los animales control (Figura 1.7C).

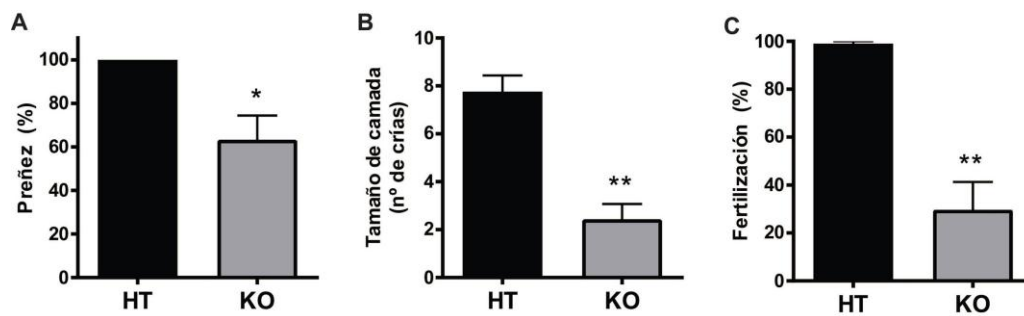


Figura 1.7 Machos HT o KO sometidos a una vasectomía unilateral fueron colocados en apareo con hembras control, determinándose el porcentaje de hembras preñadas (**A**) y el tamaño de camada (**B**). Los mismos machos fueron luego colocados en apareo con hembras en estro, analizándose el porcentaje de ovocitos fertilizados en la *ampulla* al día siguiente (**C**). Media \pm SEM, n=5; * p <0,05, ** p <0,005.

Como otra aproximación al estudio del efecto de la falta de CRISP2 sobre la fertilización *in vivo*, machos HT y KO fueron colocados en apareo ya sea con hembras estimuladas hormonalmente o con hembras en estro como control, evaluándose el porcentaje de fertilización al día siguiente. De manera interesante, los porcentajes de fertilización fueron normales cuando los machos KO se aparearon con hembras en estro (Fig. 1.8A), consistente con la fertilidad normal de estos animales (Ver Fig.1.6). Por el contrario, los niveles de fertilización mostraron una marcada disminución cuando los animales KO habían sido apareados con hembras estimuladas (Fig. 1.8A). Estos resultados indicaban que mientras los espermatozoides de los machos control podían lidiar con los cambios impuestos por el tratamiento hormonal (ej. mayor número de ovocitos en la *ampulla*, ver Fig. 1.8B), los espermatozoides de los machos KO para CRISP2 no podían lograrlo. Como una manera de evaluar esta posibilidad, se analizaron los porcentajes de fertilización en función del número de ovocitos presentes en el oviducto, observándose que mientras los porcentajes obtenidos con los espermatozoides KO disminuían significativamente en función del número de ovocitos ovulados, aquellos correspondientes a los espermatozoides control no se modificaban al aumentar el número de ovocitos (Figura 1.8C).

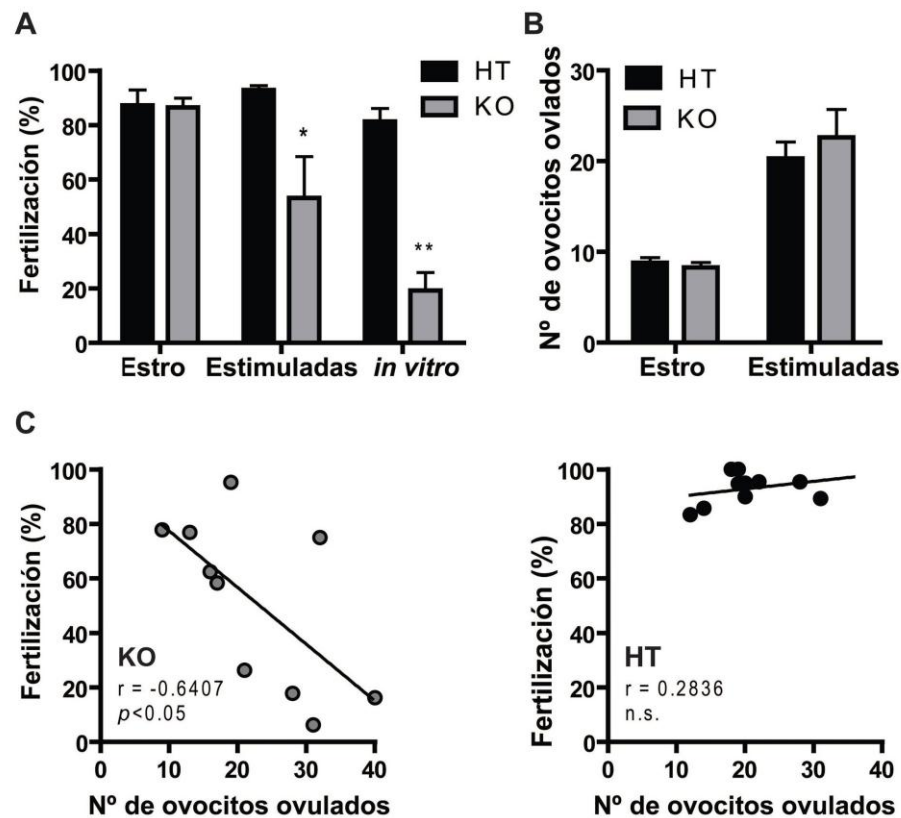


Figura 1.8 (A) Machos HT y knockout KO fueron colocados en apareo con hembras en estro natural y hembras estimuladas hormonalmente, determinándose, al día siguiente, el porcentaje de ovocitos fertilizados en la *ampulla*. Los espermatozoides epididimarios de esos mismos machos fueron recuperados y utilizados en ensayos de fertilización *in vitro* con ovocitos de hembras estimuladas hormonalmente. Media \pm SEM, $n=5$, * $p<0,01$, ** $p<0,001$. **(B)** Número de ovocitos recuperados de hembras en estro o estimuladas hormonalmente correspondientes a los apareos experimentales del panel (A). Media \pm SEM, $n=5$, n.s. **(C)** Porcentaje de fertilización en función del número de ovocitos ovulados correspondientes a los machos KO (panel de la izquierda) y HT (panel de la derecha). $n=10$. El coeficiente de Pearson “ r ” y la significancia se incluyen en cada panel.

Los menores niveles de fertilización obtenidos *in vivo* podrían deberse a un problema en la cópula o en la deposición de los espermatozoides, a una menor migración de los espermatozoides hacia la *ampulla*, o una menor capacidad de los mismos de interactuar con los ovocitos. El éxito de la cópula y la correcta deposición de los espermatozoides fueron confirmados en todos los casos por la presencia de tapón vaginal y de espermatozoides en útero, respectivamente. Para analizar la interacción de gametas, espermatozoides epididimarios HT y KO de los mismos machos utilizados para los apareos experimentales (ver Fig. 1.8A), fueron capacitados y co-incubados *in vitro* con COC obtenidos de hembras WT superovuladas.

Bajo estas condiciones, el porcentaje de ovocitos fertilizados por los espermatozoides KO fue marcadamente menor que el de los controles (Fig. 1.8A). Cabe destacar, que el porcentaje de fertilización de los espermatozoides epididimarios HT no fue diferente a aquel obtenido por los espermatozoides eyaculados tras los apareos con hembras en estro o estimuladas (comparación entre las barras negras en la Fig. 1.8A).

Con el fin de evaluar si una menor calidad de los ovocitos en respuesta a la estimulación hormonal podría contribuir a los menores porcentajes de fertilización obtenidos para el grupo KO, espermatozoides de ambos genotipos fueron utilizados en ensayos de fertilización *in vitro* empleando el mismo número de COC ovulados naturalmente o por estimulación hormonal. Los resultados mostraron que los espermatozoides KO se comportaron defectuosamente comparados con los controles cuando eran expuestos a ambos tipos de ovocitos (Tabla 1.1), confirmando que los espermatozoides mutantes exhiben defectos en su capacidad fertilizante *in vivo* e *in vitro* independientemente de la calidad ovocitaria.

Tabla 1.1 Capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides empleando ovocitos obtenidos de hembras en estro o estimuladas hormonalmente.

	Estro	Estimuladas
HT	91.5 ± 6.5 %	82.5 ± 6.5 %
KO	23.7 ± 13.1* %	22.2 ± 8.3* %

Espermatozoides capacitados HT o KO fueron incubados *in vitro* con igual número de ovocitos obtenidos de hembras en estro natural o estimuladas hormonalmente analizándose el porcentaje de fertilización. Los resultados representan la media ± SEM, n = 5; * $p < 0.01$ versus control. No se observaron diferencias significativas dentro de cada genotipo para los tipos de ovocitos.

Habiendo observado que los espermatozoides KO presentaban una menor capacidad fertilizante *in vitro*, estudiamos el comportamiento de los mismos en las distintas etapas del proceso de fertilización. Para ello, espermatozoides capacitados de ambos genotipos fueron co-incubados *in vitro* ya sea con COC, con ovocitos rodeados solo de ZP o con ovocitos sin cúmulus ni ZP. En todos los casos, se observaron menores niveles de fertilización para los espermatozoides KO que para los HT (Fig. 1.9A–C), consistente con la participación de CRISP2

en la etapa de fusión de gametas (Fig. 1.9C) tal como había sido reportada por nuestro laboratorio (Busso et al., 2007).

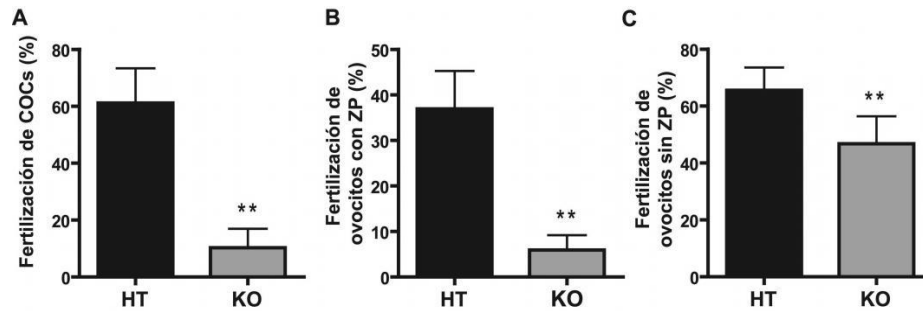


Figura 1.9 Espermatozoides capacitados de machos HT o KO fueron co-incubados con **(A)** COC por 3 h, **(B)** ovocitos con ZP por 3 h o **(C)** ovocitos sin ZP por 1 h. Al final de cada incubación se determinó el porcentaje de fertilización analizándose la presencia de al menos una cabeza de espermatozoide decondensada en el citoplasma. Media \pm SEM, (A) $n=6$, $**p<0,01$, (B) $n=9$, $**p<0,01$, (C) $n=7$, $**p<0,01$.

Dada la posibilidad de que estos defectos se debieran a un mero retraso en la fertilización, los COC fueron expuestos a espermatozoides HT y KO durante 5 horas en vez de 3 h, y los ovocitos fertilizados incubados hasta su desarrollo a embriones de 2 células. En este caso, el porcentaje de fertilización obtenido para cada genotipo (Fig. 1.10) fue similar al observado previamente al analizar presencia de cabeza decondensada o pronúcleos (ver Fig. 1.9A), indicando que los defectos en fertilización de los espermatozoides mutantes no podían ser revertidos por una co-incubación de mayor duración.

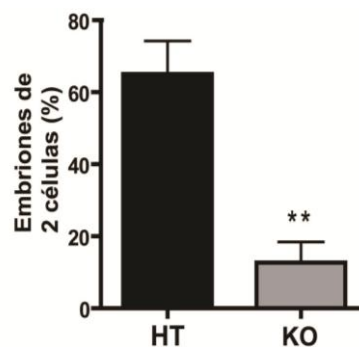


Figura 1.10 Espermatozoides capacitados de machos HT o KO fueron co-incubados con COC por 5 h, analizándose el porcentaje de embriones de 2 células al día siguiente. Media \pm SEM. $n=5$, $**p<0,01$.

El hecho de que los porcentajes de fertilización fueran mucho menores para los casos en los que se utilizaban COC u ovocitos rodeados de ZP (Fig. 1.9A,B) que en aquellos en los cuales se utilizaban ovocitos sin cúmulus ni ZP (Fig. 1.9C), sugirió que los espermatozoides carentes de CRISP2 presentaban deficiencias no sólo para fusionarse con el ovocito sino también para interactuar con las envolturas del mismo. Para examinar la capacidad de los espermatozoides KO de penetrar el cúmulus, los COC fueron co-incubados con espermatozoides de cada genotipo previamente marcados con Hoescht y el número de espermatozoides dentro de la matriz del cúmulus determinado luego de 15 min de co-incubación. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de espermatozoides mutantes que penetraron el cúmulus en comparación con los controles (Fig. 1.11).

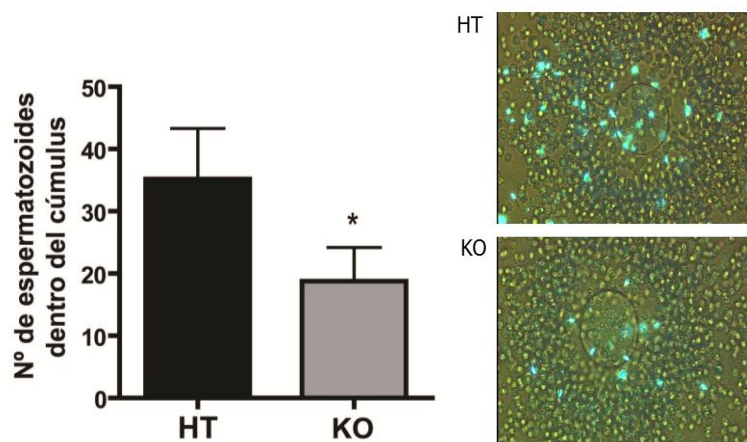


Figura 1.11 Espermatozoides capacitados de machos HT y KO fueron expuestos a Hoescht y co-incubados con COC por 15 min, determinándose el número de espermatozoides fluorescentes dentro de la matriz del cúmulus. Media \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$.

Si bien cuando existe una falla en la fusión de gametas, los espermatozoides tienden a acumularse en el espacio perivitelino, no se observó acumulación de espermatozoides KO en el espacio perivitelino de los ovocitos fertilizados o no fertilizados, sugiriendo la existencia de una deficiencia en la capacidad de estos espermatozoides de unirse y/o penetrar la ZP. Para estudiar dicha posibilidad, ovocitos con ZP fueron co-incubados con espermatozoides KO o control y el número de espermatozoides unidos a la ZP evaluado luego de 30 min. Los resultados no revelaron diferencias entre ambos genotipos en cuanto al número de espermatozoides unidos por ZP (Fig. 1.12A), sugiriendo una deficiencia a nivel de la siguiente etapa de penetración de la ZP. Para estudiar esta etapa específica del proceso de fertilización

se intentaron diferentes estrategias que tienen como base el empleo de ovocitos incapaces de desencadenar el bloqueo de polispermia por modificación de la ZP post-fertilización. Para ello se utilizaron: a) ovocitos de hembras WT en estadio de vesícula germinal, en los cuales la maduración citoplasmática no ha ocurrido y, por lo tanto, no puede ocurrir la reacción cortical (Iwamatsu y Chang, 1972); b) ovocitos maduros incubados por 1 hr a 55 °C, inactivándose las enzimas que modifican la ZP (Miller et al, 1993); c) ovocitos maduros almacenados en soluciones concentradas de sales neutras (ej. sulfato de amonio 2 M) que retraen el citoplasma del ovocito, creando un gran espacio perivitelino, manteniendo las propiedades biológicas de la ZP (Yanagimachi et al, 1979). Sin embargo, en ninguna de las condiciones se observó un número significativo de espermatozoides control en el espacio perivitelino de los ovocitos imposibilitando el estudio con espermatozoides KO. En paralelo al desarrollo de estos estudios, se publicó un trabajo en el cual lograban aumentar la permeabilidad de la ZP tratando a los ovocitos con glutatión reducido y, de esta forma, revertir los defectos en fertilización por fallas en la penetración de la ZP (Miyata et al, 2015). En base a ello, se realizaron ensayos de fertilización *in vitro* exponiendo a espermatozoides KO y HT a ovocitos tratados con glutatión reducido. Bajo estas condiciones, los porcentajes de fertilización correspondientes a espermatozoides KO aumentaron, alcanzando los niveles de los espermatozoides controles (Figura 1.12B) y apoyando una deficiencia a nivel de la penetración de la ZP.

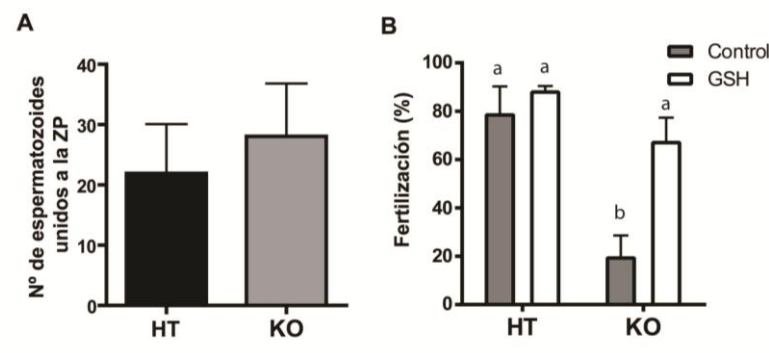


Figura 1.12 (A) Espermatozoides capacitados de machos HT y KO fueron co-incubados con ovocitos sin cúmulus y con ZP por 30 min, determinándose el número de espermatozoides unidos a la ZP. Media \pm SEM, n=5, n.s. **(B)** Espermatozoides capacitados HT y KO fueron co-incubados con ovocitos control o tratados con glutatión, determinándose el porcentaje de fertilización al cabo de 3 h. Media \pm SEM, n=5; (a) vs. (b) $p < 0,05$.

Con el fin de elucidar los mecanismos que conducen a la menor capacidad fertilizante de los espermatozoides KO observada tanto *in vivo* como *in vitro*, espermatozoides de ambos genotipos fueron incubados bajo condiciones capacitantes, examinándose diferentes parámetros espermáticos asociados a la capacitación. Por medio de radioinmunoensayo (Del Punta et al., 1996) y en colaboración con el Dr. Omar Pignataro (IBYME), se evaluaron los niveles intracelulares de cAMP, el cual es un mensajero crítico para el desarrollo de la capacitación. Los resultados mostraron niveles similares entre ambos genotipos (Fig. 1.13A). Consistentemente, el análisis por *western blot* de extractos de espermatozoides mutantes y controles no reveló diferencias en los niveles de fosforilación de proteínas en tirosina (Fig. 1.13B), evento post-traducciona que ocurre normalmente durante la capacitación vía activación de PKA en respuesta al aumento de cAMP (Visconti et al., 2005), como así tampoco en el porcentaje de RA espontánea o inducida con progesterona (Fig. 1.13C). Sin embargo, el análisis objetivo de la motilidad de los espermatozoides por el sistema CASA reveló que, a pesar de presentar una motilidad total normal (KO: 58±5% versus HT: 60±6%; media ± SEM; n=7; n.s.), los espermatozoides mutantes exhibían una disminución en la mayoría de los parámetros cinéticos asociados a la HA (Tabla 1.2) como así también en el porcentaje de células hiperactivadas (Fig. 1.13D).

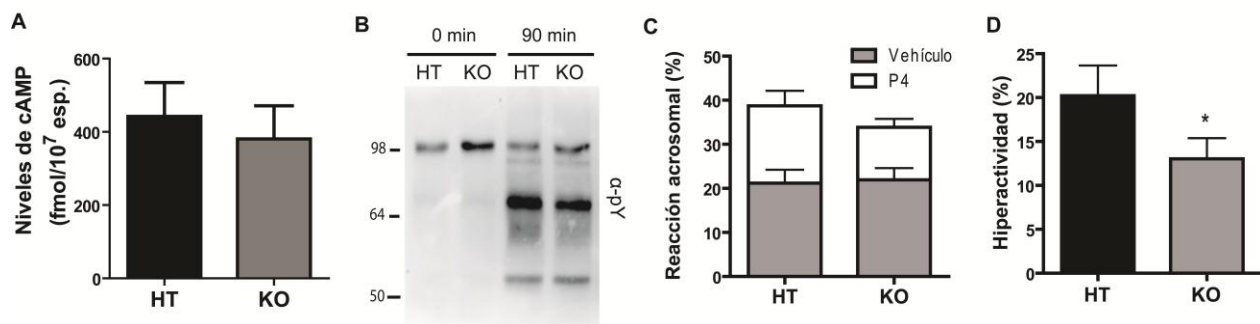


Figura 1.13 Espermatozoides epididimarios de machos HT y KO fueron incubados en condiciones capacitantes evaluándose diferentes parámetros funcionales asociados a la capacitación. **(A)** Niveles de cAMP medidos mediante radioinmunoensayo. Media ± SEM, n=5, n.s. **(B)** Fosforilación de proteínas en tirosina analizada por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. n=4. Se muestra una imagen representativa. **(C)** Porcentaje de RA analizado por medio de tinción con Coomassie Blue de espermatozoides expuestos a progesterona (P4) o a DMSO (vehículo) durante los últimos 15 minutos de la capacitación. Media ± SEM, n=4, n.s. **(D)** Porcentaje de HA evaluado por el sistema CASA. Media ± SEM, n=7, * $p < 0,05$.

Tabla 1.2. Efecto de la falta de CRISP2 sobre la motilidad de espermatozoides capacitados

	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
HT	122,1 \pm 5,3	52,6 \pm 3,0	226,0 \pm 12,4	4,7 \pm 0,3	11,7 \pm 0,3	43,6 \pm 0,1	24,2 \pm 0,7
KO	110,7 \pm 4,2 *	46,7 \pm 1,8 *	202,9 \pm 10,7 **	4,2 \pm 0,2 ***	12,0 \pm 0,2	43,1 \pm 1,6	24,4 \pm 1,3

Espermatozoides capacitados HT o KO fueron analizados por CASA evaluándose diferentes parámetros de motilidad. VAP: velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm), BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz), STR: rectilineidad (%) y LIN: linealidad (%). $n=7$; * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$ vs control.

Teniendo en cuenta los defectos en la HA de los espermatozoides KO, estudiamos si la reversión de la fertilización en presencia de glutatión (ver Fig. 1.12B) se debía a una mayor permeabilidad de la ZP o a un aumento en los porcentaje de HA de los espermatozoides KO. Los resultados mostraron que la incubación de los espermatozoides con glutatión no tiene efectos sobre los niveles de HA de los mismos (Fig. 1.14), indicando que el efecto en la ZP sería el principal factor en la reversión con el agente reductor.

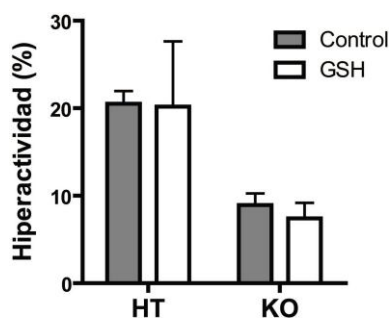


Figura 1.14 Espermatozoides capacitados de machos HT y KO fueron incubados 30 min en condiciones control o con glutatión (GSH) y el porcentaje de HA evaluado por el sistema CASA. Media \pm SEM, $n=3$, n.s. versus control sin GSH.

Considerando que la motilidad es dependiente de los niveles de Ca^{2+} citosólico (Ren et al., 2001; Schuh et al., 2004), evaluamos por fluorimetría el Ca^{2+} intracelular en espermatozoides KO y HT tanto frescos como capacitados utilizando una sonda sensible al catión (Fluo-4, AM). Los resultados mostraron que mientras que los espermatozoides de los dos genotipos exhibían el ya reportado aumento de Ca^{2+} intracelular durante la capacitación (Ruknudin y Silver, 1990), en el grupo KO este aumento fue significativamente mayor que en los controles (Fig. 1.15A). En paralelo, empleando citometría de flujo, se pudieron evaluar los niveles de Ca^{2+} en espermatozoides KO y HT incubados por 90 min en condiciones capacitantes y no capacitantes. Para el análisis, los espermatozoides fueron seleccionados por su forma en el gráfico SSC (*side scatter* o dispersión lateral) vs. FSC (*forward scatter* o dispersión frontal) (Fig. 1.15B) y luego por su viabilidad, es decir, aquellas que no mostraron marca para yoduro de propidio (Fig. 1.15C). Los resultados mostraron que tanto los espermatozoides frescos como los incubados en condiciones no capacitantes exhibían bajos niveles de fluorescencia que no diferían entre genotipos (Fig. 1.15D,E). Asimismo, los espermatozoides capacitados KO presentaron niveles de fluorescencia significativamente mayores que los de espermatozoides capacitados control (Fig. 1.15D,E). En conjunto, los resultados obtenidos por fluorimetría y citometría de flujo apoyan la existencia de una desregulación del Ca^{2+} intracelular que podría ser la responsable de los defectos en capacitación y fertilización observados en los espermatozoides KO.

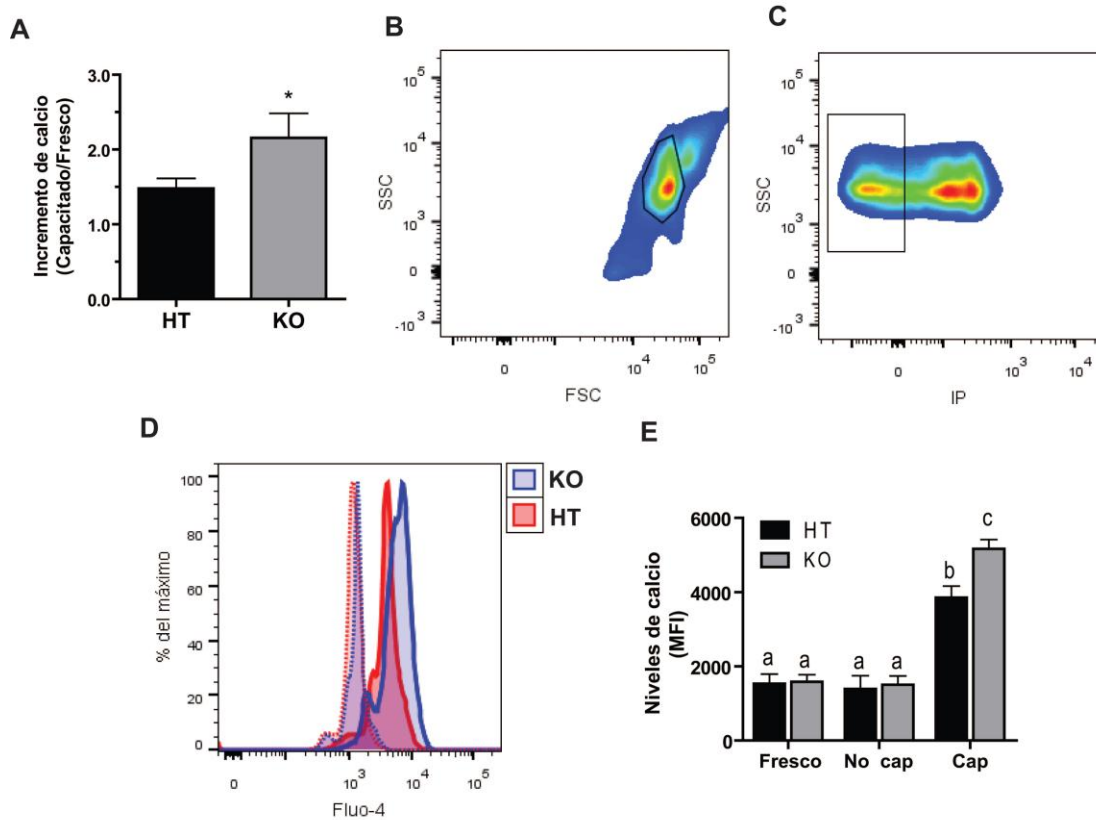


Figura 1.15 (A) Incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular durante la capacitación medidos por fluorimetría utilizando Fluo-4, AM (Fluorescencia de espermatozoides capacitados/frescos). Media \pm SEM. $n=4$, $p<0,05$. (B-E) Niveles de Ca^{2+} intracelular evaluados por citometría de flujo. (B) Gráfico SSC vs FSC mostrando el área seleccionada. Solo los eventos dentro de esa área fueron utilizados en los posteriores análisis. (C) Gráfico de fluorescencia en el canal de yoduro de propidio (IP) mostrando las células negativas (vivas) y positivas (muertas). Solo los espermatozoides dentro del área marcada fueron utilizados. (D) Histogramas de fluorescencia del canal FITC de un experimento representativo en el que se muestran espermatozoides HT (rojo) y KO (azul), tanto frescos (línea punteada) como capacitados (línea continua) (E) Intensidad de fluorescencia media (MFI) del Fluo-4 de espermatozoides de ambos genotipos frescos, no capacitados y capacitados. Media \pm SEM, $n=5$, (a) vs. (b) $p<0,001$; (b) vs. (c) $p<0,001$.

Dado que el aumento de Ca^{2+} intracelular durante la capacitación espermática depende principalmente de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior de la célula a través de CatSper, el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide, evaluamos los niveles de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados en menores concentraciones de Ca^{2+} extracelular o en presencia de un inhibidor específico de CatSper. El aumento exacerbado de Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides KO no se observó en ninguna de estas dos condiciones (Fig. 1.16A,B) indicando que la desregulación del Ca^{2+} en los espermatozoides KO es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de este canal.

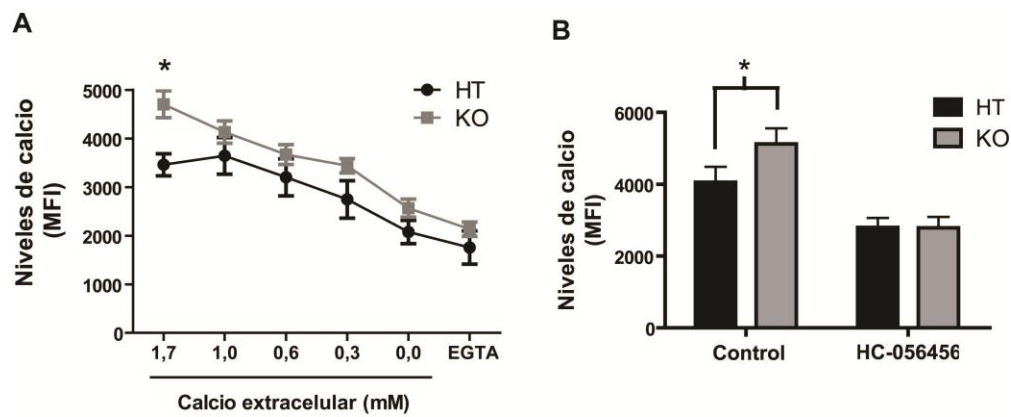


Figura 1.16 (A) Niveles de Ca^{2+} intracelular evaluados por citometría de flujo usando Fluo-4, AM. Los resultados se muestran como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de espermatozoides expuestos en concentraciones decrecientes de Ca^{2+} extracelular o EGTA. Media \pm SEM, $n=5$, * $p<0,05$ **(B)** Niveles de Ca^{2+} evaluados en espermatozoides capacitados en condiciones control o en presencia 10 μM del inhibidor de CatSper, HC-056456. Media \pm SEM, $n=5$, * $p<0,05$.

Habiendo observado que los niveles de Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides KO podían ser normalizados disminuyendo la concentración de este ion en el medio de incubación, el próximo paso consistió en estudiar si en estas condiciones mejoraba la hiperactividad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Sin embargo, no se observó un aumento en los porcentajes de hiperactividad (Fig. 1.17A) ni de fertilización (Fig. 1.17B) indicando que la simple normalización de los niveles de Ca^{2+} intracelular no sería suficiente para revertir el fenotipo de los espermatozoides KO. Más aún, a la menor concentración empleada (0,6 mM), se observó incluso un detrimento en la fertilización en el grupo HT (Fig. 1.17B), posiblemente debido al crítico rol que cumple este ion en el desarrollo de la HA y en las distintas etapas de la fertilización.

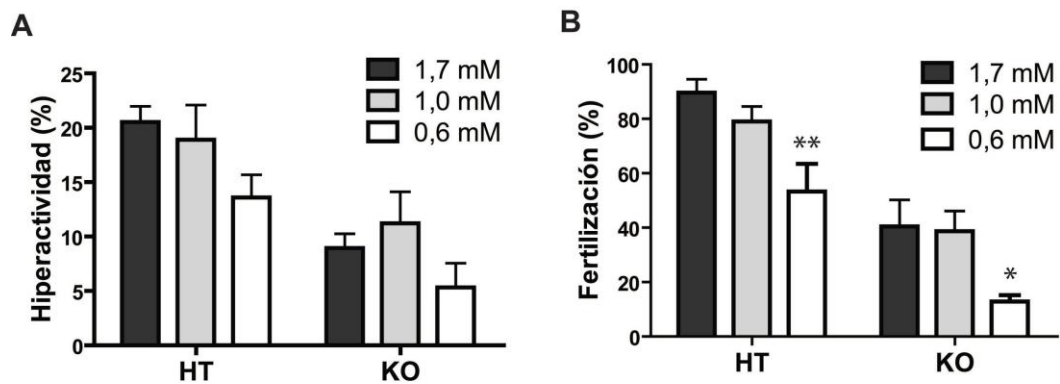


Figura 1.17 Espermatozoides epididimarios de machos HT o KO fueron capacitados bajo diferentes concentraciones de Ca²⁺ extracelular. **(A)** El porcentaje de HA fue evaluado por el sistema CASA. Media \pm SEM, n=3, n.s. versus 1,7 mM **(B)** El porcentaje de fertilización fue estudiado analizándose el porcentaje de embriones de 2 células al día siguiente de una co-incubación de 3 h con COC. Media \pm SEM. n=5, * p <0,05, ** p <0,01 vs 1,7 mM.

Finalmente, con el objetivo de esclarecer cuales flujos de Ca²⁺ podrían estar siendo regulados por CRISP2 y teniendo en cuenta la naturaleza intracelular de esta proteína que dificulta los estudios electrofisiológicos, nos planteamos analizar en mayor profundidad su localización celular. En este sentido, CRISP2 podría regular el Ca²⁺ intracelular a través de la modulación de canales de Ca²⁺ ubicados tanto en el RNE (*redundant nuclear envelope*) del cuello, como en la membrana plasmática a lo largo de la cola. Considerando que la cola del espermatozoide tiene un diámetro menor de 1 μ m, este análisis se realizó utilizando el sistema 3D STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*), que permite una resolución mayor al límite de refracción de la luz, y que ya fue utilizado para conocer la localización de diferentes proteínas en el flagelo del espermatozoide murino (Chung et al., 2015). Estos estudios se hicieron en colaboración con los Dres. Mariano Buffone (IBYME) y Diego Krapf (Universidad de Colorado, EEUU), utilizando anticuerpos anti-CRISP2 en espermatozoides frescos de animales WT. Los resultados confirmaron la localización de CRISP2 en el acrosoma, en el cuello y en la cola del espermatozoide (Fig. 1.118A), mientras que el análisis radial de la cola indicó que CRISP2 se ubicaba a una distancia desde el centro coincidente con la membrana plasmática de la pieza principal y pieza media de la cola (Fig. 1.18B,C), apoyando así el rol de CRISP2 en la regulación de los diferentes canales de Ca²⁺ mencionados.

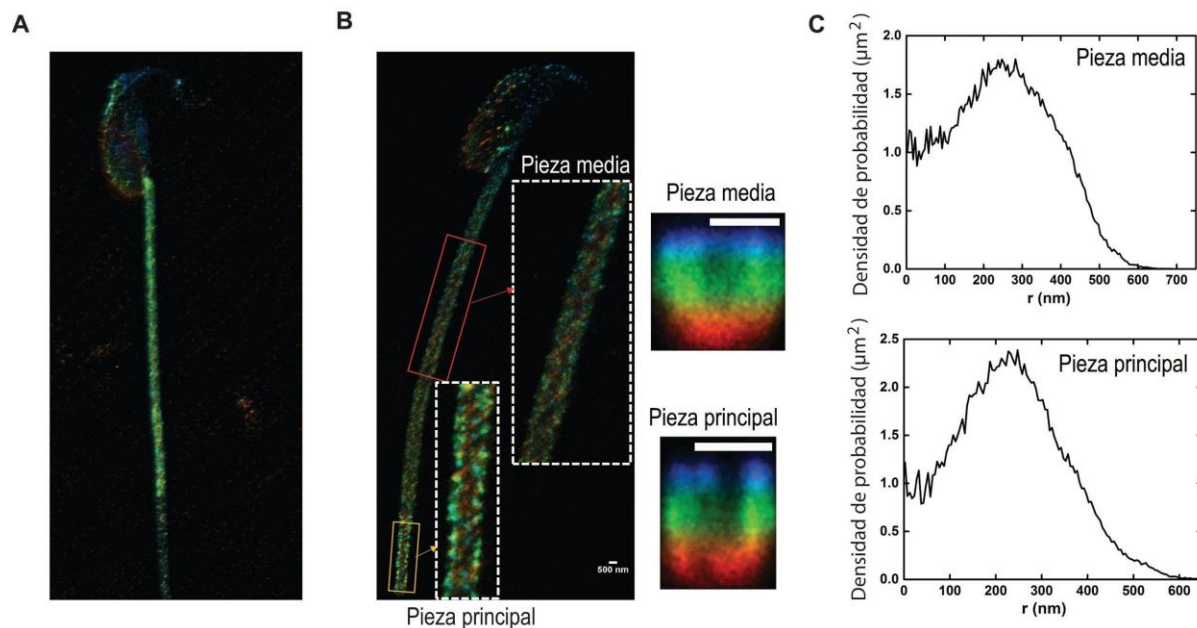


Figura 1.18 (A) Imagen representativa de un espermatozoide marcado con un anticuerpo anti-CRISP2 y analizado por el sistema STORM. **(B)** Detalle de la pieza media (recuadro amarillo) y pieza principal (recuadro rojo) y cortes transversales de las mismas. Las barras blancas corresponden a 500 nm. **(C)** Cuantificación de la densidad de probabilidad a partir de las reconstrucciones mostradas en (B).

En resumen, los resultados obtenidos a partir de ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* mostraron que los animales deficientes en CRISP2 exhibían defectos asociados a la fertilidad en condiciones demandantes, y que sus espermatozoides presentaban una menor capacidad fertilizante, defectos en el desarrollo de la HA y una desregulación del Ca²⁺ intracelular.

Capítulo 2

Regulación de los niveles de calcio intracelular en espermatozoides humanos

Tal como se mencionara en la introducción, existen estudios que señalan al gen codificante para la proteína testicular CRISP2 como uno de los candidatos cuya alteración es causante de infertilidad masculina, especialmente asociada a astenozoospermia (Paoloni-Giacobino et al., 2000; Olesen et al., 2001; Du et al., 2006; Jing et al., 2011; Zhou et al., 2015). Estos estudios señalan que, además del rol en la fusión de gametas propuesto previamente por nuestro laboratorio (Busso et al., 2005), CRISP2 tendría una relevancia para la motilidad de los espermatozoides humanos y la fertilidad masculina. En base a ello, y teniendo en cuenta los defectos en hiperactividad y en la regulación de Ca^{2+} observados en los animales KO para CRISP2, nos planteamos como objetivo estudiar en muestras de pacientes con astenozoospermia si la falta de CRISP2 podría ocasionar la falla en motilidad a través de la regulación del Ca^{2+} intracelular. Para ello, se estableció una colaboración con el Dr. Álvarez Sedó, Director del Laboratorio de Biología y Genética Reproductiva de la clínica de reproducción asistida CEGYR, quien nos proveyó de muestras de semen tanto de donantes sanos como de pacientes.

En primer lugar, pusimos a punto el método de recuperación de espermatozoides ya que si intentáramos seleccionar las células por su motilidad en pacientes con problemas severos en la motilidad espermática (por ejemplo, a través de la técnica de *swim up*), las mismas serían tan escasas que serían insuficientes para poder obtener datos y analizarlos estadísticamente. Por lo tanto, se probó el uso de la centrifugación en gradiente de densidad (PureCeption®) de dos capas (40/80 %) y de una única capa (40 %). Los mayores porcentajes de recuperación de espermatozoides se lograron mediante el uso de una única capa de gradiente de densidad, obteniéndose una población de espermatozoides con los mismos porcentajes de motilidad que la muestra de semen original y sin contaminación con células redondas. Dado que trabajos en la literatura muestran que esta forma de separación no selecciona exclusivamente a los espermatozoides con mejor motilidad (Tamburrino et al., 2015), los resultados que se obtienen sobre las células así recuperadas serían representativos de lo que ocurre naturalmente.

Luego de analizarse la motilidad de la muestra de semen, y separados los espermatozoides por el método de gradiente de una única capa, se dividió cada muestra en dos partes, la primera se utilizó para medir los niveles de expresión de CRISP2 por medio de *western blot*. En el tiempo que duró este estudio, se obtuvieron tan solo 3 muestras astenozoospermicas (motilidad progresiva menor a 32 % según la OMS, 2010) y 43 controles con motilidad normal. De las 3 muestras de pacientes, dos presentaron niveles más bajos de CRISP2 que el promedio de donantes sanos, mientras que solo el 30% de los donantes tenían niveles bajos de CRISP2 (Fig. 2.1A). Sin embargo, el bajo número de muestras astenozoospermicas y la variabilidad de las muestras controles no permitió hacer una correcta comparación entre ambos grupos, por lo cual se decidió hacer análisis de correlaciones utilizando todas las muestras en conjunto, sin observarse una correlación significativa entre los niveles de CRISP2 y la motilidad progresiva de las muestras (Fig. 2.1B).

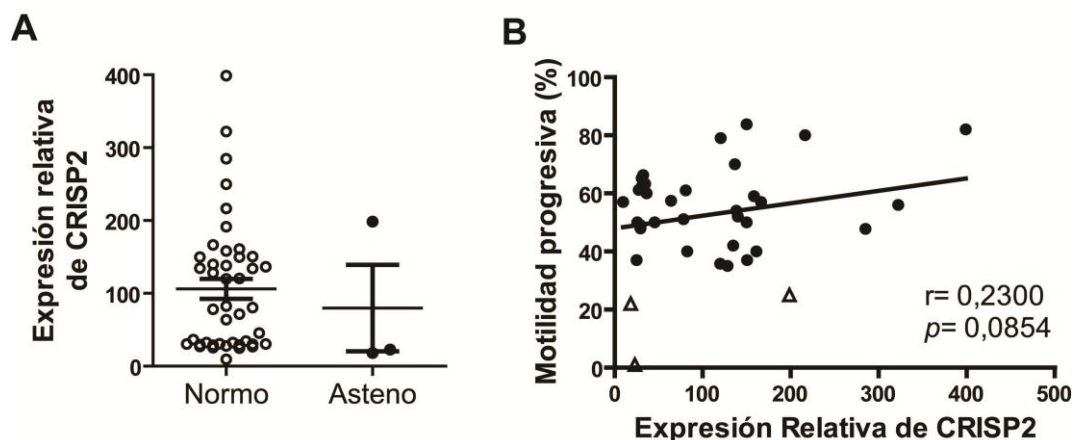


Figura 2.1 (A) Cuantificación mediante *western blot* de la expresión de CRISP2 relativizada a la cantidad de tubulina y a una muestra patrón que se sembró en todos los geles. Se grafican los valores independientes (normozoospermicos, $n=43$ y astenozoospermicos, $n=3$) y la media \pm SEM, n.s. **(B)** Porcentaje de motilidad progresiva en función de la expresión relativa de CRISP2. Los triángulos representan las muestras astenozoospermicas y los círculos las de motilidad normal. Se incluye en el gráfico el coeficiente de correlación de Pearson y el nivel de significancia ($n=37$).

Con el objetivo de investigar si CRISP2 tenía un rol en la regulación del aumento de Ca^{2+} intracelular, la otra parte de la muestra de espermatozoides se empleó para medir los niveles de Ca^{2+} intracelular por citometría de flujo en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y no capacitantes (sin BSA ni bicarbonato) utilizando una sonda

sensible a Ca^{2+} (Fluo-4, AM). Estas mediciones se realizaron en colaboración con la Lic. Sol Nuñez, miembro del Laboratorio dirigido por el Dr. Zwirner del IBYME. En primer lugar, pusimos a punto esta medición con espermatozoides de donantes sanos, seleccionándose los espermatozoides a partir de un gráfico SSC (*side scatter* o dispersión lateral) vs. FSC (*forward scatter* o dispersión frontal) (Fig. 2.2A) ya que estas variables brindan información acerca del volumen y complejidad celular (Mata-Martinez et al., 2013). Luego, se seleccionan las células por su viabilidad según la ausencia de marca con yoduro de propidio (Fig. 2.2B). Los resultados mostraron el aumento esperado de Ca^{2+} intracelular dependiente de la capacitación, medido como fluorescencia media de Fluo-4 (Fig. 2.2C,D) y como el porcentaje de células con alto Ca^{2+} (Fig. 2.2C,E), tal como había sido reportado previamente (Mata-Martinez et al., 2013).

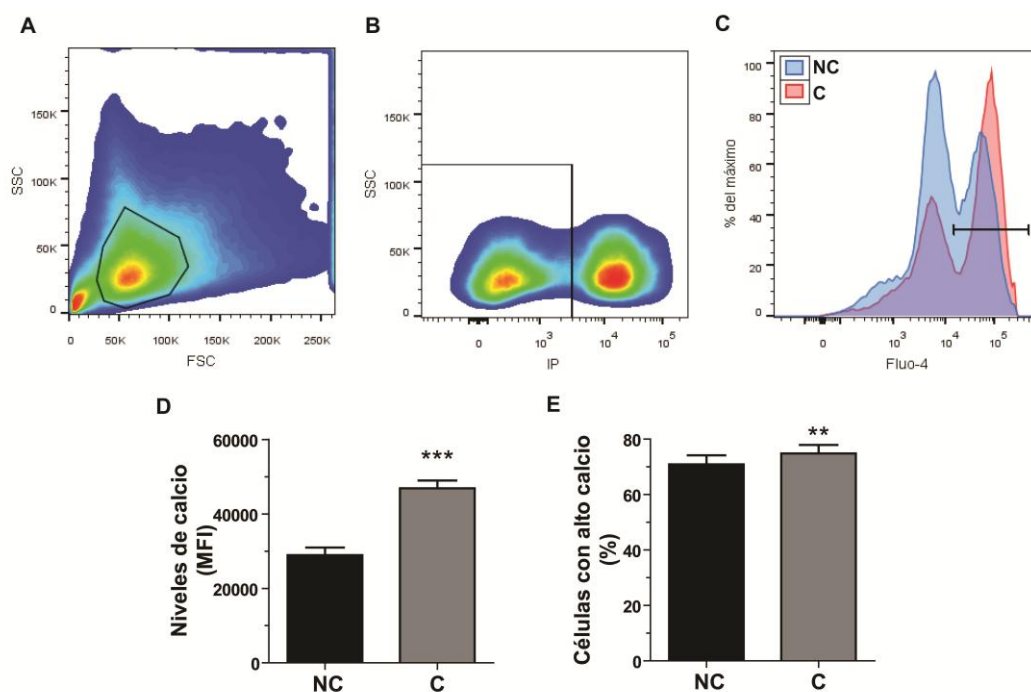


Figura 2.2 El aumento de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados y no capacitados fue medido por citometría de flujo. **(A)** Gráfico SSC vs FSC mostrando el área seleccionada. Solo los eventos dentro de esa área fueron utilizados en los posteriores análisis. **(B)** Gráfico de fluorescencia en el canal de yoduro de propidio (IP) mostrando las células negativas (vivas) y positivas (muertas). Solo los espermatozoides dentro del área marcada fueron utilizados. **(C)** Histogramas de fluorescencia del canal FITC de un experimento representativo en el que se muestran espermatozoides capacitados (C, rojo) y no capacitados (NC, azul). Además, se señala la población de espermatozoides con altos niveles de Ca^{2+} . **(D-E)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) del Fluo-4 **(D)** y porcentaje de células con alto Ca^{2+} **(E)** de espermatozoides no capacitados y capacitados. Media \pm SEM, $n=35$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

El próximo paso consistió en evaluar la asociación entre los niveles de CRISP2 y el aumento de Ca^{2+} durante la capacitación. El análisis de los resultados mostró una tendencia, en el caso del aumento del MFI (Fig. 2.3A), y una correlación negativa significativa, en el caso del porcentaje de células con alto Ca^{2+} (Fig. 2.3B), entre el aumento de Ca^{2+} y la expresión de CRISP2. Estos resultados sugieren que cuanto menor es la expresión de CRISP2 mayor es el aumento de Ca^{2+} , indicando que los pacientes con expresión aberrante de CRISP2 podrían estar teniendo una desregulación en los niveles de este catión al igual que en el modelo de ratones KO para *Crisp2*.

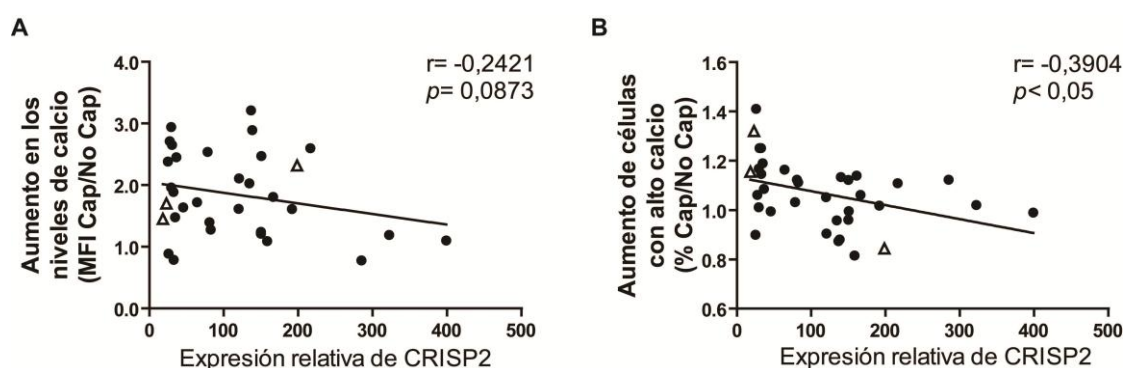


Figura 2.3 Aumento de Ca^{2+} medido como veces de aumento de intensidad media de fluorescencia (MFI) **(A)** o porcentaje de células con alto Ca^{2+} **(B)** entre espermatozoides capacitados (Cap) y no capacitados (No Cap), en función de la expresión relativa de CRISP2. Los triángulos representan las muestras astenozoospermicas y los círculos las de motilidad normal. Se incluye en cada gráfico el coeficiente de correlación de Pearson y el nivel de significancia ($n=33$).

De forma paralela a las mediciones de CRISP2 y Ca^{2+} , se buscó desarrollar un modelo experimental que emulara a pacientes con niveles elevados de Ca^{2+} intracelular para ensayar posibles tratamientos. Dado que el Ca^{2+} extracelular es esencial para el aumento de los niveles intracelulares de este ion, decidimos incubar a espermatozoides de donantes sanos en concentraciones crecientes de Ca^{2+} en el medio de capacitación. Como control positivo, los espermatozoides fueron expuestos al ionóforo de Ca^{2+} A23187, registrándose el aumento esperado en el calcio intracelular. El análisis por citometría de flujo mostró que ninguna de las concentraciones de Ca^{2+} extracelular ensayadas logró elevar el Ca^{2+} intracelular con respecto al control (1,7 mM) (Fig. 2.4).

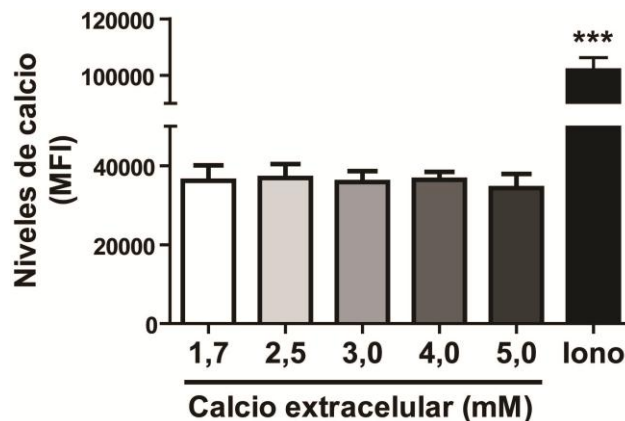


Figura 2.4 Niveles de Ca^{2+} medidos por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (MFI) del Fluo-4 de espermatozoides capacitados en concentraciones crecientes de Ca^{2+} en el medio. Como control positivo, se utilizó el ionóforo A23127 (Iono). Media \pm SEM, $n=5$, *** $p<0,001$.

Dado que nuestros resultados indicaban que bajos niveles de CRISP2 estaban asociados a mayores aumentos de Ca^{2+} durante la capacitación (ver Fig. 2.3) y, teniendo en cuenta los posibles efectos negativos de niveles anormalmente altos de Ca^{2+} (Schuh et al., 2004, Brukman et al., 2016, Li et al., 2016), nos planteamos como objetivo encontrar moduladores de la capacitación que inhiban el aumento anormal de Ca^{2+} y que puedan ser utilizados como herramienta farmacológica para mejorar la motilidad de los espermatozoides de este tipo de pacientes. Como primer paso, se buscaron drogas que inhibieran el aumento de Ca^{2+} que ocurre normalmente durante la capacitación en muestras de donantes sanos con la idea de emplear dicha droga en aquellos pacientes que muestren mayores niveles de Ca^{2+} que lo normal. Para ello, medimos los niveles de Ca^{2+} de espermatozoides de donantes sanos expuestos a diferentes compuestos que inhiban la entrada de Ca^{2+} a través de CatSper. Los compuestos empleados fueron EGTA, un quelante de calcio extracelular; HC056456, un inhibidor específico de CatSper; y H89, un inhibidor de la quinasa PKA que regula la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide (Torres-Flores et al., 2008, Baron et al., 2016). Finalmente, como un control negativo del H89 se empleó un inhibidor de la quinasa PYK2 (PF431396, PF) que inhibe la fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr) sin afectar la actividad de PKA (Battistone et al., 2014). Como controles, se utilizaron espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores y espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes. En todas las condiciones ensayadas se observó una disminución en los niveles de Ca^{2+} intracelular respecto a los espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores (Fig. 2.5).

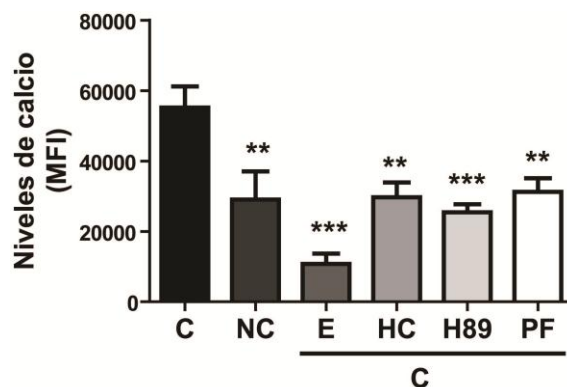


Figura 2.5 Niveles de Ca^{2+} expresados como intensidad de fluorescencia media Fluo-4 (MFI) de al menos 4 experimentos diferentes de espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 3,5 mM EGTA (E); 10 μM de HC056456, inhibidor de CatSper (HC); 50 μM de H89, inhibidor de PKA (H89); o 30 μM de PF431396, inhibidor de PYK2 (PF). Media \pm SEM. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs. C.

Para nuestra sorpresa, el PF produjo una inhibición en el aumento de Ca^{2+} ya que el mismo había sido empleado como control negativo de la inhibición de PKA. Dado que hasta el momento no existían evidencias acerca de la relevancia de la pTyr para la regulación de los niveles de Ca^{2+} , nos pareció de sumo interés investigar en profundidad el *cross-talk* entre esta cascada de señalización y el aumento de Ca^{2+} inducido por la capacitación, ampliando así el abanico de actores moleculares que podrían ser blanco de un tratamiento para la infertilidad. Para ello, en primer lugar estudiamos el efecto de la concentración de PF en los niveles de Ca^{2+} (Fig. 2.6), observándose tanto un efecto dosis-dependiente como diferencias con respecto al control en aquellas concentraciones a las cuales se veía inhibición de la pTyr (Battistone et al., 2014).

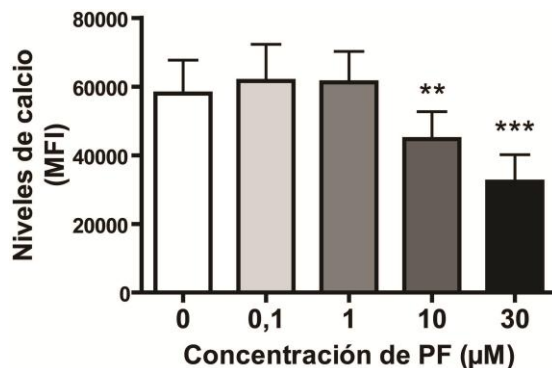


Figura 2.6 Niveles de Ca^{2+} medidos por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (MFI) del Fluo-4 en espermatozoides capacitados expuestos a concentraciones crecientes de PF en el medio. Media \pm SEM, $n=3$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs 0 μM .

Teniendo en cuenta que CatSper es el principal canal involucrado en la entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide humano (Smith et al., 2013; Williams et al., 2015), el próximo paso fue estudiar si el efecto de inhibir pTyr en los niveles intracelulares de Ca^{2+} se debía a una menor actividad de CatSper. Estos estudios se llevaron a cabo durante una beca de entrenamiento otorgada por PLISSER llevada a cabo en el laboratorio Consorcio de Fisiología del Espermatozoide (Instituto de Biotecnología, UNAM, México), dirigido por el Dr. Alberto Darszon. En primer lugar, la actividad de CatSper fue evaluada mediante citometría de flujo por depolarización del potencial de membrana (E_m) (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2014), dado que cuando CatSper se encuentra activo en un medio libre de cationes divalentes, es permeable a cationes monovalentes (Kirichok et al., 2006; Strunker et al., 2011) como el Na^+ , produciendo una depolarización de la célula (Torres-Flores et al., 2011). Para ello, espermatozoides tanto capacitados en presencia de PF como controles (capcitados, no capacitados y capacitados con HC) fueron teñidos con el indicador de E_m DiSC3(5) y la intensidad de fluorescencia registrada antes y después del agregado de 3,5 mM de EGTA. Solo aquellas células seleccionadas en los gráficos de FSC y SSC (Fig. 2.7A), y negativas para yoduro de propidio fueron utilizadas en el análisis (Fig. 2.7B). Bajo estas condiciones, los espermatozoides capacitados mostraron mayor depolarización de membrana que los espermatozoides no capacitados o capacitados con HC (Fig. 2.8C), lo cual es consistente con la mayor actividad de CatSper durante la capacitación. En el caso de los espermatozoides capacitados en presencia de PF, se observó una disminución en la depolarización inducida con EGTA comparado con los espermatozoides capacitados control (Fig. 2.7C).

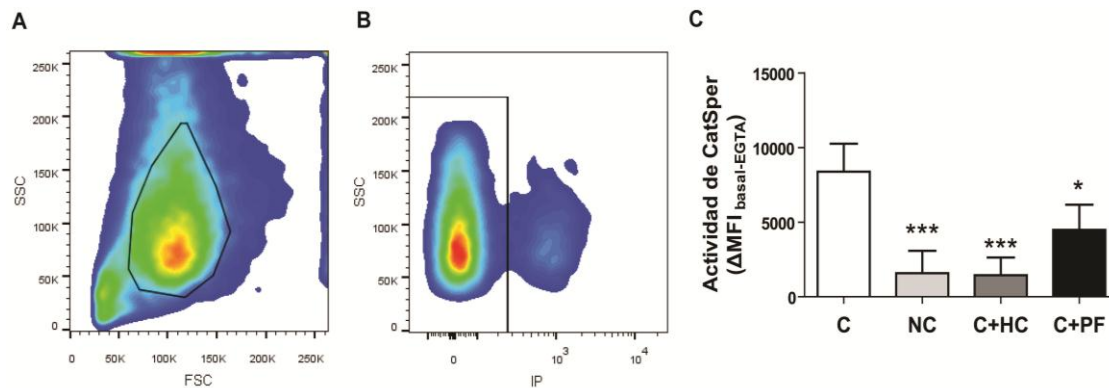


Figura 2.7 Actividad de CatSper evaluada por la depolarización de membrana luego del tratamiento con EGTA. El potencial de membrana fue evaluado por citometría de flujo registrando la fluorescencia de la sonda DiSC3(5). **(A)** Gráfico SSC vs FSC mostrando las células seleccionadas para el posterior análisis. **(B)** Gráfico de fluorescencia del yoduro de propidio (IP) mostrando la selección de células negativas (vivas). **(C)** Espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 10 μM de HC (C+HC) o 30 μM de PF (C+PF) expuestos a 3,5 mM EGTA. Los resultados se expresan como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia media antes y después del agregado de EGTA ($\Delta\text{MFI}_{\text{basal-EGTA}}$). Media \pm SEM, $n=7$, * $p<0,05$, *** $p<0,001$ vs C.

Considerando que en humanos, CatSper es activado por progesterona (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), evaluamos si dicha activación era afectada por la inhibición de pTyr. Debido a la rapidez y a la naturaleza bifásica del aumento de Ca^{2+} , la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 fue registrada por microscopía en tiempo real antes y después del agregado de 100 nM de progesterona. Tal como se muestra en la Figura 2.8A, se pudo observar el típico aumento de Ca^{2+} bifásico en respuesta a progesterona con un pico máximo a los 50 seg seguido de un *plateau* (Strunker et al., 2011), en todos los tratamientos. Sin embargo, los espermatozoides capacitados en presencia de PF exhibieron una disminución significativa tanto en el pico máximo (Fig. 2.8B) como en el *plateau* (Fig. 2.8C) con respecto a los espermatozoides capacitados control.

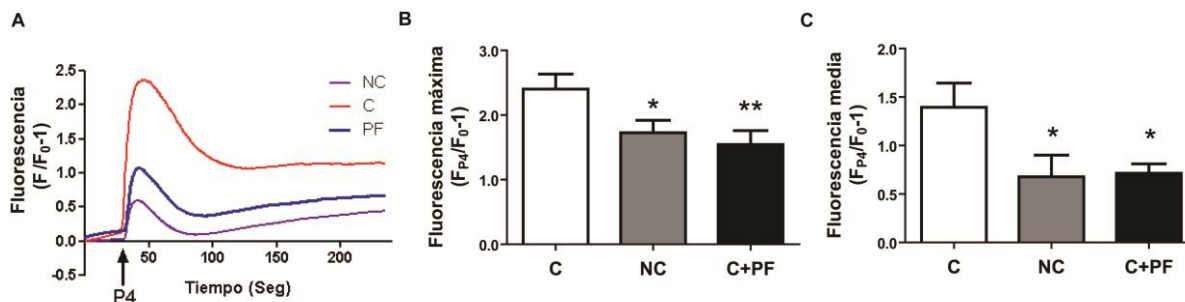


Figura 2.8 Actividad de CatSper evaluada por el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por 100 nM de progesterona (P4). **(A)** Experimento representativo de microscopía en tiempo real de espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 30 μ M de PF (C+PF). Se registró la fluorescencia relativa máxima correspondiente al pico **(B)** y la fluorescencia relativa media obtenida en la fase estacionaria **(C)** de la respuesta a P4. Los niveles de calcio se representan como la fluorescencia del Fluo-4 relativa al valor inicial (F_0). Media \pm SEM, $n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs. C.

Dado que ambos esquemas experimentales sugerían que la actividad de CatSper estaba disminuida por acción del tratamiento con PF, lo siguiente que nos preguntamos fue si el inhibidor bloqueaba a CatSper directamente o indirectamente a través de un mecanismo asociado a la capacitación tal como la pTyr. Para ello, y considerando que CatSper en espermatozoides no capacitados tiene cierta sensibilidad a progesterona (Ver Fig. 2.9A) (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), evaluamos si el agregado de PF (o HC como control) a espermatozoides no capacitados inhibía el aumento de Ca^{2+} inducido por la hormona. Los resultados mostraron que en tanto el tratamiento con HC fue capaz de bloquear el incremento de Ca^{2+} en espermatozoides no capacitados, el agregado de PF a dichas células no afectó la respuesta a progesterona (Fig. 2.9A,B), descartando que el PF estuviera bloqueando directamente a CatSper.

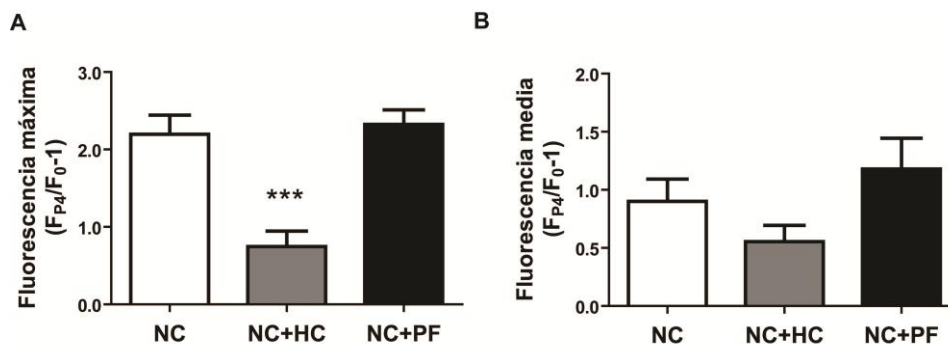


Figura 2.9 Incremento de Ca^{2+} en respuesta a 100 nM de progesterona medido por microscopía en tiempo real como fluorescencia de Fluo-4. Se registró la fluorescencia relativa máxima correspondiente al pico (**B**) y la fluorescencia relativa media obtenida en la fase estacionaria (**C**) de la respuesta a P4. Los niveles de calcio se representan como la fluorescencia del Fluo-4 relativa al valor inicial (F_0). Media \pm SEM, $n=5$, *** $p<0,001$ vs. NC.

Otra posibilidad que podría explicar los menores niveles de Ca^{2+} en los espermatozoides capacitados en presencia de PF sería que la inhibición de pTyr esté afectando el sistema (*Store Operated Calcium Entry*) ya que existen en la literatura fuertes evidencias que señalan que en otros tipos celulares, PYK2 regula la entrada de Ca^{2+} por este sistema a través de la fosforilación en Tyr de STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) (Mohammad et al., 2011, López et al., 2012, Mohammad et al., 2015, Yazbeck et al., 2017). Asimismo, este mecanismo de entrada de Ca^{2+} juega un rol en la fase estacionaria de la respuesta a progesterona en espermatozoides humanos (Lefièvre et al., 2012), durante la cual se observó una disminución de los niveles de Ca^{2+} en espermatozoides capacitados expuestos a PF. Por lo tanto, estudiamos la posible modulación de SOCE por pTyr agregando taspigargina a espermatozoides no capacitados o capacitados expuestos o no a PF, un compuesto que libera Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y activa la vía SOCE. El análisis por citometría mostró que la taspigargina produjo efectos similares en las tres condiciones ensayadas (Fig. 2.10), indicando que la actividad de SOCE en espermatozoides humanos no estaría bloqueada por la inhibición de pTyr.

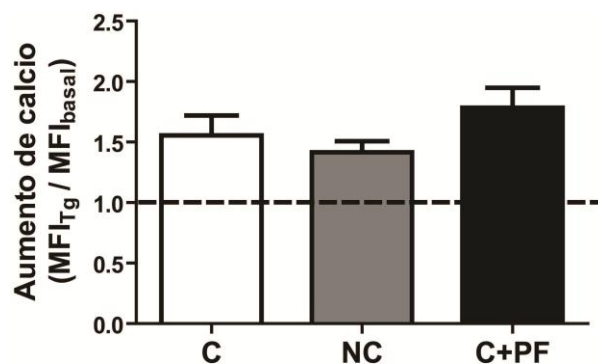


Figura 2.10 Niveles de Ca^{2+} medidos por citometría de flujo como aumento de la intensidad de fluorescencia media del Fluo-4 (MFI) de espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) y capacitados en presencia de 30 μM de PF (C+PF) expuestos a 10 μM de taspigargina. Los resultados se expresan como veces de aumento con respecto al basal sin taspigargina. Media \pm SEM, $n=5$, n.s.

Basado en los resultados expuestos, el próximo paso consistió en analizar los eventos asociados a la capacitación que son requeridos para la activación de CatSper y que pudieran estar afectados al inhibir pTyr. En este sentido, es sabido que la actividad de CatSper es dependiente del pH intracelular y del potencial de membrana (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011, Miller et al., 2015), por lo cual el siguiente paso consistió en estudiar la alcalinización del citoplasma y la hiperpolarización de membrana luego de la capacitación. Para evaluar el efecto del tratamiento con PF sobre estos parámetros, los espermatozoides fueron capacitados en presencia del inhibidor y luego analizados por citometría de flujo utilizando como sondas BCECF para pH y DiSC3(5) para Em. Los espermatozoides fueron seleccionados para el posterior análisis tanto por su forma en el gráfico FSC vs SSC (Fig. 2.11A) como a través de la marca positiva para BCECF (Fig. 2.11B), dado que esta sonda sólo se acumula en células vivas (Puga Molina et al., 2016). Los resultados mostraron una disminución de la fluorescencia de DiSC3(5) en espermatozoides no capacitados con respecto a los capacitados (Fig. 2.11C), confirmando la ya descrita ausencia de hiperpolarización en esta condición (López-González et al., 2014). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la fluorescencia de DiSC3(5), entre los espermatozoides expuestos a PF con respecto a los capacitados control (Fig. 2.11C). En el caso del pH, se observó una disminución significativa en la fluorescencia tanto en los espermatozoides no capacitados, como ya se encontraba descrito (López-González et al., 2014), como en los capacitados en presencia de PF respecto a los espermatozoides capacitados control (Fig. 2.11D).

Estos resultados indicarían que la vía de pTyr estaría regulando a CatSper a través de la alcalinización del citoplasma.

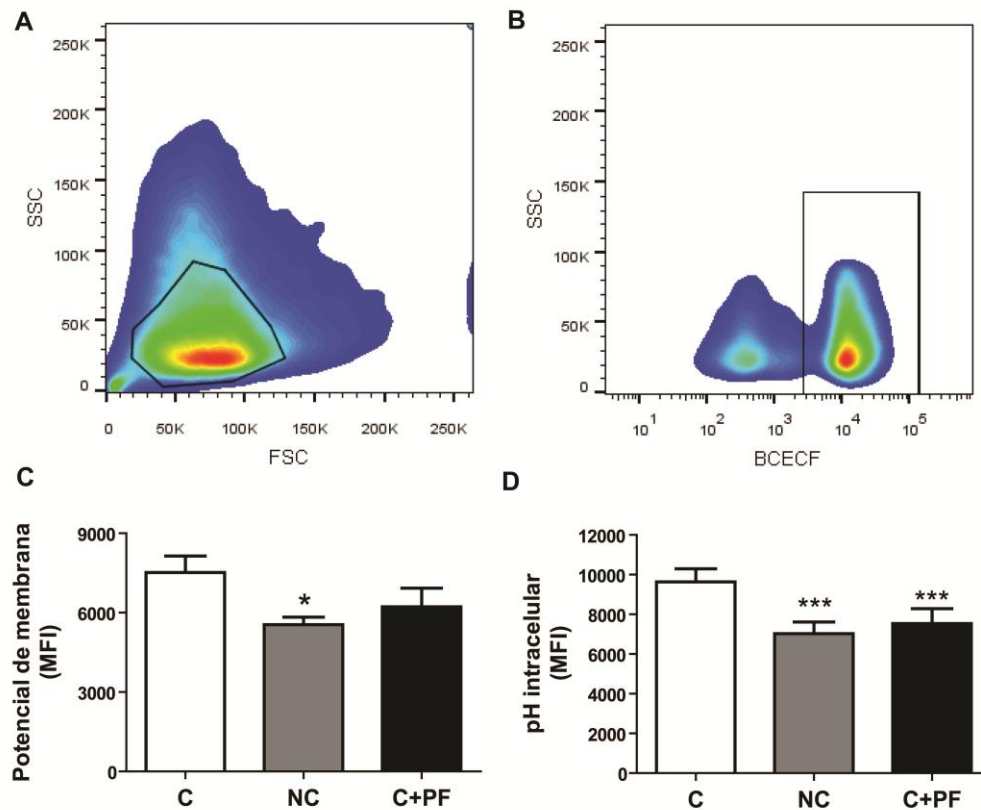


Figure 2.11 pH intracelular y E_m evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas BCECF y DiSC5(3), respectivamente. **(A)** Gráfico SSC vs FSC mostrando las células seleccionadas para el posterior análisis. **(B)** Gráfico de fluorescencia del BCECF mostrando la selección de células positivas. **(C,D)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) del DiSC5(3) **(C)** y del BCECF **(D)** de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y capacitados en presencia de 30 μ M de PF (C+PF). Media \pm SEM, n=8, *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001 vs C.

Teniendo en cuenta que la capacitación espermática involucra cascadas de señalización secuenciales y que, en humanos, este proceso requiere varias horas, nos propusimos estudiar la cinética de los cambios en pH y Ca^{2+} en espermatozoides capacitados control o expuestos a PF. Los resultados mostraron que los espermatozoides tratados con PF exhibían un aumento dentro de la primera hora tanto de pH como de Ca^{2+} , similar a lo observado en los controles (Fig. 2.12A,B). Sin embargo, a partir de las 2 hs de capacitación, coincidiendo temporalmente con la activación de la quinasa PYK2, se

observaron diferencias significativas en ambos parámetros comparados con el control (Fig. 2.12A,B).

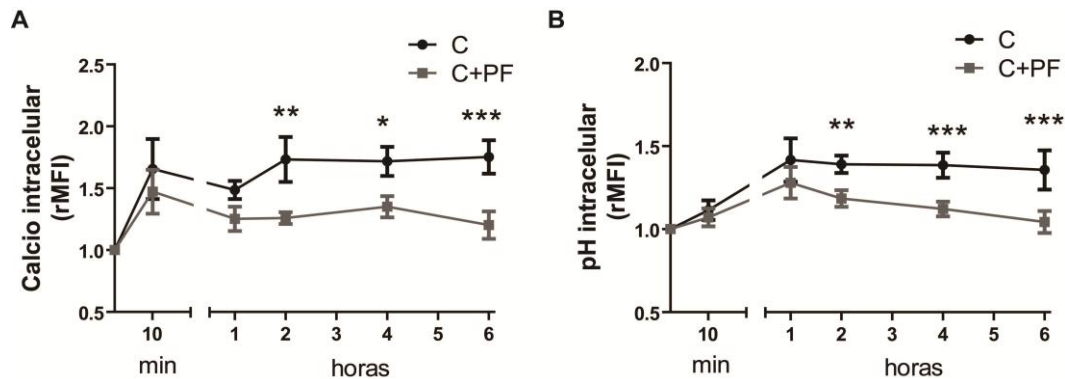


Figure 2.12 (A) Ca²⁺ y (B) pH intracelulares fueron evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas Fluo-4 y BCECF, respectivamente, de espermatozoides capacitados control (C) y capacitados en presencia de 30 μM de PF (C+PF). Se muestran los niveles de fluorescencia media relativos al valor de los espermatozoides no capacitados (rMFI). Media ± SEM, n=6, *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001 vs C.

Como una manera de confirmar que CatSper estaría siendo regulado por pTyr a través de la modulación del pH, espermatozoides capacitados en presencia de PF y los controles (espermatozoides no capacitados y capacitados) fueron expuestos a NH₄Cl o monensina, dos compuestos con capacidad de elevar el pH intracelular (Alasmari et al., 2013, Woo et al., 2002), evaluándose posteriormente los niveles intracelulares de pH y Ca²⁺ por citometría de flujo en los espermatozoides antes y después del tratamiento. Los resultados mostraron un aumento similar en el pH intracelular en las tres condiciones empleadas para ambos compuestos (Fig. 2.13A,C). Sin embargo, mientras que esta alcalinización no logró revertir los niveles de Ca²⁺ en los espermatozoides no capacitados, en aquellos tratados con PF, fue suficiente para aumentar el Ca²⁺ intracelular de forma similar a los espermatozoides capacitados control (Fig. 2.13B,D).

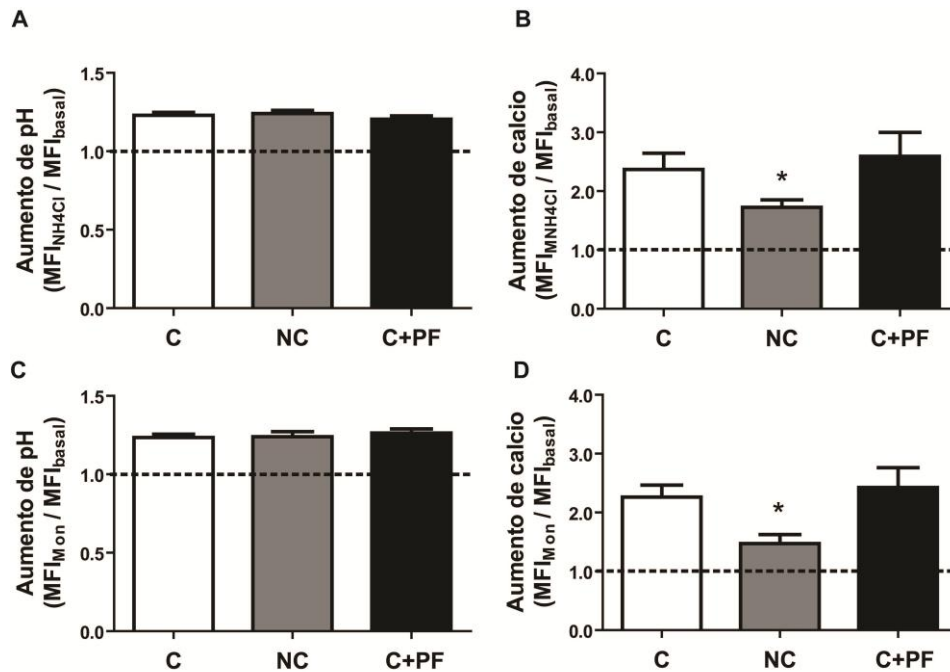


Figura 2.13 (A,C) pH y (B,D) Ca²⁺ intracelulares evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas BCECF y Fluo-4, respectivamente, en espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de PF (C+PF) antes y después de un tratamiento de 2 min con 10 mM de NH₄Cl (A,B) o 5 μM de Monensina (C,D). Los resultados se muestran como las veces de aumento luego del agregado de los compuestos con respecto al basal (MFI_{trat}/MFI_{basal}). Media ± SEM, n=5 (Monensina), n=6 (NH₄Cl), **p*<0,05, vs C.

Para confirmar que la regulación del Ca²⁺ intracelular por el pH se encontraba río abajo de la pTyr, se evaluaron los niveles de pTyr por medio de *western blot* en los espermatozoides tratados con PF antes y después del aumento del pH por NH₄Cl. Los resultados mostraron que el aumento de Ca²⁺ luego de la alcalinización del citoplasma no involucraría un aumento de pTyr (Fig. 2.13).

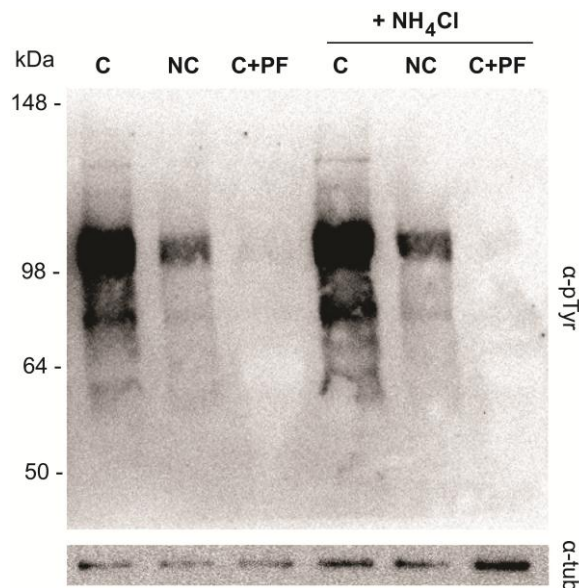


Figura 2.14 Efecto de la alcalinización del citoplasma sobre la vía de pTyr. Los niveles de pTyr fueron evaluados en espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de PF (C+PF) antes y luego de la exposición por 2 min a 10 mM de NH_4Cl . Para ello, extractos proteicos de los espermatozoides fueron sometidos a electroforesis en gel de acrilamida seguido por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-pTyr. Se utilizó tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo. n=3.

En base a estos resultados, y teniendo en consideración que la bomba de protones Hv1 esta propuesta como la principal responsable de la alcalinización del citoplasma en espermatozoides humanos (Lishko et al., 2010), el próximo paso fue estudiar la actividad del canal en espermatozoides tratados con PF. Para ello, espermatozoides capacitados en presencia de PF y controles (espermatozoides no capacitados o capacitados) fueron incubados con anandamida, un activador de Hv1, evaluándose posteriormente los niveles intracelulares de pH y Ca^{2+} . Sin embargo, no pudimos obtener resultados relevantes de estos experimentos dado que en nuestras condiciones no observamos un aumento en ninguno de los dos parámetros estudiados, aún en los espermatozoides control (Fig. 2.15A,B) (pH anandamida vs. basal, $p=0,9891$ y Ca^{2+} anandamida vs. basal, $p=0,7162$, n=5). Cabe aclarar que se utilizaron dos lotes distintos de anandamida y se emplearon las mismas condiciones de activación de Hv1 que en el trabajo publicado en el que describen su actividad en espermatozoides humanos (Lishko et al., 2010).

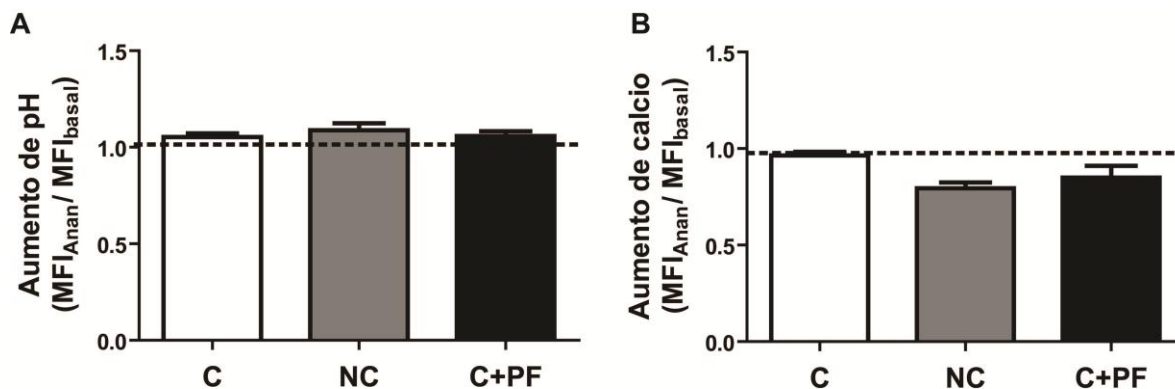


Figura 2.15 Niveles de pH y Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con andandamida. Espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de PF (C+PF) fueron expuestos por 5 min a 10 μM de andandamida. Los niveles de pH y Ca^{2+} medidos como intensidad de fluorescencia de las sondas BCECF (A) y Fluo-4 (B) fueron evaluados por citometría de flujo mostrándose las veces de aumento luego del agregado de la andandamida con respecto al basal. Media \pm SEM, n=5.

Finalmente, habiendo demostrado la regulación del Ca^{2+} por medio de la modulación del pH, y teniendo en cuenta la ya demostrada relevancia del Ca^{2+} y de la pTyr para la motilidad espermática (Battistone et al., 2014), el próximo paso fue analizar si la alcalinización del citoplasma revertía los defectos de motilidad de los espermatozoides tratados con PF. Con este objetivo, espermatozoides capacitados en presencia o no de PF fueron analizados por el sistema CASA antes y después del agregado de NH_4Cl , utilizando como control espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor. Los resultados mostraron que la alcalinización farmacológica fue suficiente para revertir, al menos parcialmente, los parámetros de motilidad afectados en los espermatozoides con inhibición de pTyr (STR y LIN) (Tabla 2.1), señalando la relevancia del pH en el efecto producido por PF sobre la motilidad.

Tabla 2.1 Efecto de la alcalinización del citoplasma sobre la motilidad de espermatozoides con inhibición de pTyr

	STR (%)	LIN (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
C	64,2 \pm 3,4 ^a	38,8 \pm 2,7 ^a	71,0 \pm 6,4	48,0 \pm 6,3	128,7 \pm 13,4	2,9 \pm 0,3	15,0 \pm 1,9
C+PF	52,0 \pm 3,7 ^b	28,5 \pm 2,2 ^b	61,7 \pm 7,4	35,0 \pm 5,8	120,0 \pm 15,2	2,8 \pm 0,3	12,3 \pm 1,6
C+PF +NH ₄ Cl	61,6 \pm 3,5 ^{ab}	36,0 \pm 2,6 ^{ab}	57,2 \pm 6,9	38,8 \pm 6,6	102,8 \pm 13,4	2,5 \pm 0,3	12,7 \pm 1,6

Espermatozoides capacitados en presencia de PF antes y después de ser expuestos a 10 mM de NH₄Cl fueron analizados por CASA, analizándose luego diferentes parámetros de motilidad. Como control, se utilizaron espermatozoides capacitados en ausencia de PF como control. STR: rectilineidad (%), LIN: linealidad (%), VAP: velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz). Media \pm SEM, n=6, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Capítulo 3

Evaluación del fenotipo de animales deficientes en más de una proteína

CRISP simultáneamente

Tal como se mencionara en la introducción, existen proteínas del tracto reproductor masculino cuya falta es compensada en los animales KO individuales pero evidenciada en modelos de animales múltiples KO (Kawano et al, 2010, Zhou et al, 2012, Fiedler et al, 2013, White et al, 2013, Huang et al, 2016, Nakasuji et al, 2017, Zhang et al, 2017). En base a ello, existía la posibilidad de que alguno de los miembros de la familia CRISP estuviera compensando la falta de CRISP2 en los animales KO. Frente a ello, se planteó como objetivo, analizar el fenotipo reproductivo de animales deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente. La primera estrategia consistió en generar animales doble KO (DKO) por apareo de los ratones KO simples. Sin embargo la opción de generar por este medio las combinaciones entre *Crisp2* y *Crisp1* o *Crisp2* y *Crisp3* se descartó debido a que los loci *Crisp1* y *Crisp3* se encuentran muy cercanos al de *Crisp2* en el cromosoma 17 del ratón (Fig. 3.1), llevando a una probabilidad baja de recombinación entre ellos de aproximadamente el 0,5 % por generación.

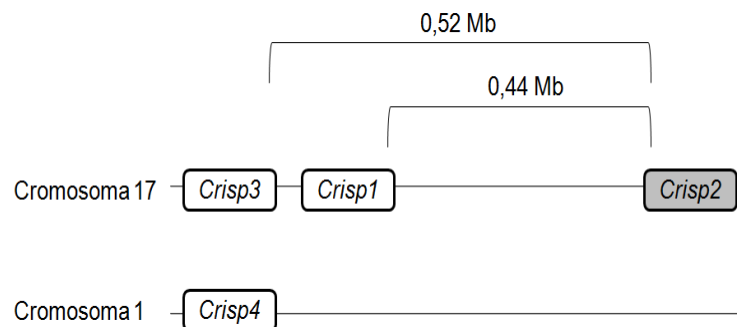


Figura 3.1 Se muestran de forma esquemática la posición y distancias (en millones de bases, Mb) entre los genes de las proteínas de la familia CRISP en el genoma murino. Las distancias y tamaños de los genes no están a escala.

Teniendo en cuenta que el locus de *Crisp4* se encuentra en el cromosoma 1 del ratón y que, por lo tanto, la probabilidad de recombinación con el locus de *Crisp2* es del 50 % (Fig. 3.1), se generó una colonia de animales DKO para ambos genes por medio de cruces entre animales KO para *Crisp2* y KO para *Crisp4*, los cuales estaban disponibles en el laboratorio. En una primera instancia se aparearon animales simple KO para cada uno de los genes obteniéndose un 100 % de animales HT para ambos

genes (Fig. 3.2A). Luego, animales de esta segunda generación fueron apareados entre sí, obteniéndose animales DKO con una frecuencia de 1:16. El genotipo de cada animal fue determinado mediante PCR de ADN genómico (Fig. 3.2B) y la ausencia de las proteínas fue confirmada por ensayos de *western blot* de extractos de espermatozoides (Fig. 3.2C,D)

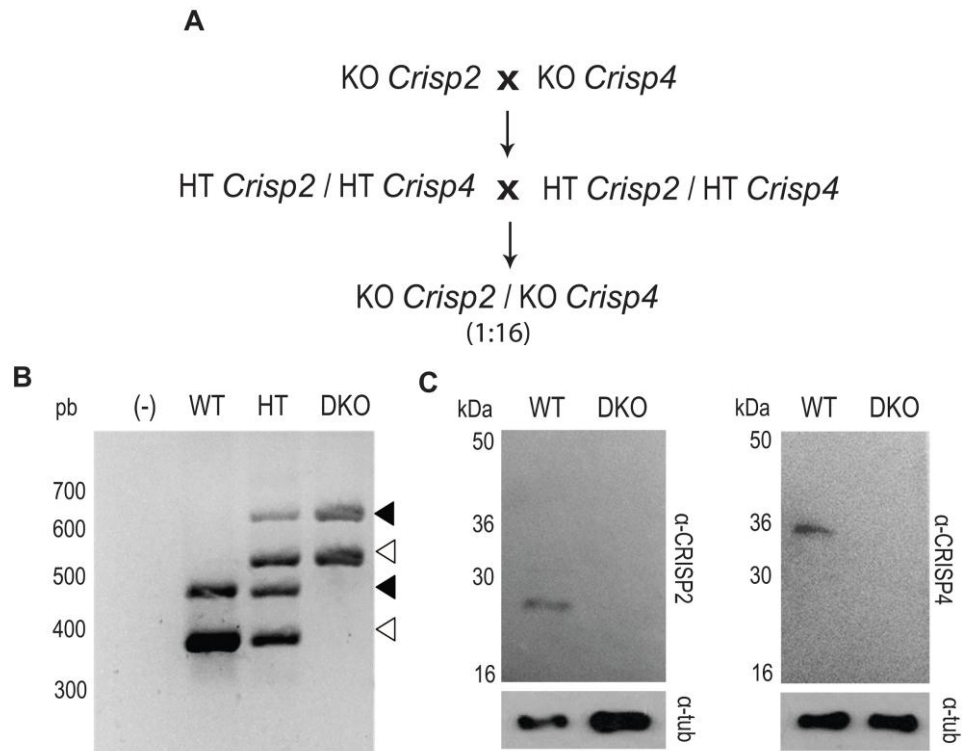


Figura 3.2 (A) Esquema de apareos realizado para la obtención de animales deficientes en CRISP2 y CRISP4. **(B)** El genotipo de los animales fue determinado por PCR a partir de extractos de ADN genómico obteniendo bandas de 380 pb y 470 pb (WT), 540 pb y 650 pb (DKO) o todas ellas (HT). Las flechas negras indican las bandas correspondientes al gen de *Crisp4* y las blancas al de *Crisp2* **(C)** La presencia de CRISP2 y CRISP4 en extractos de proteínas de espermatozoides epididimarios fue evaluada por *western blot* utilizando anticuerpos anti-CRISP2 y anti-CRISP4, respectivamente. β -tubulina fue utilizada como control de carga (paneles inferiores). n=3. Se muestran imágenes representativas.

Considerando la baja frecuencia de DKO obtenidos por apareo entre animales HT para ambos genes (Ver Fig. 3.2A), este tipo de apareos se reservó únicamente para el mantenimiento de la colonia, en tanto que para obtener animales de experimentación se emplearon otros esquemas que aumentaban la probabilidad de obtener animales DKO. Por otro lado, y tal como se mencionara previamente, si bien los animales HT representan buenos controles para comparar fenotipos, en esta sección de la Tesis se utilizaron animales WT como control debido a que estos últimos se encontraban disponibles en mayor número.

En primer lugar, la fertilidad de los animales se analizó apareando cada macho con dos hembras control durante dos semanas, evaluándose el número de crías por camada. Bajo estas condiciones, no se observaron diferencias en la fertilidad entre machos DKO y control (Fig. 3.3A). Tampoco se observaron defectos cuando los machos DKO fueron apareados con hembras DKO. Sin embargo, en ensayos de fertilización *in vivo*, en los cuales los ovocitos eran recuperados al día siguiente de detectarse el tapón vaginal, los machos DKO mostraron menores niveles de fertilización que los controles (Fig. 3.3B). Más aún, los porcentajes de fertilización *in vivo* correspondientes a los machos DKO fueron significativamente menores que los de los machos simples KO para *Crisp2* y *Crisp4* (Fig. 3.3B).

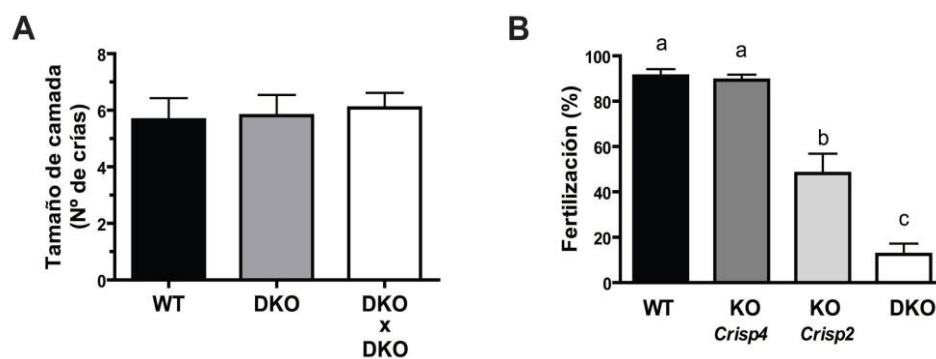


Figura 3.3 (A) Machos WT o DKO fueron colocados en apareo por dos semanas con hembras control (n=10) o hembras DKO (n=6) determinándose el tamaño de camada para cada grupo. Media \pm SEM, n.s. **(B)** Machos WT (n=8), DKO (n=9) o simple KO para cada *Crisp2* (n=7) o *Crisp4* (n=4) fueron colocados en apareo con hembras estimuladas hormonalmente, analizándose el porcentaje de ovocitos fertilizados en la ampulla al día siguiente. Media \pm SEM. Las barras con diferente letra presentan diferencias significativas entre sí, $p < 0,01$.

Con el fin de estudiar los parámetros que podrían estar siendo afectados por la ausencia simultánea de CRISP2 y CRISP4, se analizó la funcionalidad *in vitro* de los espermatozoides DKO. Los resultados mostraron que, pese a que el número (Fig. 3.4A) y la motilidad (Fig. 3.4B) de los espermatozoides epididimarios de los animales mutantes no fueron diferentes a los controles, los porcentajes de fertilización fueron marcadamente menores para los espermatozoides DKO (Fig. 3.4C).

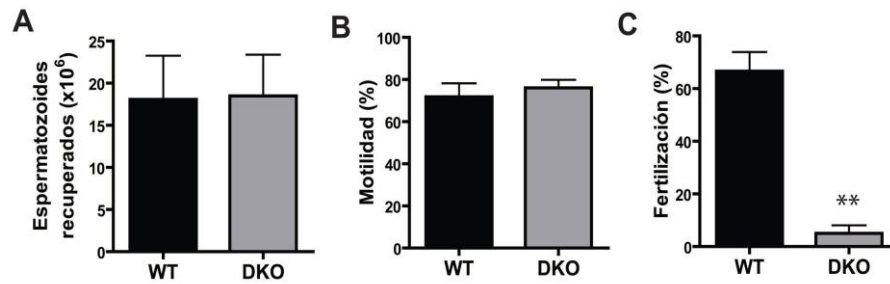


Figura 3.4 (A) Número total de espermatozoides recuperados de epidídimos WT o DKO. Media \pm SEM, n=7, n.s. **(B)** Porcentaje de espermatozoides epididimarios WT o DKO mótils analizado por medio del sistema CASA. Media \pm SEM, n=5, n.s. **(C)** Espermatozoides capacitados de machos WT o DKO fueron co-incubados con COC por 3 hs, analizándose el porcentaje de fertilización por detección de al menos una cabeza de espermatozoide decondensada en el citoplasma. Media \pm SEM, n=4, ** p <0,001.

Dado que tanto CRISP4 (Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2012, Carvajal et al., en preparación) como CRISP2 (Brukman et al., 2016) tienen roles en la capacitación espermática, se analizó si los menores porcentajes de fertilización *in vivo* e *in vitro* de los machos DKO podían deberse a defectos en diferentes parámetros asociados a la capacitación. Los resultados mostraron que los espermatozoides mutantes capacitados exhibían menores niveles de pTyr (Fig. 3.5A), menores porcentajes de RA inducida por progesterona (Fig. 3.4B) y fallas en el desarrollo de la HA (Fig. 3.5C, Tabla 3.1), sugiriendo que los defectos en la fertilización observados por la falta de ambas proteínas en los espermatozoides DKO podrían deberse a una acumulación de fallas durante la capacitación espermática.

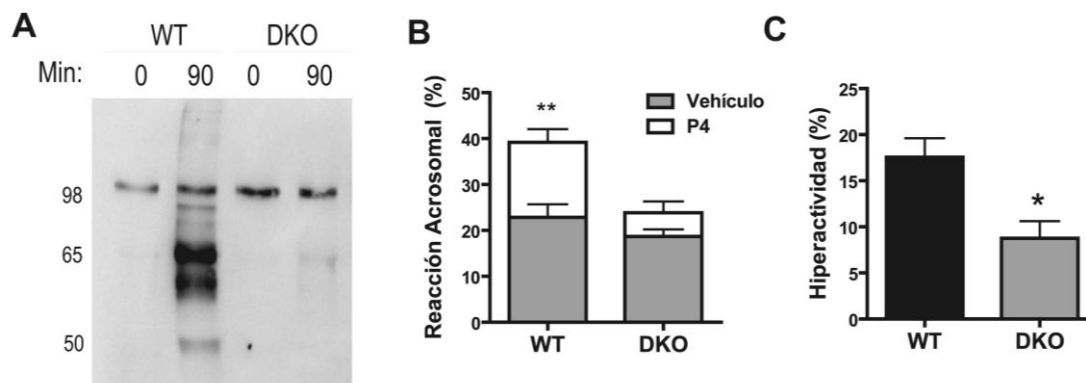


Figura 3.5 Espermatozoides epididimarios de machos WT y DKO fueron incubados en condiciones capacitantes por 90 min, evaluándose diferentes parámetros funcionales. **(A)** Fosforilación de proteínas en tirosina evaluada por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. n=3. Se muestra una imagen representativa. **(B)** Porcentaje de reacción acrosomal estudiado por medio de tinción con Coomassie Blue de espermatozoides expuestos a progesterona (P4) o DMSO (vehículo) durante los últimos 15 min de la capacitación. Media \pm SEM, n=8, ** p <0,001 con respecto al vehículo. **(C)** Porcentaje de hiperactividad analizado por el sistema CASA. Media \pm SEM, n=5, * p <0,05.

Tabla 3.1 Efecto de la falta simultánea de CRISP2 y CRISP4 sobre la motilidad de espermatozoides capacitados

	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
DKO	99,5 \pm 4,4	68,6 \pm 2,9	215,8 \pm 16,1	4,3 \pm 0,3	11,9 \pm 0,2	53,9 \pm 2,8	26,7 \pm 1,4
WT	112,0 \pm 4,1	61,5 \pm 4,0	239,1 \pm 5,9	4,8 \pm 0,1	11,5 \pm 0,4	67,0 \pm 1,5**	33,6 \pm 2,0*

Espermatozoides capacitados WT o DKO fueron evaluados por el sistema CASA analizándose diferentes parámetros de motilidad. VAP: velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ($\mu\text{m/s}$), VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm), BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz), STR: rectilineidad (%) y LIN: linealidad (%). Media \pm SEM, n=5, * p <0,05, ** p <0,01.

A pesar de que los resultados señalaban la existencia de cierta cooperación entre CRISP2 y CRISP4 en el proceso de fertilización *in vivo*, la fertilidad de los animales no se vio afectada por la falta de ambas proteínas, sugiriendo que podría existir una compensación por parte de las restantes proteínas de la familia (CRISP1 y/o CRISP3). En base a ello, nos propusimos generar ratones deficientes en más de dos miembros de la familia CRISP (triples KO (TKO) o cuádruples KO (CKO)) a través de la novedosa técnica de CRISPR/Cas9, que permite mutar diferentes genes en simultáneo (Wang et al., 2013). Esta metodología resulta ventajosa considerando la baja probabilidad de recombinación entre los genes *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3*, ubicados en el mismo cromosoma (Ver Fig. 3.1). Sin embargo, dado lo novedoso de la técnica y lo laborioso de analizar las mutaciones para cada uno de los genes, decidimos simplificar el esquema utilizando la técnica de CRISPR/Cas9 contra los genes *Crisp1* y *Crisp3* sobre los animales DKO para *Crisp2* y *Crisp4* que ya teníamos disponibles en el laboratorio. Para ello, diseñamos sgARN específicos dirigidos contra *Crisp1* y *Crisp3*. Tal como se mencionara en la introducción, los sgARN son capaces de formar un complejo con la endonucleasa Cas9 y de reconocer un determinado sitio en el genoma en el cual la Cas9 genera una ruptura de doble hélice. Este daño al ADN es reconocido por los sistemas endógenos de reparación, produciéndose inserciones y deleciones al azar (*indels*). Si bien el diseño y la selección de los sgARN a utilizar se realizaron mediante aproximaciones informáticas basadas principalmente en minimizar la posibilidad de que los mismos reconozcan otros lugares del genoma, la eficiencia de mutagénesis con cada uno de los sgARN debe ser probada experimentalmente. Una

vez diseñados los sgARNs, el grupo dirigido por el Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI), fue el encargado de realizar la transcripción *in vitro* de los mismos y del mRNA correspondiente a la enzima Cas9, como así también de microinyectarlos en los embriones DKO y de transferirlos a hembras pseudopreñadas. Una vez nacidas las crías, la presencia de mutaciones fue analizada en nuestro laboratorio.

En una primera instancia, teniendo en cuenta que *Crisp1* y *Crisp3* presentan un alto porcentaje de identidad en los primeros exones y, considerando que cada sgARN microinyectado puede reconocer sitios inespecíficos en el genoma, se utilizó un único sgARN dirigido al exón 3 de ambos genes (Fig. 3.6A). De esta forma, se minimizaba la posibilidad de que existieran efectos en otros sitios del genoma. Se realizaron dos tandas de microinyecciones y transferencias embrionarias, de las cuales nacieron 13 crías vivas. Posteriormente, se realizó un análisis por PCR a partir de ADN genómico utilizando *primers* que flanquean el exón 3 de cada gen, seguido por un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en gel de poliacrilamida. Dado que las bandas obtenidas mostraron el mismo patrón de corrida electroforética que el animal WT, se concluyó que estos animales resultaron ser todos WT para *Crisp1* y *Crisp3* (Fig. 3.6B).

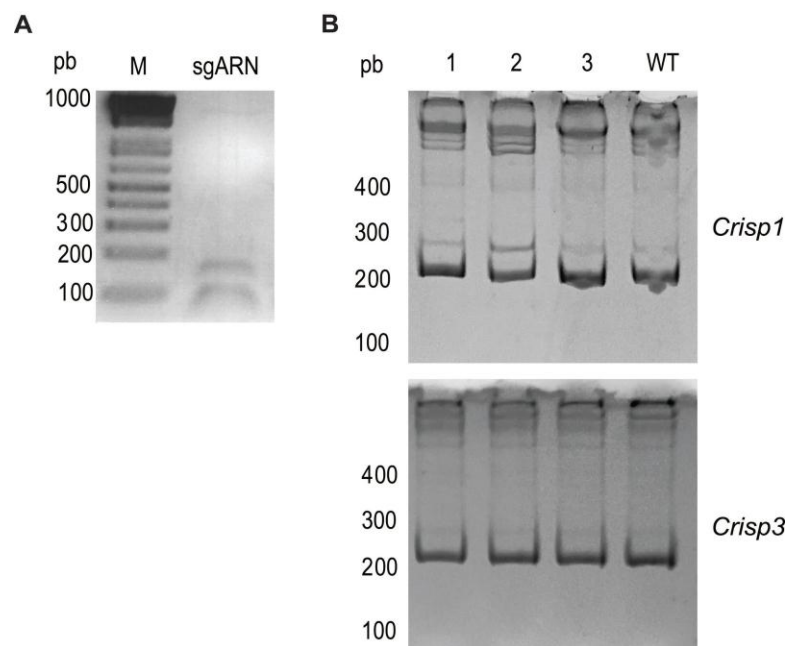


Figura 3.6 (A) Análisis del sgARN utilizado para la microinyección mediante electroforesis en gel de agarosa para corroborar el tamaño y la calidad del mismo. **(B)** Análisis del genotipo de 3 de las 13 crías nacidas de la primera tanda de microinyección (calles 1, 2 y 3). Se realizó una PCR genómica utilizando *primers* que flanquean el exón 3 de cada gen (panel superior *Crisp1* y panel inferior *Crisp3*), seguido por un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en gel de poliacrilamida. Como control, se muestra un animal WT.

Ante la posibilidad de que la concentración del único sgARN no fuese suficiente para producir mutaciones en dos genes, se realizó una segunda tanda con dos nuevos sgARN dirigidos cada uno contra el exón 5 de *Crisp1* y *Crisp3* (Fig. 3.7A). En esta región, ambos genes difieren lo suficiente como para poder diseñar dos sgRNA que reconozcan específicamente a cada uno de ellos. En este caso, luego de cuatro tandas de microinyección y transferencia, se obtuvieron 4 crías vivas. El análisis por PCR seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida mostró que uno de los animales (macho 14) presentaba una mutación en el gen de *Crisp1* (Fig. 3.7B). Este macho se puso en apareo y el análisis del ADN genómico de sus crías reveló que, mientras que en el gen de *Crisp3* no había ninguna mutación, en el gen de *Crisp1* existía una delección de 3 pares de bases ($\Delta 455-457$, Fig. 3.7C). Dado que la mutación en *Crisp1* produjo la delección de un codón y, por ende, de un único aminoácido en el gen de (CRISP1 Δ Ser134) manteniendo intacto el resto de la proteína, y que no se detectaron mutaciones en *Crisp3*, se decidió continuar con otra tanda de mutagénesis para obtener el modelo animal deseado.

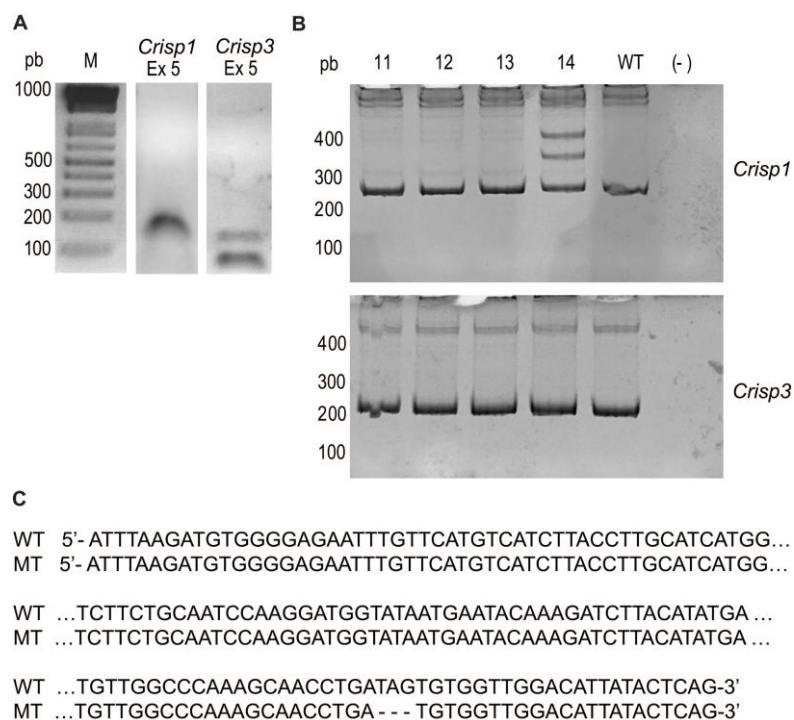


Figura 3.7 (A) Análisis de los sgARNs utilizados para la microinyección mediante electroforesis en gel de agarosa para corroborar el tamaño y la calidad de los mismos. Se indica en cada caso el exón y gen blanco. **(B)** Análisis del genotipo de las crías nacidas de la segunda tanda de microinyección (11, 12, 13 y 14). Se realizó una PCR genómica utilizando *primers* que flanquean el exón 5 de cada gen (panel superior *Crisp1* y panel inferior *Crisp3*), seguido por un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en gel de poliacrilamida. Como control, se muestra un animal WT y agua (-). **(C)** Resultado de la secuenciación de un fragmento del exón 5 de *Crisp1* de los alelos WT y mutante (MT) mostrando la delección de tres aminoácidos en el alelo MT.

Finalmente, se eligió seguir una nueva estrategia para la tercera tanda de microinyección. En este caso, se utilizaron dos sgARNs complementarios al exón 2 de ambos genes (en dicha región ambos genes también presentan un alto porcentaje de identidad) con el fin de lograr dos clivajes separados por unos 40 pb (Fig. 3.8A), de forma tal de aumentar las probabilidades de generar mutaciones más grandes que resulten deletéreas. Asimismo, cabe mencionar que uno de los sitios de clivaje se encuentra muy próximo al sitio de inicio de la traducción abriendo la posibilidad de que se elimine. De esta nueva tanda de mutagénesis, se obtuvieron 4 animales (Fig. 3.8B,C). El análisis del genotipo de las crías mediante PCR mostró la presencia de grandes deleciones que podían verse incluso en un gel de agarosa (Fig. 3.8A).

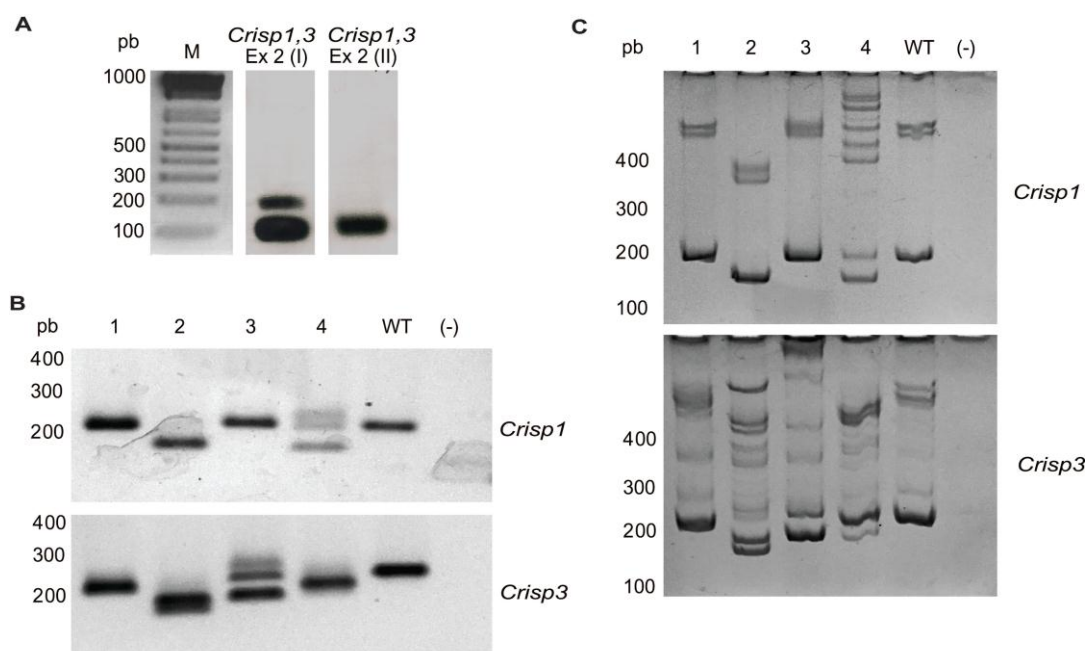


Figura 3.8 (A) Análisis de los sgARNs utilizados para la microinyección mediante por electroforesis en gel de agarosa para corroborar el tamaño y la calidad de los mismos. Se indica en cada caso el exón y gen blanco. **(B,C)** Análisis del genotipo de las crías nacidas de la tercera tanda de microinyección (1, 2, 3 y 4). Se realizó una PCR genómica utilizando primers que flanquean el exón 2 de cada gen (panel superior *Crisp1* y panel inferior *Crisp3*), seguido por electroforesis en gel de agarosa (A) o un ciclo de desnaturalización/renaturalización y electroforesis en gel de poliacrilamida (B). Como control, se muestra un animal WT y agua (-).

Los animales 2 y 4 mostraron mutaciones en ambos genes y fueron colocados en apareo con animales WT. Sólo el animal 2 generó crías que se analizaron por PCR y electroforesis en gel de agarosa (Fig. 3.9). Ya que todas las crías eran heterocigotas para *Crisp1* y *Crisp3*, se puede concluir que las mutaciones presentes en un mismo animal están en el mismo cromosoma. Este resultado fue muy importante ya que, debido a la baja probabilidad de recombinación entre *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3*, las

mutaciones que se produjeran en estos genes se comportarían como un único alelo. Dado que la mutagénesis se hizo sobre citogtas DKO para *Crisp2* y *Crisp4*, los animales resultantes presentaban mutaciones para *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3* en un mismo cromosoma, mientras que *Crisp4*, por su parte, se segrega independientemente. En cuanto a los alelos de *Crisp1* y *Crisp3* obtenidos, el análisis electroforético reveló dos tipos diferentes: uno que presentaba deleciones de aproximadamente 150 y 70 pb para *Crisp1* y *Crisp3*, respectivamente, y otro que presentaba deleciones de 40 y 50 pb para *Crisp1* y *Crisp3*, respectivamente.

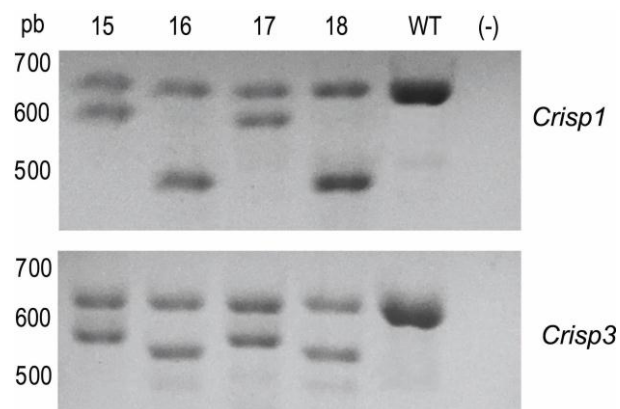


Figura 3.9 Análisis del genotipo de las crías nacidas del macho 2 obtenido de la tercera tanda de microinyección (15, 16, 17 y 18). Se realizó una PCR genómica utilizando *primers* que flanquean el exón 2 de cada gen (panel superior *Crisp1* y panel inferior *Crisp3*), seguido por electroforesis en gel de agarosa. Como control, se muestra un animal WT y agua (-).

La secuenciación de los productos de PCR correspondientes a ambos alelos, confirmó que los animales con mutaciones más pequeñas (15 y 17) presentaban deleciones para *Crisp1* y *Crisp3* de 44 y 50 pb, respectivamente, permaneciendo en el gen, posibles sitios de inicio de la traducción (Fig. 3.10). Por otro lado, los animales con mutaciones más grandes (16 y 18) mostraron deleciones para *Crisp1* y *Crisp3* de 161 y 72 pb, respectivamente, eliminándose en ambos genes, el sitio de inicio de la traducción (Fig. 3.11). De este modo, para tener la seguridad de que no iba a haber ningún tipo de expresión proteica de CRISP1 y CRISP3, se decidió utilizar a los animales con deleciones más grandes como fundadores de la colonia de animales TKO (deficientes en CRISP1, CRISP2 y CRISP3) y CKO.

A *Crisp1*

WT 5'-TCTCTTTTTTGTCTCTAGCCATGGCATTAATGCTTGTGCTGTTCTTCTT...
 MT 5'-TCTCTTTTTTGTCTCTAGCCATGGC-----
 WT
 MT ...**GGCTGCTG**ACTGCCCCATCCCTTCTTCAAGATAGCTCTCAGGTATGGG-3'
 ----- CCCTTCTTCAAGATAGCTCTCAGGTATGGG-3'

B *Crisp3*

WT 5'-TCTTTGTTCTCTAGCCATGGCATTAATGCTTGTGCTGTTCTTCTGGCTG...
 MT 5'-TCTTTGTTCTCTAGCCATGG-----
 WT
 MT ...**CTG**ACTGCCCCATCCCTTCTTCAAGATAACTCTCAGGTATGGGTAAAG-3'
 ----- CTTCAAGATAACTCTCAGGTATGGGTAAAG-3'

Figura 3.10 Análisis del genotipo de las crías nacidas del macho 2 de la tercera tanda de microinyección con deleciones más pequeñas (15 y 17) mediante secuenciación. Se muestra el resultado de la secuenciación de *Crisp1* (**A**) y *Crisp3* (**B**) de los alelos WT y mutante (MT). Se encuentra resaltada la región correspondiente al exón 2 y subrayado el sitio de inicio de la traducción.

A *Crisp1*

WT 5'-AGAAAGAATTGCTAGACTCCTAGAACCTGAAGAAAGGACCTACATTGATT...
 MT 5'-AGAAAGAATTGCTAGACTCCTAGAAC - - - - -
 WT
 MT ...TCAGCTCAGAGCATTGTAGTTGTGTTTCTCTGAACCAATGTACTAAAA...

 WT ...ATCGTAATGCTTGTCTTTGTTCTCTTTTTGTTCTCTAGCCATGGCATTA...
 MT -----
 WT ...**ATG**CTTGTGCTGTTCTTCTTGGCTGCTGACTGCCCCATCCCTTCTTCA...
 MT ----- TCCCTTCTTCA...
 WT ...**AGATAGCTCTC**AGGTATGGGTAAGGTTTATTATCTTCTCAGAATAATTTA-3'
 MT ...**AGATAGCTCTC**AGGTATGGGTAAGGTTTATTATCTTCTCAGAATAATTTA-3'

B *Crisp3*

WT 5'-TAAACATCATAATGCATGTTTTGTTCTCTTCTTTGTTCTCTAGCCATGG...
 MT 5'-TAAACATCATAATGCATGTTTT-----
 WT
 MT ...**CATTAATG**CTTGTGCTGTTCTTCTTGGCTGCTGACTGCCCCATCCCTT...
 -----ATCCCTT...
 WT ...**CTTCAAGATAACTCTC**AGGTATGGGTAAGTATTATTCTCAGAACA-3'
 MT ...**CTTCAAGATAACTCTC**AGGTATGGGTAAGTATTATTCTCAGAACA-3'

Figura 3.11 Análisis del genotipo de las crías nacidas del macho 2 de la tercera tanda de microinyección con deleciones más pequeñas (16 y 18) mediante secuenciación. Se muestra el resultado de la secuenciación de *Crisp1* (**A**) y *Crisp3* (**B**) de los alelos WT y mutante (MT). Se encuentra resaltada la región correspondiente al exón 2 y subrayado el sitio de inicio de la traducción.

El establecimiento de la colonia se realizó siguiendo el genotipo de los animales mediante PCR a partir de ADN genómico con el fin de detectar las nuevas mutaciones (Fig. 3.12A) mientras que la ausencia de CRISP1 en los animales homocigotas para la delección se evaluó por medio de *western blot* (Fig. 3.12B,C). Si bien la falta de CRISP3 no pudo confirmarse debido a que no se encuentran disponibles en el mercado anticuerpos contra esta proteína, la mutación del sitio de inicio de la traducción en el gen no debería permitir expresión alguna de la misma. Los genotipos para *Crisp2* y *Crisp4* se hicieron tal como se mostró anteriormente para la colonia DKO.

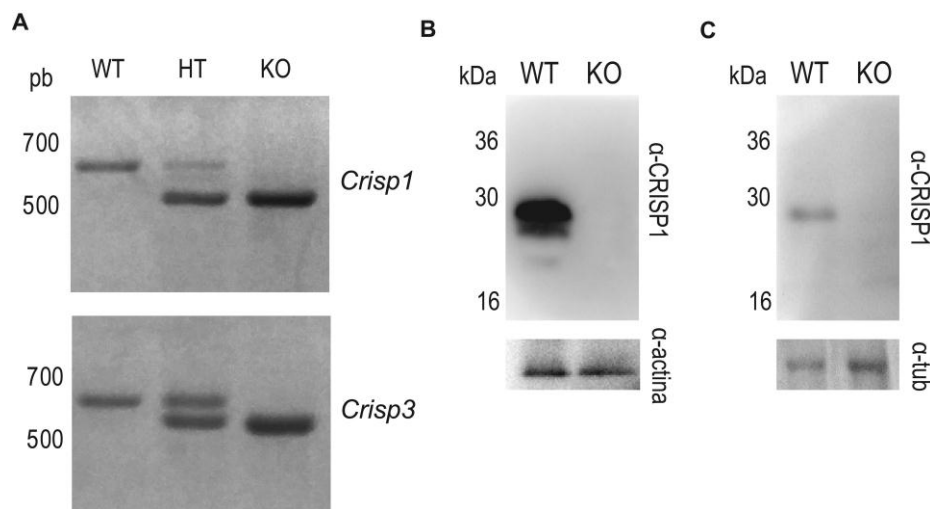


Figura 3.12 (A) Las mutaciones en *Crisp1* y *Crisp3* generadas por CRISPR/Cas9 fueron detectadas por medio de PCR a partir de extractos de ADN genómico obteniendo bandas correspondientes al alelo WT o KO, o la combinación de ambas en el HT. **(B y C)** La presencia de CRISP1 en extractos de proteínas de glándula salival de hembras (B) o de epidídimo (C) fue evaluada por *western blot* utilizando anticuerpos anti-CRISP1. Actina o tubulina fueron utilizadas como control de carga (paneles inferiores). Se muestran imágenes representativas.

A continuación, se evaluó la fertilidad de los machos TKO, deficientes en CRISP1, CRISP2 y CRISP3, por medio de apareo natural con hembras control, determinándose el tamaño de la camada promedio por macho. Bajo estas condiciones, se observó una marcada disminución en la fertilidad de los machos TKO en relación a los machos WT (Fig. 3.13A). Consistentemente, los ensayos de fertilización *in vivo* con hembras en estro, analizados al día siguiente de detectarse el tapón vaginal, mostraron que los machos TKO tenían menores niveles de fertilización que los controles (Fig. 3.3B).

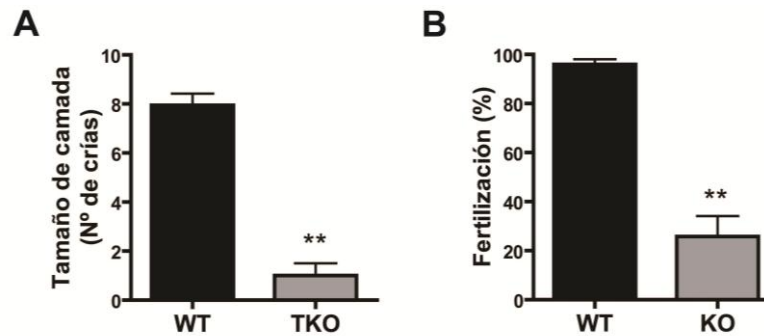


Figura 3.13 (A) Machos WT o TKO fueron colocados en apareo por dos semanas con hembras control determinándose el tamaño de camada para cada grupo. $n=3$, Media \pm SEM, ** $p<0,01$ **(B)** Machos WT o TKO fueron colocados en apareo con hembras en estro natural, analizándose el porcentaje de ovocitos fertilizados en la *ampulla* al día siguiente. $n=3$, Media \pm SEM, ** $p<0,01$.

El próximo paso consistió en analizar la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides obtenidos de machos TKO. Hasta el momento, se han podido analizar tres animales TKO con sus respectivos controles. Los resultados obtenidos a partir de dos de dichos animales mostraron que si bien el peso de los testículos y de los epidídimos así como el número de espermatozoides y su motilidad eran similares a los controles, los espermatozoides TKO presentaban porcentajes de fertilización nulos (Tabla 3.2). El tercer animal TKO utilizado en los estudios presentó epidídimos de mayor tamaño con muy pocos espermatozoides que además eran inmóviles e inviables. Esto junto al hecho que se observaron mayormente cabezas y colas de espermatozoides por separado, imposibilitó el estudio de la capacidad fertilizante de los espermatozoides de este último animal.

Tabla 3.2 Resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* empleando machos TKO y WT.

Exp.	Macho	Peso testículos/ corporal (%)	Peso epidídimos/ corporal (%)	N° de esper.	Motilidad	Fertilización <i>in vitro</i>
1	WT	0,34 %	0,09 %	18×10^6	79,1 %	72,7 %
	TKO	0,36 %	0,10 %	12×10^6	77,1 %	0,0 %
2	WT	0,43 %	0,09 %	8×10^6	85,5 %	90,9 %
	TKO	0,35 %	0,08 %	6×10^6	76,4 %	0,0 %
3	WT	0,37 %	0,08 %	15×10^6	77,8 %	N.D.
	TKO	0,36 %	0,21 %	N.D.	0,0 %	N.D.

Machos TKO y WT fueron sacrificados analizándose el peso relativo de los testículos y de los epidídimos (expresado como porcentaje del peso corporal), el número total de espermatozoides recuperados del epidídimos y los porcentajes de motilidad y de fertilización *in vitro* utilizando COC de hembras control.

Hasta el momento de finalizada esta Tesis Doctoral, se pudo caracterizar reproductivamente a un único macho CKO, el cual tenía apariencia y comportamiento normal. Si bien el mismo se apareó con tres hembras, lo cual fue confirmado por presencia de tapón vaginal, no dejó preñada a ninguna de ellas. Dos de estas mismas hembras tuvieron 6 y 9 crías al ser apareadas con un macho control. El mismo macho CKO fue colocado con otras dos hembras, pero esta vez, en vez de evaluar preñez, las hembras fueron sacrificadas el día del tapón vaginal, analizándose el porcentaje de fertilización en la *ampulla*. A pesar de que para ambas hembras se observaron espermatozoides en útero los porcentajes de fertilización fueron nulos (0/8 y 0/12 ovocitos recuperados). En el caso del macho WT, por su parte, se obtuvieron 100% de fertilización *in vivo* en la dos hembras utilizadas para el apareo (11/11 y 10/10 ovocitos recuperados). Finalmente, el macho CKO fue sacrificado, observándose una morfología normal del tracto reproductor respecto del WT con un peso normal de los epidídimos y testículos (Tabla 3.3). A pesar de que el número de espermatozoides recuperados del cauda epididimario fue similar entre ambos genotipos, así como su viabilidad, y su motilidad, el porcentaje de fertilización *in vitro* fue 0 % (Tabla 3.3).

En conjunto, los resultados analizando los animales TKO y CKO confirman la relevancia de las proteínas CRISP para la fertilidad y la existencia de mecanismos de cooperación funcional entre los miembros de la familia.

Tabla 3.3 Resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* empleando machos CKO y WT.

	Peso testículos/corporal (%)	Peso epidídimos/corporal (%)	Nº de esper.	Motilidad	Viabilidad	Fertilización <i>in vitro</i>
WT	0,35 %	0,09 %	6,5x10 ⁶	90,3 %	85,4 %	66,7 %
CKO	0,34 %	0,08 %	6,1x10 ⁶	92,7 %	90,0 %	0,0 %

Los machos CKO y WT fueron sacrificados analizándose el peso relativo de los testículos y de los epidídimos (expresado como porcentaje del peso corporal), el número total de espermatozoides recuperados del epidídimos y los porcentajes de motilidad, de viabilidad y de fertilización *in vitro* utilizando COC de hembras control.

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que si bien los animales deficientes en CRISP2 y CRISP4 eran fértiles, los ratones TKO y CKO presentaban una profunda disminución en su fertilidad asociada a la incapacidad de sus espermatozoides para interactuar con el ovocito.

Discusión



Capítulo 1

Estudio de la relevancia de CRISP2 para la fertilización y la fertilidad

Teniendo en cuenta el rol propuesto para CRISP2 en fertilización, tanto en modelos de roedores como en humanos (Busso et al., 2005, Busso et al., 2007, Weigel-Muñoz et al., 2012), y la expresión aberrante de esta proteína en pacientes infértiles (Paoloni-Giacobino et al., 2000, Olesen et al., 2001, Du et al., 2006, Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015), nos planteamos como objetivo de esta parte de la Tesis, analizar el fenotipo reproductivo de ratones KO para CRISP2 con el fin de evaluar la relevancia de esta proteína para la fertilidad.

El hecho de que la relación de genotipos en las crías haya seguido una proporción mendeliana indica que la falta de CRISP2 no es letal en el desarrollo intrauterino ni neonatal. Asimismo, dado que CRISP2 se expresa no solo en testículo sino también en músculo, pulmón y glándula lacrimal (Reddy et al., 2008), el haber observado que los animales KO para *Crisp2* no presentaran alteraciones en su desarrollo general ni en su comportamiento, descarta la posibilidad de que CRISP2 cumpla roles esenciales en el desarrollo de dichos órganos u de otros en los que aún no se haya descrito su expresión. Por otro lado, pese a detectarse la presencia de CRISP2 en ovario (Reddy et al., 2008), las hembras resultaron fértiles, indicando que su ausencia no tendría efectos significativos sobre la reproducción de las hembras. A pesar de que CRISP2 en el testículo se expresa en células germinales (Kasahara et al., 1987, 1989, Hardy et al., 1988, Mizukiet al., 1992, Maeda et al., 1998, O'Bryan et al., 1998, Giese et al., 2002) y que se ha descrito que la proteína participa en la adhesión entre células de Sertoli y las células germinales (Maeda et al., 1998, 1999), los ratones KO para *Crisp2* presentaron testículos y espermatozoides epididimarios normales, indicando que la falta de CRISP2 tampoco afecta el desarrollo de la espermatogénesis. Estos resultados son consistentes con un trabajo previo realizado por nuestro laboratorio en el que se observó que la inmunización de ratas con CRISP2 recombinante no tenía efectos sobre los testículos de los animales (Weigel Muñoz et al., 2012), pese a que esta proteína estaba descrita como un posible causante de la orquitis autoinmune (Hardy et al., 1988, Foster y Gerton, 1996).

Tal como fuera observado para los KO para *Crisp1* (Da Ros et al., 2008) y *Crisp4* (Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2012), los animales deficientes en CRISP2 resultaron

ser fértiles, sugiriendo que la falta de alguna de las proteínas de la familia CRISP podría estar siendo compensada por las restantes, pese a no observarse cambios en los niveles de expresión de CRISP1 y CRISP4 en los espermatozoides KO para *Crisp2*. En este sentido, se ha descrito que CRISP2 recombinante puede unirse a los mismos sitios en el ovocito que CRISP1 (Busso et al., 2006b) e incluso inhibir la fusión entre ovocitos y espermatozoides KO para *Crisp1* (Da Ros et al., 2008), señalando a CRISP1 como una de las proteínas capaces de compensar la falta de CRISP2. Por otra parte, nuestros resultados de fertilidad son consistentes con el hecho de que la mayoría de los modelos de ratones KO para proteínas espermáticas con roles propuestos en fertilización presentan una fertilidad normal (Okabe y Cummins, 2007, Okabe, 2014). En este sentido, es importante mencionar que el tracto femenino es capaz de seleccionar muy eficientemente a los espermatozoides de alta calidad que serían los encargados de fertilizar a los ovocitos en la *ampulla* (Holt y Fazeli 2015, Sakkas et al., 2015). Este eficiente sistema de selección puede garantizar un número suficiente de espermatozoides en el sitio de fertilización, incluso en aquellos machos con deficiencias reproductivas y, de esta forma, enmascarar defectos de los espermatozoides que se vuelven evidentes solo en condiciones más demandantes. En base a esta idea, estudiamos el desempeño reproductivo de los machos CRISP2 en condiciones restrictivas. En tanto que la reducción a la mitad del número de espermatozoides en el eyaculado por medio de una vasectomía unilateral no afectó el rendimiento reproductivo de los animales HT, dicha reducción tuvo un impacto significativo en la fertilidad de los machos mutantes. Además, el hecho de que se observaran menores niveles de fertilización en la *ampulla* en el caso de los machos KO vasectomizados unilateralmente confirma que los defectos en fertilización son responsables de la menor fertilidad observada en estos animales. En otro esquema experimental, encontramos que los machos KO exhibían menores niveles de fertilización *in vivo* con respecto a los HT cuando eran colocados en apareo con hembras estimuladas hormonalmente que ovulan un mayor número de ovocitos que las hembras en estro natural. En ambas aproximaciones experimentales es claro que, en tanto que los machos control pudieron lidiar con las condiciones más demandantes, los machos KO no lograron hacerlo. Es interesante señalar que estas observaciones pueden ser extrapoladas al modelo humano, en el cual la subfertilidad de un individuo puede ser detectada o no dependiendo de la combinación de los propios defectos y del estado reproductivo de su pareja.

Los defectos observados en los ensayos de fertilización *in vivo* podrían estar asociados a distintas causas. La detección del tapón vaginal y la presencia de espermatozoides en el útero confirmaron la correcta cópula y deposición de los espermatozoides respectivamente, descartando defectos en el comportamiento o en la eyaculación en los animales mutantes tal como fuera observado en otros modelos KO tales como los mutantes para la proteína seminal Transglutaminasa IV (Tgm4) (Dean, 2013) o los receptores P2X1 y $\alpha 1A$ del *vas deferens* (White et al., 2013, Kauffenstein et al., 2014). Los resultados posteriores obtenidos en ensayos de fertilización *in vitro* apoyan la idea de que los menores porcentajes de fertilización *in vivo* observados para los machos KO podrían deberse a defectos en la habilidad de los espermatozoides mutantes de interactuar con el COC. Sin embargo, dado que existen evidencias que señalan que el protocolo hormonal utilizado para las hembras podría llegar a tener un efecto negativo sobre los ovocitos (Edgar et al., 1987), era posible que una menor calidad de los ovocitos de hembras estimuladas contribuyera a los menores niveles de fertilización obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*. El hecho de que los espermatozoides mutantes tuvieran un mal desempeño cuando fueron co-incubados con COC obtenidos tanto de hembras en estro natural como de hembras estimuladas, iría en contra de esta posibilidad. En este sentido, es posible que la cantidad de espermatozoides de alta calidad en el eyaculado de animales KO haya sido suficiente para fertilizar el bajo número de ovocitos presentes en la *ampulla* en condiciones normales, pero que no alcance para fertilizar al mayor número que se ovula luego del tratamiento hormonal. Esta posibilidad está apoyada por la correlación negativa observada para el caso de los KO entre el porcentaje de fertilización y el número de ovocitos ovulados. A pesar de haber detectado defectos en la interacción de gametas, no se puede descartar que los espermatozoides KO tengan, además, problemas para llegar al sitio de fertilización. De este modo, es posible que los espermatozoides KO tengan una menor viabilidad en el útero o que no puedan migrar correctamente a la *ampulla* tal como fuera descrito para ratones KO para las proteínas CatSper, ADAM3, Tex101 o SVS2 (Ho et al., 2009, Yamaguchi et al., 2009, Li et al., 2013, Kawano et al., 2014). No obstante, estos posibles defectos solo serían relevantes en condiciones de apareo más demandantes en las que, por ejemplo, podría estar afectado el sistema de selección de espermatozoides por parte del tracto femenino como consecuencia de la estimulación hormonal.

Posteriores ensayos fertilización *in vitro* en los cuales los espermatozoides fueron expuestos a ovocitos desnudos o rodeados de sus envolturas revelaron que los

espermatozoides KO presentaban defectos en diferentes etapas del proceso de fertilización. La menor penetración de los ovocitos sin ZP por parte de los espermatozoides KO, que presentaban niveles normales de RA espontánea, apoyan las observaciones previas de nuestro laboratorio proponiendo un rol para CRISP2 en la fusión de gametas, tanto en roedores como en humanos, a través de su interacción con sitios complementarios en el ovocito (Busso et al., 2005, 2007, Da Ros et al., 2008, Weigel Muñoz et al., 2012). Consistentemente, CRISP2 se re-localiza durante la capacitación desde el compartimiento acrosomal al segmento ecuatorial, región por la cual el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. (Busso et al., 2005, 2007, Nimlamool et al., 2013). En este sentido, es interesante mencionar que CRISP1 también se localiza en el segmento ecuatorial de espermatozoides capacitados y, tal como se mencionara anteriormente, se ha propuesto que participa en la fusión de gametas (Rochwerger y Cuasnicú, 1992, Rochwerger et al., 1992, Cohen et al., 2000, 2001, Da Ros et al., 2008) a través de su unión a los mismos sitios en el ovocito que CRISP2 (Ellerman et al., 2006, Busso et al., 2007), sugiriendo a CRISP1 como un posible candidato a compensar la falta de CRISP2 durante la fusión de gametas. Estudios recientes de nuestro laboratorio, aún no publicados, mostraron que el KO para *Crisp4* también presenta deficiencias en esta etapa de la fertilización, por lo cual CRISP4 podría ser otra proteína que compense la falta de CRISP2.

Las diferencias en los porcentajes de fertilización entre espermatozoides KO y HT fueron más pronunciadas cuando los espermatozoides fueron expuestos a COC o ovocitos con ZP. Estos defectos no pudieron revertirse al co-incubar a las gametas por mayores períodos de tiempo, indicando que los menores porcentajes de fertilización obtenidos para los espermatozoides KO no se debían a un retraso en la fertilización, tal como fuera descrito para los espermatozoides deficientes en acrosina (Adham et al., 1997). El hecho de que, pese a tener una menor capacidad fusogénica, los espermatozoides KO no se acumularan en el espacio perivitelino de ovocitos con ZP fertilizados o no fertilizados, indica una falla de los espermatozoides para unirse y/o penetrar la ZP. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los KO para *Crisp1* (Cohen et al., 2011) y para *Crisp4* (Turunen et al., 2012), los espermatozoides KO para *Crisp2* no mostraron defectos en su habilidad para unirse a la ZP, sugiriendo que estas células tendrían deficiencias en la etapa de penetración de esta envoltura *per se*. Esta posibilidad fue confirmada al incubar a los ovocitos con glutatión reducido, el cual es capaz de hacer a la ZP más permeable a los espermatozoides (Miyata et al., 2015). Bajo

estas condiciones, los espermatozoides KO para *Crisp2* pudieron fertilizar el mismo porcentaje de ovocitos que los espermatozoides HT, confirmando la relevancia de CRISP2 para la penetración de la ZP. En contraposición a esta observación, resultados previos mostraron que la exposición de espermatozoides WT a anticuerpos anti-CRISP2 no afectó la penetración de la ZP resultando en una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino (Busso et al., 2007). En base a ello, es posible que los espermatozoides KO para *Crisp2* tuvieran deficiencias para penetrar la ZP debido a defectos asociados a la población intracelular de CRISP2 que está presente en el cuello y la cola del espermatozoide y, por lo tanto, no accesible al bloqueo por anticuerpos en espermatozoides WT. A diferencia de esta población presente dentro del flagelo, la proteína intra-acrosomal, con un rol en fusión, se expone y migra al segmento ecuatorial luego de la RA (Busso et al., 2005, 2007, Nimlamool et al., 2013) pudiendo ser inhibida por los anticuerpos. Los resultados utilizando anticuerpos sobre espermatozoides WT, junto a los menores niveles de penetración del *cumulus oophorus* observados para espermatozoides KO, apoyan la participación de CRISP2 en la fusión de gametas y revelan un nuevo rol de la proteína en la penetración de las envolturas del ovocito.

Para explorar los mecanismos moleculares que conducen a una menor capacidad fertilizante de los espermatozoides KO, se analizaron diferentes parámetros asociados a la capacitación espermática. Los niveles de pTyr, que aumentan normalmente con la capacitación (Visconti et al., 1995a), fueron similares en ambos genotipos, sugiriendo que no existirían mayores defectos en esta cascada de señalización. Consistentemente, no se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a los niveles de cAMP, mensajero celular necesario para el inicio de la vía de señalización conducente al aumento de pTyr (Visconti et al., 1995b). Estas evidencias parecen indicar que, a diferencia de lo que se encuentra descrito para CRISP1 y CRISP4 (Da Ros et al., 2008, Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2012), CRISP2 no tendría un rol relevante en esta cascada de señales. De forma similar, no se observaron diferencias entre los HT y KO en cuanto a la RA espontánea o inducida por progesterona, excluyendo la posibilidad de que la menor capacidad fertilizante de los espermatozoides mutantes se deba a defectos en este evento excitotico, a diferencia de CRISP1 y CRISP4, las cuales tienen un rol reportado en la RA inducida por progesterona (Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2012, Weigel Muñoz et al., en revisión). Por otra parte, el análisis objetivo de motilidad de los espermatozoides KO por el sistema CASA reveló una disminución significativa en la mayoría de los parámetros cinéticos asociados al desarrollo de la HA así como en los

porcentajes de células hiperactivadas. Estos defectos en la motilidad de los espermatozoides KO son consistentes con su menor capacidad de fertilizar a los ovocitos recubiertos por el cumulus y la ZP ya que la HA es un requisito esencial para la penetración de las envolturas ovocitarias (Suarez and Dai, 1992, Yanagimachi, 1994, Stauss et al., 1995, Ren et al., 2001). Dado que CRISP2 ha sido descrito como un componente de las fibras densas de la cola en la rata (O'Bryan et al., 2001), los menores niveles de HA en los espermatozoides KO podrían atribuirse a alteraciones estructurales en el flagelo debido a la falta de esta proteína. Sin embargo, los espermatozoides KO para *Crisp2* no mostraron defectos en su morfología analizada por microscopía óptica ni en su motilidad inicial, tal como fuera reportado para dos modelos diferentes de ratones KO para proteínas de las fibras densas de la cola (Tarnasky et al., 2010, Yang et al., 2012). Más aún, nuestros análisis por microscopía de ultra-resolución revelaron que la localización de CRISP2 en el ratón no es coincidente con las fibras densas de la cola como fuera descrito para la rata (O'Bryan et al., 2001).

Teniendo en cuenta que el Ca^{2+} es crítico para el desarrollo de la HA (Yanagimachi, 1994), el rol de CRISP2 en la motilidad espermática podría estar ligado a su reportada capacidad de regular canales de Ca^{2+} del tipo RyR (receptores rianodínicos) en otros tipos celulares (Gibbs et al., 2006). Esta posibilidad está apoyada por los mayores niveles de Ca^{2+} intracelular observados en los espermatozoides KO para *Crisp2* luego de la capacitación así como por los defectos en HA observados en espermatozoides KO para PMCA4 y JAM-A con niveles aumentados de este catión (Schuh et al., 2004, Aravindan et al., 2012). A su vez, si se exponen espermatozoides WT a agentes farmacológicos que aumentan el Ca^{2+} intracelular, tales como timerosal o ionóforo, o a mayores concentraciones del catión en el medio, la motilidad se ve disminuida (Ho et al., 2002, Chang y Suarez, 2011, Tateno et al., 2013, Li et al., 2016).

El hecho de que los mayores niveles de Ca^{2+} no afectaran la ocurrencia de la RA en los espermatozoides KO está en concordancia con reportes previos en murinos que muestran que un aumento de Ca^{2+} no se asocia necesariamente con mayores niveles de RA (Chang y Suarez, 2011) y que diferentes flujos de Ca^{2+} pueden estar involucrados en las distintas vías de señalización conducentes a la HA o RA (Alasmari et al., 2013, Tateno et al., 2013). A pesar de que se lograron normalizar los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los espermatozoides KO para *Crisp2* mediante la reducción de la concentración del ion en el medio capacitante, esto no se reflejó en una mejora en los porcentajes de HA ni de

fertilización *in vitro*. Incluso, con menores concentraciones de Ca^{2+} extracelular se vio afectada la fertilización en ambos genotipos, muy probablemente debido a los múltiples roles que cumple el Ca^{2+} en distintas etapas de la fertilización (Yanagimachi 1994). Por otra parte, en el espermatozoide existen mecanismos de homeostasis que mantienen bajos los niveles de Ca^{2+} (Wennemuth et al., 2003) tales como las bombas de Ca^{2+} PMCA4 o SERCA. En base a ello, es posible que los niveles normalizados de Ca^{2+} en los espermatozoides KO estén asociados a una mayor actividad de estos mecanismos de homeostasis celular, lo cual, a su vez, podría estar resultando en menores niveles de ATP o en un mayor estrés oxidativo. La primera de las posibilidades se encuentra apoyada por trabajos que asocian mayores niveles de Ca^{2+} con un menor balance energético de la célula (Aravindan et al., 2012, Li et al., 2016). Por el hecho de que la incubación de los espermatozoides KO con glutatión reducido no tuvo efectos en la HA, el aumento del estrés oxidativo no parecería probable. Sin dudas, el estudio de los efectos producidos por la desregulación de Ca^{2+} es de extremo interés y será llevado a cabo en profundidad en el futuro.

Existen diferentes posibilidades en cuanto a los canales que podrían estar siendo regulados por CRISP2. Considerando la localización de los canales RyR (Harper et al., 2004) como así también de CRISP2 en el cuello de los espermatozoides, y que la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares ubicados en dicha región está involucrada en el desarrollo de la HA (Ho y Suarez, 2003, Chang y Suarez, 2011), es posible que CRISP2 se encuentre modulando la motilidad espermática a través de la regulación del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Por otro lado, basados en el rol esencial que cumple el canal de Ca^{2+} CatSper en el desarrollo de la HA (Ren et al., 2001, Carlson et al., 2003), existe la posibilidad de que CRISP2 se encuentre regulando la entrada de Ca^{2+} a través de CatSper, tal como lo hace CRISP1 (Ernesto et al., 2015). Esta posibilidad está apoyada por el hecho de que CRISP2 fue localizada en la membrana plasmática de la pieza principal de la cola mediante nuestro estudio de ultra-resolución, y que el aumento exacerbado de Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides KO capacitados pudo ser prevenido empleando menores concentraciones de Ca^{2+} o un inhibidor de CatSper en el medio de capacitación. Esta posibilidad debería ser explorada con mayor profundidad a través de ensayos de *patch clamp*, los cuales son difíciles de llevar a cabo debido a la naturaleza intracelular de CRISP2. Por otro lado, hasta el momento no ha sido posible expresar el complejo de proteínas que forman CatSper en sistemas heterólogos

(incluyendo huevos de *Xenopus*) (Chung et al., 2011), lo cual dificulta el estudio de los posibles reguladores de su actividad.

En conjunto, los resultados de esta primera parte de la Tesis revelaron deficiencias en la capacidad fertilizante de espermatozoides KO para *Crisp2* tanto *in vivo* como *in vitro* ligados a defectos en el desarrollo de la HA y a una desregulación del Ca^{2+} intracelular. Estas observaciones apoyan la idea de que una menor capacidad fertilizante podría contribuir a los problemas de fertilidad detectados en pacientes con expresión aberrante de CRISP2 (Du et al., 2006, Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015). Asimismo, mientras los niveles normales de fertilización observados para los machos KO para *Crisp2* luego de un apareo convencional remarcan el rol del tracto femenino para la selección de espermatozoides de alta calidad, los defectos en fertilización observados en condiciones más demandantes destacan la necesidad de emplear diferentes aproximaciones experimentales para el análisis de la fertilidad de los machos.

Capítulo 2

Regulación de los niveles de calcio intracelular en espermatozoides humanos

La proteína CRISP2 está presente en espermatozoides humanos y, al igual que en el ratón, se localiza dentro del acrosoma y la cola de los espermatozoides (Busso et al., 2005, Nimlamool et al., 2013). Asimismo, resultados de nuestro laboratorio indican que CRISP2 humana participaría en el proceso de fusión de gametas (Busso et al., 2005). Tal como se mencionara previamente, existen evidencias que señalan que el gen codificante para CRISP2 estaría asociado a infertilidad masculina, más específicamente en pacientes con astenozoospermia (Paoloni-Giacobino et al., 2000, Olesen et al., 2001, Du et al., 2006, Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015), abriendo la posibilidad de que CRISP2 tenga relevancia para la motilidad de los espermatozoides humanos. En base a ello, y considerando que CRISP2 es capaz de regular canales de Ca^{2+} (Gibbs et al., 2006), nos planteamos como objetivo estudiar en muestras de pacientes con astenozoospermia si la falta de CRISP2 podría ocasionar la falla en motilidad a través de la desregulación del Ca^{2+} intracelular. Para tal fin, se analizó la motilidad en muestras de semen de pacientes que consultaban por problemas de fertilidad y de donantes sanos, midiéndose en paralelo los niveles proteicos de CRISP2 y el aumento de Ca^{2+} inducido por la capacitación. Si bien durante el desarrollo de esta Tesis se obtuvieron pocas muestras de pacientes con problemas de motilidad, se logró analizar un número significativo de muestras de donantes sanos. Dado que el análisis poblacional de los niveles de CRISP2 mostró una variabilidad importante entre individuos, no fue posible hacer una comparación concluyente entre ambos grupos, por lo cual, decidimos incluir a todos los sujetos experimentales en los diferentes análisis de correlaciones. En primer lugar, no se observó una correlación significativa entre la motilidad progresiva de las muestras y los niveles de CRISP2, lo cual sería contrario a los reportes existentes (Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015). Sin embargo, se pudo observar una clara tendencia hacia la correlación positiva entre dichos parámetros que abre la posibilidad de que con un mayor número de muestras analizadas, especialmente de pacientes con astenozoospermia, se alcance una significancia que coincida con los reportes previos. Además, resulta interesante mencionar que en tanto el 2/3 de los pacientes mostraron niveles bajos de CRISP2, solo el 30,0 % del grupo control tenía niveles bajos de esta proteína. En conjunto, estas evidencias son compatibles con la idea de que los menores niveles de CRISP2 estrían

asociados a menores porcentajes de motilidad progresiva. Estas observaciones representan una diferencia en cuanto a lo observado en ratones KO en los que los defectos se encontraron sólo en el tipo de motilidad hiperactivada, consistente con el hecho de que existen algunas diferencias en la regulación de la funcionalidad espermática entre los espermatozoides humanos y murinos (Miller et al., 2015). Una de dichas diferencias es que CatSper, un claro regulador de la motilidad, es activado por progesterona en humano pero no así en ratón (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011, Miller et al., 2016).

El próximo paso consistió en correlacionar el aumento de Ca^{2+} inducido por la capacitación con los niveles de CRISP2, observándose que cuanto menor era la expresión de CRISP2, mayor era el aumento de Ca^{2+} en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que los espermatozoides de ratones KO para CRISP2 tienen un aumento exacerbado de Ca^{2+} durante la capacitación. En este sentido, existen varias evidencias que muestran los efectos negativos de un aumento anormal de los niveles de este ion sobre la motilidad espermática (Ho et al., 2002, Schuh et al., 2004, Chang y Suarez, 2011, Aravindan et al., 2012, Tateno et al., 2013, Li et al., 2016, Brukman et al., 2016). Ante esta posibilidad, nos planteamos como objetivo encontrar moduladores de la capacitación que inhiban el aumento de Ca^{2+} en humanos y que puedan ser utilizados como posibles agentes terapéuticos para mejorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de pacientes infértiles. En paralelo a la búsqueda de pacientes con menores niveles de CRISP2, nos propusimos desarrollar un modelo de espermatozoides con altos niveles de Ca^{2+} que simulara la situación de dichos pacientes. En base a la dependencia existente entre el Ca^{2+} intracelular y extracelular en los espermatozoides (Serres et al., 1991), primeramente incubamos a los espermatozoides de donantes sanos en medios de capacitación conteniendo mayores concentraciones de Ca^{2+} . Sin embargo, el análisis por citometría no mostró alteraciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} aun cuando la concentración en el medio era 3 veces mayor a la normal. El hecho de que en los mismos experimentos se haya podido detectar un aumento del Ca^{2+} intracelular utilizando el ionóforo A23187 descarta que haya habido problemas en la sensibilidad de la técnica. Es posible, por ende, que en las condiciones ensayadas, los mecanismos de regulación del Ca^{2+} intracelular (Wennemuth et al., 2003) hayan sido suficientes para mantener los niveles del mismo.

Como otra estrategia, nos propusimos estudiar moduladores del incremento normal de Ca^{2+} que ocurre durante la capacitación. Los resultados mostraron una inhibición en dicho incremento utilizando el quelante de Ca^{2+} EGTA y el inhibidor de CatSper HC056456, lo cual es consistente con la relevancia que tiene el influjo de Ca^{2+} a través de este canal para la capacitación (Ren et al., 2001, Lishko et al., 2011). También se pudo observar un efecto al utilizar el inhibidor de PKA H89, apoyando la idea de que esta quinasa regularía la entrada de Ca^{2+} a los espermatozoides (Torres-Flores et al., 2008, Baron et al., 2016). Curiosamente, también se observó una disminución en los niveles intracelulares de Ca^{2+} al utilizar un inhibidor de la quinasa PYK2 (PF431396, PF), que impide el aumento en pTyr sin afectar la actividad de PKA (ver Figura 9 de la Introducción) (Battistone et al., 2014, Alvau et al., 2016). Más aún, la inhibición se produjo a concentraciones a las que el PF inhibe la actividad PYK2 y pTyr en espermatozoides humanos (Battistone et al., 2014), sugiriendo un rol de pTyr en la regulación del Ca^{2+} intracelular. Dado que el PF no afecta la actividad de PKA (Battistone et al., 2014, Alvau et al., 2016), el efecto observado para el H89 se debería, al menos en parte, a un rol de pTyr. Esto resultó ser de sumo interés ya que no existían en la bibliografía evidencias claras que indicaran la influencia del aumento de pTyr sobre el aumento del Ca^{2+} durante la capacitación de los espermatozoides, por lo que nos propusimos investigar en profundidad el *cross-talk* entre estas cascadas de señalización.

Tal como se mencionara anteriormente, CatSper es crítico para la entrada de Ca^{2+} a los espermatozoides durante la capacitación (Ren et al., 2001, Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011) y resulta esencial para la fertilidad tanto en ratones (Ren et al., 2001) como en humanos (Smith et al., 2013, Williams et al., 2015). Por lo tanto, ante la posibilidad de que la inhibición con PF pudiera estar regulando a CatSper, estudiamos la actividad de este canal mediante dos aproximaciones diferentes. En primer lugar, evaluamos la depolarización de membrana inducida por EGTA como un indicador de la actividad de CatSper (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2015). Este ensayo fue validado en nuestras condiciones experimentales al detectarse no solo una mayor actividad del canal en espermatozoides capacitados que en no capacitados (Lishko et al., 2011), sino una completa inhibición de dicha actividad en presencia de HC056456 (Carlson et al., 2009). Empleando este ensayo, nuestros resultados mostraron que el PF era capaz de inhibir la actividad de CatSper. Por otro lado, utilizando como herramienta a la progesterona, que activa a CatSper en humanos (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), pudimos observar que cuando los espermatozoides eran capacitados en presencia

de PF, el aumento de Ca^{2+} inducido por progesterona estaba significativamente disminuido, indicando una inhibición de la actividad de CatSper. Considerando que en espermatozoides no capacitados, CatSper es capaz de tener una cierta respuesta a progesterona (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011) no bloqueable por inhibición de pTyr, se puede pensar que la inhibición de CatSper por PF, a diferencia de lo observado con HC056456, no sería directa sobre el canal. En conjunto, estos resultados indicarían que el PF sería capaz de inhibir la actividad de CatSper por un mecanismo subyacente a la capacitación tal como la pTyr.

Otra posibilidad que podría explicar la inhibición por PF del incremento de Ca^{2+} durante la capacitación es que PYK2 estuviera involucrado en la activación de SOCE. En este sentido, evidencias en otros tipos celulares, tales como las células endoteliales, indican que la inhibición de PYK2 bloquea la entrada de Ca^{2+} por el sistema SOCE inducida por taspigargina al inhibir la fosforilación de STIM1 (Tauseef et al., 2011, Yazbeck et al., 2017). Si bien las proteínas STIM y Orai se encuentran presentes en el espermatozoide humano, las corrientes correspondientes a este sistema aún no pudieron ser detectadas (Lefièvre et al., 2012). Asimismo, tal como se mencionara, se observó una disminución en el *plateau* alcanzado luego de la inducción con progesterona en espermatozoides capacitados en presencia de PF. Por lo tanto, dado que la activación de SOCE está involucrada en la fase estacionaria dicha respuesta a la hormona (Lefièvre et al., 2012), era probable que la pTyr tuviera una relevancia para la activación de SOCE. Sin embargo, el hecho de que no se observaran diferencias en el aumento de Ca^{2+} inducido por taspigargina entre espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de PF, sugiere que la pTyr no estaría regulando la entrada de Ca^{2+} por el sistema SOCE en espermatozoides humanos. En concordancia con estas observaciones, algunos autores sugieren que en los espermatozoides, en los cuales los reservorios intracelulares de Ca^{2+} se encuentran muy cercanos a la membrana plasmática, la activación del sistema SOCE presentaría propiedades diferentes a las de las células somáticas (Correia et al., 2015).

Habiendo encontrando una conexión entre la vía de pTyr y la regulación de CatSper, y considerando que este canal es dependiente del voltaje y activado por pH (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), decidimos evaluar el efecto del tratamiento con PF sobre los cambios tanto en el potencial de membrana como en el pH intracelular asociados a la capacitación. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de pTyr por PF durante la capacitación no afectó la hiperpolarización de la membrana del espermatozoide, a

diferencia de lo observado para H89 (Puga Molina et al., 2017), indicando que la quinasa PKA tendría un rol en la inducción de la hiperpolarización de membrana que sería independiente de la activación de la vía de pTyr. Sin embargo, el tratamiento con PF bloqueó la alcalinización del citoplasma, sugiriendo que la señalización por pTyr regularía la actividad de CatSper a través de la modulación del pH intracelular. Dado que el mismo efecto había sido reportado para H89 (Puga Molina et al., 2017), es probable que al menos parte del efecto observado al inhibir a PKA se deba al rol de la pTyr en la alcalinización del citoplasma. Es interesante mencionar que si bien las cinéticas revelan un aumento inicial tanto en los niveles de Ca^{2+} como en el pH durante la capacitación, incluso en presencia de PF, a partir de las 2 hs de capacitación, se empiezan a observar diferencias significativas entre tratamientos. Teniendo en cuenta que el aumento de pTyr no es un evento temprano de la capacitación (Battistone et al., 2013), estos resultados señalan que existiría una activación inicial de CatSper independiente de la señalización por pTyr, la cual podría estar asociada a la activación inmediata de la vía cAMP/PKA de la capacitación de los espermatozoides humanos (Battistone et al., 2013). Este aumento temprano de la actividad de CatSper independiente de la inhibición de pTyr, refuerza la idea de que PF no estaría actuando directamente sobre CatSper, a diferencia de lo que ocurre con otros inhibidores ya que este canal es promiscuo para la acción de múltiples ligandos (Barrat y Publicover, 2012, Brenker et al., 2012). Por otro lado, los menores niveles de Ca^{2+} y pH detectados a partir de las 2 hs de incubación en presencia de PF coinciden temporalmente con la activación de PYK2 por auto-fosforilación a lo largo de la capacitación (Battistone et al., 2014), apoyando el rol de la vía de pTyr en el mantenimiento de la actividad de CatSper durante la capacitación.

Es interesante mencionar que, en los espermatozoides humanos, el pH intracelular y el Ca^{2+} también regulan el potencial de membrana a través de la activación de los canales de K^+ SLO1 y SLO3 (Mannowetz et al., 2013, Brenker et al., 2014, Geng et al., 2017). De este modo, el hecho de que los espermatozoides capacitados en presencia de PF presenten una disminución del pH citoplasmático y de los niveles de Ca^{2+} y una normal hiperpolarización, podría resultar contradictorio. Sin embargo, como se mencionara anteriormente, en los comienzos de la capacitación de espermatozoides tratados con PF, se observa un aumento tanto de pH como de los niveles de Ca^{2+} que podrían ser suficientes para la inducción de la corriente de K^+ y, por lo tanto, de la hiperpolarización de la membrana. Luego, esta hiperpolarización sería mantenida a lo largo de la capacitación por otros mecanismos tales como el cierre de canales de Na^+ por acción de

PKA (Hernández-González et al. al., 2006, Escoffier et al., 2012, Puga Molina et al. 2017). Este no sería el caso de los espermatozoides no capacitados los cuales no presentan ni un aumento en el pH ni una hiperpolarización de la membrana (López-González et al., 2014, Puga Molina et al., 2017).

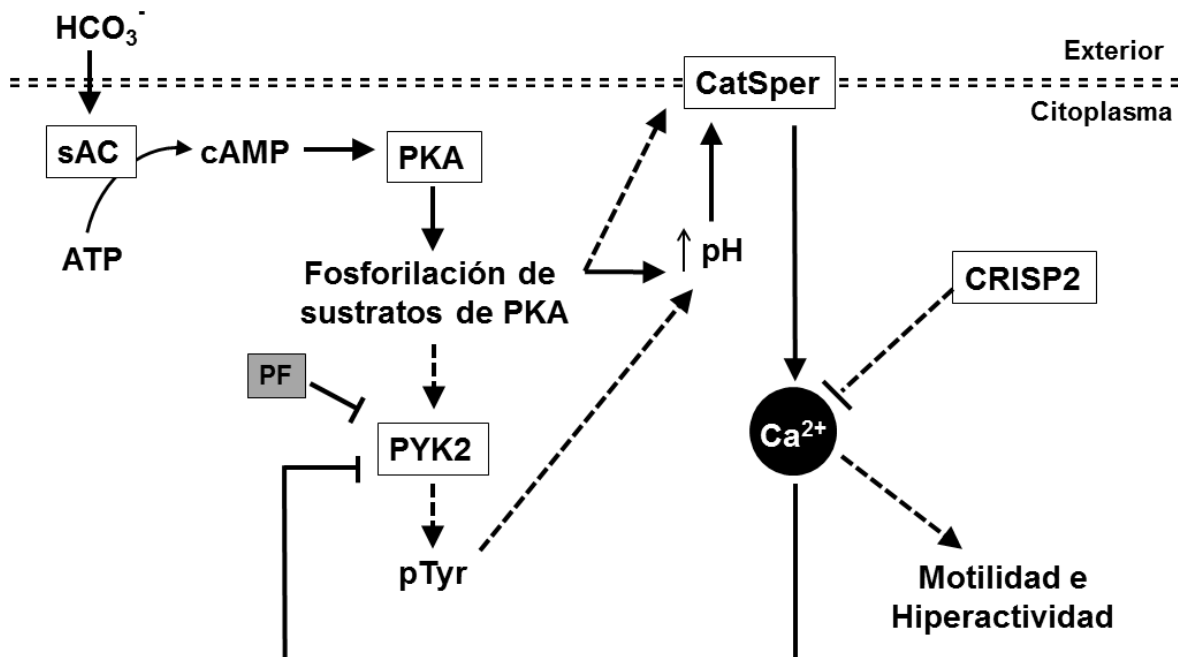
Basado en estos resultados, quisimos verificar si los menores niveles de Ca^{2+} encontrados en los espermatozoides expuestos a PF podrían ser revertidos mediante una alcalinización artificial del citoplasma. Nuestros resultados mostraron que el agregado de NH_4Cl o monensina a espermatozoides capacitados en presencia de PF logró aumentar el pH intracelular y fue suficiente para incrementar los niveles de Ca^{2+} . Considerando evidencias previas que muestran que el mero aumento de pH no es suficiente para activar a CatSper en humanos (Miller et al., 2015), nuestros resultados sugieren que los espermatozoides expuestos a PF durante la capacitación exhibirían una inhibición del aumento de Ca^{2+} por la sola inhibición de pTyr y de sus mediadores río abajo. Por su parte, espermatozoides no capacitados, además de no presentar un aumento de pTyr, exhiben otras fallas tales como la falta de activación de PKA o de hiperpolarización, por lo que el aumento de Ca^{2+} en respuesta a la alcalinización es marcadamente menor. Estos resultados están apoyados por el hecho de que la alcalinización artificial del citoplasma no afecta el estado de la pTyr de la célula, indicando que la inducción de pTyr es previa al aumento de Ca^{2+} inducido por incremento del pH.

En conjunto, estos resultados revelan un rol para la vía de pTyr en la regulación del Ca^{2+} a través de la modulación de la actividad de CatSper inducida por pH. En tanto que el rol del pH en la inducción de la entrada de Ca^{2+} ya fue reportada (Kirichok et al., 2006, Lishko et al., 2010), la regulación del pH por la vía de pTyr en la cascada de señalización de la capacitación de los espermatozoides humanos representa un resultado novedoso y de interés. En este sentido, dado que los espermatozoides son expuestos a diversos cambios en la composición iónica de los fluidos de los tractos reproductivos masculino y femenino, no resulta raro que estas células posean diferentes mecanismos de regulación fina del pH intracelular. En tanto que diferentes actores moleculares han sido propuestos en dicha regulación (Nishigaki et al., 2014), el canal de protones Hv1 es, probablemente, el responsable de la mayor parte del flujo de protones detectado en los espermatozoides humanos (Lishko et al., 2010). Si bien la corriente de Hv1 es potenciada por la capacitación y por la exposición a anandamida, el mecanismo exacto de activación de este canal se desconoce (Lishko et al., 2010). Considerando que en leucocitos y en

células B malignas, la fosforilación de Hv1 humano por PKC promueve la activación del canal (Musset et al., 2010, Hondares et al., 2014), es posible que en espermatozoides, Hv1 se encuentre regulado de forma similar. De hecho, existe una estrecha relación entre PKC y PYK2 que fue descrita en un amplio rango de tipos celulares (Lev et al., 1995, Tsuchida et al., 1999, Yang et al., 2013). En base a ello, intentamos revertir los bajos niveles de Ca^{2+} en espermatozoides tratados con PF por exposición a anandamida. Sin embargo, el tratamiento con el endocanabinoide no logró aumentar el pH intracelular ni siquiera en espermatozoides control. Futuros estudios serán realizados con el objetivo de identificar el actor molecular que vincula la vía de pTyr con la regulación del pH citoplasmático.

Como una forma de investigar el impacto final del aumento de Ca^{2+} inducido por alcalinización en espermatozoides cuya vía de pTyr se encuentra inhibida, evaluamos la motilidad de espermatozoides expuestos a PF luego de un estímulo con NH_4Cl . Si bien fue reportado que el tratamiento con PF afecta la HA (Battistone et al., 2014), se sabe que la sola activación de CatSper por agregado de NH_4Cl no tiene efectos sobre este tipo de motilidad (Alasmari et al., 2013), por lo cual nos enfocamos al análisis de los parámetros cinéticos. El tratamiento con NH_4Cl en espermatozoides capacitados en presencia de PF fue capaz de revertir parcialmente los defectos en dos de dichos parámetros (LIN y STR) asociados a la motilidad progresiva indicando que el bloqueo de la alcalinización del citoplasma es causante, al menos en parte, de los defectos en motilidad. Estos resultados son consistentes con que la idea de que pTyr sea un sensor de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides humanos, lo cual no había sido reportado hasta el momento para ninguna especie. De este modo, podría proponerse un mecanismo de retroalimentación en el que los niveles de Ca^{2+} regulen la vía de pTyr (Battistone et al., 2014) y esto a su vez, module la actividad de CatSper, componiendo un sistema de regulación fina que garantice una concentración de Ca^{2+} intracelular óptima (ver Modelo 1). Este tipo de regulación está en concordancia con el hecho de que una disminución del Ca^{2+} extracelular durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides humanos produce un incremento en los niveles de pTyr (Carrera et al., 1996, Luconi et al., 1996, Leclerc y Goupil, 2002, Marin-Briggiler et al., 2003, Baker et al., 2004, Battistone et al., 2014), probablemente como una respuesta celular para aumentar la entrada de Ca^{2+} . En este sentido, es interesante mencionar que existe un reporte de un paciente deficiente en CatSper en cuyos espermatozoides la corriente de protones se encuentra aumentada (Smith et al., 2013). El aumento de pTyr en respuesta a bajos niveles de Ca^{2+} se observa

en espermatozoides murinos solo en condiciones extremas (por ejemplo con EGTA), lo cual es consistente con la descripción de la quinasa en Tyr FER, que es la enzima responsable de la inducción de la vía pTyr en dicha especie y que también es sensible al PF (Alvau et al., 2016). Si bien FER fue recientemente descrita en espermatozoides humanos, la regulación de su actividad y su relevancia para la capacitación no fueron determinadas. Sin embargo, PYK2 humana, a diferencia de su homóloga murina, presenta la misma localización celular que FER murina y que las proteínas fosforiladas en Tyr (Battistone et al., 2014, Alvau et al., 2016), representando otro ejemplo de proteínas con roles diferentes en la capacitación entre estas dos especies (Miller et al., 2015). Estas observaciones podrían reflejar adaptaciones propias de cada especie para afrontar los ambientes específicos en el tracto reproductor femenino (Brenker et al., 2014). Es posible, además, que ambas quinasas tengan un mismo rol respondiendo a diferentes señales, pudiendo FER responder a los estímulos normales de la capacitación mientras que PYK2 toma mayor relevancia frente a una disminución en los niveles de Ca^{2+} . Aunque se requieren mayores estudios para comprender estas diferentes regulaciones, el hecho de que la vía de pTyr regule la entrada de Ca^{2+} representa un nuevo mecanismo de regulación de CatSper con el fin de asegurar el éxito de la capacitación.



Modelo 1. Cascadas de señalización involucradas en el proceso de capacitación. Las líneas de puntos indican regulaciones que pueden involucrar intermediarios.

En conjunto, los resultados de este capítulo de la Tesis aportan información acerca de los mecanismos de regulación fina del Ca^{2+} que ocurren durante la capacitación del espermatozoide humano y que le permiten adquirir su capacidad fertilizante. En tanto que CRISP2 estaría previniendo un aumento exacerbado de los niveles de Ca^{2+} , tal como ocurre en el ratón, la vía de pTyr estimularía la entrada de Ca^{2+} por CatSper a través de la regulación del pH intracelular (Ver Modelo 1). Por lo tanto, los defectos en motilidad de aquellos pacientes con deficiencias en CRISP2 podrían deberse a fallas en la regulación del Ca^{2+} intracelular.

Conocer las bases moleculares del proceso de capacitación de espermatozoides aumenta las herramientas disponibles para mejorar la calidad de los mismos de forma tal que los pacientes puedan tener éxito en técnicas de baja complejidad como la inseminación artificial. En ese sentido, cabe mencionar que la inseminación intrauterina, además de ser menos invasiva y más accesible económicamente para la población, permite que el espermatozoide fertilizante sea seleccionado naturalmente por el tracto reproductor femenino, asegurándose el valor biológico y funcional de dicho espermatozoide. Finalmente, a pesar de las diferencias entre especies mencionadas, los resultados obtenidos en relación a CRISP2 sugieren que los modelos de ratones KO mimetizan los defectos de los espermatozoides humanos constituyendo herramientas de suma utilidad al momento de estudiar posibles tratamientos para la infertilidad humana.

Capítulo 3

Evaluación del fenotipo de animales deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente

Las evidencias obtenidas utilizando aproximaciones biológicas, bioquímicas y genéticas apoyan la participación de las proteínas CRISP en diferentes etapas de la capacitación espermática y la fertilización tanto en roedores como en humanos (Cohen et al., 2011, Da Ros et al., 2015). Muchos de los roles propuestos para cada uno de los miembros de esta familia son compartidos, sugiriendo la existencia de una redundancia funcional y una cooperación entre dichas proteínas para garantizar el éxito de la fertilización (Cohen et al., 2011, Da Ros et al., 2015). Esto es consistente con las observaciones del primer capítulo de esta Tesis Doctoral mostrando una fertilidad normal para los machos KO para *Crisp2*, del mismo modo que se había reportado para los animales KO para *Crisp1* (Da Ros et al., 2008) y para *Crisp4*, (Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2012). En este sentido, y tal como se comentara previamente, está descrito que la delección de una gran mayoría de los genes para proteínas con roles en fertilización no presenta un fenotipo marcado en fertilidad (Okabe y Cummins, 2007, Okabe, 2014). Este hecho posiblemente sea debido a la existencia de mecanismos redundantes que garantizan el éxito de la reproducción (Klinovska et al., 2014), sobre todo, en una célula que carece de maquinaria sintética tal como el espermatozoide. En este sentido, en la literatura, se han reportado varios casos en los que la falta de dos o más proteínas del tracto reproductor masculino con función similar conlleva a un fenotipo más severo que en el caso de los KO simples (Kawano et al., 2010, Zhou et al., 2012, Fiedler et al., 2013, White et al., 2013, Huang et al., 2016, Nakasuji et al., 2017, Zhang et al., 2017). Como una manera de evaluar la posible compensación entre miembros de la familia CRISP y profundizar el estudio de la relevancia de estas proteínas para la fertilidad, nos planteamos como objetivo generar y caracterizar animales deficientes en más de una proteína de la familia, simultáneamente. Si bien la opción más sencilla para tal fin era mediante apareo entre animales KO simples, los genes de *Crisp1*, *Crisp2* y *Crisp3* se encuentran muy cercanos en el mismo cromosoma por lo que la probabilidad de recombinación entre ellas

resulta muy baja. En base a ello, se decidió primeramente generar animales deficientes en dos proteínas, tales como CRISP2 y CRISP4, y analizar su fenotipo reproductivo.

Los animales DKO presentaron un desarrollo y comportamiento aparentemente normales, lo cual es relevante teniendo en cuenta que ambas proteínas se expresan conjuntamente en músculo esquelético (Reddy et al., 2008) descartando la posibilidad de que las mismas cumplan roles redundantes en dicho tejido. Por otro lado, la apariencia normal de los órganos reproductivos de estos animales, junto al número similar de espermatozoides obtenidos, indican que la falta de CRISP2 y CRISP4 no afectaría la espermatogénesis ni el tránsito epididimario. Sin embargo, en tanto que los valores de fertilización *in vivo* utilizando hembras superovuladas fueron normales para los ratones KO de *Crisp4* y ligeramente menores para los KO de *Crisp2*, la falta de ambas proteínas en los espermatozoides DKO produjo una marcada disminución en los niveles de fertilización, sugiriendo que CRISP2 y CRISP4 se encontrarían cooperando en el proceso de fertilización *in vivo*. Por lo tanto, si bien las mutaciones no produjeron defectos a nivel de la fertilidad de los machos DKO evaluada por apareo convencional, es posible que dicha cooperación funcional afecte la fertilidad de los mismos en situaciones de mayor exigencia. Por otro lado, el hecho de no observarse diferencias a nivel de la fertilidad cuando las hembras utilizadas para los apareos eran también DKO, descarta que estas proteínas tuviesen algún efecto sobre la fertilidad de la hembra o que pudieran compensar la falta de las mismas en los espermatozoides DKO.

Los defectos en fertilización *in vivo* correspondientes a los animales DKO para *Crisp2* y *Crisp4* estuvieron acompañados de una marcada disminución en los porcentajes de fertilización *in vitro* indicando que las deficiencias observadas *in vivo* se deberían en parte a alteraciones en la interacción de gametas. En base a ello, y considerando que tanto CRISP2 como CRISP4 modulan la funcionalidad espermática (Brukman et al., 2016, Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2011), estudiamos diferentes parámetros asociados a la capacitación. Los espermatozoides de animales DKO mostraron deficiencias en los niveles de pTyr y en los porcentajes de HA y RA inducida por progesterona, sugiriendo severas fallas en el proceso de capacitación. Teniendo en cuenta que los espermatozoides KO para *Crisp2* presentan menores porcentajes de HA mientras que los KO para *Crisp4* exhiben una bajada en pTyr y RA inducida (Gibbs et al., 2011, Turunen et al., 2011, Carvajal et al., 2015), el fenotipo de los DKO puede atribuirse al aporte de los

defectos propios de los KO simples. Dado que los eventos mencionados son regulados por Ca^{2+} (Yanagimachi, 1984) y que tanto CRISP2 como CRISP4 son capaces de regular canales de Ca^{2+} (Gibbs et al., 2006, Gibbs et al., 2011), es posible que cada proteína se encuentre modulando diferentes vías de señalización por Ca^{2+} involucrados en la ocurrencia de los eventos asociados a la capacitación (Tateno et al., 2013, Alasmari et al., 2013).

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del estudio de ratones DKO para *Crisp2* y *Crisp4* sugieren que, si bien la falta de ambas proteínas no afecta la fertilidad, produce severos defectos tanto en la capacitación espermática *in vitro* como en la fertilización *in vivo*. En este sentido, es posible que la falta de un fenotipo a nivel de fertilidad pudiera deberse a la compensación de otras proteínas CRISP, tal como fuera mencionado anteriormente. Es así que CRISP1, el cual tiene conocidos roles durante la capacitación y la fertilización (Da Ros et al., 2015) y que regula la actividad del canal CatSper (Ernesto et al., 2015) se encuentre compensando la falta de CRISP2 y CRISP4 en los animales DKO. Tampoco se descarta que CRISP3 pudiera estar jugando un papel compensatorio en estos animales, aun cuando no existen evidencias sólidas acerca de su rol en la fertilización (Da Ros et al., 2015). Asimismo, dado que recientes resultados de nuestro laboratorio (aún no publicados) muestran que los machos DKO para otras proteínas CRISP (*Crisp1/Crisp3* y *Crisp1/Crisp4*) presentan leves defectos en fertilidad sin llegar a una infertilidad, es claro que la combinación de proteínas CRISP faltantes es importante para el fenotipo resultante.

En base a todo esto, decidimos estudiar el efecto de eliminar un mayor número de proteínas CRISP simultáneamente. Tal como fuera mencionado, esta estrategia era complicada de aplicar por apareo de simples KO y, aún más por mutagénesis, utilizando los métodos clásicos de recombinación homóloga en células embrionarias. En este sentido, resulta importante mencionar que durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se publicó un trabajo en la revista *Cell* que resultó ser el primer reporte de la generación de ratones genéticamente modificados a través del uso de la tecnología CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2013). En este trabajo, los autores describen una forma de introducir mutaciones en múltiples *loci* al mismo tiempo de forma mucho más rápida y sencilla que las técnicas clásicas de mutagénesis. La técnica se basa en el direccionamiento de la endonucleasa Cas9 a un determinado sitio en el genoma gracias a su asociación a un

ARN guía, produciéndose así una ruptura de la doble hélice de ADN que, al ser reconocida por los sistemas de reparación propios de la célula, llevan a la introducción de inserciones o deleciones al azar (Wang et al., 2013, ver Introducción). Esta tecnología fue adoptada rápidamente por la comunidad científica, lo cual se refleja en el número de publicaciones relacionadas que, tan solo en 2017, superó los 3000 trabajos, y en las casi 2000 citas que tiene el trabajo original (Wang et al., 2013). La técnica de CRISPR/Cas9 también fue empleada para el estudio de proteínas asociadas al espermatozoides tales como Cetn1 y Prm1 (Mashiko et al., 2013) e incluso permitió generar 54 simples KO en un único trabajo descartando la esencialidad de dichos genes para la fertilidad masculina (Miyata et al., 2016). En base a todo lo descrito, nos propusimos generar ratones triples (TKO) y cuádruples (CKO) KO valiéndonos de la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, realizamos la mutación de los genes *Crisp1* y *Crisp3* sobre los animales DKO para *Crisp2* y *Crisp4* generados anteriormente, aumentando así las probabilidades de éxito. Esta estrategia tiene la ventaja adicional de que se utilizan menos sgARN en el proceso y, por ende, disminuye potencialmente el reconocimiento de sitios no deseados (*off-target*) en el genoma (Mashiko et al., 2013, Pattanayak et al., 2013, Iyer et al., 2015). El diseño de los sgARN a emplear es crítico para el éxito de la técnica (Yuen et al., 2017), y si bien cada vez se conoce mejor cuales son aquellas secuencias que favorecen la actividad endonucleasa de la Cas9 (Peng et al., 2015), en el momento de la generación de los animales TKO y CKO aún era muy poca la información disponible. Por lo tanto, a pesar de que los soportes bioinformáticos utilizados para el diseño de los sgARN los califican en base a ciertos criterios, un alto porcentaje de la eficiencia de los mismos no puede predecirse debido a posibles estructuras secundarias del ARN, a complicadas interacciones entre los factores que afectan la calidad del sgARN y/o a la estructura de la cromatina en el gen blanco (Xu et al., 2015). Por dichas razones, incluso hasta este momento, la mejor forma de saber fehacientemente la eficiencia de un sgARN es de manera empírica. En principio, el único requerimiento para un sgARN es que reconozca un sitio adyacente a un motivo consenso denominado PAM (NGG) (Wang et al., 2013). Como un primer intento, se utilizó un único sgARN capaz de reconocer secuencias en el exón 3 de *Crisp1* y *Crisp3*, ya que en dicho exón ambos genes poseen altos niveles de identidad de secuencia. Sin embargo, el análisis de los animales obtenidos mediante esta estrategia indicó que los mismos no presentaban mutaciones en las regiones de interés. En paralelo, nuestros colaboradores (grupo del Dr. Rubinstein)

habían logrado producir mutaciones en otros genes utilizando la misma tecnología, indicando que la falta de éxito no se debía a un problema en la metodología sino, muy probablemente, a la elección del sgARN. Según un reporte reciente, es posible que la alta proporción (39 %) de adenosinas y la baja cantidad (26 %) de guanidinas en el sgARN utilizado hayan contribuido a que el mismo sea más inestable y, por lo tanto, menos eficiente (Moreno-Mateos et al., 2015). Además, se ha descrito que los sgARN (tal como el empleado en nuestro caso) que reconocen sitios en los que el motivo PAM contiene una timidina (TGG) son menos efectivos (Doench et al., 2014). Aunque no es clara la razón de esta menor efectividad, Teniendo en cuenta que la secuencia PAM no se encuentra en el sgARN sino en el ADN, es probable que esté relacionado a la afinidad de las diferentes variantes del motivo NGG (TGG, AGG, CGG o GGG) por el Dominio de Interacción con el PAM de la endonucleasa Cas9 (Jiang et al., 2015). El próximo paso consistió en generar dos sgARN, cada uno dirigido contra el exón 5 de *Crisp1* o de *Crisp3*, basados en la suposición de que si un mismo sgARN debía reconocer dos sitios en el genoma, era posible que la cantidad microinyectada no fuese suficiente como para provocar la ruptura del ADN en ambos genes. Sin embargo, un estudio reciente indica que la eficiencia de un sgARN es independiente del número de copias del gen blanco (Yuen et al., 2017). Con estos nuevos sgARN, tampoco se logró obtener animales con mutaciones en *Crisp3*, lo cual podría atribuirse nuevamente a que la tercera base de la secuencia PAM correspondía a una timidina (Doench et al., 2014). Asimismo, las timidinas en el extremo 3' de la secuencia variable de 20 pb pueden producir variables erróneas del sgARN al promover la terminación temprana de la transcripción por parte de la RNA polimerasa III (Doench et al., 2014). Por su parte, mediante el uso del sgARN dirigido contra *Crisp1*, se logró obtener un animal con una delección de tres pares de bases. Si bien fue un logro a nivel técnico, la mutación solo eliminaba un codón y no corría el marco de lectura, haciendo que este animal no fuese útil para nuestros objetivos. En base a ello, y considerando que obtuvimos una baja frecuencia de animales con mutaciones (1 de 4) comparado con los reportes existentes (Wang et al., 2013, Yen et al., 2014), fue necesario buscar una tercera estrategia para conseguir animales deficientes en las cuatro proteínas CRISP. Para la elección de la siguiente estrategia nos basamos en un trabajo que concluía que el uso de dos sgARN dirigidos a sitios adyacentes en el mismo gen aumenta significativamente la probabilidad de delecciones que resulten deletéreas (Zhou et al., 2014). Utilizando dos sgARN dirigidos a dos sitios del exón 2 de *Crisp1* y *Crisp3*

obtuvimos una mayor proporción de animales con mutaciones (4 de 4) que, además, resultaron tener un tamaño tal que eran evidentes aún en geles de agarosa, consistente con la bibliografía (Zhou et al., 2014). En conjunto, el análisis de la eficiencia de todos los sgARN utilizados en los experimentos muestra que los que produjeron algún tipo de mutación estaban dirigidos contra una hebra del ADN, en tanto que aquellos que no tenían efecto estaban dirigidos contra la otra. Esta observación es consistente con un reporte en el que se concluye que la eficiencia de un sgARN depende de la hebra a la cual reconoce (Wang et al., 2014).

El análisis por secuenciación de las crías de uno de los animales confirmó la generación de grandes deleciones que incluyeron el sitio de inicio de la traducción tanto en *Crisp1* como en *Crisp3*. Cabe mencionar que no se observaron fenotipos inesperados que se pudieran asociar a la presencia de efectos *off-target* evidentes tanto en los animales nacidos de embriones microinyectados como en su descendencia, consistente con la baja probabilidad de que estos efectos ocurran en modelos de ratones (Mashiko et al., 2013, Pattanayak et al., 2013, Iyer et al., 2015, Hay et al., 2016). El hecho de utilizar embriones que eran KO para *Crisp2* para la microinyección, permitió tener en un mismo cromosoma las variantes KO para los tres genes (*Crisp1-3*), los cuales se comportan como un único alelo por estar muy cercanos. En conjunto, estas observaciones indican la exitosa generación de animales tanto TKO para *Crisp1-3*, como CKO para *Crisp1-4*.

Los machos TKO presentaron severos defectos en su fertilidad, confirmando la existencia de mecanismos compensatorios entre las proteínas CRISP que aseguran el éxito de la reproducción. La marcada disminución en el tamaño de la camada obtenida para el grupo TKO se debería, al menos en parte, a defectos en la fertilización ya que se observaron muy bajos porcentajes de fertilización *in vivo* utilizando hembras en estro. Tal como se mencionara anteriormente, ya se había detectado una leve sub-fertilidad en los animales DKO para *Crisp1* y *Crisp3* (Curci et al., 2017) que podría contribuir al fenotipo de los machos TKO observado. Sin embargo, la gran diferencia observada entre los TKO y los controles parece indicar que la falta adicional de CRISP2 incrementa notoriamente los defectos en fertilidad de estos animales, apoyando la relevancia de CRISP2 para la fertilidad. Por otra parte, los defectos en fertilidad y fertilización *in vivo* del animal TKO en el cual se observó un aumento del tamaño del epidídimo y niveles muy bajos de viabilidad y motilidad espermática podrían deberse a un cuadro de inflamación del tipo epidídimo-

orquitis, el cual ya había sido observado en algunos animales DKO para *Crisp1* y *Crisp4* en nuestro laboratorio (Carvajal et al, 2017). Sin embargo, los severos defectos en fertilidad y las fallas en la fertilización de los animales TKO sin fenotipo inflamatorio, y con niveles normales de viabilidad y motilidad espermática, confirman la idea de que las proteínas CRISP son relevantes para la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides y, por lo tanto, para la fertilidad del individuo.

Asimismo, el macho CKO analizado resultó ser infértil, presentar tracto reproductor normal y tener espermatozoides móviles que fueron incapaces de fertilizar ovocitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Pese a que en el laboratorio ya se habían observado algunos animales infértiles en la colonia DKO para *Crisp1* y *Crisp4*, esta infertilidad estaba asociada al cuadro de epidídimo-orquitis mencionado. Si bien no podemos descartar que en los futuros animales CKO que se generen aparezca alguno con fenotipo inflamatorio, el hecho de ya haber observado infertilidad sin cuadro de epidídimo-orquitis apoya nuestra hipótesis acerca de la relevancia de las proteínas CRISP para la fertilidad.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de animales deficientes en más de una proteína CRISP son interesantes, además, desde el punto de vista clínico ya que en humanos, los genes que codifican para las tres proteínas CRISP identificadas (CRISP1-3) se encuentran muy cercanos entre sí en el mismo cromosoma (cromosoma 6), en una región de menos de 200 kb (Zerbino, et al., 2017). Esto implica que una aberración cromosómica, tal como las descritas en dicha región (Paoloni-Giacobino et al., 2000; Olesen et al., 2001), podría afectar en simultáneo la expresión de los tres genes, siendo posible encontrar pacientes deficientes en todas las proteínas CRISP humanas. En conjunto, los resultados de esta parte de la Tesis Doctoral no solo aportan información valiosa acerca de la relevancia de la familia CRISP para la fertilidad y la fertilización, sino también plantean un caso exitoso en cuanto al uso de la novedosa tecnología CRISPR/Cas9 para producir la delección de más de un gen simultáneamente.

Conclusión



Tal como se mencionara anteriormente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la relevancia de la familia de proteínas CRISP para la fertilización y la fertilidad masculina. Los resultados obtenidos, utilizando una combinación de estrategias y modelos experimentales (ratones KO y humano), forman parte de los tres capítulos que comprenden esta Tesis Doctoral.

El primer objetivo específico consistió en estudiar la relevancia de la proteína CRISP2 para la fertilidad a través del empleo de ratones KO. La proteína testicular CRISP2 está presente en espermatozoides maduros y se ha propuesto que participa en la fusión de gametas en humanos y roedores. Además, existen evidencias en humanos que asocian una expresión aberrante de CRISP2 con defectos en la motilidad espermática (astenozoospermia) e infertilidad masculina. El análisis de los machos KO para *Crisp2* reveló que los mismos presentaban una fertilidad normal acompañada de niveles normales de fertilización *in vivo*. Sin embargo, los machos mutantes presentaron claros defectos en ambos parámetros reproductivos bajo condiciones de mayor exigencia tales como la reducción del número de espermatozoides como consecuencia de una vasectomía unilateral, o el apareo con hembras estimuladas hormonalmente, que ovulan un mayor número de ovocitos. Los ensayos de interacción de gametas *in vitro* mostraron que los espermatozoides KO tenían dificultades no solo para fusionarse con el ovocito sino también para penetrar las envolturas que lo rodean (*cumulus oophorus* y ZP). Consistentemente, los espermatozoides deficientes en CRISP2 mostraron menores niveles de HA, una motilidad vigorosa necesaria para la penetración de las envolturas, y un aumento exacerbado de los niveles de Ca^{2+} durante la capacitación. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de CRISP2 en el proceso de fusión y revelan un nuevo rol de la proteína en la penetración de las envolturas a través de la regulación de la HA, sugiriendo que defectos en la fertilización podrían ser la causa de la infertilidad en pacientes con expresión aberrante de CRISP2. La mayor parte de los resultados de este capítulo se encuentran incluidos en un trabajo publicado en la revista *Molecular Human Reproduction* (Brukman et al., 2016).

En base a las evidencias mencionadas mostrando menores niveles de CRISP2 en pacientes con astenozoospermia, y teniendo en cuenta la capacidad de CRISP2 de regular canales de Ca^{2+} , el segundo Capítulo de esta Tesis tuvo como objetivo estudiar si los menores niveles de expresión de CRISP2 encontrados en pacientes con problemas de

motilidad espermática, estaban asociados a defectos en la regulación del Ca^{2+} intracelular. Los resultados mostraron una asociación negativa entre el aumento de Ca^{2+} durante la capacitación y la expresión de CRISP2 indicando que, al igual que en roedores, esta proteína cumpliría un rol en la regulación de los niveles de Ca^{2+} en espermatozoides humanos pudiendo ser éste el mecanismo por el cual los espermatozoides humanos con menores niveles de CRISP2 presentan alteraciones en su motilidad. En segundo lugar, y con la idea de encontrar posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de espermatozoides con niveles anormales de Ca^{2+} tales como los que podrían presentar los pacientes con deficiencias en CRISP2, nos planteamos estudiar en profundidad la regulación de la concentración del Ca^{2+} durante la capacitación del espermatozoide humano. Los resultados mostraron que la inhibición de la vía de pTyr por exposición de los espermatozoides a un inhibidor de la quinasa PYK2 durante la capacitación disminuyó los niveles de Ca^{2+} a través de una bajada en la actividad de CatSper. Dicho efecto estaba asociado a una menor alcalinización del citoplasma, la cual es requerida para una completa activación del canal. Estos resultados sugieren un nuevo rol para la vía de pTyr en la regulación del Ca^{2+} a través de la modulación del pH. En conjunto, los resultados obtenidos en el modelo humano brindan mayor información acerca de la regulación de la capacitación espermática contribuyendo al desarrollo de nuevos métodos tanto de diagnóstico como de tratamiento de la infertilidad. La mayor parte de los resultados incluidos en este capítulo forman parte de un trabajo enviado a publicación.

Finalmente, dada la fertilidad normal de los ratones simples KO para *Crisp1* y *Crisp4* que apoya la existencia de mecanismos de compensación entre los diferentes CRISP, como tercer objetivo específico de esta Tesis nos planteamos estudiar el fenotipo reproductivo de ratones deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente. Por un lado, se estableció una colonia de ratones deficientes en CRISP2 y CRISP4 por apareo entre los KO simples para cada proteína. La fertilidad de los animales doble KO para *Crisp2* y *Crisp4* fue normal, al igual que lo observado para los KO simples de cada una de las proteínas, indicando que la falta simultánea de estas dos proteínas no sería suficiente para afectar este parámetro. Ante la posibilidad de que CRISP1 o CRISP3 estuviesen compensando la falta de CRISP2 y CRISP4, el próximo paso fue generar ratones deficientes en más miembros de la familia mediante la técnica CRISPR/Cas9. Los resultados confirmaron la exitosa generación de ratones triples KO para *Crisp1*, *Crisp2* y

Crisp3 como de ratones cuádruples KO deficientes en las cuatro CRISP. En estos casos, se observaron severos defectos en la fertilidad de los machos, asociados a menores niveles de fertilización tanto *in vivo* como *in vitro*, confirmando la relevancia de las proteínas CRISP para la fertilización y la fertilidad, como así también la existencia de mecanismos de cooperación funcional entre los miembros de esta familia.

El estudio de animales KO demostró ser de suma utilidad para el estudio de los roles funcionales de proteínas individuales así como de la acción conjunta de múltiples proteínas, lo cual es sumamente importante ya que los defectos en fertilidad en humanos pocas veces se deben a la alteración de un único gen. En este sentido, debido a la cercanía en el genoma de los genes que codifican para las tres proteínas CRISP humanas, es probable que existan individuos con alteraciones genéticas que afecten la expresión de los tres genes.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral confirman la relevancia de la familia CRISP para la fertilidad masculina, asociada a la participación de las mismas en el proceso de interacción de gametas. Consideramos que estas evidencias contribuirán a la identificación de moléculas claves para la fertilización y, por ende, al desarrollo de nuevos métodos tanto de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad como de regulación de la fertilidad.

Abreviaturas



BSA	Albúmina sérica bovina
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CASA	<i>Computer assisted sperm analysis</i>
CatSper	<i>Cation Channel of Spermatozoa</i>
CKO	Cuádruple knockout
COC	Complejo cúmulus-ovocito
CRISP	<i>Cysteine Rich Secretory Proteins</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DKO	Doble knockout
DMSO	Dimetilsulfóxido
FSC	<i>Forward scatter</i>
HA	Hiperactividad
HT	Heterocigota
Hv1	<i>Voltage-gated proton channel 1</i>
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
KO	Knockout
MT	Mutante
n.s.	No significativo
P4	Progesterona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
pTyr	Fosforilación en residuos Tyr
PYK2	<i>Protein Tyrosine Kinase 2</i>
RA	Reacción acrosomal
RIA	Radioinmunoensayo
RNE	<i>Redundant nuclear envelope</i>
RyR	<i>Ryanodine receptors</i>
sgARN	ARN guía
sAC	Soluble Adenylate Cyclase
SOCE	<i>Store operated calcium entry</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STORM	<i>Stochastic optical reconstruction microscopy</i>
TKO	Triple knockout
TRPM8	<i>Transient receptor potential M8</i>
WT	<i>Wild type</i>
ZP	Zona pellúcida

Bibliografía

Abraham A, Chandler DE. Tracing the Evolutionary History of the CAP Superfamily of Proteins Using Amino Acid Sequence Homology and Conservation of Splice Sites. *J Mol Evol.* 2017 Oct;85(3-4):137-157.

Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltrán JL, Treviño CL, Felix R, Darszon A. KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol.* 2006 Jan 15;289(2):395-405.

Adham IM, Nayernia K, Engel W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 1997;46:370–376.

Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod.* 2013 Dec;19(12):785-93.

Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S, Barratt CL. Ca²⁺ signals generated by CatSper and Ca²⁺ stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem.* 2013 Mar 1;288(9):6248-58.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff J, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science; 2002.

Alfieri JA1, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci.* 2003 Jun 1;116(Pt 11):2149-55.

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1095-104.

Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, De la Vega-Beltran JL, Da Ros VG, Greer PA, Darszon A, Krapf D, Salicioni AM, Cuasnicu PS, Visconti PE. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development.* 2016 Jul 1;143(13):2325-33.

Anahí Franchi N, Avendaño C, Molina RI, Tissera AD, Maldonado CA, Oehninger S, Coronel CE. beta-Microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. *Reproduction.* 2008 Aug;136(2):157-66.

Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, Andò S. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4753-61.

Aravindan RG, Fomin VP, Naik UP, Modelski MJ, Naik MU, Galileo DS, Duncan RL, Martin-Deleon PA. CASK interacts with PMCA4b and JAM-A on the mouse sperm flagellum to regulate Ca²⁺ homeostasis and motility. *J Cell Physiol.* 2012 Aug;227(8):3138-50.

Arévalo L, Brukman NG, Cuasnicú PS, Roldan ER. Comparative Evolutionary Analysis of Crisp Gene Sequences. En revisión.

Arts EG, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur J Biochem.* 1993 Nov 1;217(3):1001-9.

- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol.* 2008;52(5-6):463-72.
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci.* 2004 Jul 15;117(Pt 16):3645-57.
- Aumüller G, Renneberg H, Schiemann PJ, Wilhelm B, Seitz J, Konrad L, Wennemuth G. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:193-219.
- Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B.* 1951 Nov;4(4):581-96.
- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 1952 Aug 23;170(4321):326
- Austin CR. *Reproduction in Mammals.* 1972, University Press, Cambridge.
- Austin CR. The egg. Capítulo en *Reproduction in Mammals.* de C.R.Austin y R.V. Short. Cambridge University Press, 1982, pp. 46-62.
- Austin CR. Sperm maturation in the male and female genital tracts. Capítulo en *Biology of Fertilization.* de C.B.Metz y A.Monroy. New York: Academic Press. 1985. pp. 121-55.
- Avella MA, Xiong B, Dean J. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod.* 2013 May;19(5):279-89.
- Avella MA, Baibakov B, Dean J. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol.* 2014 Jun 23;205(6):801-9
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):30310-4.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development.* 2007 Mar;134(5):933-43.
- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci.* 2004 Jan 15;117(Pt 2):211-22.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.* 1991 Sep-Oct;12(5):323-30.
- Barón L, Fara K, Zapata-Carmona H, Zuñiga L, Kong M, Signorelli J, Díaz ES, Morales P. Participation of protein kinases and phosphatases in the progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa. *Andrology.* 2016 Nov;4(6):1073-1083.
- Barratt CL, Publicover SJ. Sperm are promiscuous and CatSper is to blame.... *EMBO J.* 2012 Apr 4;31(7):1624-6.
- Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation

and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod.* 2013 Sep;19(9):570-80.

Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 2014 Nov;20(11):1054-66.

Baumber J, Meyers SA. Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl.* 2006 Jul-Aug;27(4):578-87.

Baxendale RW, Fraser LR. Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 2003 Oct;66(2):181-9.

Bedford JM. Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs (Membrane fusion). En *Membrane surface reviews de G.Poste and G.L.Nicolson* Amsterdam: North-Holland. 1978, pp. 65-125.

Bedford JM. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004 May;79(2):429-60.

Bedford JM, Moore HD, Franklin LE. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res.* 1979 Mar 1;119(1):119-26.

Belleannée C. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian J Androl.* 2015 Sep-Oct;17(5):730-6.

Bellvé, D.A. The mammalian spermatozoon:structure and temporal assembly. Capítulo en *Mechanisms and control of animal fertilization de J.Hartman.* New York: Academic Press, 1983, pp. 55-137.

Belmonte SA, Mayorga LS, Tomes CN. The Molecules of Sperm Exocytosis. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;220:71-92.

Bendahmane M, Lynch C 2nd, Tulsiani DR. Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys.* 2001 Jun 1;390(1):1-8.

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 2014 Apr 24;508(7497):483-7.

Bianchi E, Wright GJ. Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Feb 5;370(1661):20140101.

Biggers JD. Metabolism of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1971 Suppl 14, 41-54.

Bigler D, Takahashi Y, Chen MS, Almeida EA, Osbourne L, White JM. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):11576-84.

Blaquier JA, Cameo MS, Burgos MH. The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology.* 1972 Mar;90(3):839-42.

Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strünker T. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J*. 2012 Apr 4;31(7):1654-65.

Brenker C, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Poetsch A, Xia XM, Bönigk W, Lingle CJ, Kaupp UB, Strünker T. The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife*. 2014 Mar 26;3:e01438.

Brukman NG, Miyata H, Torres P, Lombardo D, Caramelo JJ, Ikawa M, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Fertilization defects in sperm from Cysteine-rich secretory protein 2 (Crisp2) knockout mice: implications for fertility disorders. *Mol Hum Reprod*. 2016 Apr;22(4):240-51.

Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96, 79-84.

Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdiushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev*. 2012 Jan;79(1):4-18.

Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE, Krapf D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Dec; 1842(0): 2610–2620.

Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M, Dean J. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol*. 2012 Apr 2;197(1):37-44.

Busso D, Cohen DJ, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. *Mol Hum Reprod* 2005;11:299–305.

Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod*. 2007a Nov;77(5):848-54.

Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2007;76:701–708.

Cameo MS, Blaquier JA. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocrinol*. 1976 Apr;69(1):47-55.

Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009; Appendix 4: Appendix 4I.

Cameo MS, Blaquier JA. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocrinol*. 1976 Apr;69(1):47-55.

Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*. 1989 Mar;5(3):70-6.

Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*. 2005. 6, 507–512

Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 9;100(25):14864-8.

Carlson AE, Burnett LA, del Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, Moran MM, Babcock DF. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS One*. 2009 Aug 31;4(8):e6844.

Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*. 1996 Nov 25;180(1):284-96.

Carvajal G, Weigel Muñoz M, Brukman NG, Ikawa M, Okabe M, Cuasnicú PS. Characterization of CRISP4 knockout mice. *BIOCELL*. 2015. 39(suppl 3);23.

Carvajal G, Brukman NG, Weigel-Muñoz M, Battistone MA, Lustig L, Breton S, Cuasnicú PS. CRISP (cystein-rich secretory proteins) as novel regulators of epididymal epithelium differentiation and immunotolerance. *Medicina*. 2017. Vol. 17, sup. 1, p387.

Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, Ziyat A, Perez E, Pincet F, Gourier C. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*. 2014 Oct;141(19):3732-9.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951 Oct 20;168(4277):697-8.

Chang H, Suarez SS. Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biol Reprod*. 2011 Aug;85(2):296-305.

Chávez JC, Ferreira JJ, Butler A, De La Vega Beltrán JL, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM. SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem*. 2014 Nov 14;289(46):32266-75.

Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, José O, Torres P, Nishigaki T, Treviño CL, Darszon A. Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J Cell Physiol*. 2017 Nov 14.

Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):11830-5.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 2000 Jul 28;289(5479):625-8.

Cherr GN, Meyers SA, Yudin AI, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev Biol*. 1996 Apr 10;175(1):142-53.

Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science*. 1998 Sep 18;281(5384):1857-9.

- Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun*. 2011 Jan 11;2:153.
- Chung JJ, Shim SH, Everley RA, Gygi SP, Zhuang X, Clapham DE. Structurally Distinct Ca²⁺ Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility. *Cell*. 2014 May 8; 157(4): 808–822.
- Chung JJ, Miki K, Kim D, Shim SH, Shi HF, Hwang JY, Cai X, Iseri Y, Zhuang X, Clapham DE. CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife*. 2017 Feb 23;6.
- Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicú PS. Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev*. 2000 Jun;56(2):180-8.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicú PS. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod*. 2000 Aug;63(2):462-8.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M, Cuasnicu PS. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol Reprod*. 2001 Oct;65(4):1000-5.
- Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):737-42.
- Cohen DJ, Maldera JA, Weigel Muñoz M, Ernesto JI, Vasen G, Cuasnicu PS. Cysteine-rich secretory proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biol Res*. 2011;44(2):135-8.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339:819–23.
- Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*. 1998;53:119-36.
- Correia J, Michelangeli F, Publicover S. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction*. 2015 Aug;150(2):R65-76.
- Courtens JL, Courrot M, Flechon JE. The perinuclear substance of boar, bull ram and rabbit spermatozoa. *J Ultrastruct Res*. 1976. 57, 54-64.
- Cowan AE, Koppel DE, Vargas LA, Hunnicutt GR. Guinea pig fertilin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. *Dev Biol*. 2001 Aug 15;236(2):502-9.
- Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*. 2012 Dec;144(6):649-60.
- Crane LH, Martin L. Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy. *Reprod Fertil Dev*. 1991;3(6):685-98.

Crosby JA, Jones R, Barros C, Carvalho P. Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev.* 1998 Apr;49(4):426-34.

Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998 Jul;59(1):7-11.

Cuasnicú PS, González Echeverría F, Piazza AD, Cameo MS, Blaquier JA. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil.* 1984 Nov;72(2):467-71.

Cuasnicú PS, Conesa D, Rochwerger L. Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. In *Gamete interaction. Prospects for immunocontraception.*, N.J.Alexander, D.Griffin, J.M.Spieler, and G.M.H.Waites, eds. (New York: Wiley-Liss). 1990. pp. 143-153.

Cuasnicú PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch Med Res.* 2001 Nov-Dec;32(6):614-8.

Cuasnicú PS, Da Ros VG, Weigel Muñoz M, Cohen DJ. Acrosome Reaction as a Preparation for Gamete Fusion. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;220:159-72.

Curci L, Brukman NG, Rojo D, Da Ros VG, Rubinstein M, Cuasnicú PS. Generation of multiple knockouts for cysteine-rich secretory proteins using CRISPR/Cas9 technology. *Medicina.* 2017. Vol. 17, sup. 1, p439.

Da Ros VG, Munuce MJ, Cohen DJ, Marín-Briggiler CI, Busso D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol Reprod.* 2004 May;70(5):1325-32. Epub 2004 Jan 7.

Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol.* 2008 Aug 1;320(1):12-8.

Da Ros VG, Muñoz MW, Battistone MA, Brukman NG, Carvajal G, Curci L, Gómez-Ellas MD, Cohen DB, Cuasnicu PS. From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammalian fertilization. *Asian J Androl.* 2015 Sep-Oct;17(5):711-5

Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* 2006 Jun;131(6):977-88.

Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1305-55.

De La Vega-Beltran JL, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernandez-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, Visconti PE, Darszon A. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem.* 2012 Dec 28;287(53):44384-93.

de Lamirande E, Gagnon C. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod.* 2002 Feb;8(2):124-35.

Dean MD. Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003185.

Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 1996 Dec;137(12):5337-43.

Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7001-9.

Desseyn JL, Burton KA, McKnight GS. Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6433-8.

Diaz-Perez E, Thomas P, Meizel S. Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. *J Exp Zool.* 1988. 248, 213-21.

Diaz-Perez E, Meizel S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Mol Reprod Dev.* 1992. 31, 122-30.

Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(12):1262-7.

Domagała A, Pulido S, Kurpisz M, Herr JC. Application of proteomic methods for identification of sperm immunogenic antigens. *Mol Hum Reprod.* 2007 Jul;13(7):437-44.

Dorin JR. Novel phenotype of mouse spermatozoa following deletion of nine β -defensin genes. *Asian J Androl.* 2015 Sep-Oct;17(5):716-9.

Drabent B, Saftig P, Bode C, Doenecke D. Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem Cell Biol.* 2000;113:433-442.

Du Y, Huang X, Li J, Hu Y, Zhou Z, Sha J. Human testis specific protein 1 expression in human spermatogenesis and involvement in the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril.* 2006;85:1852-1854.

Ducibella T. Mammalian egg cortical granules and cortical reaction. Capítulo en: *Elements of mammalian fertilization.* Wassarman PM. 1991, Boca Raton, Florida.: CRC Press, pp. 205-31.

Ducibella T, Duffy P, Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod.* 1994 Mar;50(3):467-73.

Ebensperger C, Barros C. Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. *Gam Res.* 1984. 9, 387-97.

Eddy EM, O'Brien D.A. The spermatozoon. Capítulo en *The Physiology of Reproduction* de E. Knobil y J.D. Neill. New York: Raven Press. 1994, pp. 29-78.

Edgar DH, Whalley KM, Mills JA. Effects of high-dose and multiple-dose gonadotropin stimulation on mouse oocyte quality as assessed by preimplantation development following in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987;4:273–276.

Ellerman DA, Brantúa VS, Martínez SP, Cohen DJ, Conesa D, Cuasnicú PS. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol Reprod*. 1998 Nov;59(5):1029-36.

Ellerman DA, Da Ros VG, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Cuasnicú PS. Expression and structure-function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biol Reprod*. 2002 Oct;67(4):1225-31.

Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicu PS. Sperm protein 'DE' mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Dev Biol* 2006;297:228–237.

Ellerman DA, Busso D, Maldera JA, Cuasnicú PS. Immunocontraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. *Fertil Steril*. 2008 Jan;89(1):199-205.

Ellerman DA, Cohen DJ, Weigel Muñoz M, Da Ros VG, Ernesto JI, Tollner TL, Cuasnicu PS. Immunologic behavior of human cysteine-rich secretory protein 1 (hCRISP1) in primates: prospects for immunocontraception. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2551-6.

Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 1979. 281, 483-4.

Ernesto JI, Weigel Muñoz M, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G, Figueiras-Fierro D, De la Vega-Beltran JL, Moreno IA, Guidobaldi HA, Giojalas L, Darszon A, Cohen DJ, Cuasnicú PS. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol*. 2015 Sep 28; 210(7): 1213–1224.

Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci*. 2012 Jan 15;125(Pt 2):473-85.

Eposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2993-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5180.

Evans J, D'Sylva R, Volpert M, Jamsai D, Merriner DJ, Nie G, Salamonsen LA, O'Bryan MK. Endometrial CRISP3 is regulated throughout the mouse estrous and human menstrual cycle and facilitates adhesion and proliferation of endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*. 2015 Apr;92(4):99.

Fiedler SE, Dudiki T, Vijayaraghavan S, Carr DW. Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. *Biol Reprod*. 2013 Feb 21;88(2):41.

Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 19):3543-55.

Florman HM, Fissore RA. Fertilization in mammals. Capítulo de: Physiology of Reproduction por E. Knobil y J.D. Neill, Academic Press, 4ta edición, 2015, pp.149-196.

Foster JA, Gerton GL. Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol Reprod Dev* 1996;44:221–229.

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

Fraser LR, Harrison RA, Herod JE. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990 May;89(1):135-48.

Frenette G, Sullivan R. Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev*. 2001 May;59(1):115-21.

Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Selected proteins of "protasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod*. 2002. 67, 308-13.

Frenette G, Legare C, Saez F, Sullivan R. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod*. 2005. 11, 575-82.

Fraser LR, Drury LM. The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol Reprod* 1975;13:513–518.

Freeman B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction*. 2003, 125, 635-43.

Fouquet JP, Kann ML. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell*. 1994. 81, 89-93.

Fulcher KD, Mori C, Welch JE, O'Brien DA, Klapper DG, Eddy EM. Characterization of Fsc1 cDNA for a mouse sperm fibrous sheath component. *Biol Reprod*. 1995 Jan;52(1):41-9.

Furlong LI, Hellman U, Krimer A, Tezón JG, Charreau EH, Vazquez-Levin MH. Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol Reprod*. 2000 Mar;62(3):606-15.

Gadella BM, Flesch FM, van Golde LM, Colenbrander B. Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q*. 1999 Oct;21(4):142-6.

Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*. 2000 Jun;127(11):2407-20.

Gaddum-Rosse P. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat*. 1985 Nov;174(3):347-56.

Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod*. 1997 Mar;56(3):707-19.

Garberi JC, Kohane AC, Cameo MS, Blaquier JA. Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 1979 Jan;13(1):73-82.

Garberi JC, Fontana JD, Blaquier JA. Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int J Androl.* 1982 Dec;5(6):619-26.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:E2579–86.

Geng Y, Ferreira JJ, Dzikunu V, Butler A, Lybaert P, Yuan P, Magleby KL, Salkoff L, Santi CM. A genetic variant of the sperm-specific SLO3 K⁺ channel has altered pH and Ca²⁺ sensitivities. *J Biol Chem.* 2017 May 26;292(21):8978-8987.

Gibbs GM, Scanlon MJ, Swarbrick J, Curtis S, Gallant E, Dulhunty AF, O'Bryan MK. The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem.* 2006 Feb 17;281(7):4156-63.

Gibbs GM, Bianco DM, Jamsai D, Herlihy A, Ristevski S, Aitken RJ, Kretser DM, O'Bryan MK. Cysteine-rich secretory protein 2 binds to mitogen-activated protein kinase kinase 11 in mouse sperm. *Biol Reprod.* 2007 Jul;77(1):108-14.

Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):865-97.

Gibbs GM, Orta G, Reddy T, Koppers AJ, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Lo JC, Veldhuis N, Jamsai D, McIntyre P, Darszon A, O'Bryan MK. Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:7034–7039.

Giese A, Jude R, Kuiper H, Raudsepp T, Piumi F, Schambony A, Guerin G, Chowdhary BP, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene* 2002;299:101–109.

Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-Deleon PA. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev.* 2008. 75, 1627-36.

Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* 1993 Dec 28;336(3):545-8.

Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod.* 1985 Feb;32(1):145-53.

González-Fernández L, Macías-García B, Loux SC, Varner DD, Hinrichs K. Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol Reprod.* 2013 Jun 6;88(6):138.

Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Giojalas LC. Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction.* 2012 May;143(5):587-96.

Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem*. 2005 Apr 1;280(13):12405-12.

Haendler B, Krätzschar J, Theuring F, Schleuning WD. Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology*. 1993 Jul;133(1):192-8.

Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, Leeb T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet*. 2007 Jun;38(3):259-64.

Hamamah S, Gatti JL. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod*. 1998 Dec;13 Suppl 4:20-30.

Hanada A, Chang MC. Penetration of zone-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod*. 1972 Apr;6(2):300-9.

Hardy DM, Huang TT Jr, Driscoll WJ, Tung KK, Wild GC. Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1988;38:423-437.

Hardy DM1, Oda MN, Friend DS, Huang TT Jr. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem J*. 1991 May 1;275 (Pt 3):759-66.

Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca²⁺]_i oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 2004;279:46315-46325.

Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 2005 Jan 15;63(2):342-51.

Hay EA, Khalaf AR, Marini P, Brown A, Heath K, Sheppard D, MacKenzie A. An analysis of possible off target effects following CAS9/CRISPR targeted deletions of neuropeptide gene enhancers from the mouse genome. *Neuropeptides*. 2017 Aug;64:101-107.

He ZY, Brakebusch C, Fässler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol*. 2003 Feb 15;254(2):226-37.

Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Oct;6(10):801-11

Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*. 2006 Mar 3;281(9):5623-33.

Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev*. 2002 Nov;63(3):394-410.

Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. The "soluble" adenylyl

cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell*. 2005 Aug;9(2):249-59.

Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS, Smith RJ. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet*. 2010 Nov;18(11):1178-84.

Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R. The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. *Biol Reprod*. 2016 Sep;95(3):50.

Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil*. 1980 Nov;60(2):291-4.

Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol*. 2002 Oct 1;250(1):208-17.

Ho HC, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod*. 2003 May;68(5):1590-6.

Ho K, Wolff CA, Suarez SS. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(2):345-50.

Hondares E, Brown MA, Musset B, Morgan D, Cherny VV, Taubert C, Bhamrah MK, Coe D, Marelli-Berg F, Gribben JG, Dyer MJ, DeCoursey TE, Capasso M. Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 16;111(50):18078-83.

Holt WV, Fazeli A. Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Mol Hum Reprod*. 2015 Jun;21(6):491-501.

Hoodbhoy T, Dean J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*. 2004 Apr;127(4):417-22.

Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci*. 2001 Nov;114(Pt 22):4127-36.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262-78.

Huang L, Haratake K, Miyahara H, Chiba T. Proteasome activators, PA28 γ and PA200, play indispensable roles in male fertility. *Sci Rep*. 2016 Mar 22;6:23171.

Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest*. 2010;120:984-94.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):234-8.

Inoue N, Yamaguchi R, Ikawa M, Okabe M. Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;65:363-71.

Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 13;108(50):20008-11

Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, Skarnes WC. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods*. 2015 Jun;12(6):479.

Iwamatsu T, Chang MC. Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J Reprod Fertil*. 1972 Nov;31(2):237-47.

Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod*. 2005 May;72(5):1268-74.

Jamsai D, Bianco DM, Smith SJ, Merriner DJ, Ly-Huynh JD, Herlihy A, Niranjan B, Gibbs GM, O'Bryan MK. Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. *Reproduction*. 2008 Jun;135(6):751-9.

Jamsai D, Rijal S, Bianco DM, O'Connor AE, Merriner DJ, Smith SJ, Gibbs GM, O'Bryan MK. A novel protein, sperm head and tail associated protein (SHTAP), interacts with cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) during spermatogenesis in the mouse. *Biol Cell*. 2009 Nov 16;102(2):93-106.

Jarnaess E, Taskén K. Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):931-7.

Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):10946-51.

Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA. Structural biology. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*. 2015 Jun 26;348(6242):1477-81.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 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*. 2011 Mar 22;108(12):4892-6.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816–21.

Jing XW, Xing RW, Zhou QZ, Yu QF, Guo WB, Chen SM, Chu QJ, Feng CQ, Mao XM. Expressions of cysteine-rich secretory protein 2 in asthenospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011;17:203–207.

Johnson MH, Eager D, Muggleton-Harris A, Grave HM. Mosaicism in organisation concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature*. 1975 Sep 25;257(5524):321-2.

Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 May;77(5):2772-6.

Judd JE, Berndtson WE, Castro AC. Extragonadal sperm reserves, sperm-depletion rates, numbers of sperm per mating, and fertility with successive matings by intact or unilaterally vasectomized rats. *J Androl* 1997;18:698–707.

Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet.* 2000 Mar;24(3):279-82.

Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol.* 2006 Sep 29;362(4):623-39.

Kasahara M, Figueroa F, Klein J. Random cloning of genes from mouse chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3325–3328.

Kasahara M, Gutknecht J, Brew K, Spurr N, Goodfellow PN. Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 1989;5:527–534.

Kauffmanstein G, Pelletier J, Lavoie EG, Kukulski F, Martín-Satué M, Dufresne SS, Frenette J, Ribas Fürstenau C, Sereda MJ, Toutain B, Henrion D, Sullivan R, Vial C, Sévigny J. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 ectonucleotidase is required for normal vas deferens contraction and male fertility through maintaining P2X1 receptor function. *J Biol Chem.* 2014 Oct 10;289(41):28629-39.

Kawano N, Kang W, Yamashita M, Koga Y, Yamazaki T, Hata T, Miyado K, Baba T. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod.* 2010 Sep;83(3):359-69.

Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11):4145-50.

Kim KS, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol.* 2003. 264, 141-52.

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 13;102(50):18028-33.

Kim T, Oh J, Woo JM, Choi E, Im SH, Yoo YJ, Kim DH, Nishimura H, Cho C. Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse. *Biol Reprod.* 2006 Apr;74(4):744-50.

Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod.* 1996 Mar;2(3):177-84.

Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):737-40.

Klinovska K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci.* 2014 Jun 13;15(6):10652-68.

Kohane AC, Cameo MS, Piñeiro L, Garberi JC, Blaquier JA. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod.* 1980 Aug;23(1):181-7.

Kota V, Rai P, Weitzel JM, Middendorff R, Bhande SS, Shivaji S. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol Reprod Dev.* 2010 Sep;77(9):773-83.

Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem.* 2010 Mar 12;285(11):7977-85.

Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* 1996;236:827–836.

Kulanand J, Shivaji S. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia.* 2001 Mar;33(2):95-104.

La Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol.* 2016 Mar 15;411(2):172-182

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.

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

Lea IA, Richardson RT, Widgren EE, O'Rand MG. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human sperm protein, Sp17. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jul 17;1307(3):263-6.

Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 2000 Jan 14;287(5451):319-21.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod.* 1996 Sep;55(3):684-92.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(4):643-56.

Leclerc P, Goupil S. Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inhibition by Ca(2+). *Biol Reprod.* 2002 Jul;67(1):301-7.

Lefièvre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl.* 2002 Sep-Oct;23(5):709-16.

Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*. 2004 Jul;19(7):1580-6.

Lefièvre L, Nash K, Mansell S, Costello S, Punt E, Correia J, Morris J, Kirkman-Brown J, Wilson SM, Barratt CL, Publicover S. 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca(2+) signals in human sperm. *Biochem J*. 2012 Dec 1;448(2):189-200.

Légaré C, Bérubé B, Boué F, Lefièvre L, Morales CR, El-Alfy M, Sullivan R. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev*. 1999 Feb;52(2):225-33.

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):737-45.

Li Y, Sosnik J, Brassard L, Reese M, Spiridonov NA, Bates TC, Johnson GR, Anguita J, Visconti PE, Salicioni AM. Expression and localization of five members of the testis specific serine kinase (Tssk) family in mouse and human sperm and testis. *Mol Hum Reprod*. 2011. 17, 42-56.

Li W, Guo XJ, Teng F, Hou XJ, Lv Z, Zhou SY, Bi Y, Wan HF, Feng CJ, Yuan Y, Zhao XY, Wang L, Sha JH, Zhou Q. Tex101 is essential for male fertility by affecting sperm migration into the oviduct in mice. *J Mol Cell Biol*. 2013 Oct;5(5):345-7.

Li X, Wang L, Li Y, Zhao N, Zhen L, Fu J, Yang Q. Calcium regulates motility and protein phosphorylation by changing cAMP and ATP concentrations in boar sperm in vitro. *Anim Reprod Sci*. 2016 Sep;172:39-51.

Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol*. 1994 Jun;125(5):1157-63.

Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):327-37.
Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*. 2010 Dec 1;588(Pt 23):4667-72.

Lishko P, Kirichok Y. Signaling the differences between cilia. *Elife*. 2015 Dec 23;4. pii: e12760.

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

Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:453-75.

Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):18945-52. Epub 2007 May 3.

Livera G, Xie F, Garcia MA, Jaiswal B, Chen J, Law E, Storm DR, Conti M. Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol Endocrinol*. 2005 May;19(5):1277-90

Lopez E, Jardin I, Berna-Erro A, Bermejo N, Salido GM, Sage SO, Rosado JA, Redondo PC. STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1315-22.

Lopez LC, Shur BD. Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J Cell Biol*. 1987 Oct;105(4):1663-70.

López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi CM, Darszon A, Treviño CL. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*. 2014 Jul;20(7):619-29.

Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1996 Jul;55(1):207-16.

Luconi M, Krausz C, Barni T, Vannelli GB, Forti G, Baldi E. Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1998 Mar;4(3):251-8.

Maeda T, Sakashita M, Ohba Y, Nakanishi Y. Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:140–146.

Maeda T, Nishida J, Nakanishi Y. Expression pattern, subcellular localization and structure—function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Dev Growth Differ* 1999;41:715–722.

Magdaleno L, Gasset M, Varea J, Schambony AM, Urbanke C, Raida M, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett*. 1997 Dec 29;420(2-3):179-85.

Maldera J, Fornes MW, Cuasnicú PS. Participación de los epididimosomas en el mecanismo de asociación de DE al espermatozoide. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 51-228.

Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Weigel-Muñoz M, Cohen DJ, Cuasnicu PS. Evidence for the involvement of zinc in the association of CRISP1 with rat sperm during epididymal maturation. *Biol Reprod*. 2011 Sep;85(3):503-10.

Maldera JA, Weigel Muñoz M, Chirinos M, Busso D, G E Raffo F, Battistone MA, Blaquier JA, Larrea F, Cuasnicu PS. Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Mol Hum Reprod*. 2014 Apr;20(4):341-9.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339:823–6.

Mahony MC, Gwathmey T. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod*. 1999 May;60(5):1239-43.

Maňásková-Postlerová P, Davidová N, Sulc M, Philimonenko A, Hozák P, Jonáková V. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine beta-microseminoprotein. *Cell Tissue Res*. 2011 May;344(2):341-53.

Mannowetz N, Naidoo NM, Choo SA, Smith JF, Lishko PV. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife*. 2013 Oct 8;2:e01009.

Mannowetz N, Miller MR, Lishko PV. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 30;114(22):5743-5748.

Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría F, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril*. 2003 Jun;79(6):1396-403.

Martínez-López P, Treviño CL, de la Vega-Beltrán JL, De Blas G, Monroy E, Beltrán C, Orta G, Gibbs GM, O'Bryan MK, Darszon A. TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J Cell Physiol*. 2011 Jun;226(6):1620-31.

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013 Nov 27;3:3355.

Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie AA, Sánchez-Guevara Y, Treviño MB, Treviño CL. Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp*. 2013 May 24;(75):e50344.

Matamoras-Volante A, Moreno-Irusta A, Torres-Rodriguez P, Giojalas L, Gervasi MG, Visconti PE, Treviño CL. Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*. 2017 Nov 25.

Means AR, Tash JS, Chafouleas JG, Lagace L, Guerriero V. Regulation of the cytoskeleton by Ca²⁺-calmodulin and cAMP. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;383:69-84.

Miller DJ, Gong X, Shur BD. Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development*. 1993 Aug;118(4):1279-89.

Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J Cell Biol*. 2000 Jun 12;149(6):1289-96.

Miller MR, Mansell SA, Meyers SA, Lishko PV. Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium*. 2015 Jul;58(1):105-13.

Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*. 2016 Apr 29;352(6285):555-9.

Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):12921-6.

Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. 2015 Oct 23;350(6259):442-5.

Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 12;113(28):7704-10.

Mizuki N, Sarapata DE, Garcia-Sanz JA, Kasahara M. The mouse male germ cell-specific gene *Tpx-1*: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm Genome* 1992;3:274–280.

Mizuki N, Kasahara M. Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol Cell Endocrinol*. 1992 Nov;89(1-2):25-32.

Moreno-Mateos MA, Vejnár CE, Beaudoin JD, Fernández JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Oct;12(10):982-8.

Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 1990;11, 195-203.

Müller K, Pomorski T, Müller P, Zachowski A, Herrmann A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*. 1994. 33, 9968-74.

Munoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol*. 2001 Jun 1;234(1):261-74.

Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Luconi M, Baldi E. Markers of human sperm functions in the ICSI era. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jan 1;16:1344-63.

Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol Reprod*. 2016 Apr;94(4):80.

Musset B, Smith SM, Rajan S, Cherny VV, Morgan D, DeCoursey TE. Oligomerization of the voltage-gated proton channel. *Channels (Austin)*. 2010 Jul-Aug;4(4):260-5.

Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod*. 1997 Feb;56(2):320-7.

Nakamura BN, Fielder TJ, Hoang YD, Lim J, McConnachie LA, Kavanagh TJ, Luderer U. Lack of maternal glutamate cysteine ligase modifier subunit (*Gclm*) decreases oocyte glutathione concentrations and disrupts preimplantation development in mice. *Endocrinology* 2011;152:2806–2815.

Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Toshimori K, Okabe M. Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev Biol*. 2001 Sep 1;237(1):222-31.

Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary Critical Functions of

Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. *PLoS Genet.* 2017 Jan 23;13(1):e1006578.

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril.* 1999 May;71(5):919-23.

Navarrete FA, García-Vázquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cárdenas C, Salicioni AM, Darszon A, Visconti PE. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2015 Aug;230(8):1758-1769

Naz RK, Ahmad K, Kumar R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J Cell Sci.* 1991 May;99 (Pt 1):157-65.

Nimlamool W, Bean BS, Lowe-Krentz LJ. Human sperm CRISP2 is released from the acrosome during the acrosome reaction and re-associates at the equatorial segment. *Mol Reprod Dev* 2013;80:488–502.

Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 1;450(3):1149-58.

Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol.* 2001 May 1;233(1):204-13.

Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34957-62.

Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 14;101(37):13483-8.

Nolan MA, Wu L, Bang HJ, Jelinsky SA, Roberts KP, Turner TT, Kopf GS, Johnston DS. Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol Reprod.* 2006 May;74(5):984-91.

Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, Oji A, Ikawa M. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Sci Rep.* 2018 Jan 22;8(1):1315.

O'Bryan MK, Loveland KL, Herszfeld D, McFarlane JR, Hearn MT, de Kretser DM. Identification of a rat testis-specific gene encoding a potential rat outer dense fibre protein. *Mol Reprod Dev* 1998;50:313–322.

O'Bryan MK, Sebire K, Meinhardt A, Edgar K, Keah HH, Hearn MT, De Kretser DM. Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acrosome of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2001;58:116–125.

Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 2013 140: 4471-4479

Okabe M. Mechanism of Fertilization: A Modern View. *Exp Anim.* 2014; 63(4): 357–365.

Okabe M. Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian J Androl.* 2015 Jul-Aug; 17(4): 646–652.

Okabe M, Cummins JM. Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(15):1945-58.

Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33742-50.

Olesen C, Hansen C, Bendtsen E, Byskov AG, Schwinger E, Lopez-Pajares I, Jensen PK, Kristoffersson U, Schubert R, Van Assche E, Wahlstroem J, Lespinasse J, Tommerup N. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol Hum Reprod.* 2001 Jan;7(1):11-20.

Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat.* 1985 Nov;174(3):269-83.

O'Rand MG, Welch JE, Fisher SJ. Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. *Adv Exp Med Biol.* 1986;205:131-44.

Organización Mundial de la Salud. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. Geneva, Switzerland:World Health Organization Press. 2010.

Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod.* 1999 Nov;5(11):1017-26.

Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, Svindrych Z, Hagen GM. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics.* 2014 Aug 15;30(16):2389-90.

Paoloni-Giacobino A, Kern I, Rumpler Y, Djelati R, Morris MA, Dahoun SP. Familial t(6;21)(p21.1;p13) translocation associated with male-only sterility. *Clin Genet.* 2000 Oct;58(4):324-8.

Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, Barone C, Galileo DS, Strehler EE, Martin-DeLeon PA. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biol Reprod.* 2013 Jul 11;89(1):6.

Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):839-43.

Peitz B, Olds-Clarke P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod.* 1986 Oct;35(3):608-17.

Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J.* 2016 Apr;283(7):1218-31.

Perez Martinez S, Conesa D, Cuasnicú PS. Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J Reprod Immunol.* 1995 May;29(1):31-45.

Pfisterer P, König H, Hess J, Lipowsky G, Haendler B, Schleuning WD, Wirth T. CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov;16(11):6160-8.

Philpott CC, Ringuette MJ, Dean J. Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev Biol.* 1987 Jun;121(2):568-75.

Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod.* 2003 Apr;68(4):1208-14.

Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol.* 1985 Dec;101(6):2239-44.

Puga Molina LC, Pinto NA, Torres Rodríguez P, Romarowski A, Vicens Sanchez A, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL, Buffone MG. Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J Cell Physiol.* 2017 Jun;232(6):1404-1414.

Quill TA, Wang D, Garbers DL. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. *Mol Cell Endocrinol.* 2006. 250, 84-92.

Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5;106(18):7642-7.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281-2308.

Rankin T, Familiarì M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development.* 1996, 122, 2903-10.

Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development.* 1999. 126, 3847-55.

Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development.* 2001. 128, 1119-26.

Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell.* 2003 Jul;5(1):33-43.

Ravaux B, Garroum N, Perez E, Willaime H, Gourier C. A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci Rep.* 2016 Aug 19;6:31886.

Raz T, Shalgi R. Early events in mammalian egg activation. *Hum Reprod.* 1998 Dec;13 Suppl 4:133-45.

Reddy T, Gibbs GM, Merriner DJ, Kerr JB, O'Bryan MK. Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Dev Dyn.* 2008 Nov;237(11):3313-23.

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

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001 Oct 11;413(6856):603-9.

Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. Capítulo en: Knobil E, Neill J, editores. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press; 1988. pp. 999–1080.

Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod.* 2003 Aug;69(2):572-81. Epub 2003 Apr 16.

Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature.* 1986 Oct 2-8;323(6087):445-8.

Rochwerger L, Cuasnicu PS. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jan;31(1):34-41.

Rochwerger L, Cohen DJ, Cuasnicú PS. Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol.* 1992 Sep;153(1):83-90.

Rogers BJ, Van Campen H, Ueno M, Lambert H, Bronson R, Hale R. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril.* 1979 Dec;32(6):664-70.

Roller RJ, Kinloch RA, Hiraoka BY, Li SS, Wassarman PM. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development.* 1989 Jun;106(2):251-61.

Rotman T, Etkovitz N, Spiegel A, Rubinstein S, Breitbart H. Protein kinase A and protein kinase C(alpha)/PPP1CC2 play opposing roles in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction.* 2010 Jul;140(1):43-56.

Ruknudin A, Silver IA. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol Reprod Dev.* 1990;26:63–68.

Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update.* 2015 Nov-Dec;21(6):711-26.

Saling PM, Storey BT. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol.* 1979 Dec;83(3):544-55.

Sánchez-Carranza O, Torres-Rodríguez P, Darszon A, Treviño CL, López-González I. Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 23;466(3):554-9

Sanders JR, Swann K. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction.* 2016 Aug;152(2):R41-50.

- Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* 2010 Mar 5;584(5):1041-6.
- Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci.* 2012 Nov 1;125(Pt 21):4985-90.
- Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl.* 2007 Sep-Oct;28(5):706-16.
- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch KP, Neyses L. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28220-6.
- Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 100:12201–12206.
- Schwidetzky U, Haendler B, Schleuning WD. Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) gene. *Biochem J.* 1995 Aug 1;309 (Pt 3):831-6.
- Serres C, Feneux D, Berthon B. Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1991;18(3):228-40.
- Shalgi R, Phillips DM. Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol Reprod.* 1980 Sep;23(2):433-44.
- Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod.* 1999 Dec;61(6):1445-51.
- Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod.* 1999 Jul;61(1):240-6.
- Si Y, Olds-Clarke P. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1231-9.
- Sidhu KS, Mate KE, Gunasekera T, Veal D, Hetherington L, Baker MA, Aitken RJ, Rodger JC. A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction.* 2004 Jan;127(1):95-103.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9. Erratum en: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):216.
- Smith FD, Scott JD. Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur J Cell Biol.* 2006 Jul;85(7):585-92.
- Smith JF, Syrityna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 23;110(17):6823-8.

Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):174-9

Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci.* 2009 Aug 1;122(Pt 15):2741-9.

Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 1995;53:1280–1285.

Stein KK, Primakoff P, Myles D. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2004 Dec 15;117(Pt 26):6269-74.

Stein KK, Go JC, Primakoff P, Myles DG. Defects in secretory pathway trafficking during sperm development in Adam2 knockout mice. *Biol Reprod* 2005;73:1032–1038.

Stival C, Puga Molina Ldel C, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;220:93-106.

Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature.* 2011 Mar 17;471(7338):382-6.

Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 1992;46:686–691.

Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl.* 1996 Jul-Aug;17(4):331-5.

Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2006 Jan-Feb;12(1):23-37.

Suarez SS. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 2016 Jan;363(1):185-94

Sunagar K, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A. Evolution of CRISPs associated with toxicoforan-reptilian venom and mammalian reproduction. *Mol Biol Evol.* 2012 Jul;29(7):1807-22.

Sutovsky P. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med.* 2009 Apr 1;11:e11.

Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol.* 1999 Aug 23;146(4):893-904.

Takano H, Yanagimachi R, Urch UA. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote.* 1993. 1, 79-91.

Talbot P. Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat.* 1985 Nov;174(3):331-46.

Tamburrino L, Marchiani S, Vicini E, Muciaccia B, Cambi M, Pellegrini S, Forti G, Muratori M, Baldi E. Quantification of CatSper1 expression in human spermatozoa and relation to functional parameters. *Hum Reprod.* 2015 Jul;30(7):1532-44.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2002. 61, 414-24.

Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):784-92.

Tarnasky H, Cheng M, Ou Y, Thundathil JC, Oko R, van der Hoorn FA. Gene trap mutation of murine outer dense fiber protein-2 gene can result in sperm tail abnormalities in mice with high percentage chimaerism. *BMC Dev Biol.* 2010;10:67.

Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol.* 1988 May;106(5):1625-33.

Tateno H, Krapf D, Hino T, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 12;110(46):18543-8.

Tauseef M, Vogel S, Dietrich A, Malik A, Birnbaumer L, Mehta D. Tyrosine phosphorylation of STIM1 induced by TRPC6-Pyk2 cascade regulates store-operated calcium entry and endothelial permeability. *The FASEB Journal* 2011 25:1_supplement, 1082.4-1082.4.

Taylor SS, Zhang P, Steichen JM, Keshwani MM, Kornev AP. PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1834(7):1271-8.

Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M, Sullivan R. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod.* 2008 Aug; 23(8):1698-707.

Tomes CN. The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model. *Biochem J.* 2015 Feb 1;465(3):359-70.

Torres-Flores V, Hernández-Rueda YL, Neri-Vidaurre Pdel C, Jiménez-Trejo F, Calderón-Salinas V, Molina-Guarneros JA, González-Martínez MT. Activation of protein kinase A stimulates the progesterone-induced calcium influx in human sperm exposed to the phosphodiesterase inhibitor papaverine. *J Androl.* 2008 Sep-Oct;29(5):549-57.

Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, González-Martínez MT. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod.* 2011 Oct;26(10):2626-35.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.

Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):731-6.

- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 2000 Jul;29(1):52, 54.
- Turunen HT, Sipilä P, Krutskikh A, Toivanen J, Mankonen H, Hämäläinen V, Björkgren I, Huhtaniemi I, Poutanen M. Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biol Reprod*. 2012 Jan 16;86(1):1-8.
- Tsuchida M, Manthei ER, Alam T, Knechtle SJ, Hamawy MM. T cell activation up-regulates the expression of the focal adhesion kinase Pyk2: opposing roles for the activation of protein kinase C and the increase in intracellular Ca²⁺. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6640-50.
- Udby L, Cowland JB, Johnsen AH, Sørensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *J Immunol Methods*. 2002 May 1;263(1-2):43-55.
- Udby L, Sørensen OE, Pass J, Johnsen AH, Behrendt N, Borregaard N, Kjeldsen L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha1B-glycoprotein in human plasma. *Biochemistry*. 2004 Oct 12;43(40):12877-86.
- Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall A, Cowland JB, Borregaard N, Kjeldsen L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl* 2005;26:333–342.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod*. 2001 May;64(5):1350-7.
- Urner F, Sakkas D. Reproduction. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. 2003 Jan;125(1):17-26
- Valansi C, Moi D, Leikina E, Matveev E, Graña M, Chernomordik LV, Romero H, Aguilar PS, Podbilewicz B. Arabidopsis HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens. *J Cell Biol*. 2017 Mar 6;216(3):571-581.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*. 2005 Aug;11(8):583-90.
- van Gestel RA, Brouwers JF, Ultee A, Helms JB, Gadella BM. Ultrastructure and lipid composition of detergent-resistant membranes derived from mammalian sperm and two types of epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 2016 Jan;363(1):129-45.
- Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol Endocrinol*. 1999 May;13(5):705-17.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995 Apr;121(4):1129-37.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 1995 Apr;121(4):1139-50.

Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezón JG. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod.* 1999 Jul;61(1):76-84.

Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 2002 Jan;53(1-2):133-50.

Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan 20; 106(3): 667–668.

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

Wandernoth PM, Mannowetz N, Szczyrba J, Grannemann L, Wolf A, Becker HM, Sly WS, Wennemuth G. Normal Fertility Requires the Expression of Carbonic Anhydrases II and IV in Sperm. *J Biol Chem.* 2015 Dec 4;290(49):29202-16.

Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na⁺/H⁺-exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol.* 2003. 5:1117–1122

Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104:9325–9330

Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod.* 2009 Sep;81(3):539-44.

Wang HX, Kolesnikova TV, Denison C, Gygi SP, Hemler ME. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J Cell Sci.* 2011 Aug 15;124(Pt 16):2702-10.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013 May 9;153(4):910-8.

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):80-4.

Wasco WM, Orr GA. Function of calmodulin in mammalian sperm: presence of a calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with demembrated rat caudal epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Jan 30;118(2):636-42.

Wassarman PM. Fertilization in mammals. *Sci Am.* 1988 Dec;259(6):78-84.

Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:415-42.

Wassarman PM. Zona Pellucida Glycoproteins *J Biol Chem.* 2008 Sep 5; 283(36): 24285–24289.

Wassarman PM, Bleil JD, Florman HM, Greve JM, Roller RJ, Salzman GS, Samuels FG. The mouse egg's receptor for sperm: what is it and how does it work? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1985. 50, 11-9.

- Wassarman PM, Litscher ES. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs*. 2001. 168, 36-45.
- Weigel Muñoz M, Ernesto JI, Bluguermann C, Busso D, Battistone MA, Cohen DJ, Cuasnicú PS. Evaluation of testicular sperm CRISP2 as a potential target for contraception. *J Androl*. 2012 Nov-Dec;33(6):1360-70.
- Weigel Muñoz, M. Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune. Tesis Doctoral 2013. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
- Weigel M, Battistone MA, Carvajal G, Maldera JA, Curci L, Torres P, Lombardo D, Pignataro OP, Da Ros VG, Cuasnicu PS. Influence of the genetic background on the reproductive phenotype of mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). En revisión.
- Wennemuth G, Babcock DF, Hille B. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol*. 2003 Jul;122(1):115-28. Erratum: *J Gen Physiol*. 2003 Sep;122(3):375.
- Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Trevino CL, Chavez J, Hernández-González EO, Darszon A, Visconti PE. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008 Dec 19;283(51):35539-50.
- Wertheimer E, Krapf D, de la Vega-Beltran JL, Sánchez-Cárdenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, Mager J, Darszon A, Visconti PE. Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem*. 2013 Dec 6;288(49):35307-20.
- White CW, Choong YT, Short JL, Exintaris B, Malone DT, Allen AM, Evans RJ, Ventura S. Male contraception via simultaneous knockout of $\alpha 1A$ -adrenoceptors and P2X1-purinoceptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20825-30.
- Williams HL, Mansell S, Alasmari W, Brown SG, Wilson SM, Sutton KA, Miller MR, Lishko PV, Barratt CL, Publicover SJ, Martins da Silva S. Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2015 Dec;30(12):2737-46.
- Woo AL, James PF, Lingrel JB. Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Mol Reprod Dev*. 2002 Jul;62(3):348-56.
- Wright GJ, Bianchi E. The challenges involved in elucidating the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals and approaches to overcome them. *Cell Tissue Res*. 2016 Jan;363(1):227-35.
- Xia J, Ren D. The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Oct 27;7:119
- Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol*. 2006 Aug 15;296(2):353-62.
- Xu H, Xiao T, Chen CH, Li W, Meyer CA, Wu Q, Wu D, Cong L, Zhang F, Liu JS, Brown M, Liu XS. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res*. 2015 Aug;25(8):1147-57. doi: 10.1101/gr.191452.115.

Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M. Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmeglin (Clgn)-deficient mice. *Biol Reprod.* 2006 Nov;75(5):760-6.

Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biol Reprod.* 2009 Jul;81(1):142-6.

Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C. B., Bronson, R. A., Mahi, C. A., and Nicolson, G. L.. Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1979. 31:562–574.

Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 1969 Mar;18(2):275-86.

Yanagimachi, R, Phillips DM. The Status of Acrosomal Caps of Hamster Spermatozoa Immediately Before Fertilization In Vivo. 1984. *Gamete Research* 9:1-19.

Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat.* 1985. 172, 317-30.

Yanagimachi R, Bhattacharyya A. Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J Exp Zool.* 1988. 248, 354-60.

Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. Capítulo en: *The Physiology of Reproduction.*, por E. Knobil y J.D. Neill, New York: Raven Press, 2da edición, 1994, pp. 189-317.

Yang K, Meinhardt A, Zhang B, Grzmil P, Adham IM, Hoyer-Fender S. The small heat shock protein ODF1/HSPB10 is essential for tight linkage of sperm head to tail and male fertility in mice. *Mol Cell Biol* 2012;32:216–225.

Yang S, Roselli F, Patchev AV, Yu S, Almeida OF. Non-receptor-tyrosine kinases integrate fast glucocorticoid signaling in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2013 Aug 16;288(33):23725-39.

Yazbeck P, Tauseef M, Kruse K, Amin MR, Sheikh R, Feske S, Komarova Y, Mehta D. STIM1 Phosphorylation at Y361 Recruits Orai1 to STIM1 Puncta and Induces Ca²⁺ Entry. *Sci Rep.* 2017 Feb 20;7:42758.

Yen ST, Zhang M, Deng JM, Usman SJ, Smith CN, Parker-Thornburg J, Swinton PG, Martin JF, Behringer RR. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev Biol.* 2014 Sep 1;393(1):3-9.

Yudin AI, Vandervoort CA, Li MW, Overstreet JW. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1999 Jul;53(3):350-62.

Yuen G, Khan FJ, Gao S, Stommel JM, Batchelor E, Wu X, Luo J. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 16;45(20):12039-12053.

Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 1995 Oct;171(2):554-63.

Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol.* 1996 Feb 1;173(2):510-20.

Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. *Ensembl* 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 16.

Zhang H, Martin-Deleon PA. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl.* 2003 Jan-Feb;24(1):51-8.

Zheng LP, Wang HF, Li BM, Zeng XH. Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception.* 2013 Oct;88(4):485-91.

Zhou C, Kang W, Baba T. 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.

Zhou J, Wang J, Shen B, Chen L, Su Y, Yang J, Zhang W, Tian X, Huang X. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS J.* 2014 Apr;281(7):1717-25.

Zhou J, Zhou Q, Lyu X, Zhu T, Chen Z, Chen M, Xia H, Wang C, Qi T, Li X, Liu CD6. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod* 2015;92:28.1–9.

Zhu N, Jia HX, Liu XK, Zhao XE, Wei Q, Ma BH. Measuring the estrus cycle and its effect on superovulation in mice. *Dongwuxue Yanjiu* 2012;33:276–282.

Zhu X, Xu Y, Yu S, Lu L, Ding M, Cheng J, Song G, Gao X, Yao L, Fan D, Meng S, Zhang X, Hu S, Tian Y. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2014 Sep 19;4:6420.

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

Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci.* 2006 Feb 1;119(Pt 3):416-24.