



**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario**

---

**Tesis de Doctorado**

***DIFERENCIACIÓN DE VÍAS ACTUANTES EN LA  
HIPERACTIVACIÓN Y REACCIÓN ACROSÓMICA  
DURANTE LA ADQUISICIÓN DE CAPACIDAD  
FECUNDANTE EN MAMÍFEROS***

**Presentada por Lic. Cintia Estefanía Stival**

**Rosario, Argentina**

**2018**

***DIFERENCIACIÓN DE VÍAS ACTUANTES EN LA HIPERACTIVACIÓN Y REACCIÓN  
ACROSÓMICA DURANTE LA ADQUISICIÓN DE CAPACIDAD FECUNDANTE EN  
MAMÍFEROS***

Cintia Estefanía Stival V.  
Licenciada en Biotecnología  
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Laboratorio de Cascadas de Transducción de Señales, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2014 y el 14 de diciembre de 2018, bajo la dirección del Dr. Darío Krapf y la codirección de la Dra. Silvia Arranz.

Director Dr. Darío Krapf .....

Co-director Dra. Silvia E. Arranz.....

Dra. Débora J. Cohen .....

Dra. Silvina Pérez Martínez .....

Dr. Juan Manuel Teijeiro.....

Defendida .....

Los resultados que se describen en esta Tesis, así como también trabajo complementario en el campo de estudio ha sido publicado en las siguientes modalidades:

**Publicaciones científicas:**

**Stival C**, La Spina FA, Baró Graf C, Arcelay E, Arranz SE, Ferreira JJ, Le Grand S, Dzikunu VA, Santi CM, Visconti PE, Buffone MG & Krapf D. Src Kinase Is the Connecting Player between Protein Kinase A (PKA) Activation and Hyperpolarization through SLO3 Potassium Channel Regulation in Mouse Sperm. *J Biol Chem*, 290(30):18855-18864 (2015). doi: 10.1074/jbc.M115.640326

**Stival C**, Puga Molina L del C, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE and Krapf D. “Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm”. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 220:93-106 (2016). doi: 10.1007/978-3-319-30567-7\_5

La Spina FA, **Stival C**, Krapf D and Buffone MG. “Molecular and Cellular Aspects of Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis”. In H. Schatten & GM. Constantinescu (Eds.), *Animal Models and Human Reproduction* (pp. 409–426) (2017). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118881286.ch15>

Ritagliati C, Baro Graf C, **Stival C** and Krapf D. “Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization”. *Mech Dev*, 154:33-43 (2018). doi: 10.1016/j.mod.2018.04.004.

**Stival C**, Ritagliati C, Xu X, Gervasi MG, Luque GM, Baró Graf C, De la Vega-Beltrán JL, Torres N, Darszon A, Krapf D, Buffone MG, Visconti PE & Krapf D. Disruption of protein kinase A localization induces acrosomal exocytosis in capacitated mouse sperm. *J Biol Chem*, 293(24):9435-9447 (2018).

Ritagliati C, Luque GM, **Stival C**, Baro Graf C, Buffone MG, Krapf D. “Lysine acetylation modulates mouse sperm capacitation”. *Sci Rep*, 8(1):13334 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-31557-5.

### **Presentaciones en reuniones científicas:**

- 2014 **Stival C**, La Spina FA, Arranz SE, Visconti PE, Buffone MG and Krapf D. “Src is the connecting player between PKA activation and hyperpolarization in mouse sperm capacitation”. *L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB2014)*. Rosario, Argentina. Comunicación oral.
- 2015 **Stival C**, Romarowski A, Alvau A, Arranz S, Visconti PE, Buffone MG, Krapf D. “Crossroads to sperm acrosomal responsiveness: PKA, actin dynamics and membrane hyperpolarization”. *LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB2015)*. Mar del Plata, Argentina. Presentación de póster.
- 2016 **Stival C**; Ritagliati C, Luque GM, Baro Graf C, Visconti PE, Buffone MG, Krapf D. “Protein Kinase A localization is critical for sperm capacitation”. *LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB2016)*. Córdoba, Argentina. Comunicación oral.
- 2017 **Stival C**, Ritagliati C, Xinran X, Gervasi MG, Luque GM, Baro Graf C, Visconti PE, Krapf D, Buffone MG, Krapf D. “Protein Kinase A anchoring is critical for sperm capacitation”. *Fertilization & Activation of Development - Gordon Research Conference (GRC2017)*. Holderness, United States. Presentación de póster.
- 2017 **Stival C**, Ritagliati C, Xinran X, Gervasi MG, Luque GM, Baro Graf C, Visconti PE, Krapf D, Buffone MG, Krapf D. “Protein Kinase A: being in the right place at the right time”. *Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias (SAB2017)*. Buenos Aires, Argentina. Presentación de póster.

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral cierra una etapa de mucho trabajo y no pudo haberse logrado sin el aporte de muchas personas. Por eso, gracias:

A mi director, Darío por elegirme y darme esta enorme oportunidad de aprender bajo su guía. Gracias por ayudarme a crecer profesionalmente con tanta generosidad. Por darme libertad para preguntar, trabajar y siempre valorar mis opiniones. De vos aprendí la dedicación, pasión y entusiasmo con la que hacer ciencia. A mis hermanitas académicas, la Triple C (Caro y Car) por haber formado un verdadero equipo que se potencia y ayuda mutuamente, tanto en lo académico como en lo personal. Tuve la suerte inmensa de formar parte de un grupo de excelencia en todo sentido, del cual aprendí que en la discusión de los errores se esconden las ideas asombrosas.

Al grupo Buffone (Mariano, Guille, Jami, Florenza, Ana, Lis, Clari) por su permanente colaboración y discusión de mi trabajo. En ellos resalta tanto su calidad científica como humana. Especialmente gracias a Lis y a Guille que se han convertido en excelentes amigas y consejeras académicas no-oficiales.

A los que me demostraron que la amistad trasciende fronteras y me hicieron sentir como en casa. Siempre voy a estar agradecida al Dr. Alberto Darszon (IBT-UNAM, México) y a *todo* su equipo, por recibirme con puertas abiertas y brindarme la experiencia única de trabajar en su laboratorio. La gente más cálida que conozco vive en México (Pauli, Gaby C, Joseph, Arturo y Gaby A). A Nico Brukman que fue copiloto de esta experiencia y gran compañero de viaje, siempre con una sonrisa. A Tavo por ser sostén en la distancia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA), 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 otros colaboradores que aportaron discusión y resultados en este trabajo. En especial a los grupos de los Dres. Pablo Visconti, Celia Santi y Diego Krapf.

A los que hacen día a día que el IBR sea un hogar y no sólo un lugar de trabajo. Afortunadamente, son muchos los que siempre están dispuestos a ayudar con una sonrisa en el instituto. En especial a los becarios del Lab 4 (Aldi, Mauco, Ernest, Lari, Agus, Mati)

y a todos los excelentes compañeros –actuales y antiguos- que me tocó cruzar. Gracias a Mauro por acompañarme tanto en el día a día del laboratorio hasta convertirnos en apoyo mutuo. Y a Ani por su genuina calidez conmigo.

Al Área Biología y en particular a Silvia por confiar en mí y ayudarme a crecer en la docencia que tanto amo. Somos muchos y de todos aprendo. Biología es una pequeña hermandad donde siempre encuentro consejo y contención. Aquí encontré grandes amigos (Pauli, Robi, Nico G., Tuty, Euge, Alvi, Pili, Agos, Delfi, todos los A2As y ex A2As, que por suerte son muchos).

A Lisandro, porque sigo agradecida por la paciencia que tuvo para enseñarme de cero y yo tuve la suerte de aprender de un genio.

A las amistades que conocí de grande pero que trascienden el tiempo: Ro, Pitu, Flor, Nerón, Vicky, Martín, Nacho, Vane. Como siempre digo, son lo mejor que me dio la facu. A Cabru y Nico H. que me dieron el peor examen, a cambio de los momentos en los que me río con más ganas.

A Griselda, por hacer que me enamore de la ciencia.

A los amigos que siempre están para compartir las risas y los momentos de desafíos: a mis Patas que me sostienen desde pequeñita (Leo, Juli y Vir) y a José que siempre me cuida.

A Mamá y Papá que me brindan todo lo que son y hacen que crea en mí misma. El microscopio de juguete que me regalaron me dio el primer empujón para llegar acá. A Vir por enseñarme a ser mejor persona como sólo una hermana puede hacerlo. Son el núcleo que me contiene y escuda de amor.

A mis ángeles de la guarda en el cielo: Aba, Nono y Nona. A mi ángel de la guarda en la Tierra: Ape. Gracias por cada vela prendida y por cada demostración de amor infinito.

A Marian por elegir compartir la vida conmigo.

## **A mis padres y abuelos.**

*Sus esfuerzos fueron los cimientos de mi vocación científica.*

---

*“La ciencia tiene la fascinación de la aventura porque, por encima de todo, es una exploración a lo desconocido”.*

- César Milstein

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	iii
VOCABULARIO ESPECIAL .....	v
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
BREVE HISTORIA DEL CAMPO Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO REPRODUCTIVO .....	4
MADURACIÓN Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA .....	6
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA: EVENTOS GENERALES .....	9
HIPERACTIVACIÓN .....	10
REACCIÓN ACROSÓMICA .....	11
EVENTOS MOLECULARES DE LA CAPACITACIÓN .....	15
OBJETIVOS .....	20
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	21
CAPÍTULO I: “Regulación del anclaje de PKA durante la adquisición de capacidad fecundante” .....	22
INTRODUCCIÓN .....	23
RESULTADOS .....	28
1.1. Selección de las concentraciones de inhibidores catalíticos de PKA a utilizar durante el trabajo .....	28
1.2. El desanclaje de PKA inhibe los patrones de fosforilación de proteínas asociados a la capacitación .....	29
1.3. sHT31 provoca el desanclaje de PKA y AKAP4, sin afectar la actividad catalítica de la quinasa .....	30
1.4. El desanclaje de PKA inhibe el movimiento hiperactivado .....	34
1.5. El desanclaje de PKA inhibe la adquisición de respuesta acrosómica y la capacidad fecundante in vitro .....	36
DISCUSIÓN .....	38
CAPÍTULO II: “Regulación del anclaje de PKA durante el proceso de Reacción Acrosómica” .....	41
INTRODUCCIÓN .....	42
RESULTADOS .....	44
2.1. El desanclaje de PKA induce la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados .....	44

2.2. La reacción acrosómica inducida por desanclaje de PKA está mediada por aumento de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	50
2.3. El ingreso de Ca <sup>2+</sup> durante la reacción acrosómica inducida por desanclaje de PKA ocurre a través del canal CatSper .....	53
DISCUSIÓN .....	58
CAPÍTULO III: “ <i>Rol de Src en la adquisición de capacidad de respuesta acrosómica</i> ” .....	61
INTRODUCCIÓN .....	62
RESULTADOS .....	66
3.1. La inhibición de Src no afecta la fosforilación de proteínas asociadas a capacitación .....	66
3.2. La activación de Src depende de PKA .....	67
3.3. La activación de Src es necesaria para adquirir capacidad de respuesta acrosomal .....	69
3.4. La inhibición de Src impide la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación .....	71
DISCUSIÓN .....	75
CONCLUSIONES .....	79
MATERIALES Y MÉTODOS .....	84
Reactivos .....	85
Preparación de espermatozoides murinos .....	85
Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes (SDS-PAGE) e inmunotransferencia (western-blot) .....	86
Ensayo de fosforilación de sustratos de PKA en sistema libre de células .....	87
Ensayo radiactivo de actividad de PKA in vitro .....	88
Co-inmunoprecipitación de PKARII, AKAP3 y AKAP4 .....	89
Ensayos de motilidad espermática mediante Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) .....	89
Tinción acrosomal fluorescente y tinción con coomassie .....	90
Recolección de ovocitos y ensayos de fecundación in vitro .....	91
Medición de potencial de membrana (Em) en ensayos poblacionales y ensayo de apertura de CatSper .....	92
Análisis de niveles de Ca <sup>2+</sup> por microscopía en vivo .....	93
Análisis estadístico .....	95
BIBLIOGRAFÍA .....	96

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

8Br-cAMP	8-Bromo adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ACtm	Adenilato ciclase transmembrana
AKAP	Proteína de anclaje de PKA
AM	Grupo funcional acetometil éster
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAP	Capacitado, medio capacitante (H-TYH con HCO <sub>3</sub> Na y BSA)
CASA	Sistema computarizado de análisis del semen
C-terminal	Carboxilo-terminal
Cav	Canales de calcio operados por voltaje
db-AMPc	2'-O-dibutiril adenosín monofosfato-3',5' cíclico
DISC <sub>3</sub> (5)	3,3'-Dipropylthiadicarbocyanina yoduro
DMSO	Dimetil sulfóxido
EE	Error estándar
Ej.	Ejemplo
Em	Potencial de membrana
etc.	Etcétera
F	Fluorescencia
Fig.	Figura
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
HA	Hiperactivación
HRP	Peroxidasa de rabanito
H-TYH	Medio de incubación de espermatozoides "Toyoda, Yokoyama y Hosi", equilibrado con Hepes.
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IgG	Inmunoglobulina, anticuerpo
KO	Knock-out

MAE	Membrana acrosomal externa
MAI	Membrana acrosomal interna
MP	Membrana plasmática
n	Número de mediciones experimentales independientes
NC	No capacitado, medio no capacitante (H-TYH sin HCO <sub>3</sub> Na ni BSA)
NPP	p-Nitrofenil fosfato
N-terminal	Amino-terminal
ODF	Fibras densas externas (Outer Dense Fibers)
PNA	Aglutinina de maní
PKA	Proteína quinasa A o Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKAc	Subunidad catalítica de PKA
PKAR	Subunidad regulatoria de PKA
pPKAs	Sustratos de PKA fosforilados
pY	Proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas
RA	Reacción acrosómica
sAC	Adenilato ciclasa soluble
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFKs	Quinasas de la familia de Src
SKI-606	4-anilino-3-quinolinecarbonitrile
SOCs	Canales de calcio operados por reserva
sZP	Zona pelúcida soluble
TA	Temperatura ambiente (23-25 °C)
TBS	Tampón salino de Tris
VF	Vaina fibrosa
$\lambda$	Longitud de onda
$\alpha$	Indica la especificidad contra la que está dirigida un anticuerpo
.	Separador de decimales

## **VOCABULARIO ESPECIAL**

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Western-blot: inmunodetección de proteínas separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Patch-clamp: técnica electrofisiológica empleada en el estudio de las propiedades eléctricas, tanto pasivas como activas, de las células. Se basa en la generación de un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana celular, posibilitando el registro de corrientes a través de canales iónicos.

## RESUMEN

La **capacitación** es el proceso por el cual los espermatozoides de mamíferos adquieren la habilidad para fecundar un ovocito, y se caracteriza por: 1) un cambio en el patrón de motilidad flagelar (*hiperactivación*); y 2) adquisición de *capacidad para sufrir reacción acrosómica* (RA) al enfrentarse a progesterona. Al incubar espermatozoides en un medio capacitante se estimula la activación temprana de la Proteína Quinasa A (PKA), una Ser/Thr quinasa de amplio espectro involucrada en la regulación de distintos procesos celulares. La activación precisa de PKA depende de su adecuada localización en regiones subcelulares concretas. En este sentido, las Proteínas de Anclaje a PKA (AKAPs) forman andamiajes para generar microdominios de señalización y juegan un rol central en restringir la actividad de PKA a sitios específicos. Debido a que los procesos que se desencadenan a partir de la activación de PKA son esenciales para la adquisición de estado fecundante, entender cómo es que esta quinasa se regula en el espacio y tiempo es crucial para descifrar los pasos de la capacitación espermática. En este trabajo utilizamos espermatozoides murinos como modelo para la caracterización de las cascadas de transducción de señales que tienen lugar durante la capacitación.

Para estudiar el rol de la interacción PKA-AKAPs se utilizó el péptido inhibidor de anclaje sHT31, en distintos momentos de la fisiología espermática. En primer lugar, validamos el uso de este compuesto, determinando que a las concentraciones de trabajo el péptido no bloquea la actividad catalítica de PKA, pero sí disocia la unión de PKA a AKAP4 en el espermatozoide. Demostramos que el anclaje de PKA a AKAPs es necesario para lograr el estado capacitado, ya que provocar su desanclaje al comienzo de la capacitación resultó en la inhibición de todos los eventos asociados: aparición del patrón de pPKAs, aparición del patrón de pY, hiperpolarización de la membrana plasmática, hiperactivación y capacidad de sufrir RA frente a progesterona. Sin embargo, encontramos que una vez que las células se han vuelto fecundantes, la interrupción repentina de la interacción PKA-AKAPs promueve un rápido influjo de  $Ca^{2+}$  a través del canal CatSper y resulta en la inducción de la RA sin agregado de progesterona. Estos resultados proponen un nuevo evento de señalización que vincula a CatSper con a la reacción acrosómica, en donde el canal es sensible a una activación por PKA provocada por su desanclaje de AKAPs.

Por otra parte, debido a que la hiperpolarización del potencial de membrana (Em) es un evento intermedio fundamental en la vía que conduce a la capacidad de RA, y sabiendo que depende de PKA, decidimos estudiar la conexión molecular entre ambos sucesos. En este sentido, los espermatozoides de ratones knock-out en Src no pueden adquirir capacidad de respuesta acrosomal, sugiriendo un rol para la tirosina quinasa en esta vía de señalización durante la capacitación. Por ello, decidimos evaluar la participación de Src en los eventos de la capacitación que conducen a la preparación para desencadenar la RA. Nuestros resultados indican que Src es activada corriente abajo de PKA y que su inhibición bloquea la hiperpolarización del Em sin afectar al patrón de pY que acompaña a la capacitación. Además, la inhibición de Src impidió que los espermatozoides adquieran capacidad de RA frente a progesterona, lo cual pudo revertirse hiperpolarizando farmacológicamente a las células en presencia de inhibidores de Src. Evidencia complementaria sugiere que Src podría activar de manera directa o indirecta al canal de K<sup>+</sup> Slo3 para lograr la hiperpolarización del Em durante la capacitación espermática, evento que a su vez es necesario para la adquisición de capacidad de respuesta acrosómica.

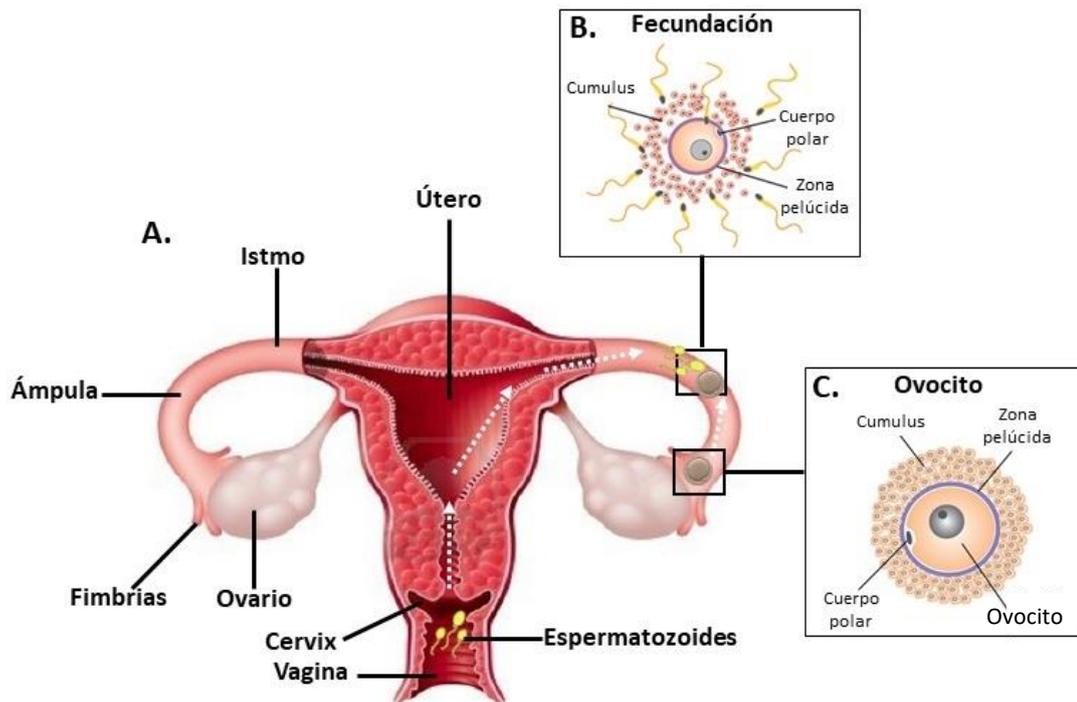
En conjunto nuestros resultados aportan nuevos datos en el entendimiento de las cascadas de señalización que ocurren durante la capacitación espermática, evidenciando el rol central de PKA como modulador de la misma. PKA podría ser un componente esencial, no sólo en las vías de transducción que conducen a la capacitación, sino también en la regulación de la exocitosis acrosomal una vez que los espermatozoides alcanzaron el estado capacitado. Esta función de PKA requiere tanto de la regulación de su actividad como de su localización subcelular.

# **INTRODUCCIÓN**

## BREVE HISTORIA DEL CAMPO Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO REPRODUCTIVO

En 1677 el holandés Anton van Leeuwenhoek analizó por primera vez una muestra de semen humano bajo las lentes de magnificación y pudo ver pequeños “animáculos” (Andrade-Rocha, 2017), los hoy conocidos **espermatozoides** (del griego -esperma, 'semilla', -zoo 'animal' y el francés -oide 'semejante a') (Real Academia Española, 2014). Estas observaciones fueron publicadas en el año 1677 en la revista *Philosophical transactions*, dando origen al amplio campo de la biología espermática (Andrade-Rocha, 2017). Las gametas masculinas son unidades altamente complejas y especializadas, cuya función final es la de fusionarse con un ovocito de la misma especie (en el proceso llamado *fecundación*), para así reconstituir la dotación cromosómica total de la misma y dar origen a un nuevo individuo (revisado por Aitken, 2013).

Los espermatozoides de mamíferos **no son fecundantes al momento de su eyaculación**, sino que primero deben sufrir una serie de cambios fisiológicos que en conjunto se conocen como **capacitación** y ocurren durante el trayecto de los mismos por el tracto reproductor de la hembra (ver apartado “Capacitación espermática: eventos generales” para mayor detalle) (revisado por Stival et al., 2016). En humanos, las gametas masculinas deben desplazarse desde el lugar de inseminación hasta el encuentro con el ovocito en el ampulla, sitio donde ocurre la fecundación (Fig. 1A). Allí, las células masculinas deben atravesar un conjunto de células accesorias que rodean al ovocito (denominadas *cumulus*) y a la matriz extracelular propia de la gameta femenina, llamada *zona pelúcida* (Fig. 1B), antes de poder fusionar sus membranas celulares para constituir el cigoto (revisado por La Spina et al., 2017).



**Figura 1. Aparato reproductor femenino humano.** A) Esquema del aparato reproductor femenino humano, vista general. El conjunto del istmo, ampulla y fimbrias se conoce como “Oviducto” o “Trompas de Falopio”. B) Esquema de la fecundación en el ampulla. C) Esquema de un ovocito al momento de la ovulación, rodeado por su matriz extracelular típica (zona pelúcida) y por un conjunto de células accesorias (Cumulus). Se indica además el cuerpo polar que resulta de la primera división meiótica asimétrica de la célula precursora. Imagen modificada a partir de original de <https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Images>.

Debido a su alto grado de especialización en transportar el núcleo haploide hasta un ovocito, las células espermáticas reducen sus componentes citoplasmáticos (tal como los ribosomas, Golgi, etc.), y desarrollan una maquinaria propulsora específica en el flagelo. Además, el material cromosómico se ultra-condensa con el fin de proteger su integridad de factores externos que podrían dañarlo, volviéndolos **incapaces de llevar a cabo los procesos de transcripción y traducción** (Ward & Zalensky 1996). En este contexto peculiar, la respuesta de las células a estímulos no puede ser mediada por síntesis *de novo* de proteínas, sino que recae en **cascadas de señalización basadas en rápidas modificaciones pos-traduccionales** (MPTs) de proteínas pre-existentes, así como cambios inducidos por mensajeros secundarios. Las fallas en estos procesos de señalización pueden conducir a alteraciones en la salud reproductiva masculina. La Organización Mundial de la Salud considera a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que afecta al 10 % de las parejas en edad fértil, el equivalente a unas

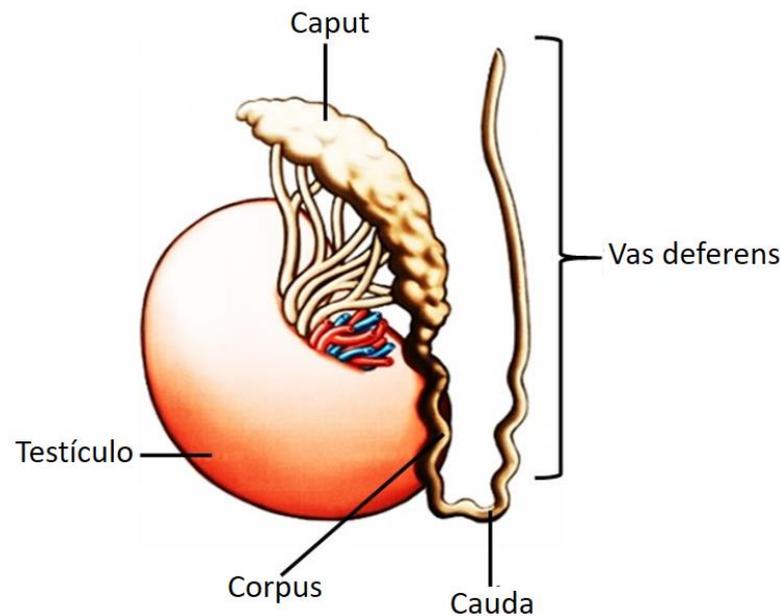
160 millones de personas (Nygren et al., 2011). En Argentina se practican anualmente un cuarto de los 30.000 tratamientos de fertilidad asistida anuales realizados en América Latina, posicionando a nuestro país como referente en este campo. Sin embargo, el éxito de los procedimientos clínicos ha probado una baja eficiencia (<30 %), dejando al descubierto la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico que permitan predecir el éxito de un dado procedimiento. En este sentido es de altísima relevancia el **estudio y comprensión de los procesos que atañen tanto a la fisiología normal como a la alterada, del espermatozoide y del ovocito** para optimizar tratamientos de fertilidad asistida. Por otro lado, estos mismos conocimientos podrían permitir la mejora o creación de métodos anticonceptivos más eficientes y con menores efectos secundarios (Darszon et al., 2011). De igual manera, comprender los mecanismos de reproducción que puedan extenderse a especies de relevancia económica o especies en peligro de extinción es de vital importancia (Darszon et al., 2011).

**Esta tesis se enfoca en el estudio de los procesos moleculares y celulares que ocurren en las gametas masculinas, previo a la fecundación del ovocito.** Dada la ubicuidad de los mecanismos celulares, la caracterización de cascadas de señalización asociadas a la fisiología espermática no sólo aporta entendimiento en el campo de la reproducción, sino que además son potencialmente extensibles a otros tipos celulares.

A continuación, se describen las características morfológicas y fisiológicas generales de los espermatozoides de mamíferos.

## **MADURACIÓN Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA**

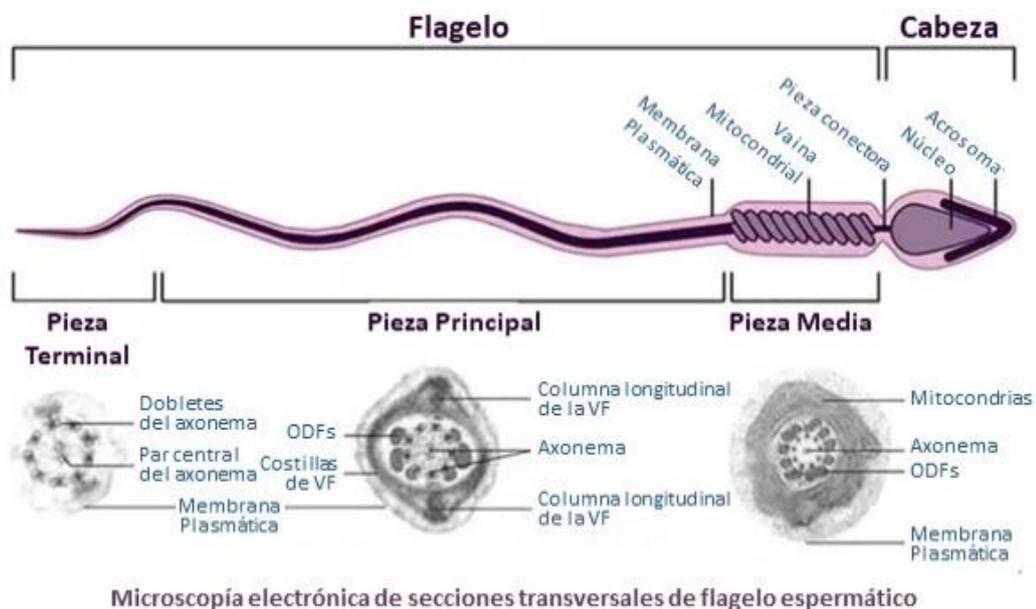
Los espermatozoides se producen en los testículos, a través del proceso de espermatogénesis, en el cual un grupo de células precursoras se dividen por meiosis para dar lugar a células haploides, llamadas espermatoцитos. Luego, sigue un proceso de diferenciación conocido como espermiogénesis, donde adquieren su morfología final. Las células ya diferenciadas ingresan al epidídimo, un órgano par conectado a los testículos que se subdivide en tres regiones: caput, corpus y cauda (Fig. 2).



**Figura 2. Esquema de testículo y epidídimo humano.** El epidídimo se subdivide en tres regiones: el caput (más próximo al testículo), el corpus (porción más larga) y el cauda (segmento terminal donde quedan almacenados los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación). Imagen modificada a partir de original de *Centralxr® Atlas*, 2018. *El Atlas del Cuerpo Humano*.

El espermatozoide maduro almacenado en el cauda del epidídimo, consta de dos compartimentos fundamentales: un **flagelo** (o cola) y una **cabeza**. En la parte anterior de la cabeza, ubicada entre el núcleo y la membrana plasmática apical, se encuentra una vesícula de secreción única denominada **acrosoma**. El flagelo se subdivide a su vez en tres regiones: **pieza terminal**, **pieza principal** y **pieza media**. Cada una de estas regiones presenta características bien definidas que se diferencian en la organización del citoesqueleto y en los elementos de señalización que hay en cada una de ellas. La estructura central a lo largo de todo el flagelo es un típico axonema eucariota formado por un doblete central de microtúbulos y nueve dobletes incompletos alrededor. La **pieza terminal** se forma únicamente por el axonema y la membrana plasmática que lo recubre (Fig. 3) (revisado por Borg et al., 2009 y Turner, 2006). La **pieza principal**, ocupa dos tercios de la longitud total del flagelo (35-45  $\mu\text{m}$  según la especie) y se compone de tres estructuras concéntricas por debajo de la membrana plasmática: el axonema central, un conjunto de cúmulos proteicos que rodean al axonema llamados *fibras densas externas* (ODF, por sus siglas en inglés), y finalmente la *vaina fibrosa* (VF) que define la extensión de la pieza principal en el flagelo (Fig. 3). La VF consiste de dos columnas longitudinales

de proteínas conectadas por “costillas” semicirculares y condiciona el grado de flexibilidad y tipo de batido flagelar. La VF no sólo se compone de proteínas estructurales (como proteínas de anclajes a PKA –AKAPs-), sino también de proteínas con funciones metabólicas (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa-1) (revisado por Turner, 2006) y de señalización (Rho GTPasa) (revisado por Eddy et al. 2003). Finalmente, la **pieza media** es la más cercana a la cabeza, consta del axonema central, rodeado por columnas de ODFs y por fuera se encuentra una densa capa de mitocondrias, llamada vaina mitocondrial (Fig. 3) (revisado por Borg et al., 2009 y Turner, 2006).



**Figura 3. Esquema de espermatozoide de mamífero.** El espermatozoide consta de 2 secciones principales: cabeza y flagelo. Ambos compartimentos están unidos a través de una pieza conectora. En la cabeza se ubica la vesícula acrosomal (acrosoma) y el núcleo de la célula. En el panel inferior se muestran microscopías electrónicas de secciones transversales del flagelo. El flagelo se subdivide en 3 regiones que se diferencian en función de su estructuración: la pieza terminal, la pieza principal y la pieza media. VF = vaina fibrosa, ODFs = fibras densas externas. Imagen modificada a partir de original de Borg, 2009.

Los compartimentos descritos están bien definidos y contienen componentes de vías de señalización que se activan de manera diferencial para generar dos grandes cambios en la célula: la **hiperactivación** en el flagelo y la **reacción acrosómica** en la cabeza. A continuación, se contextualizan y explican estos dos eventos que en conjunto definen el proceso de **capacitación**.

## CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA: EVENTOS GENERALES

La *capacitación* fue descrita por primera vez en forma simultánea e independiente por Min Chueh Chang y Colin Russell Austin en el año 1951, cuando descubrieron que sólo podían llevar a cabo una fecundación *in vitro* exitosa aquellos espermatozoides de conejo que habían sido recuperados luego de residir un tiempo determinado en el tracto reproductor de la hembra (Austin 1952; Chang 1951). En 1977 Imai y col. demostraron que espermatozoides de cerdo recuperados del tracto reproductor de cerdas, penetraban ovocitos de hámster libres de zona pelúcida. Esto sugería que los inductores de la capacitación que se encuentran en el fluido oviductal pueden ser similares o comunes entre distintas especies (Imai et al. 1977). Un año más tarde, el grupo de Chang amplió aún más la evidencia en este aspecto, demostrando que ovocitos de hámster podían ser fecundados por espermatozoides capacitados de diversas especies (ratón, conejo, etc.) (Hanada & Chang 1978).

Los primeros trabajos se enfocaron en identificar factores que permitieran la utilización de espermatozoides capacitados en condiciones de laboratorio controladas, es decir, fuera del tracto reproductor de la hembra. Así, se desarrollaron los primeros medios definidos, logrando la **capacitación *in vitro*** de espermatozoides recuperados de cauda epididimario (Bavister 1969; Miyamoto & Chang 1972; Toyoda et al. 1971). Actualmente los medios capacitantes (CAP) contienen, entre otros factores,  $\text{HCO}_3^-$  y un aceptor de ácidos grasos (tradicionalmente, albúmina sérica bovina -**BSA**-) que los diferencia de los medios no capacitantes (NC).

Sólo aquellos espermatozoides que adquieren el estado capacitado pueden llevar a cabo la fecundación del ovocito, convirtiendo a este proceso en un pre-requisito esencial para la fusión de gametas. Durante la capacitación los espermatozoides sufren dos grandes cambios fisiológicos: 1) modifican el patrón de movilidad flagelar a uno conocido como **hiperactivación**, y 2) adquieren **potencialidad para llevar a cabo la reacción acrosómica** al ser enfrentados a un inductor de la misma (revisado en Stival et al., 2016).

Debido a que la capacitación **no** se trata de un proceso de todo o nada, existe una gran variedad de estadíos intermedios, que afectan a las mediciones globales (Escoffier et al., 2015). Es decir que en un momento dado de estudio sólo habrá una sub-población de células con ciertos parámetros de capacitación. Se ha argumentado que la falta de

sincronización en la capacitación de una población de espermatozoides podría tratarse de una ventaja evolutiva, ya que garantizaría que en el momento en que ocurra el encuentro con el ovocito, al menos un grupo de células se encuentre en estado óptimo para la fecundación (revisado por Buffone et al., 2012 y Turner, 2006). A esta gran heterogeneidad en la población de espermatozoides provenientes de un dado individuo, se suma la aportada por la diversidad de trasfondos (genéticos, alimenticios, comportamentales, etc.) correspondiente a cada masculino.

## HIPERACTIVACIÓN

El movimiento flagelar en espermatozoides se puede clasificar en: motilidad activada (o progresiva) y motilidad hiperactivada (HA). En la primera, el batido flagelar es simétrico, de baja amplitud y poco vigoroso, resultando en un desplazamiento lineal de las células en medios acuosos (Fig. 4A) (revisado por Suarez, 2008). Las gametas masculinas se encuentran inmóviles mientras son almacenadas en el cauda epididimario debido al pH ácido del mismo, pero una vez que son eyaculadas y encuentran un pH neutral, se activa su movimiento progresivo (Nishigaki et al., 2014). Por otro lado, la **motilidad hiperactivada o hiperactivación**, es obtenida en el tracto reproductor femenino durante el proceso de capacitación. Se trata de un batido flagelar asimétrico y vigoroso, que resulta en un movimiento de tipo látigo y un trayecto aleatorio de los espermatozoides en medios acuosos (Fig. 4A). Fue Yanagimachi quien en 1969 describió por primera vez este movimiento vigoroso en espermatozoides de hámster capacitándose *in vitro* y propuso que podría servirles para atravesar la densa matriz extracelular del ovocito. (Yanagimachi, 1969). Esto fue probado años más tarde por Stauss y col., cuando demostraron que aquellos espermatozoides que habían logrado hiperactivarse, penetraban la zona pelúcida (ZP) con éxito en experimentos de fecundación *in vitro* (FIV), mientras que los que no habían desarrollado este tipo de motilidad no lo hacían (Stauss et al. 1995).

Desde aquellos trabajos, nuevas funciones se le han asignado a la hiperactivación, entre ellas, permitir un movimiento rectilíneo en ambientes mucosos (Fig. 4A). De este modo, si bien en medios fluidos como los que se utilizan *in vitro* los espermatozoides hiperactivados pasan la mayor parte de su tiempo en trayectorias circulares, en el

contexto viscoso del tracto reproductor de la hembra, el batido intenso les permite moverse linealmente (Suarez & Dai 1992). Además, se ha demostrado que se genera una reserva de espermatozoides que quedan adheridos al epitelio del istmo oviductal, y la HA parece ser necesario para que las células puedan disociarse de él (Fig. 4A) (Suarez 2002).

El desarrollo de la HA *in vivo* debe ser regulado temporal y espacialmente para que las gametas masculinas estén listas al momento del encuentro con el ovocito. Por ello, se postula que en el oviducto deben existir factores de señalización que estimulen este tipo de motilidad. Experimentos *in vitro* demostraron que tanto el fluido folicular (Yao et al. 2000) como el sobrenadante recuperado a partir del cumulus (Fetterolf et al., 1994), exacerbaban el movimiento hiperactivado de espermatozoides humanos, y se ha sugerido que la hormona progesterona podría ser el componente activo en dichas condiciones (Sueldo et al., 1993). Si bien hasta la fecha no se ha identificado unívocamente una señal específica de HA, se han caracterizado distintos factores esenciales para el inicio y mantenimiento de este movimiento *in vitro*:  $Ca^{2+}$ , AMPc, bicarbonato y sustratos energéticos. Trabajos en erizo de mar demostraron que el aumento de  $Ca^{2+}$  estimula selectivamente la actividad de un grupo de dineínas en el axonema, constituyendo la base de los cambios en el patrón de movimiento (Bannai et al., 2000). Se ha propuesto que podría existir un modelo análogo en espermatozoides de mamíferos, en donde la fosforilación de dineínas mediadas por un complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina activaría la HA (Chang & Suarez 2010; Tash & Bracho 1998).

## REACCIÓN ACROSÓMICA

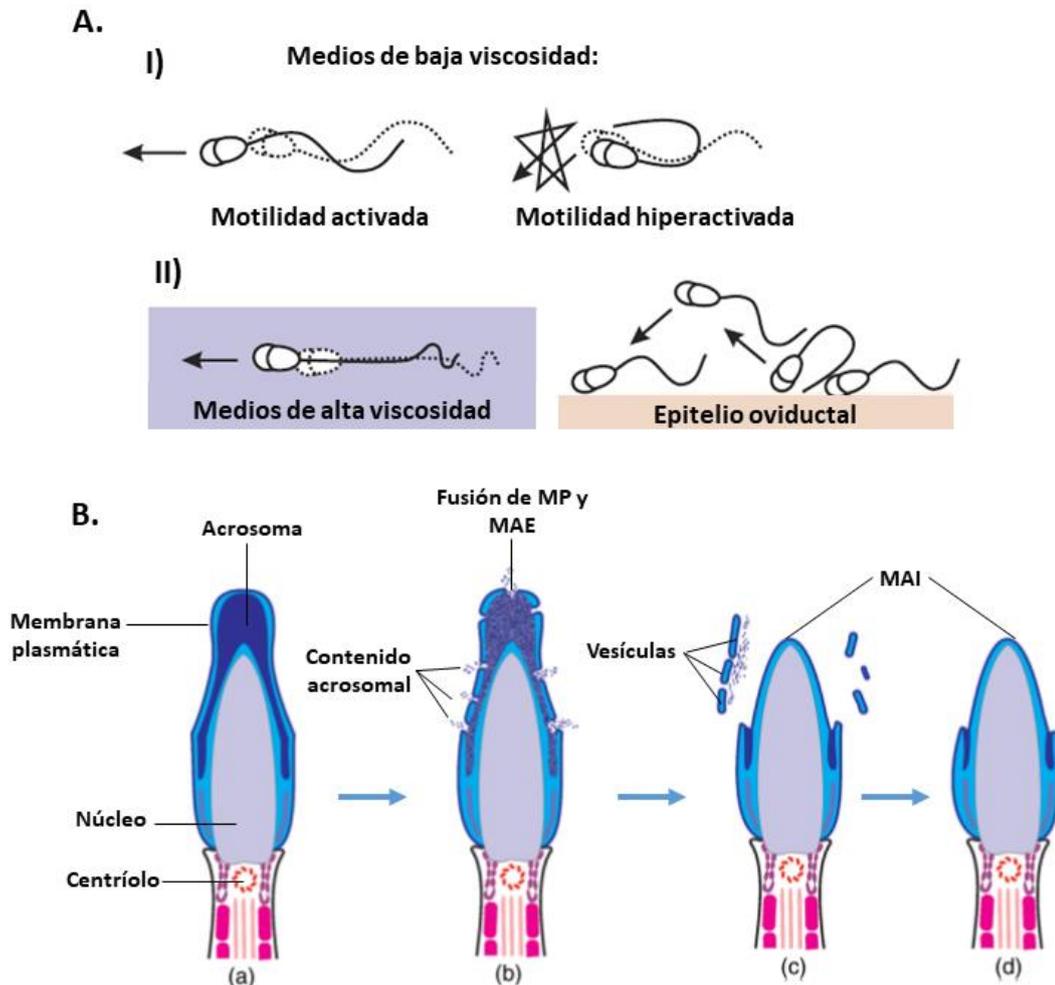
El acrosoma es una vesícula electrodensa ubicada en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Para lograr la fecundación, su membrana debe fusionarse con la membrana plasmática de la célula en el proceso conocido como **reacción acrosómica**. El interior del acrosoma funciona como un reservorio de calcio, pero también contiene una matriz insoluble en contacto con una batería de diversas enzimas hidrolíticas que son liberadas al momento de la exocitosis (De Blas et al., 2002; revisado por La Spina et al., 2017). Si bien aún se discute acerca de la función exacta que cumple este evento, es un pre-requisito fundamental para que pueda ocurrir la fusión de las gametas masculinas y femeninas (revisado por Cuasnicú et al., 2016).

La exocitosis acrosomal es un tipo particular de secreción regulada, distinto al de células somáticas, debido a que: 1) sólo hay un acrosoma por célula espermática; 2) el acrosoma no se encuentra anclado a la membrana plasmática (MP) antes de aplicar el estímulo de RA; 3) se forman múltiples puntos de fusión entre la membrana de la zona apical del acrosoma (llamada membrana acrosomal externa -MAE-) y la MP de la célula; 4) la fusión entre la MAE y la MP forma vesículas híbridas, es decir con componentes de ambas membranas, que son liberadas al medio circundante durante la exocitosis y 5) es un proceso irreversible ya que no hay reciclado de membrana (Fig. 4B) (revisado por La Spina et al. 2017 y Mayorga et al. 2007).

Si bien el mecanismo molecular de la RA aún no ha sido completamente elucidado, el uso de distintas estrategias para importar macromoléculas en espermatozoides, ha permitido esclarecer el rol de algunas de ellas (revisado por Belmonte et al. 2016). La RA está mediada por complejos de proteínas SNAREs, que inicialmente se encuentran asociadas en un estado inactivo (“complejo cis”) tanto en la MP como en la MAE. Durante la capacitación ocurren cambios que permiten el ensamblado de los componentes necesarios para la posterior exocitosis acrosomal. Por ejemplo, la reducción de colesterol de la MP en medio capacitante, aumenta la cantidad de proteína Rab3 que se recluta a los dominios de fusión, involucrada en el reconocimiento de membranas durante la RA (Belmonte et al. 2005).

Una vez que el espermatozoide se ha capacitado y la maquinaria de fusión se ha ensamblado, la gameta queda **latente** para llevar a cabo la exocitosis frente a un estímulo adecuado. Tanto los complejos SNAREs de la MP como los de la MAE se mantienen en estado de reposo. Al momento del encuentro con un inductor de RA, se activan cascadas de señalización mediadas por proteínas GTPasas monoméricas de la familia Rab que dirigen el reconocimiento y la asociación física entre los compartimentos a fusionarse (Belmonte et al. 2016). La activación de Rab3 desreprime al factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) cuya actividad ATPasa es necesaria para desensamblar al complejo cis (Zarelli et al., 2009). Esto provoca la re-estructuración en un estado “trans”, donde las proteínas SNAREs de ambas membranas se asocian y traccionan para acercarlas (Zanetti & Mayorga 2009). Sin importar cuál sea el estímulo de inicio, se sabe que la señal intracelular para efectuar la RA cursa a través de un aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático (Darszon et al., 2011). En humanos, el influjo de calcio externo acaba provocando la

movilización de calcio desde el acrosoma hacia el citoplasma (Ruete et al., 2014). Como resultado de este proceso ocurre la liberación al medio de enzimas hidrolíticas y la relocalización de proteínas en la cabeza del espermatozoide.



**Figura 4. Esquema de los dos eventos característicos de la capacitación: Hiperactivación y Reacción Acrosómica.** A) Patrones de motilidad flagelar: I. Forma del batido flagelar y dirección neta de movimiento (indicado por las flechas) de espermatozoides activados e hiperactivados, en medios de baja viscosidad. En dicha condición, los espermatozoides activados presentan un desplazamiento lineal, mientras que el batido asimétrico de los espermatozoides hiperactivados resulta en una trayectoria azarosa. II. Motilidad hiperactivada en medios de alta viscosidad y en la interacción con el epitelio oviductal. En la primera situación, los espermatozoides se desplazan en línea recta, similar a lo que ocurriría en el fluido viscoso vaginal. Por otra parte, el movimiento hiperactivado serviría para que los espermatozoides adheridos al epitelio oviductal puedan unirse, soltarse y avanzar. Imagen modificada de Darszon, 2011. B) Esquema del proceso de reacción acrosómica. (a) Espermatozoide con acrosoma intacto. (b) Fusión de la membrana plasmática (MP) con la membrana acrosomal externa (MAE) en múltiples sitios, resultando en la liberación del contenido acrosomal soluble. (c) Como consecuencia de la fusión de membranas se da la formación de vesículas híbridas y la exposición de la membrana acrosomal interna (MAI). (d) Espermatozoide reaccionado. Imagen modificada de La Spina, 2017.

Tradicionalmente se ha postulado que la RA le permite a las gametas masculinas penetrar la zona pelúcida gracias a la acción de las enzimas hidrolíticas liberadas (Bedford, 2004). Sin embargo, existe una gran controversia respecto a cuál es la región del tracto reproductor femenino en la que los espermatozoides sufren RA *in vivo*. Por esta razón tampoco se sabe aún con certeza cuál es el inductor fisiológico real de la misma, ni se termina de comprender cabalmente su función. Como consecuencia de estudios de fecundación *in vitro*, durante años se postuló que el espermatozoide sufría RA al contacto directo con la ZP del ovocito (Saling et al. 1979), liberando enzimas degradativas que le permitieran penetrar en el espacio perivitelino. No obstante, investigaciones recientes comenzaron a cuestionar este paradigma (Hirohashi et al. 2011; Inoue et al. 2011; Jin et al. 2011). Trabajando con ovocitos rodeados de cumulus y espermatozoides que expresan la proteína fluorescente GFP en el acrosoma intacto, el grupo de Hirohashi demostró que aquellos espermatozoides que lograban fecundar *in vitro* habían sufrido RA **antes** del contacto con la ZP (Jin et al., 2011). Esto lo lograron haciendo un seguimiento filmográfico y posterior análisis en retrospectiva de cada espermatozoide fecundante. A esta evidencia se suma el trabajo reciente de La Spina y col., en donde demuestran que la RA de espermatozoides de ratones ocurre *in vivo* en la zona del istmo del oviducto, es decir antes del contacto con el ovocito que ocurre en el ámpula (La Spina et al., 2016). Se ha sugerido que como consecuencia de la RA se exponen proteínas sobre la superficie del espermatozoide que estabilizan el contacto entre células reaccionadas y la ZP del ovocito. En este marco, pareciera ser que el inductor fisiológico de la RA debe tener una naturaleza difusible. La progesterona, esteroide producido por las células del cumulus, ha emergido como el principal candidato para ser el inductor de la RA (Osman et al. 1989; Roldan et al. 1994; Romarowski et al. 2016). Asimismo, agentes farmacológicos no fisiológicos son utilizados de rutina en los laboratorios para inducir la RA entre los que se destacan los ionóforos de calcio (ionomicina y A23187) (Garde & Roldan 1996; De Jonge et al. 1991; De la Vega-Beltrán et al. 2012).

Independientemente de cuál sea el inductor empleado, la cinética de exocitosis es lenta (min) y se ha observado consistentemente que no todos los espermatozoides llevan a cabo la RA al mismo tiempo (revisado por Belmonte et al. 2016). La razón de esta falta de sincronía no es entendida, aunque se ha especulado que está asociada a distintos grados de capacitación de las células (revisado por Belmonte et al. 2016).

## EVENTOS MOLECULARES DE LA CAPACITACIÓN

La capacitación es un proceso que presenta cinéticas variables según la especie, siendo de 1 hora en ratón y hasta 6 horas en humanos. Al incubar las células en un medio capacitante (es decir, que contiene principalmente  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y BSA), algunos eventos se inician luego de unos pocos minutos (**eventos tempranos**), mientras que otros requieren tiempos mayores (**eventos tardíos**). Dentro de los primeros, se incluye el aumento de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activación de la proteína quinasa A y consecuente aparición de un patrón de sus sustratos fosforilados (pPKAs) y la remoción de colesterol de la membrana por parte de un aceptor de lípidos en el medio (BSA). Dentro de los eventos tardíos se incluye la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas (pY), la hiperpolarización del potencial de membrana y el aumento de pH intracelular (revisado por Stival et al., 2016). Hasta la fecha se desconoce de manera cierta cómo estos distintos eventos se asocian entre sí para conducir al espermatozoide a una motilidad hiperactivada y a alcanzar un estado de latencia para sufrir la reacción acrosómica. A continuación, se describen en mayor profundidad los eventos moleculares asociados a este proceso.

En 1995 Visconti y col. comenzaron a sentar las bases moleculares de la capacitación estableciendo el requerimiento de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Visconti et al. 1995). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inicial se produce a través del canal CatSper (Barratt, 2011), mientras que el co-transportador de sodio/bicarbonato NBC parece ser el candidato más probable para el ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  (Puga Molina et al., 2018). El aumento citoplasmático de estos iones provoca la activación rápida de una adenilato ciclasa soluble (sAC), que resulta en un incremento de AMPc y consecuente activación de la **Proteína Quinasa A** (PKA) (Hess et al., 2005). Esta secuencia de eventos iniciales es lo que se conoce como el **eje sAC/AMPc/PKA**.

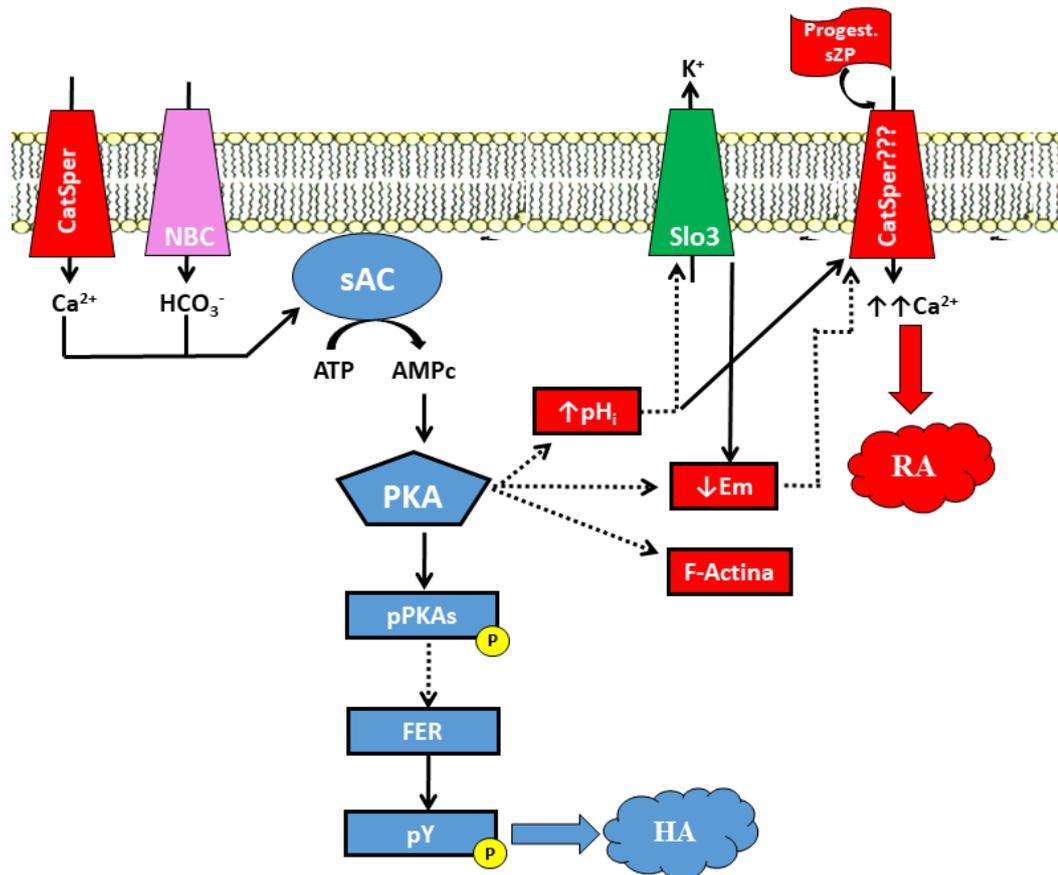
En espermatozoides, sAC constituye la principal fuente de AMPc para la Ser/Thr quinasa PKA. En 2013 se demostró la presencia de adenilato ciclasas transmembranas tradicionales en la cabeza de espermatozoides de ratón, pero la síntesis de AMPc derivada de ellas no estimula a PKA (Wertheimer et al., 2013). La activación de PKA es un evento temprano, ya que en los espermatozoides de todas las especies de mamíferos estudiados, la quinasa alcanza valores máximos de actividad en menos de un minuto de exposición a medio capacitante (Harrison & Miller 2000; Krapf et al. 2010; O'Flaherty et al. 2004). El

desarrollo de anticuerpos contra sustratos de PKA fosforilados que reconocen la secuencia consenso RXXpS/pT o RRXpS/pT, ha sido esencial para el estudio de su cinética de activación.

El rol crucial de PKA en la capacitación se ha fundado en la utilización de una batería de inhibidores, tales como H89, Rp-cAMPS y sPKI, los cuales interfieren con la actividad de la quinasa de modos distintos (revisado por Murray, 2008). Por otra parte, considerando que la variante no miristoilable PKA $\alpha_2$  (también llamada PKAc $\alpha_2$ ), es la única subunidad catalítica presente en los espermatozoides maduros de ratón (Desseyn et al. 2000; San Agustín et al. 2000) fue posible eliminar la actividad PKA específicamente de estas células (Nolan et al., 2004). Dichos ratones, son estériles y el fenotipo infértil se relaciona con defectos en la movilidad y la capacitación (Nolan et al., 2004). La combinación de estudios empleando inhibidores farmacológicos o el *knock-out* de PKA $\alpha_2$  han demostrado que la gran mayoría de los eventos tardíos asociados a la capacitación, se encuentran corriente abajo y están regulados por PKA. Entre ellos: la hiperactivación (Luconi et al., 2005), la activación de tirosina quinasa (Leclerc et al. 1996; Nolan et al. 2004) y la potencialidad de respuesta acrosomal (De Jonge et al., 1991). El **aumento de proteínas fosforiladas en tirosinas** puede ser detectado por western-blot y por más de 20 años, se ha utilizado como un marcador molecular de capacitación en espermatozoides de ratón y otras especies.

Otro evento de cinética lenta asociado a la capacitación, es la **hiperpolarización de la membrana plasmática**, es decir, el aumento de cargas negativas neta del lado intracelular que genera un incremento en la diferencia de potencial de membrana (Em). Se ha reportado una hiperpolarización de membrana plasmática durante la capacitación en espermatozoides murinos (Ecoffier et al. 2015; Stival et al. 2015; Zeng et al. 1995), bovinos (Zeng et al. 1995) y humanos (López-González et al., 2014). La hiperpolarización ha sido asociada con la vía que conduce a la capacidad de respuesta acrosomal (Zeng et al. 1995), entre otras razones porque en espermatozoides de ratón, la hiperpolarización es necesaria y suficiente para que las células queden preparadas para la exocitosis acrosomal (De La Vega-Beltrán et al., 2012). A través de trabajos con ratones knock-out, se ha establecido al canal **Slo3** como el principal mediador de la hiperpolarización durante la capacitación en esta especie (Zeng et al. 2011). Se trata de un canal de K<sup>+</sup>, sólo presente en espermatozoides de mamíferos. Estructuralmente, se compone de 7 dominios

transmembrana sensores de voltaje, así como de un anillo citoplasmático grande, responsable de la regulación por efectores intracelulares. Se ha determinado que la apertura del canal se estimula por pH alcalino y despolarización interna, pero su regulación exacta es aún objeto de estudio (revisado por Ritagliati et al., 2018).



**Figura 5. Eventos moleculares de la capacitación espermática.** Esquema simplificado donde se muestran los principales eventos asociados a la vía que conduce a la hiperactivación (HA) y a la vía que conduce a la capacidad de respuesta acrosomal (RA). Al incubar las células en un medio capacitante se da el ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , que activan a la adenilato ciclasa sAC. En consecuencia, se produce un aumento en la concentración de AMPc, el cual activa en forma directa a la Proteína Quinasa A (PKA) para fosforilar sustratos específicos (pPKAs). Dentro de los llamados “eventos tardíos” de la capacitación ocurre la activación de la tirosina quinasa FER y la consecuente fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas (pY), la hiperpolarización de la membrana plasmática ( $\downarrow\text{Em}$ ), la polimerización de actina (F-Actina) y el aumento de pH intracelular ( $\uparrow\text{pH}_i$ ). Estos tres últimos eventos se asocian a la capacidad de respuesta acrosomal que adquieren los espermatozoides durante la capacitación, de manera que al ser estimulados con un agonista fisiológico (progesterona, sZP), se dispara la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  aun no identificado claramente (CatSper???), lo cual culmina en la fusión de la vesícula acrosomal a la membrana plasmática. Las flechas indican la relación entre eventos. Las líneas discontinuas indican asociación entre los eventos pero sin evidencia de interacción directa.

Finalmente, el rol del **ion  $\text{Ca}^{2+}$**  merece una mención especial dentro de la señalización espermática. Este mensajero secundario juega varios papeles a lo largo de la capacitación y en la inducción de la RA. Durante la incubación en medio capacitante, el calcio ingresa a las gametas y junto al  $\text{HCO}_3^-$ , promueve la activación de sAC que, a su vez, produce el AMPc que estimula a PKA. Además, cantidades trazas de este catión estimulan la actividad de fosfatasa, por lo que el mantenimiento del equilibrio fino en la concentración de calcio es crucial para regular las vías de señalización asociadas al eje sAC/AMPc/PKA/pPKAs (Navarrete et al., 2015). Este ingreso inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de **CatSper** se ha asociado con la capacidad de desarrollar motilidad hiperactivada (Qi et al. 2007; Xia & Ren 2009). El trabajo con inhibidores y la identificación de péptidos o ARNm ha llevado a que se postule la existencia de distintos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (canales activados por voltaje –Cav-, canales operados por reservas –SOCs-). Sin embargo, sólo se ha detectado en forma contundente por electrofisiología la actividad del canal CatSper, exclusivo de espermatozoides (Darszon et al., 2011). Se trata de un heteromultímero, compuesto por 4 subunidades  $\alpha$  formadoras de poro (CatSper1-4) asociadas a 3 subunidades regulatorias ( $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), en donde la eliminación de cualquiera de ellas en modelos de ratones knock-out da como resultado animales infértiles con espermatozoides que no logran capacitarse (Darszon et al. 2011; Kirichok et al. 2006; Qi et al. 2007). Los canales CatSper se han localizado en la pieza principal del flagelo de espermatozoides de ratón y humanos. Son ligeramente sensibles a voltaje, no se inactivan por despolarización (a diferencia de los canales Cav), y se activan fuertemente con un aumento de  $\text{pH}_i$  (Kirichok et al. 2006). Los espermatozoides de ratones CatSper-KO no logran hiperactivarse, y es por ello que su rol en este proceso ha sido definido. En espermatozoides de ratón, numerosos estímulos inducen aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $\text{HCO}_3^-$ , BSA, progesterona, agonistas permeables de AMPc, ZP) y esta respuesta desaparece en los CatSper-KO.

Por otro lado, la inducción de la RA con agonistas como progesterona o zona pelúcida solubilizada (sZP) tanto en espermatozoides de ratón como de humano, provoca una despolarización del potencial de membrana asociado a al menos dos tipos de aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$ : el primero es rápido y transitorio, mientras que el segundo es lento y sostenido. Debido a que el tratamiento con sZP logra inducir RA en espermatozoides de ratones CatSper-KO, la contribución de este canal en la excitocis acrosomal no es

clara (Xia & Ren 2009). En estos espermatozoides se pierde el pico inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  pero permanece inalterable el influjo tardío. Independientemente de cuál es la identidad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados durante la RA, la evidencia actual establece que dicha corriente es dependiente de voltaje y que se estimula cuando la despolarización va precedida por hiperpolarización de la membrana plasmática (De La Vega-Beltran et al., 2012; Linares-Hernández et al., 1998). Parece entonces, que la hiperpolarización ocasionada por Slo3 en ratón durante la capacitación, tiene la función de sensibilizar canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta hipótesis se apoya en el hecho de que espermatozoides Slo3-KO en medio capacitante no sufren aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la RA estimulada por sZP o altas concentraciones de potasio extracelular. Sin embargo, la inducción de RA puede recuperarse si a los espermatozoides carentes de Slo3 se les provoca hiperpolarización farmacológica (Chávez et al. 2014).

En humanos la progesterona puede activar a CatSper, induciendo la RA en espermatozoides capacitados, aunque no ocurre lo mismo con espermatozoides de ratón (Lishko et al. 2011; Strünker et al. 2011). Esto podría explicar por qué mientras que la inducción de RA *in vitro* en espermatozoides humanos capacitados puede lograrse con 3  $\mu\text{M}$  de progesterona, la inducción en espermatozoides de ratón requiere de concentraciones > 20  $\mu\text{M}$ .

**OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y conocer las cascadas de señalización por las cuales se regula la adquisición de capacidad fecundante de espermatozoides de mamíferos, utilizando como modelo experimental espermatozoides de cauda murino.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Estudiar el rol del anclaje subcelular de PKA a AKAPs en la *adquisición de capacidad fecundante*.
- II. Estudiar el rol del anclaje subcelular de PKA a AKAPs *durante la inducción de la reacción acrosomal* espermática.
- III. Evaluar la participación de la quinasa Src en los eventos que conducen a la preparación para desencadenar la reacción acrosómica.

# **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## **CAPÍTULO I.**

*Regulación del anclaje de PKA durante la  
○, adquisición de capacidad fecundante*

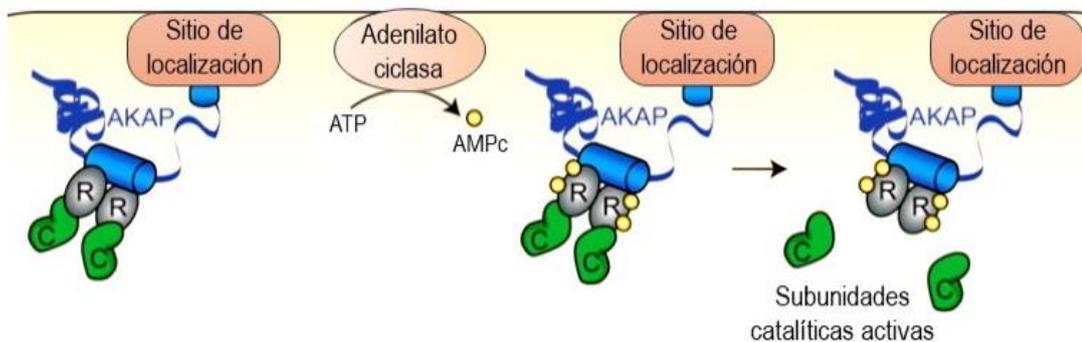
## INTRODUCCIÓN

La capacitación es un proceso altamente complejo orquestado inicialmente por la acción de la Proteína Quinasa A (PKA) (Visconti et al. 1995). La holoenzima se compone de dos **subunidades catalíticas** (PKAc) idénticas asociadas no covalentemente a dos subunidades **regulatorias idénticas** (PKAR). Existen, además, 4 isoformas posibles de las subunidades regulatorias (PKARI $\alpha$ , PKARI $\beta$ , PKARII $\alpha$ , PKARII $\beta$ ) que definen el posicionamiento de la holoenzima dentro de la célula y la sensibilidad de activación. En el complejo enzimático las subunidades catalíticas se mantienen inhibidas por la interacción con las subunidades regulatorias, pero la unión de AMPc a estas últimas provoca la liberación de los centros catalíticos en su forma quinasa activa (Fig. 6). La inactivación de PKA ocurre por depleción de AMPc, mediado tanto por acción de fosfodiesterasas (Baxendale & Fraser 2005) como por extrusión del mensajero a través de bombas citoplasmáticas (Osycka-Salut et al., 2014). Este modelo de regulación de actividad de PKA ha sido descrito no sólo en espermatozoides, sino también en las células somáticas que expresan a esta quinasa (revisado por Taylor et al., 2013).

La **activación temprana de PKA durante la capacitación** es fundamental ya que de ella dependen una variedad de eventos que se dan corriente abajo, entre los cuales se encuentran: 1) hiperpolarización del potencial de membrana plasmática ( $E_m$ ) (Ecoffier et al., 2015; revisado por Ritagliati et al., 2018), 2) desarrollo de motilidad hiperactivada (Baker et al. 2006; Harayama & Nakamura 2008; Wertheimer et al. 2013) y 3) desencadenamiento de la RA frente a un inductor, una vez que la capacitación se completó (Harrison et al. 2000; Visconti et al. 1995).

Debido a que PKA es una quinasa promiscua de residuos Ser/Thr, con multiplicidad de sustratos, su regulación precisa requiere de la activación en localizaciones subcelulares específicas. El posicionamiento de PKA puede variar con el tiempo y se ha propuesto que estos cambios de ubicación regulan distintos procesos (revisado por Taylor et al., 2013). La restricción espacial de PKA se logra por interacción con proteínas de anclaje específicas conocidas como **AKAPs**, por sus siglas en inglés (A Kinase Anchoring Proteins) (revisado por McConnachie et al. 2006) (Fig. 6). Los miembros de esta familia son altamente divergentes en secuencia, pero todos conservan 3 características fundamentales: 1) un dominio de interacción con PKA; 2) una secuencia de localización única y 3) sitios de interacción con otras proteínas de la vía de señalización de PKA (revisado por Taylor et

al. 2013 y Luconi et al. 2011). El dominio de anclaje a PKA está constituido por una secuencia corta de 14-18 residuos que forman una hélice anfipática. Dicha hélice, contenida en las AKAPs, se inserta en un surco complementario de PKA formado por el dominio de dimerización (D/D) de las subunidades regulatorias (Carr et al., 1991). La gran mayoría de las AKAPs identificadas se unen selectivamente a las isoformas PKARII de PKA, aunque existen un número limitado de AKAPs con especificidad dual que también pueden interactuar con PKARI (revisado por Kennedy & Scott 2015).



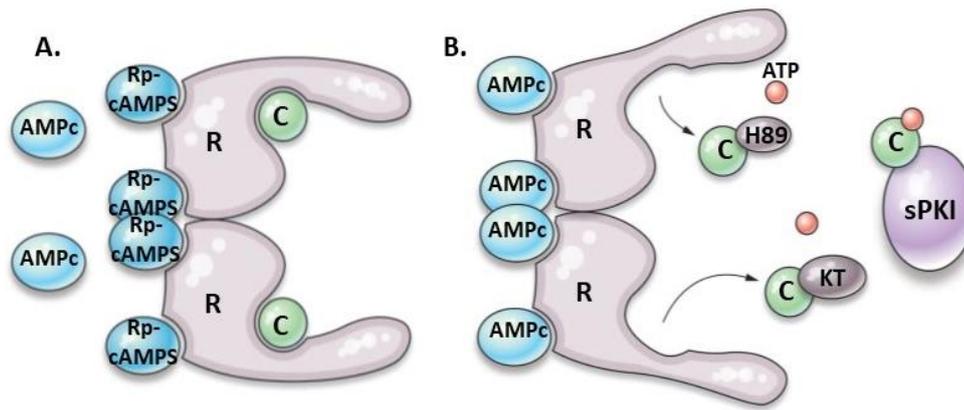
**Figura 6. Señalización de PKA a través de complejos con AKAPs.** PKA es una Ser/Thr quinasa formada por dos subunidades regulatorias (R), asociadas a dos subunidades catalíticas (C). Cuando las concentraciones intracelulares de AMPc son bajas, el complejo holoenzimático de PKA está mayoritariamente asociado a proteínas de anclaje (AKAP) a través de la interacción con las subunidades R. Cuando la concentración de AMPc citoplasmática aumenta como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa, cada subunidad R une dos moléculas de AMPc y sufre profundos cambios conformacionales alostéricos que culminan en la liberación de las dos subunidades C activas. Imagen modificada de Kennedy, 2015.

Los sitios de interacción con otras proteínas están destinados a anclar sustratos o reguladores de PKA, de manera de crear microdominios de señalización altamente regulados en espacio-tiempo (revisado por McConnachie et al. 2006). Por ejemplo, en células somáticas se ha probado que la actividad de una adenilato ciclasa transmembrana anclada a un dado complejo AKAP resulta en la producción localizada de AMPc. Este a su vez activa a la proteína PKA asociada, sin tener efectos sobre otras PKA

compartimentalizadas en sitios distintos. La PKA activada de esta manera, luego fosforila sólo a los sustratos también anclados al complejo, iniciando una cascada de señalización focalizada. Incluso, PKA puede fosforilar a la adenilato ciclasa del microdominio para silenciar la producción de AMPc, ejerciendo una retro-regulación sobre la misma (Bauman et al., 2006).

Debido a la naturaleza espacial y temporal dinámica de las interacciones con AKAPs, ha resultado difícil desenmascarar las particularidades de los eventos de señalización asociados. Sumado a esto, el genoma humano codifica para más de 50 AKAPs (sin considerar las variantes de empalme alternativo), de las cuales cada célula somática expresa entre 10-15 subtipos distintos. Este grado de complejidad dificulta el estudio de las interacciones de PKA con cada tipo individual de AKAP (revisado por Kennedy & Scott 2015). Particularmente en espermatozoides predominan dos tipos distintos: AKAP3 y AKAP4 (también conocidas como AKAP110 y AKAP82, respectivamente), y constituyen los principales componentes de la cubierta fibrosa (revisado por Eddy et al. 2003; Carrera et al. 1994). Numerosos trabajos identificaron incrementos en la fosforilación de estas AKAPs (o de proteínas con un peso molecular equivalente) durante la capacitación, indicando que podría existir una regulación diferencial sobre las mismas (Chung et al. 2014; Hillman et al. 2013; Harrison 2004; O'Flaherty et al. 2004).

Tradicionalmente se ha estudiado el rol de PKA en la capacitación espermática mediante el uso de **inhibidores que afectan su actividad catalítica** de diversas maneras: 1) moléculas que bloquean el sitio de unión a ATP (ej.: H89, KT5720), 2) inhibidores que son análogos inactivos de AMPc (ej.: Rp-cAMPS) y 3) "pseudo-sustratos" que se unen al sitio catalítico de PKA y quedan asociados irreversiblemente (ej.: sPKI) (revisado por Murray, 2008) (Fig. 7).



**Figura 7. Mecanismos de acción de los inhibidores de actividad de PKA.** A) Rp-cAMPS es un antagonista competitivo de los sitios de unión a AMPc sobre las subunidades reguladoras (R) de PKA. La unión de Rp-cAMPS a PKA evita que las subunidades catalíticas (C) puedan ser liberadas en su forma activa. B) Los inhibidores sPKI, H89 y KT5720 (KT), actúan en una etapa posterior a Rp-cAMPS. Luego de la unión del AMPc a las subunidades R y la consecuente liberación de las subunidades C, el péptido sPKI se asocia al sitio activo de las subunidades catalíticas, evitando que las mismas puedan fosforilar sustratos. Por otra parte, H89 y KT5720 son dos antagonistas competitivos de los sitios de unión del ATP sobre las subunidades catalíticas de PKA. Sin la unión de ATP, las subunidades C no pueden fosforilar proteínas diana. Imagen modificada de Murray, 2008.

Sin embargo, la regulación de una vía de señalización no viene dada sólo por el estado activo/inactivo de sus componentes, sino también por la adecuada localización subcelular de los mismos. Hasta la fecha, existen relativamente pocos trabajos que aborden este aspecto de regulación no canónica de PKA en espermatozoides maduros (Hillman et al. 2013; Luconi et al. 2004; Carr et al. 2001; Harrison et al. 2000; Vijayaraghavan et al. 1997; Visconti et al. 1997) en comparación a la cantidad de bibliografía que analizan los efectos de activar/inhibir la vía sAC/AMPC/PKA. Como herramientas en el estudio del anclaje de PKA a AKAPs en distintos tipos celulares se han empleado “péptidos inhibidores de anclaje”. Se trata de secuencias cortas que se pliegan formando la hélice anfipática de interacción con los dominios D/D de PKAR, de manera que compiten con las AKAPs naturales por la interacción con PKA. El primero de estos péptidos en ser aislado y utilizado fue el llamado **HT31**, una secuencia de 24 aminoácidos (DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY) clonada a partir del dominio de unión a PKA de la AKAP\_Lbc, cuyo extremo N-terminal fue luego esterificado para permitir el ingreso a las células (sHT31) (Carr et al. 1992). Si bien se han desarrollado algunos pocos inhibidores de anclaje sintético, sHT31 presenta una gran variedad de ventajas: ha sido ampliamente

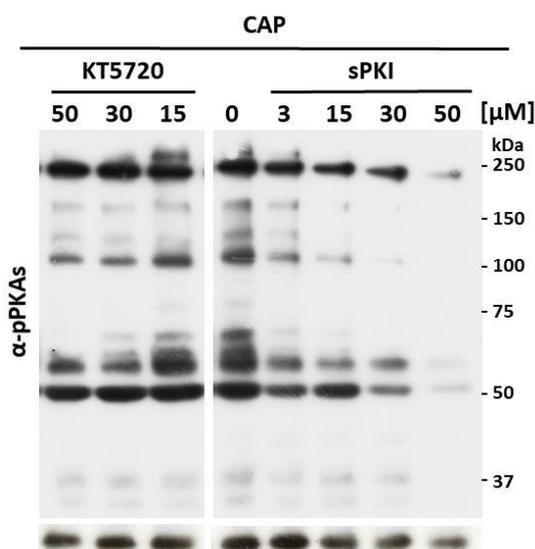
estudiado y validado en distintos tipos celulares (incluido espermatozoides) (Hillman et al. 2013; Luconi et al. 2004; Harrison et al. 2000; Vijayaraghavan et al. 1997), se cuenta con un análogo inactivo -llamado **sHT31p**- que sirve como control de especificidad del efecto deslocalizador, está disponible comercialmente, su solubilidad en medio acuoso lo hace adecuado para el estudio en células vivas y, finalmente dada su capacidad de interrumpir interacciones con las subunidades PKARI como PKARII es útil para abordajes iniciales donde se desconoce la existencia de mecanismos compensatorios entre ambas isoformas (revisado por Kennedy & Scott 2015).

En este primer capítulo de tesis se analizaron los efectos de interrumpir la interacción PKA-AKAPs sobre distintos eventos de la capacitación espermática.

## RESULTADOS

### 1.1. Selección de las concentraciones de inhibidores catalíticos de PKA a utilizar durante el trabajo

Con el fin de verificar y establecer las concentraciones efectivas de los inhibidores catalíticos de PKA utilizados en este trabajo, se realizaron curvas de concentración y se observó el efecto sobre la fosforilación de sustratos de PKA (pPKAs) por western-blot. Según los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, y en concordancia con la bibliografía publicada, se seleccionaron como concentraciones inhibitorias: 15  $\mu\text{M}$  para sPKI y 30  $\mu\text{M}$  para KT5720 (Fig. 8). Por otra parte, la concentración inhibitoria de H89, también utilizado en este proyecto, ya ha sido establecida en 30  $\mu\text{M}$ , según trabajos anteriores del grupo (Krapf et al., 2010).



**Figura 8. Curva de inhibición de PKA.** Los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante (CAP) en presencia o ausencia de distintas cantidades de dos inhibidores catalíticos de PKA: sPKI o KT5720. Se prepararon extractos de proteínas totales de las distintas condiciones y se realizó SDS-PAGE seguido de western-blot, revelado contra sustratos fosforilados de PKA ( $\alpha$ -pPKAs). En el panel inferior se muestra el control de carga (hexoquinasa). La imagen mostrada corresponde a un mismo experimento, de manera que la condición CAP 0  $\mu\text{M}$  corresponde al control de fosforilación normal en medio capacitante para ambas curvas de inhibidores.

## **1.2. *El desanclaje de PKA inhibe los patrones de fosforilación de proteínas asociados a la capacitación***

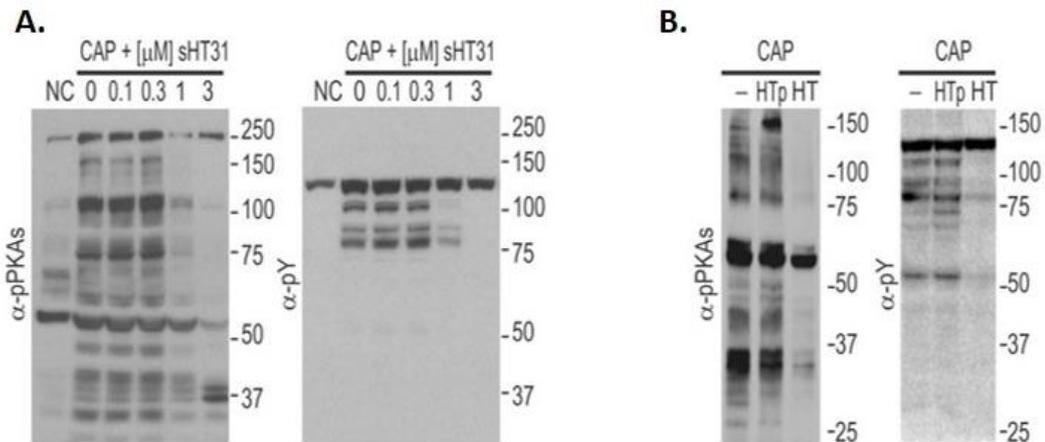
La activación temprana de PKA por producción de AMPc durante la capacitación ha sido ampliamente estudiada, y se ha definido como un evento fundamental para que los espermatozoides adquieran el estado capacitado. Sin embargo, poco se conoce acerca de la relevancia de la localización subcelular específica de PKA en este contexto. Se ha demostrado en trabajos de diversos campos que la exposición de células somáticas a inhibidores de anclaje de PKA, resultan en el bloqueo de las cascadas de señalización asociadas a la quinasa (Mack & Fischer 2017; Poppinga et al. 2015; Wojtal et al. 2006).

Con el fin de estudiar el rol del anclaje de PKA durante la adquisición del estado capacitado, se utilizó el péptido sHT31 que inhibe la interacción entre PKARII y AKAPs en espermatozoides de ratón (Carr et al., 1992). sHT31 es la forma esterificada del compuesto HT31, capaz de ingresar a las células por difusión simple. Este péptido inhibidor ha sido utilizado ampliamente en el estudio del anclaje de PKA por su alta eficiencia, permeabilidad celular y validación en la biografía. En adición, se cuenta con un análogo inactivo del mismo (sHT31p) que permite realizar controles de especificidad de acción (revisado por Kennedy & Scott 2015). En el péptido inactivo sHT31p, se reemplazan dos isoleucinas de la secuencia original de sHT31 por prolinas, impidiendo que se forme así la hélice de interacción con PKARII.

Para inhibir la interacción entre PKA y AKAPs previo a la inducción de la capacitación, los espermatozoides fueron pre-incubados durante 10 min con diferentes concentraciones de sHT31 en medio no capacitante (medio H-TYH). Luego, fueron expuestos a condiciones capacitantes (medio H-TYH suplementado con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 15 mM y BSA 5 mg/ml) durante 60 min, tiempo que se considera como punto final del proceso en espermatozoides murinos. Durante todo el tiempo de capacitación se mantuvo la concentración de sHT31 ensayada.

El análisis por western-blot mostró que la pre-incubación con sHT31 bloqueó la fosforilación de sustratos de PKA asociada a la capacitación (pPKAs), a partir de 1 μM. Así mismo, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas (pY) que es un evento corriente abajo y dependiente de PKA, también se inhibió a las mismas concentraciones

de sHT31 (Fig. 9A). El péptido control sHT31p utilizado a la más alta concentración ensayada (3  $\mu$ M) no impidió la aparición ni de pPKAs ni de pY (Fig. 9B), indicando que el efecto inhibitorio de sHT31 se debe su acción deslocalizadora, y no es el resultado de efectos estructurales colaterales.



**Figura 9. Efecto de sHT31 sobre patrones de fosforilación de proteínas asociados a capacitación.** A) Los espermatozoides fueron pre-incubados 10 min con las concentraciones indicadas del inhibidor de anclaje sHT31 antes de ser expuestos durante 60 min a medio capacitante (CAP). Como control negativo, los espermatozoides fueron incubados 60 min en medio no capacitante (NC). Extractos de proteínas totales de estos tratamientos fueron analizados por western-blot revelado contra sustratos fosforilados de PKA (pPKAs) y proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas (pY), analizados sobre la misma membrana. B) Se repitió el tratamiento de los espermatozoides como en el punto A), incubando a los mismos en medio capacitante y en presencia de 3  $\mu$ M del inhibidor sHT31 (HT) o 3  $\mu$ M del análogo inactivo sHT31p (HTp). Como control, se incubó a los espermatozoides en medio capacitante en ausencia de estos compuestos (-). Por western-blot se verificó que el análogo inactivo sHT31p no bloquea ni la fosforilación de sustratos de PKA (pPKAs) ni la fosforilación de residuos de tirosinas (pY).

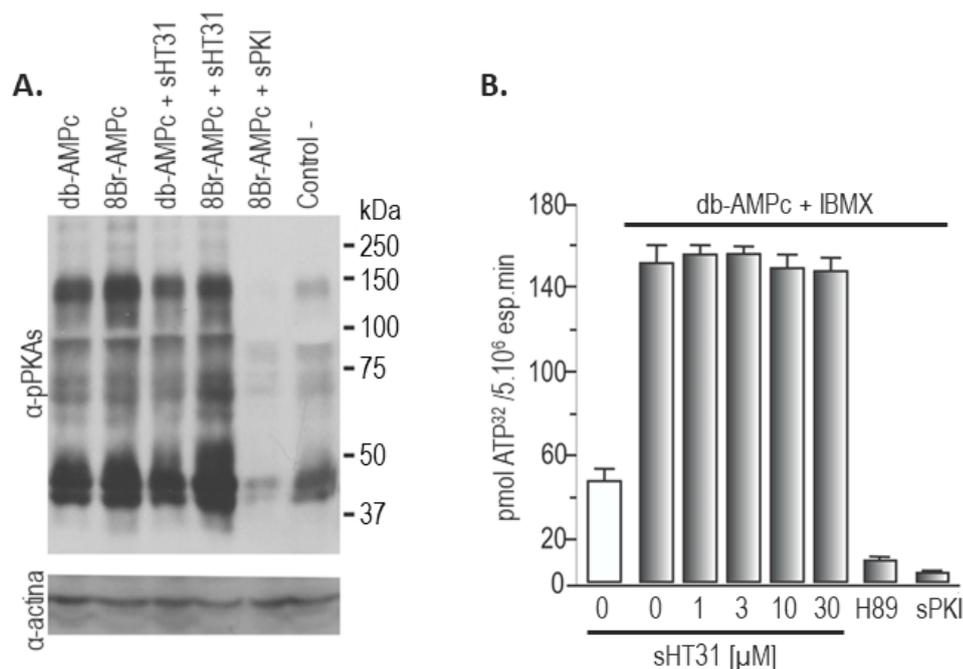
### 1.3. *sHT31 provoca el desanclaje de PKA y AKAP4, sin afectar la actividad catalítica de la quinasa*

Para verificar que la falta del patrón pPKAs observado no se debiera a una inhibición directa de la **actividad catalítica** de PKA por sHT31, realizamos dos experimentos: 1) medición indirecta de actividad de PKA en sistema libre de células y 2) ensayo de actividad quinasa *in vitro*. En el primero, se analiza la capacidad de PKA de fosforilar a sus proteínas dianas en presencia de sHT31 en un medio donde las células han sido lisadas

(“sistema libre de células”), en el cual el acercamiento de la enzima a sus sustratos se da estocásticamente. De esta manera, si sHT31 no interfiere con la actividad catalítica de PKA, cuando la quinasa encuentre a sus sustratos podrá fosforilarlos y esto podrá evidenciarse mediante western-blot. Para obtener este sistema, se incubó a los espermatozoides en solución conteniendo tritón X-100, de manera disrumpir las membranas celulares, liberando al medio tanto a PKA como a sus sustratos. Estos extractos totales fueron luego tratados con análogos permeables de AMPc (db-AMPc ó 8Br-AMPc) junto con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX, para provocar la activación directa de PKA. En presencia de sHT31 3  $\mu\text{M}$ , los análogos de AMPc activaron a PKA y hubo fosforilación de sustratos. Esto no ocurrió cuando en lugar de añadir sHT31 se incubó a las células en presencia de sPKI 15  $\mu\text{M}$ , que inhibe la actividad catalítica de PKA (Fig. 10A).

En el segundo ensayo se midió en forma directa la actividad quinasa de PKA extraída de espermatozoides, al enfrentarla al sustrato peptídico “kémptido”, el cual acumula marca radiactiva al ser fosforilado en un medio que contenga ATP[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]. En este experimento, la actividad *in vitro* de PKA no se vio bloqueada aun en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de sHT31 (30 veces más de la concentración empleada en ensayos *in vivo*), mientras que la fosforilación del kémptido sí se impidió ante la presencia de dos inhibidores específicos de actividad de PKA (H89 30  $\mu\text{M}$  y sPKI 15  $\mu\text{M}$ ), como era esperado (Fig. 10B).

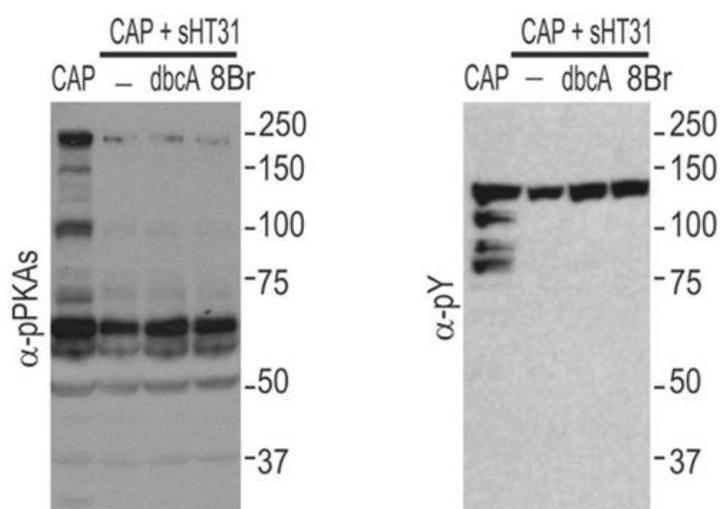
Estos resultados indican que **sHT31 no inhibe la actividad catalítica de PKA, pero sí su actividad biológica durante la capacitación**, presuntamente al interferir con el anclaje a AKAPs. Así, el péptido alejaría a la quinasa de sustratos fosforilables detectables en western-blot, impidiendo la aparición de los patrones de pPKAs y pY.



**Figura 10. sHT31 no inhibe la actividad catalítica de PKA.** A) Análisis de la actividad de PKA en ensayo libre de células. Los espermatozoides fueron incubados por 30 min en medio conteniendo ATP 40  $\mu$ M, db-AMPC 1 mM ó 8Br-AMPC 1 mM, IBMX 0.1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y Tritón X-100 1 %, en ausencia o presencia de sHT31 3  $\mu$ M o sPKI 15  $\mu$ M. El control negativo (-) no contiene análogos permeables de AMPc, de manera que PKA no se activa. Cada condición fue procesada para análisis de western-blot y la inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-sustratos fosforilados de PKA ( $\alpha$ -pPKAs). B) Medición de la actividad de PKA en ensayo radiactivo. Se determinó la incorporación de marca radiactiva (ATP<sup>32</sup>) en el sustrato sintético “kémptido” por acción de PKA espermática, activada *in vitro* por agregado de db-AMPC 1 mM e IBMX 0.1 mM al buffer de reacción. La actividad quinasa fue medida en presencia de las cantidades indicadas de sHT31, H89 30  $\mu$ M, o sPKI 15  $\mu$ M. El control negativo (barra blanca) corresponde a un medio sin db-AMPC de manera de no inducir la activación de PKA. Los datos representan el promedio de experimentos independientes + EE.

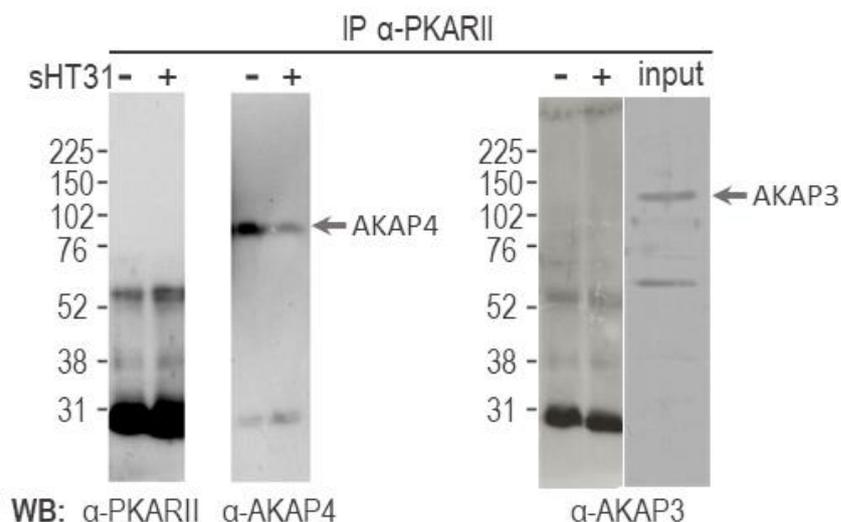
A pesar de que las 9 isoformas de adenilato ciclasas transmembrana (ACTm) identificadas en células somáticas, pueden unirse a AKAPs (revisado por Luconi et al. 2011), la activación de PKA en la capacitación no está mediada por ACTm, sino que ocurre por acción de la adenilato ciclasa soluble sAC (Wertheimer et al., 2013). Si bien aún no existen evidencias de interacción física de sAC con AKAPs, contemplamos la posibilidad de que la presencia de sHT31 estuviera alejando a PKA de su fuente natural de AMPc en el espermatozoide, y que esa fuera la causa de la ausencia de sustratos fosforilados de PKA *in vivo*. Para verificarlo, se pre-incubó a los espermatozoides en medio no capacitante con sHT31 1  $\mu$ M y luego fueron enfrentados a análogos permeables de AMPc (db-AMPC 1 mM

ó 8Br-AMPC 1 mM) en conjunto con un inhibidor de fosfodiesterasas (IBMX 0.1 mM), de manera de garantizar la activación directa de PKA (Fig. 11). Aun en estas condiciones, no se detectó patrón de sustratos fosforilados de PKA, reafirmando que la ausencia del mismo no se debe a falta de actividad catalítica de PKA, sino a su desanclaje de AKAPs y consecuente alejamiento de sus sustratos.



**Figura 11. Los patrones de fosforilación asociados a capacitación son inhibidos por desanclaje de PKA y no pueden recuperarse por activación catalítica de la quinasa.** Espermatozoides fueron tratados con sHT31 1  $\mu$ M durante 10 min en medio no capacitante. Luego, fueron incubados por 60 min en medio capacitante (CAP) conteniendo sHT31 1  $\mu$ M en presencia o ausencia de dibutilil-AMPC 1 mM + IBMX 0.1 mM (dbcA) ó 8Br-AMPC 1 mM + IBMX 0.1 mM (8Br). Extractos de proteínas totales fueron analizados por western-blot para la detección de los sustratos fosforilados de PKA (pPKAs) y de proteínas fosforiladas en tirosinas (pY), sobre la misma membrana.

Con el fin de confirmar que sHT31 afecta la interacción entre PKA y AKAPs del espermatozoide, se realizó una inmunoprecipitación de la subunidad PKARII de espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de sHT31 3  $\mu$ M. Los inmunoprecipitados fueron analizados por western-blot para la detección de las dos principales AKAPs en flagelo de ratón: AKAP3 y AKAP4 (Fig. 12). La presencia de sHT31 en el medio, provocó una significativa reducción en la cantidad de AKAP4 que co-inmunoprecipitó con PKARII, indicando que el péptido efectivamente reduce la interacción entre ambas proteínas ocasionando el desanclaje de PKA. No se pudo detectar co-inmunoprecipitación de PKARII con AKAP3 ni en ausencia ni en presencia de sHT31, sugiriendo que la quinasa interactúa mayoritariamente con la variante AKAP4.



**Figura 12. sHT31 interfiere con el anclaje de PKARII a AKAPs en espermatozoides de ratón.** Se realizaron inmunoprecipitaciones de la subunidad RII de PKA (IP  $\alpha$ -PKARII, policlonal de conejo) sobre extractos de espermatozoides incubados en condiciones capacitante, en ausencia (-) o presencia (+) de sHT31 3  $\mu$ M. Luego, los inmunoprecipitados fueron analizados por western-blot (WB) para el análisis de co-inmunoprecipitación con AKAP4 ( $\alpha$ -AKAP4, monoclonal de ratón) o AKAP3 ( $\alpha$ -AKAP3, monoclonal de conejo). AKAP3 no fue detectada en la IP, pero sí en el extracto total sin inmunoprecipitar (input). Para evitar la detección de la cadena pesada del anticuerpo  $\alpha$ -PKARII (52 kDa) utilizada durante la IP, se empleó como anticuerpo secundario un  $\alpha$ -cadena liviana de IgG de ratón o conejo (25 kDa), según el caso. Los pesos moleculares esperados son: AKAP4 (82 kDa), AKAP3 (110 kDa), PKARII (53 kDa).

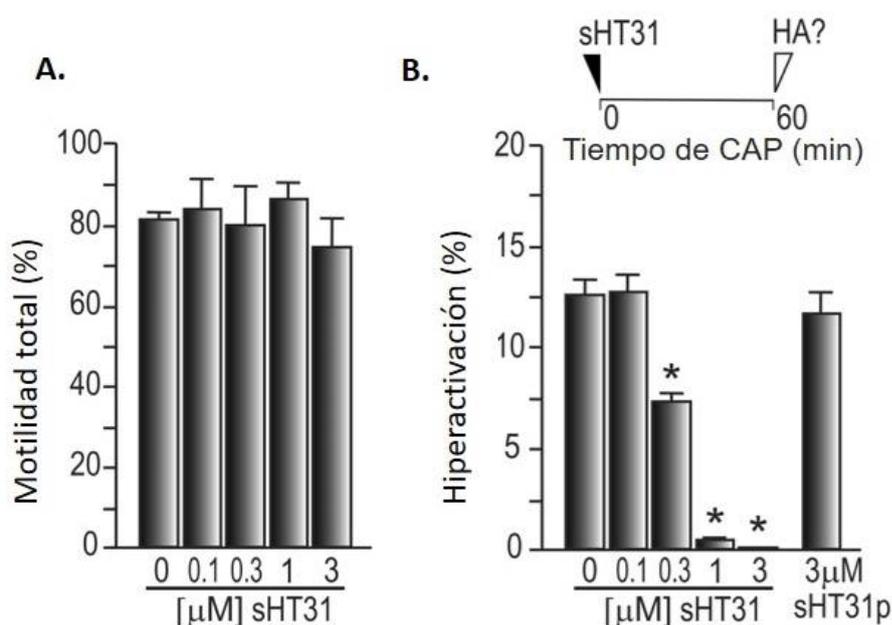
#### 1.4. El desanclaje de PKA inhibe el movimiento hiperactivado

Como resultado del proceso de capacitación los espermatozoides adquieren dos parámetros funcionales principales que les permiten fecundar: 1) transición de motilidad progresiva a motilidad hiperactivada (HA) (revisado por Stival et al. 2016; Suarez & Dai 1992) y 2) capacidad de sufrir reacción acrosómica al enfrentarse a un inductor fisiológico como la progesterona (Harrison et al. 2000). Ambos eventos dependen de la activación temprana de la vía de AMPc/PKA ya que se ha demostrado extensamente que cuando la misma es interrumpida por inhibición de SAC o de PKA, se bloquea la adquisición del estado capacitado (Harayama & Nakamura 2008; Hillman et al. 2013; Luconi et al. 2004; Harrison et al. 2000; Visconti et al. 1995).

En relación a los parámetros de motilidad espermáticos, el potencial para el desplazamiento lineal es adquirido durante el tránsito epididimario y no es dependiente

de la activación de la vía AMPc/PKA. Por el contrario, el cambio en el patrón de motilidad a un estado hiperactivado, es completamente dependiente de la producción temprana de AMPc por sAC y consecuente activación de PKA (Tourzani et al., 2018).

Con el fin de evaluar el efecto de inhibir el anclaje de PKA-AKAPs sobre la motilidad espermática, se enfrentó a los espermatozoides con concentraciones crecientes de sHT31 en medio capacitante durante 60 min. La motilidad de los mismos fue evaluada a través del software CASA (Fig. 13).



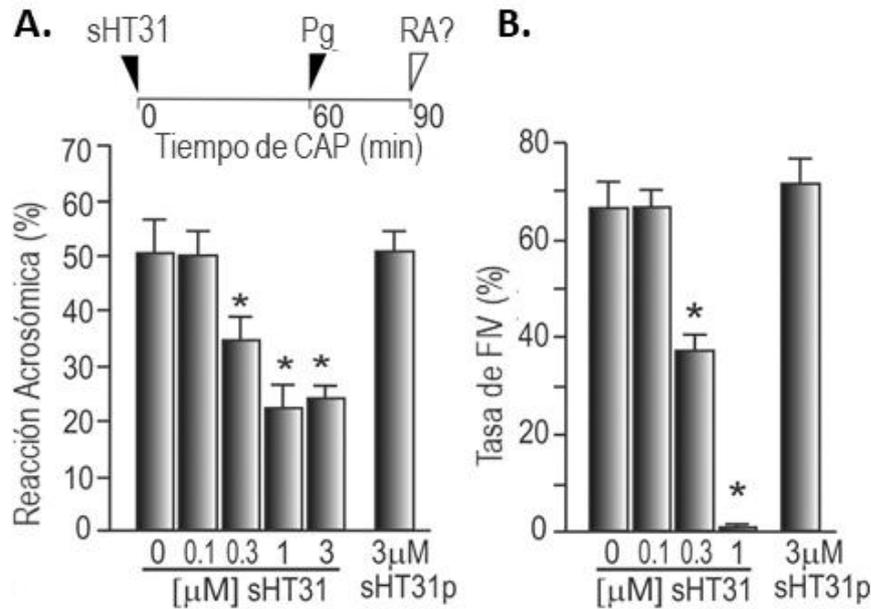
**Figura 13. El desanclaje de PKA bloquea la adquisición del movimiento hiperactivado sin afectar la motilidad total.** Espermatozoides murinos fueron incubados en ausencia o presencia de distintas concentraciones de sHT31 o sHT31p durante 60 min en medio capacitante (CAP). Luego se examinó la motilidad espermática utilizando el sistema CEROS CASA. Se indica la motilidad total (A) y la hiperactivada (HA) (B) como porcentajes de la población total de espermatozoides analizados. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Los resultados muestran que enfrentar a los espermatozoides con hasta  $3 \mu\text{M}$  sHT31 no afecta la motilidad total (Fig. 13A), probando que las células conservan su viabilidad en presencia de todas las concentraciones de sHT31 utilizadas en estos experimentos. Por el contrario, se ve un **efecto inhibitorio en la adquisición de hiperactividad** (Fig. 13B)

dependiente de concentración, con un descenso significativo a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  de sHT31 y una abolición total de la misma con 1  $\mu\text{M}$ . Esta concentración coincide con la que produjo la inhibición de la fosforilación de proteínas asociadas a la capacitación (Fig. 9A).

### **1.5. El desanclaje de PKA inhibe la adquisición de respuesta acrosómica y la capacidad fecundante *in vitro***

Como se mencionó anteriormente, el otro efecto fisiológico principal de la capacitación es la adquisición de capacidad de respuesta acrosómica. Esto significa que, luego de la capacitación, el espermatozoide queda en un estado de latencia, preparado para llevar a cabo la fusión de la vesícula acrosomal y posterior exocitosis de su contenido, al enfrentarse a un inductor de reacción acrosómica (revisado por La Spina et al., 2017). Por este motivo analizamos el efecto de inhibir la interacción PKA-AKAPs durante la capacitación sobre la capacidad de respuesta acrosómica. Para ello se pre-incubó a las células con distintas concentraciones de sHT31 en medio no capacitante durante 10 min. Luego, se sometieron los espermatozoides a condiciones capacitantes durante 60 min, tras lo cual fueron enfrentados a progesterona 40  $\mu\text{M}$  como inductor de RA. El estado acrosomal fue evaluado mediante tinción fluorescente del acrosoma con PNA-Alexa488 y observación al microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron un bloqueo significativo de la RA a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  de sHT31 (Fig. 14A). Estos datos concuerdan con la inhibición de la capacidad fecundante *in vitro*, analizada por el Dr. Darío Krapf. En dichos experimentos se determinó que el porcentaje de fecundación *in vitro* (FIV) disminuyó significativamente cuando los espermatozoides fueron pre-incubados con sHT31 antes de ser capacitados. El efecto inhibitorio se evidenció a partir de una concentración de 0.3  $\mu\text{M}$  de sHT31, cayendo drásticamente a partir de 1  $\mu\text{M}$  del inhibidor (Fig. 14B).



**Figura 14. El desanclaje de PKA inhibe la capacidad de adquirir capacidad fecundante.** A) Espermatozoides fueron incubados en medio capacitante (CAP) durante 60 min, en presencia de distintas concentraciones de sHT31 o sHT31p. Luego, fueron enfrentados a progesterona (Pg) 40  $\mu$ M durante 30 min adicionales. El estado acrosomal fue evaluado por tinción con PNA-Alexa488 y microscopía de fluorescencia. B) Ovocitos de ratón fueron inseminados con espermatozoides capacitados ( $2.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml en gotas de 200  $\mu$ l). Se consideró que hubo fecundación *in vitro* (FIV) por visualización microscópica de pronúcleo. Al menos 30 ovocitos fueron evaluados en cada tratamiento. Tanto en A) como en B) Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Estos resultados en conjunto demuestran que al **inhibir la interacción PKA-AKAPs antes de exponer a las células a un medio capacitante, impide que las mismas puedan adquirir capacidad fecundante** como consecuencia del bloqueo de la hiperactivación y de potencialidad de RA.

## DISCUSIÓN

A lo largo de décadas, numerosos trabajos han establecido la necesidad de la actividad catalítica de PKA como iniciadora de la capacitación. El enfoque de estudio usualmente se basa en alterar los puntos de la regulación canónica de PKA. Así, mediante el uso de inhibidores catalíticos (H89, sPKI, KT5720) y activadores directos de PKA (análogos permeables de AMPc, inhibidores de fosfodiesterasas) se ha probado el rol de la quinasa en la adquisición del estado capacitado. Sin embargo, poco es sabido acerca de la necesidad de su correcto anclaje y posicionamiento subcelular. En esta primera parte del proyecto de tesis se estudió el rol de la interacción PKA-AKAPs en la regulación de la capacitación espermática de ratón. Este trabajo representa un análisis más abarcativo que el enfoque tradicional, analizando el efecto de impedir el anclaje de PKA a AKAPs sobre distintos parámetros espermáticos.

Como primer paso validamos que la utilización del péptido inhibidor de anclaje, sHT31, no afecta la actividad catalítica de PKA (Fig. 10), descartando así que los efectos biológicos observados se debieran a un bloqueo sobre el sitio activo de la quinasa. Así mismo, probamos que la presencia de sHT31 en el medio capacitante afecta la interacción de PKARII con AKAP4, reduciendo la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas (Fig. 12). Esto constituye una prueba directa de que en nuestro sistema sHT31 interrumpe la unión de PKA a AKAP4, y se suma a la evidencia previa del efecto disruptor de anclaje del péptido (Harrison et al. 2000; Hillman et al. 2013; Vijayaraghavan et al. 1997).

Al inhibir la interacción PKA-AKAPs en espermatozoides murinos, se impidió que las células desarrollaran tanto el patrón de fosforilación de sustratos de PKA como el patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas (Fig. 9). Considerando que el rol tradicionalmente asignado a las proteínas de anclaje AKAPs es el de constituir microdominios de señalización donde se acerque PKA a sus sustratos, **la inhibición de pPKAs puede explicarse por un alejamiento de la quinasa** de sus dianas, inducido por sHT31. Por otra parte, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas es un evento tardío que se interpreta como marcador molecular del estado capacitado (Visconti et al. 1995). El hecho de que el patrón de fosfotirosinas también se haya inhibido por el desanclaje de PKA, sugiere que las células no lograron adquirir capacidad fértil. Este resultado es consistente con trabajos anteriores que demuestran que la fosforilación de

residuos de tirosinas durante la capacitación requiere de la activación temprana de PKA (Leclerc et al. 1996; Nolan et al. 2004; Visconti et al. 1995).

En la misma línea, estudios previos han reportado que la hiperactivación flagelar, es regulada por AMPc, cuyo principal efector es PKA (revisado por Pereira et al. 2015). Tanto PKA como AKAP4 se encuentran localizadas en la pieza media y pieza principal del flagelo y se las considera reguladores cruciales del batido flagelar (revisado por Luconi et al. 2011). En este trabajo demostramos que la adición del péptido inhibidor de anclaje afecta la interacción PKA-AKAP4 en espermatozoides murinos (Fig. 12) y que redujo drásticamente la hiperactivación de los mismos (Fig. 13B). En concordancia, resultados obtenidos en espermatozoides knock-out para  $C\alpha_2$ , probaron que la falta de actividad de PKA no afectó el nado espontáneo *in vitro* pero sí la adquisición de un batido flagelar vigoroso (Nolan et al., 2004).

De la misma manera que la hiperactivación se vio impedida, el desanclaje de PKA ocasionó que los espermatozoides **no** pudieran adquirir potencialidad de respuesta acrosómica (Fig. 14A). Así, mientras que un espermatozoide capacitado normalmente lleva a cabo la exocitosis de su contenido acrosomal cuando se lo enfrenta a progesterona, aquellas células en las que se inhibió la interacción PKA-AKAPs antes de iniciar la capacitación, no lograron liberar su contenido acrosomal frente a la inducción con progesterona (Osman et al. 1989; Roldan et al. 1994; Romarowski et al. 2016). En concordancia con la inhibición de los dos parámetros fisiológicos que indican capacitación (hiperactivación y capacidad de respuesta acrosómica), los espermatozoides tratados con sHT31 no lograron fecundar ovocitos *in vitro* (Fig. 14B). En relación a todos los eventos analizados, el péptido control sHT31p, no tuvo ningún efecto inhibitor, sugiriendo que el bloqueo de la capacitación ocasionado por sHT31 no se debió a una alteración de la membrana plasmática ocasionada por la esterificación de la molécula, sino a la disrupción del anclaje de PKA.

Aunque no se puede descartar la posibilidad que el tratamiento con sHT31 pueda afectar la interacción de AKAPs con otras proteínas, la evidencia que apoya el rol de PKA en los procesos estudiados incluye: 1) trabajos previos han demostrado que el bloqueo de la actividad catalítica de PKA da efectos similares a los obtenidos aquí con el inhibidor de anclaje (Baker et al. 2006; Visconti et al. 1995); 2) sHT31 rompe la interacción PKARII/AKAP *in vitro* (Vijayaraghavan et al., 1997) y reduce la interacción con AKAP4 en

espermatozoides murinos (Fig. 12); 3) la incubación con sHT31 bloquea la aparición del patrón de sustratos fosforilados de PKA, tratándose de un indicador directo de la interrupción de actividad biológica de la quinasa; 4) la inhibición de pPKAs no pudo recuperarse mediante la activación directa de PKA con análogos permeables de AMPc (Fig. 11), añadiendo evidencia a que el efecto observado se debe a un alejamiento de PKA de sus sustratos y no a falta de actividad de la quinasa.

La evidencia acumulada indica que al inhibir el anclaje de PKA-AKAPs, los espermatozoides murinos no pueden capacitarse adecuadamente, aun cuando PKA se encuentra catalíticamente activa. Esto se manifestó en la afectación de todos los eventos moleculares asociados a la capacitación que fueron analizados en este trabajo: patrones de fosforilación de proteínas (pPKAs y pY), motilidad hiperactivada, capacidad de respuesta acrosómica y fecundación *in vitro*. Los ensayos indican que el adecuado posicionamiento de PKA por anclaje a las AKAPs celulares (en particular a AKAP4) es crucial para la activación y correcta señalización a través de la vía de AMPc/PKA/pPKAs que resulta en la adquisición del estado capacitado.

La suma de estos resultados señala la importancia fundamental de que PKA se encuentre correctamente anclada, y por lo tanto correctamente localizada, para poder iniciar los eventos moleculares que conducen a la adquisición del estado capacitado.

## **CAPÍTULO II.**

*Regulación del anclaje de PKA durante el  
⊙ proceso de Reacción Acrosómica*

## INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la capacitación, el espermatozoide adquiere una de las propiedades fundamentales para ser fecundante: potencialidad de sufrir reacción acrosómica al enfrentarse a un inductor (La Spina et al., 2017). Si bien se conoce desde hace tiempo que este fenómeno es necesario para lograr la fecundación, aún no se comprenden aspectos fundamentales del proceso, entre ellos: 1) ¿Cuál es la función biológica de la RA durante la fecundación; 2) ¿Cuál es el inductor/agonista fisiológico de la RA?; 3) ¿Cuál es el mecanismo de señalización celular que permite el inicio de la RA?

Respecto al primer punto, ha habido divergencia en la evidencia experimental para responder a esta pregunta. Durante décadas los experimentos de fecundación *in vitro* se realizaron utilizando ovocitos “desnudos”, es decir, la célula con su matriz extracelular específica (denominada *zona pelúcida*), pero despojado de las células del cumulus que rodean al ovocito durante la ovulación y que incluso están presentes durante la fecundación *in vivo*. En este contexto se determinó que la RA ocurría al contacto con la ZP, y se propuso que la liberación de las enzimas hidrolíticas del acrosoma eran necesarias para la degradación de la misma, permitiendo que el espermatozoide pueda atravesarla y alcanzar el ovocito (revisado por La Spina et al. 2017). Este paradigma también propuso que el agonista fisiológico de la RA se encontraba contenido en la matriz extracelular del ovocito, por lo que se comenzó a utilizar zona pelúcida soluble (sZP) como inductor. Sin embargo, estudios recientes demuestran tanto *in vitro* (utilizando ovocitos con cumulus) (Jin et al., 2011) como *in vivo* (La Spina et al., 2016) que la reacción acrosómica se dispara *antes* del contacto del espermatozoide con la ZP. Sumado a esto, el grupo de Yanagimachi demostró que espermatozoides reaccionados recuperados del espacio perivitelino eran aún fecundantes (Inoue et al., 2011), desafiando las concepciones actuales acerca del rol de la RA en el proceso de fecundación. Todo esto sugiere que el inductor de la RA debe ser una sustancia difusible distinta a la sZP, posiblemente secretada por las células del cumulus. Por este motivo se propuso a la progesterona, esteroide producido y excretado por dichas células, como principal candidato inductor de la RA. Es posible también, que la identidad del agonista sea variable según la especie. En este sentido, los trabajos de Lishko y Strünker, proponen que la progesterona sería el inductor nativo en humanos, pero no en ratones. En estos últimos, si bien la progesterona también logra inducir RA en espermatozoides capacitados, lo hace a concentraciones relativamente altas (20 – 40  $\mu\text{M}$ )

cuando se lo compara a las necesarias en humanos ( $< 4 \mu\text{M}$ ) (Lishko et al. 2011; Strünker et al. 2011). Para el estudio de la RA en el laboratorio se han empleado diversos agonistas que suelen encontrarse de manera natural en el tracto reproductor de la hembra (ZP, fluido folicular, progesterona) (Harrison et al. 2000; de Jonge et al. 1993; De La Vega-Beltran et al. 2012), pero también otro tipo de estímulos inductores, como ionóforos de calcio (A23187, ionomicina), o despolarización rápida de la membrana plasmática (empleando altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en presencia de ionóforo de  $\text{K}^+$ ) (De La Vega-Beltran et al., 2012).

Cualquiera sea el estímulo utilizado, el inicio de la RA se asocia a dos eventos característicos: 1) aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y 2) despolarización de la membrana plasmática (que se encontraba hiperpolarizada como resultado de la capacitación). En estas cascadas de señalización, también se ha propuesto a PKA como un modulador de importancia. Desde principio de los años 90 se conoce que al bloquear PKA con inhibidores de su actividad catalítica (KT5720, H89), y luego enfrentar espermatozoides con un inductor de RA (como fluido folicular), se impide la inducción de la exocitosis (de Jonge et al., 1993).

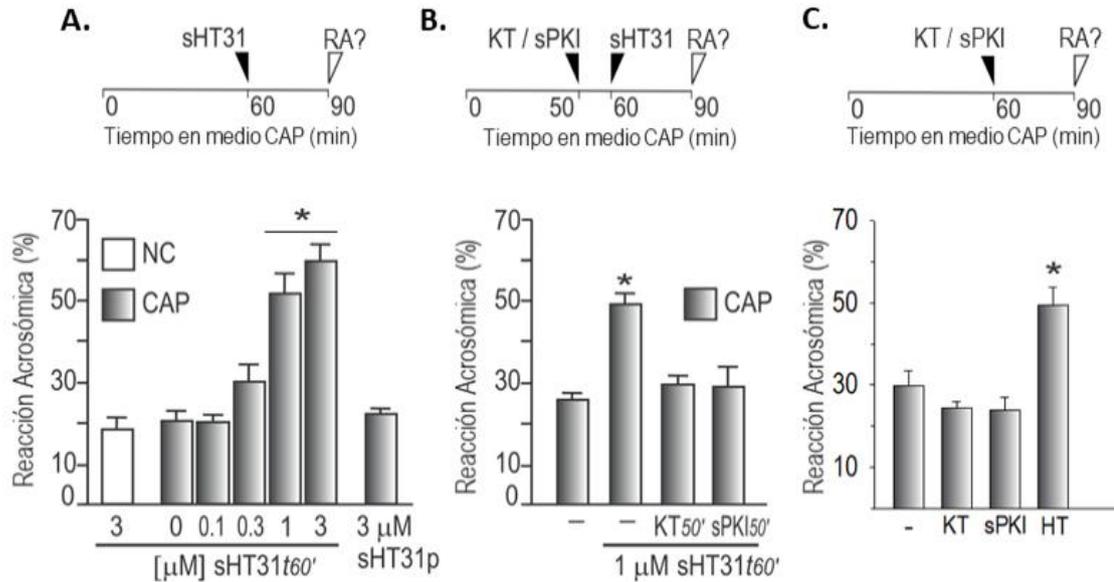
En esta segunda parte del trabajo analizamos el rol del anclaje de PKA en las vías de transducción de señales que inician la exocitosis acrosomal en espermatozoides murinos *previamente capacitados*. Esto nos permitió estudiar mecanismos de regulación no canónicos del eje AMPc/PKA, así como añadir nueva evidencia que explique las posibles diferencias entre la regulación de este proceso en espermatozoides de distintas especies.

## RESULTADOS

### *2.1. El desanclaje de PKA induce la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados*

Considerando que tanto la actividad como el correcto posicionamiento de PKA son necesarios para que los espermatozoides adquieran potencialidad de respuesta acrosomal, decidimos evaluar si la interacción PKA-AKAPs era relevante aún después de que las células hayan adquirido estado capacitado, durante el proceso de RA. Para esto, los espermatozoides incubados en medio capacitante (medio H-TYH suplementado con  $\text{HCO}_3^-$  15 mM y BSA 5 mg/ml) durante 60 min, fueron luego enfrentados a distintas concentraciones de sHT31 antes del tratamiento con progesterona para inducir RA. Sin embargo, sorpresivamente, observamos que el sólo agregado de sHT31 durante 30 min provocó la exocitosis acrosomal en ausencia del inductor, evaluado por tinción con coomassie como se describió previamente (Larson & Miller 1999). El efecto fue dependiente de concentración, lográndose inducción a partir de 1  $\mu\text{M}$  de sHT31, mientras que el análogo inactivo sHT31p no fue capaz de provocar la exocitosis incluso a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  (Fig. 15A). Es importante destacar que **la RA ocurrió exclusivamente en células previamente capacitadas**, pero no así en espermatozoides incubados en medio no capacitante, sugiriendo que la inducción de la exocitosis acrosomal por inhibición del anclaje de PKA-AKAPs, requiere de un estado fisiológico específico de las células masculinas que se alcanza luego del proceso de capacitación.

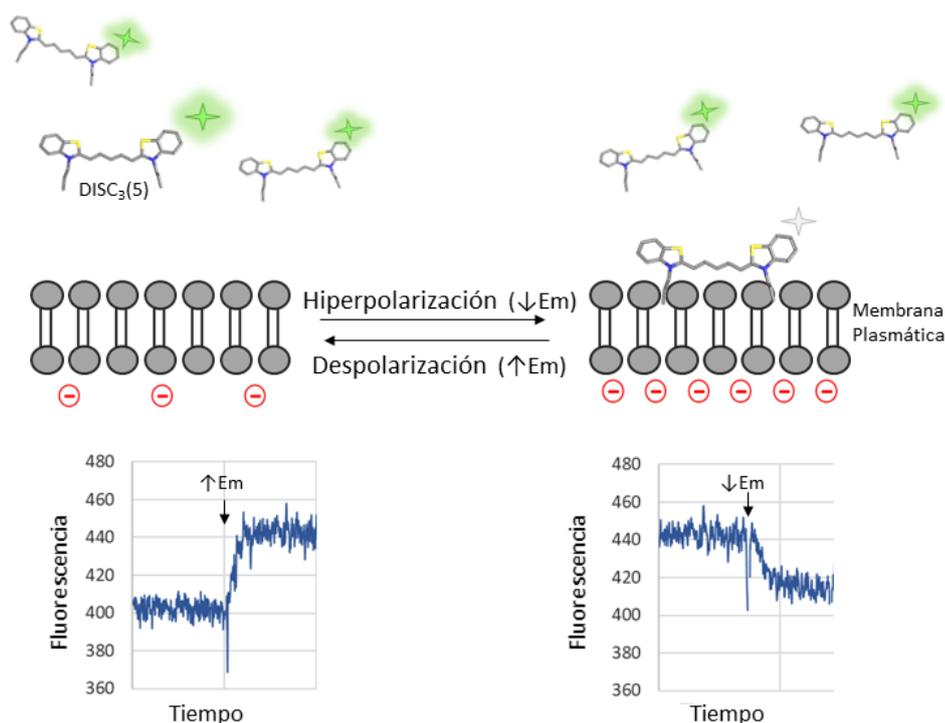
Debido a que las AKAPs no sólo se asocian a PKA, sino también a distintas moléculas de señalización (Carr et al., 2001), decidimos analizar si la RA provocada por el péptido inhibidor de anclaje, estaba efectivamente mediada por esta quinasa. Para ello, se enfrentó a los espermatozoides capacitados con dos inhibidores de actividad catalítica de PKA (sPKI 15  $\mu\text{M}$  y KT5720 30  $\mu\text{M}$ ), 10 min antes del agregado de sHT31 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 15B). En estas condiciones, el desanclaje de PKA no logró inducir RA, demostrando que **es necesario que la quinasa se encuentre activa para poder llevar a cabo la RA**. Sumado a estos resultados, la sólo inhibición de la actividad catalítica de PKA en espermatozoides capacitados, no logró emular el efecto de sHT31 (Fig. 15C), sugiriendo que la inducción de RA no se debe a la pérdida de regulación de un sustrato por alejamiento de PKA, sino más bien a la acción de PKA activa sobre una nueva diana.



**Figura 15. La reacción acrosómica puede ser inducida por el anclaje de PKA.** Se evaluó el estado acrosomal de espermatozoides tratados en distintas condiciones por tinción con coomassie. A) Los espermatozoides fueron incubados en medio no capacitante (NC, barra blanca) o capacitante (CAP, barras grises) durante 60 min, seguido de agregado de distintas concentraciones de sHT31 o sHT31p por 30 min adicionales, antes del evaluar reacción acrosómica. B) Los espermatozoides fueron incubados en medio CAP durante 50 min, seguido de agregado de sPKI 15  $\mu$ M o KT5720 30  $\mu$ M. A los 60 min, fueron expuestos a sHT31 1  $\mu$ M durante 30 min adicionales, antes de evaluar reacción acrosómica. C) Espermatozoides fueron incubados 60 min en medio CAP. A los 60 min se enfrentaron alternativamente a KT5720 30  $\mu$ M (KT), sPKI 15  $\mu$ M o sHT31 1  $\mu$ M durante 30 min adicionales antes de evaluar reacción acrosómica. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 4 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Durante el desarrollo de la capacitación existen distintos eventos moleculares que preparan a los espermatozoides para sufrir la exocitosis del acrosoma. Entre ellos destaca la hiperpolarización del potencial de membrana ( $E_m$ ), que se ha demostrado que es un evento necesario y suficiente para la adquisición de respuesta acrosomal en espermatozoides murinos (De La Vega-Beltran et al., 2012). De esta manera, las células espermáticas pasan de un potencial despolarizado en condiciones no capacitantes, a adquirir un estado hiperpolarizado durante la capacitación. Dado que dicho evento es dependiente de la activación temprana de PKA (Escoffier et al., 2015), quisimos evaluar cuál era el efecto de inhibir la interacción PKA-AKAPs sobre este parámetro. Para ello, se hicieron medidas de fluorometría poblacional en las cuales se carga a los espermatozoides

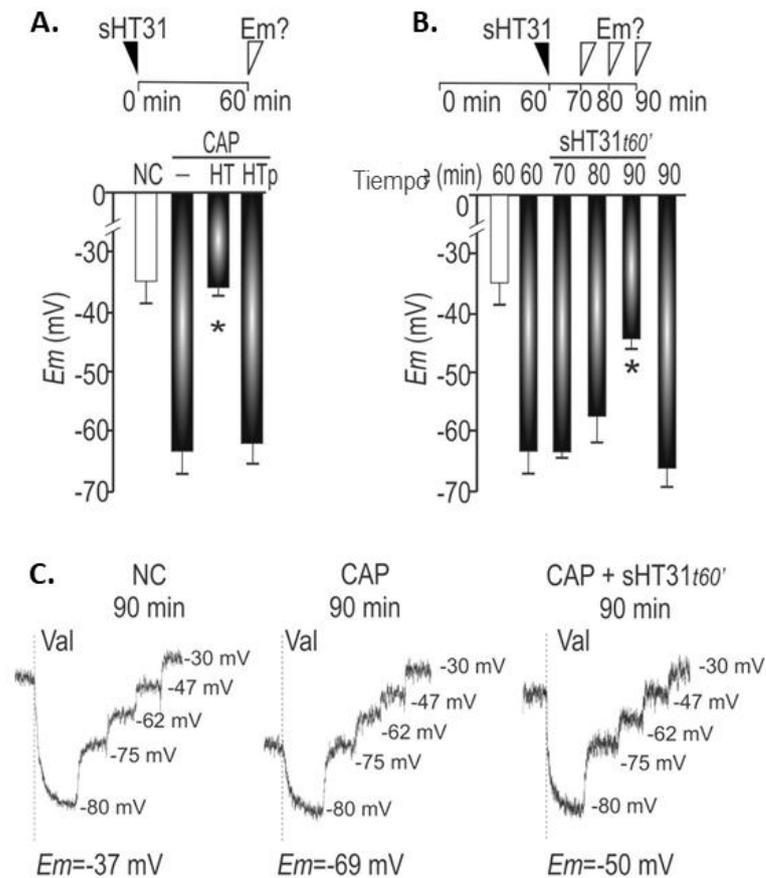
con la sonda sensible a potencial de membrana  $\text{DISC}_3(5)$ . La misma presenta carga neta positiva y puede particionarse libremente entre la membrana plasmática y el medio extracelular. Considerando que la emisión de fluorescencia se apaga en el entorno de la bicapa lipídica, si las células negativizan su potencial interno, el fluoróforo es translocado a la membrana plasmática y se da una caída de fluorescencia. En el caso contrario, si el potencial de membrana se despolariza, la sonda de carga positiva se acumula en el medio extracelular y la emisión de fluorescencia aumenta (Fig. 16).



**Figura 16. Mecanismo de acción de la sonda  $\text{DISC}_3(5)$ , sensible a cambios en el potencial de membrana.**  $\text{DISC}_3(5)$  fluoresce en el medio extracelular, pero su emisión se apaga en el entorno de la membrana plasmática. Cuando las células sufren hiperpolarización ( $\downarrow \text{Em}$ ), la sonda de carga positiva es reclutada hacia la membrana plasmática y la fluorescencia en el medio extracelular decae. En el caso de una despolarización ( $\uparrow \text{Em}$ ), ocurre el proceso inverso y se reestablece su emisión. En el panel inferior se muestran las gráficas correspondientes a una situación en donde a una población de células se les aplica un estímulo de despolarización ( $\uparrow \text{Em}$ ) como el agregado de potasio, o una situación donde se aplica un estímulo de hiperpolarización ( $\downarrow \text{Em}$ ) como el agregado de valinomicina. Los cambios de fluorescencia pueden luego convertirse a valores de potencial de membrana utilizando la ecuación de Nernst, si al final de cada condición experimental se realiza una curva de calibración (no se muestra en la imagen).

Cuando se inhibió el anclaje de PKA a AKAPs incubando a los espermatozoides en presencia de sHT31 1  $\mu\text{M}$  desde el comienzo de la capacitación, no hubo hiperpolarización de la membrana plasmática (Fig. 17A). Este resultado está en concordancia con los observados previamente en el presente trabajo, en donde el desanclaje de PKA bloqueó el desarrollo de *todos* los eventos asociados a capacitación estudiados. Por el contrario, cuando los espermatozoides primero fueron capacitados y *luego* enfrentados a sHT31 1  $\mu\text{M}$  se observó una **despolarización progresiva** del Em, medida luego de 10, 20 y 30 min de interrumpir el anclaje de PKA (Fig. 17B). Tradicionalmente se asocia la despolarización del Em en espermatozoides capacitados con la inducción de la RA por progesterona, ya que la misma se ve acompañada o disparada por un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que causa la pérdida de la hiperpolarización alcanzada durante la capacitación.

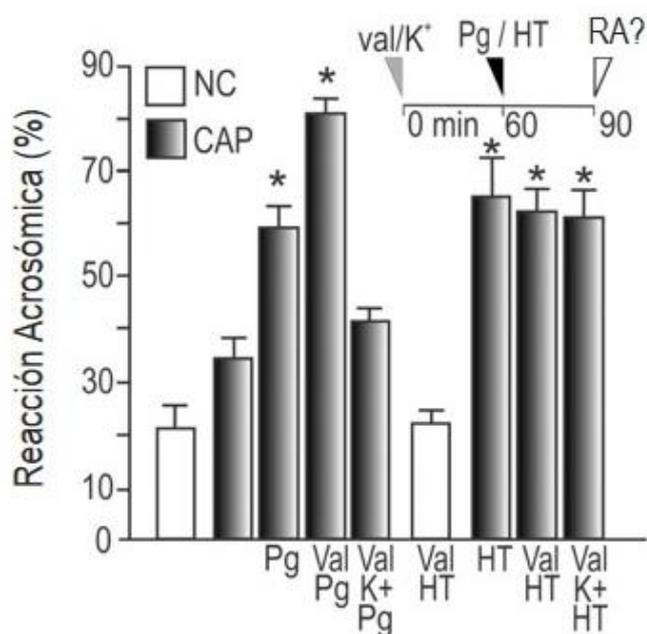
Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que la hiperpolarización es un evento necesario y suficiente para que los espermatozoides puedan sufrir RA al enfrentarse a sZP (De La Vega-Beltran et al., 2012). Que sea “suficiente” significa que si a un espermatozoide no capacitado se lo hiperpolariza farmacológicamente y luego se lo enfrenta al inductor, sufrirá RA. La hiperpolarización farmacológica puede lograrse empleando valinomicina que es un ionóforo de  $\text{K}^+$ . Que sea “necesaria” significa que si a un espermatozoide en medio capacitante se lo mantiene en condiciones de despolarización permanente, el agregado del inductor no provocará la RA. Para mantener una condición de despolarización permanente se añade al medio valinomicina y altas concentraciones de  $\text{K}^+$  desde el comienzo de la incubación en medio capacitante.



**Figura 17. Efecto del desanclaje de PKA en distintos momentos de la capacitación espermática sobre el potencial de membrana (Em).** A) Mediciones de Em de espermatozoides incubados durante 60 min en medio no capacitante (NC, barra blanca) o capacitante (CAP, barras grises), en presencia o ausencia de sHT31 1  $\mu$ M (HT) o sHT31p 1  $\mu$ M (HTp). B) Mediciones de Em realizadas luego de 60 min de incubación en medio NC (barra blanca) o CAP (barras grises). Donde se indica, sHT31 1  $\mu$ M fue agregado a los 60 min de incubación y el Em se midió 10, 20 ó 30 min luego de la adición. En A) y en B) las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones. C) Trazos representativos de las gráficas de fluorescencia vs. tiempo que se obtienen en estos experimentos, para espermatozoides incubados 90 min en medio NC, CAP o CAP con agregado de sHT31 1  $\mu$ M a los 60 min (CAP+sHT31t60'). Cada condición experimental tiene asociada una curva de calibración que comienza con el agregado de valinomicina (Val) y continúa con la adición sucesiva de cantidades conocidas de  $K^+$ . Al lado de cada trazo, se muestra el valor correspondiente de Em obtenido a partir de la ecuación de Nernst.

Con el fin de evaluar la necesidad y suficiencia de la hiperpolarización en la RA inducida por desanclaje de PKA, se incubaron suspensiones de espermatozoides en condiciones de hiperpolarización farmacológica o de despolarización en medio

capacitante, durante 60 min. Luego de este tiempo se añadió progesterona al medio y 30 min más tarde se analizó el porcentaje de RA por tinción con coomassie (Fig. 18). Cuando espermatozoides no capacitados fueron tratados con valinomicina y luego enfrentados a sHT31, no hubo inducción de RA, sugiriendo que **la hiperpolarización por sí sola no es suficiente para estimular RA por desanclaje de PKA**. Lo observado condice con resultados previos donde se vio que el agregado de sHT31 sólo provoca la RA cuando PKA está activa (Fig. 15B), lo cual no ocurre en el medio no capacitante (sin  $\text{HCO}_3^-$ ) de la condición analizada.

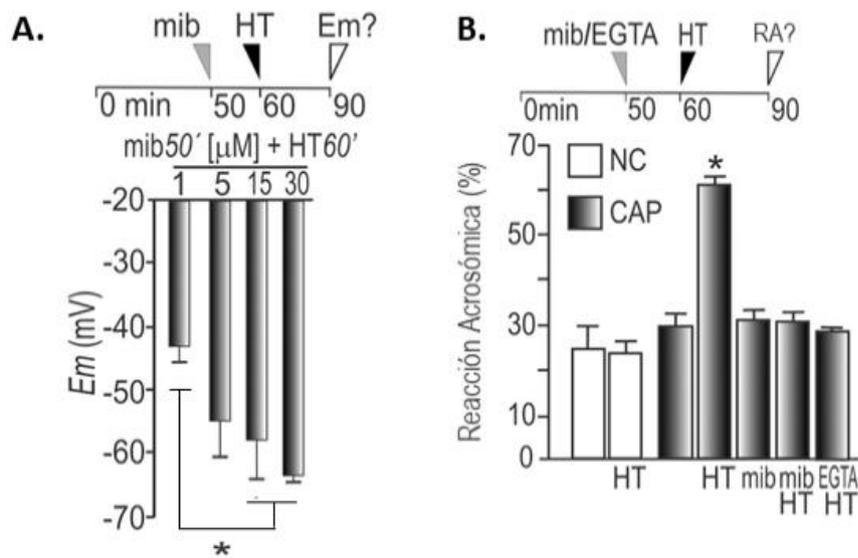


**Figura 18. El desanclaje de PKA induce reacción acrosómica por un mecanismo independiente de hiperpolarización.** Los espermatozoides fueron incubados por 60 min en medio no capacitante (NC, barras blancas) o capacitante (CAP, barras grises), en condiciones de hiperpolarización (valinomicina 1  $\mu\text{M}$  -Val-) o de despolarización permanente (Valinomicina 1  $\mu\text{M}$  + KCl 70 mM -Val K-). Alternativamente, la estimulación de la reacción acrosómica (RA) se realizó añadiendo progesterona 40  $\mu\text{M}$  (Pg) o sHT31 1  $\mu\text{M}$  (HT) a los 60 min. El estado acrosomal fue evaluado 30 min más tarde. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + \text{EE}$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Para determinar si la hiperpolarización es necesaria en la inducción de RA por desanclaje de PKA, se incubaron espermatozoides en medio capacitante pero en condiciones de despolarización permanente (valino +  $K^+$  70 mM) (Fig. 18). En esta situación donde PKA se activa por la presencia de  $HCO_3^-$  en el medio, pero no se permite que se logre la hiperpolarización, el agregado de sHT31 fue capaz de inducir RA de manera equivalente al control (CAP+sHT31). En suma, esto indica que **la inducción de RA por desanclaje de PKA es independiente de la hiperpolarización** de la membrana plasmática, **pero sí requiere de la activación de PKA** durante la capacitación y de que permanezca activa una vez alcanzado el estado capacitado.

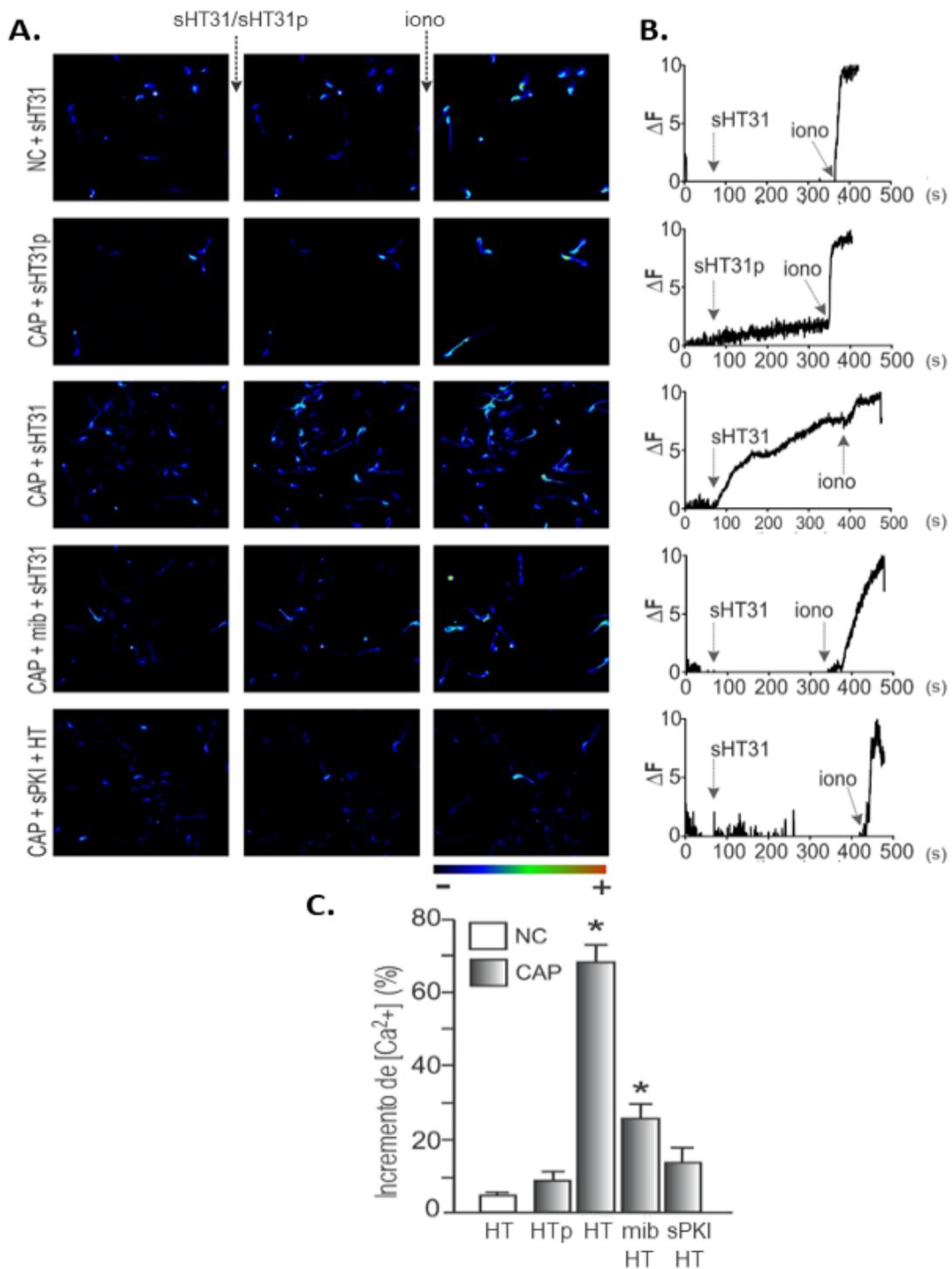
## ***2.2. La reacción acrosómica inducida por desanclaje de PKA está mediada por aumento de $Ca^{2+}$ intracelular***

En la RA inducida por agonistas fisiológicos, la despolarización de la membrana se asocia a un influjo de  $Ca^{2+}$  con la posterior exocitosis del contenido acrosomal. Para evaluar si la despolarización inducida por sHT31 (Fig. 17B) estaba asociada a un influjo de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, se repitió la medición de Em por fluorometría poblacional con DISC<sub>3</sub>(5), pero en presencia del inhibidor de canales de  $Ca^{2+}$ , mibefradil (Fig. 19A). El experimento se diseñó de manera que los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante durante 50 min, momento en el cual se agregaron distintas concentraciones de mibefradil. A los 60 min se añadió sHT31 1  $\mu$ M para desanclar a PKA, y 30 min más tarde se analizó el Em. Los resultados obtenidos muestran que **al bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  con mibefradil, el desanclaje de PKA no provoca despolarización** en las células capacitadas. De igual manera, al repetir el diseño experimental pero analizando el estado acrosomal por tinción con coomassie, observamos que tanto en presencia de mibefradil, como **en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular** (por agregado de EGTA), **sHT31 no es capaz de estimular RA** (Fig. 19B). Estos datos señalan la necesidad de este catión en la RA inducida por desanclaje de PKA y demuestran que la despolarización observada es consecuencia de su influjo al citoplasma de espermatozoides capacitados.



**Figura 19. El desanclaje de PKA induce despolarización en espermatozoides capacitados como consecuencia del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ .** A) Los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitante durante 50 min, seguido de agregado de distintas concentraciones del inhibidor de canales de calcio, mibefradil (mib). A los 60 min, los espermatozoides fueron enfrentados con sHT31 1  $\mu\text{M}$  (HT) e incubados por 30 min adicionales, antes del análisis de  $E_m$  por fluorimetría poblacional con  $\text{DISC}_3(5)$ . B) Los espermatozoides fueron incubados por 60 min en medio no capacitante (NC, barras blancas) o capacitante (CAP, barras grises) antes de ser enfrentados a sHT31 1  $\mu\text{M}$  (HT). Alternativamente, a los 50 min, se añadió EGTA 5 mM o mibefradil 5  $\mu\text{M}$  (mib). El estado acrosomal (RA) fue evaluado por tinción con coomassie a los 90 min. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + \text{EE}$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Con el fin de corroborar si la inducción de RA por desanclaje de PKA estaba asociada a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), realizamos mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Fig. 20). En estos experimentos, espermatozoides incubados en medio capacitante o no capacitante, fueron cargados con la sonda fluorescente Fluo3-AM, sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta puede difundir a través de la bicapa lipídica debido al grupo funcional acetoximetil éster (AM) y una vez dentro de la célula es retenida por la acción de esterasas citoplasmáticas que lo escinden del fluoróforo. Luego, los espermatozoides fueron lavados y adheridos sobre cubreobjetos cubiertos con laminina. Este tratamiento permite la retención de las gametas vivas, por interacción de la laminina con las cabezas, mientras los flagelos quedan libres.



**Figura 20. El desanclaje de PKA provoca la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a mibefradil.** Espermatozoides no capacitados (NC) o capacitados (CAP) fueron cargados con la sonda sensible a  $Ca^{2+}$ , Fluo3-AM, adheridos a cubreobjetos pre-tratados con laminina y analizados por microscopía de fluorescencia en el tiempo (3 Hz). Donde se indica, las células fueron pre-incubadas con mibefradil 5  $\mu M$  (mib) o sPKI 15  $\mu M$ , 10 min antes de iniciar las mediciones de fluorescencia. En todos los casos se registró la fluorescencia inicial constante, luego se añadió sHT31 1  $\mu M$  a la suspensión de espermatozoides para analizar fluctuaciones de  $[Ca^{2+}]$ . Finalmente, se añadió ionomicina (iono) 10  $\mu M$  como control de vitalidad y respuesta del sistema.

A) Imágenes representativas de experimentos independientes, correspondientes a la  $[Ca^{2+}]_i$  obtenidas antes y después del agregado de sHT31 o sHT31p 1  $\mu$ M. La escala de colores que se muestra al pie, representa intensidad de señal. B) Trazos representativos de los cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  correspondientes a una única célula. Las gráficas muestran Fluorescencia vs tiempo (s), en donde el eje de ordenadas representa los cambios de fluorescencia calculados como  $(F-F_0)/(F_{max}-F_0)$ , donde  $F_0$  es la fluorescencia inicial,  $F_{max}$  es el valor máximo de fluorescencia obtenido en respuesta a ionomicina, y  $F$  es el valor de fluorescencia en un dado punto de tiempo. Las flechas indican el momento de agregado de sHT31, sHT31p o ionomicina (iono). C) Porcentaje de incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por sHT31 o sHT31p bajo las condiciones indicadas, con respecto al incremento provocado por ionomicina (100 %). HT = sHT31 1  $\mu$ M, HTp = sHT31p 1  $\mu$ M, mib = mibefradil 5  $\mu$ M, sPKI = sPKI 15  $\mu$ M. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

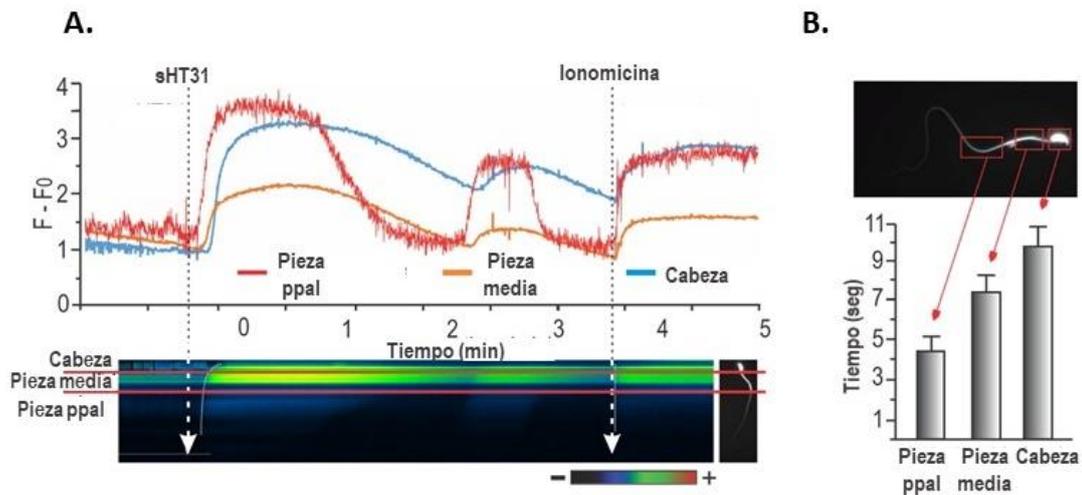
La figura 20 muestra que **el desanclaje de PKA por agregado de sHT31 provoca un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en espermatozoides capacitados**, pero no en espermatozoides no capacitados. Como era de esperar, este aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  no se vio cuando espermatozoides capacitados fueron tratados con el análogo inactivo sHT31p 3  $\mu$ M, ni cuando se bloqueó la actividad catalítica de PKA con el inhibidor sPKI, antes del agregado de sHT31. Más aún, la magnitud de ingreso de  $Ca^{2+}$  inducida por desanclaje de PKA se vio significativamente reducida por el tratamiento con mibefradil 5  $\mu$ M, reforzando la hipótesis de que la entrada del catión ocurre a través de canales de la membrana plasmática (ya sea canales de tipo T o CatSper). Como control experimental de respuesta, a todas las mediciones se les añadió el ionóforo de  $Ca^{2+}$  ionomicina que debería estimular el aumento de fluorescencia independientemente de cuál sea la condición.

### ***2.3. El ingreso de $Ca^{2+}$ durante la reacción acrosómica inducida por desanclaje de PKA ocurre a través del canal CatSper***

En espermatozoides murinos se han hallado indicios de la presencia de distintos tipos de canales de  $Ca^{2+}$ : canales operados por reservas (SOCs), canales operados por voltaje (tipo T), y el canal específico de espermatozoides CatSper (Darszon et al., 2011), coincidente con su localización en la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014).

Nuestros experimentos indican que la inhibición de la interacción PKA-AKAPs en espermatozoides capacitados, gatilla un influjo de  $Ca^{2+}$  en las células. Sin embargo, el

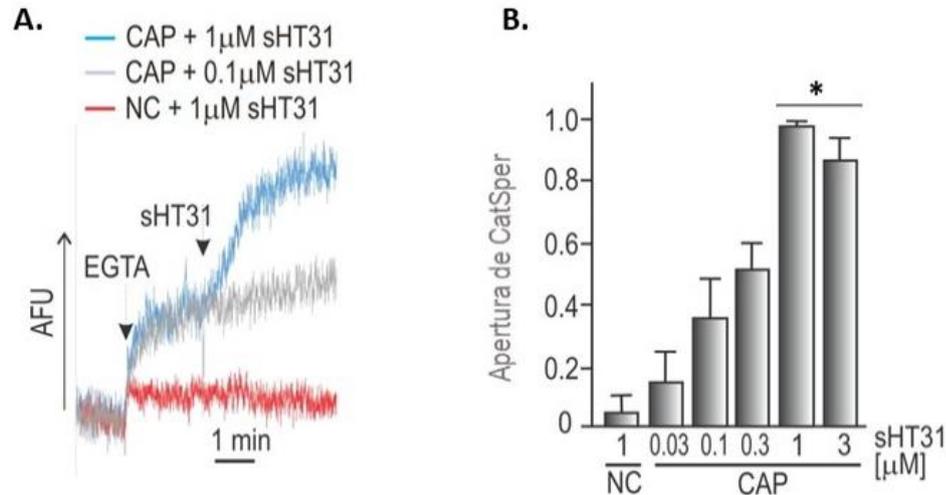
inhibidor mibefradil bloquea tanto a los canales de tipo T como a CatSper (Darszon et al., 2011). Mientras que CatSper se ubica en el flagelo, los canales tipo T se han encontrado expresados en la cabeza (Treviño et al., 2004), de manera que al determinar dónde inicia el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  con sHT31 se puede tener un indicio de si ocurre a través de un tipo de canal o del otro. Para ello llevamos a cabo experimentos de microscopía de célula única donde se siguió en tiempo real el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionado por sHT31 1  $\mu\text{M}$  en espermatozoides cargados con Fluo3-AM. Para esto, empleamos cubreobjetos pretratados con concanavalina-A que facilita la adhesión de todo el espermatozoide (cabeza y flagelo) y una cámara con mayor velocidad de adquisición de imágenes (10 Hz, 100 ms/cuadro), que nos permitiera capturar eventos de cinética rápida. En la figura 21A se muestra un trazo representativo del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las distintas regiones de un espermatozoide, acompañado del quimógrafo para dicha célula. Un quimógrafo es una gráfica utilizada para analizar procesos dinámicos, en donde se plasma el tiempo en el eje x, mientras que el eje y se asocia a una localización espacial. La escala de colores indica la intensidad de respuesta. Así, si se comienza avanzando sobre el eje “tiempo” (eje x) se verá un cambio de color de negro (intensidad de señal 0) a celeste que comienza en la región del eje y que corresponde a pieza principal. Este cambio de color (intensidad de señal) se propaga rápidamente a la región de pieza media y cabeza, y luego decrece y vuelve a crecer en un comportamiento oscilatorio. En contraste, el agregado de ionomicina como control de respuesta del sistema, provocó un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  simultáneo a lo largo del eje y, es decir, en todas las secciones del espermatozoide. Así, el análisis del aumento de señal definiendo distintas regiones dentro de la célula espermática, reveló que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  se evidencia primero en pieza principal, luego se propaga hacia pieza media y finalmente a la cabeza (Fig. 21B).



**Figura 21. El desanclaje de PKA provoca un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que inicia en la pieza principal.** Los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante por 60 min y luego adheridos a cubreobjetos pre-tratados con concanavalina-A. Las imágenes de microscopía fueron obtenidas a velocidades de captura de 100 ms/cuadro (10 Hz), permitiendo el análisis detallado de las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las distintas regiones del espermatozoide. A) En el panel superior se muestra los trazos correspondientes a la variación de fluorescencia ( $F-F_0$ ) en el tiempo correspondientes a 3 secciones de una célula espermática: pieza principal (Pieza ppal), pieza media y cabeza. Las flechas indican el momento del agregado de sHT31 1  $\mu\text{M}$  y de ionomicina 10  $\mu\text{M}$ . En el panel inferior se muestra el quimógrafo asociado a la gráfica de variaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de una célula representativa. B) Gráfico de barras indicando los tiempos en los que aumentó la señal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la pieza principal (Pieza ppal), pieza media y cabeza. Las barras representan el promedio de  $n = 5 + \text{EE}$ .

Considerando la localización de CatSper en la pieza principal y el hecho de que el mibefradil a bajas concentraciones bloquea a este canal, la evidencia experimental avala el rol de CatSper en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido por sHT31. El desanclaje de PKA en espermatozoides capacitados induce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que inicia en la pieza principal, sitio donde se localiza el canal CatSper. La onda de calcio se propaga hacia la pieza media y alcanza finalmente la cabeza, con un retardo de aproximadamente  $5,2 \pm 0,8$  segundos desde el inicio en la pieza principal. De esta manera, se muestra evidencia de un evento que comienza en el flagelo y puede inducir un cambio en la región de la cabeza, disparando una señal que acabará en RA.

Con el fin de verificar que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  cursa a través de CatSper, realizamos mediciones indirectas de apertura de este canal. Para ello, se utiliza el principio de que en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se genera una entrada masiva de  $\text{Na}^+$  a través de CatSper, que a su vez provoca una despolarización del Em. Este efecto se anula en espermatozoides que carecen del canal, indicando que el ingreso de sodio ocurre exclusivamente a través del mismo (Carlson et al., 2009). Así, utilizando la sonda sensible a Em,  $\text{DISC}_3(5)$ , se puede obtener una medida indirecta de apertura de CatSper, a partir de la magnitud de despolarización causada por sHT31, tras suprimir la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio por agregado de EGTA (Torres-Flores et al., 2011). Una mayor despolarización por ingreso de  $\text{Na}^+$  a la célula se visualiza como un aumento de fluorescencia en experimentos poblacionales. La magnitud de este incremento dependerá de la cantidad de canales CatSper en estado “abierto”. Utilizando esta estrategia, estudiamos si la interrupción de la unión PKA-AKAPs provocaba apertura de CatSper en espermatozoides capacitados (Fig. 22). Para ello, se capacitaron espermatozoides durante 60 min y luego se los enfrentó a distintas concentraciones de sHT31. Se observó un efecto de apertura dependiente de concentración, de manera que la despolarización se volvió máxima a 1  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, cuando espermatozoides no capacitados fueron enfrentados a sHT31 1  $\mu\text{M}$ , no hubo despolarización asociada a apertura de CatSper, sumando evidencia a que el desanclaje de PKA sólo induce RA y eventos asociados en espermatozoides que previamente hayan adquirido el estado capacitado.



**Figura 22. El desanclaje de PKA provoca despolarización del potencial de membrana ( $E_m$ ) asociada a la apertura de CatSper en espermatozoides capacitados.** Los espermatozoides incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) durante 60 min, fueron cargados con la sonda sensible a potencial de membrana, DISC<sub>3</sub>(5). Los cambios de fluorescencia (AFU) asociados a cambios de  $E_m$ , fueron seguidos en experimentos de fluorimetría poblacional, en los que se añadió EGTA 3.5 mM para quelar cationes divalentes. En estas condiciones, CatSper se vuelve permeable al Na<sup>+</sup> presente en el medio. Luego del agregado de EGTA, los espermatozoides fueron enfrentados a distintas concentraciones de sHT31. Los aumentos de AFU (despolarización de  $E_m$ ) observados durante la medición, se asocian a mayor apertura del canal. A) Curvas de AFU vs tiempo, representativas de las 3 condiciones experimentales indicadas. B) Las barras representan la magnitud de apertura de CatSper para las condiciones señaladas. Estos valores fueron obtenidos como  $(F_{\text{sHT31}} - F_{\text{EGTA}})/(F_{\text{EGTA}} - F_0)$ , en donde  $F_{\text{sHT31}}$  es la fluorescencia luego del agregado de sHT31,  $F_{\text{EGTA}}$  es la fluorescencia luego del agregado de EGTA, y  $F_0$  es la fluorescencia al inicio de la medición. Las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + \text{EE}$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

## DISCUSIÓN

El rol de PKA durante la reacción acrosómica ha sido abordado previamente utilizando inhibidores que bloquean su actividad catalítica, revelando la importancia de esta quinasa en la exocitosis acrosomal inducida por progesterona (Harrison et al. 2000), sZP (Bielfeld et al. 1994; Wu & Sampson 2014), y db-AMPC (De Jonge et al., 1991; Kuji et al., 2005), tanto en ratón como en humano, aunque podrían seguir caminos de señalización distintos. Sin embargo, en el campo de transducción de señales, se está comenzando a enfocar la atención no sólo en el encendido/apagado de las moléculas de señalización, sino también en los cambios en localización subcelular de las mismas. Para abordar este aspecto de la regulación no canónica de PKA, analizamos el rol del anclaje de PKA a AKAPs en espermatozoides que ya han adquirido el estado capacitado, utilizando el péptido inhibidor de anclaje sHT31. Típicamente, los efectos obtenidos utilizando sHT31 emulan a los que se obtienen con inhibidores catalíticos de PKA, es decir, una reducción en la respuesta mediada por la quinasa, presuntamente asociada a un alejamiento de PKA de sus sustratos naturales y consecuente incapacidad para regularlos (revisado por Kennedy & Scott 2015 y Luconi et al. 2011). Sin embargo, ese no fue el caso en el presente trabajo, en donde la inhibición de la interacción PKA-AKAPs estimuló la reacción acrosómica sólo en espermatozoides capacitados, pero no en las células no capacitadas (Fig. 15), indicando que el efecto inductor sólo ocurre bajo condiciones fisiológicas específicas de las gametas masculinas. Debido a que otras moléculas de señalización poseen dominios R2D2 de unión a AKAPs (ROPN1, ASP, SP17 y CABYR) (Carr et al. 2001), no puede descartarse la contribución de las mismas a los efectos observados por adición de sHT31. Sin embargo, el hecho de que la RA inducida por sHT31 fue impedida por inhibidores específicos de actividad catalítica de PKA (sPKI y KT5720) demuestra que esta quinasa juega un rol preponderante en el mecanismo de inducción.

La RA gatillada por inhibición de la interacción PKA-AKAPs se vio acompañada de un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediado por CatSper. Los datos que fundamentan la participación de este canal son: 1) el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  comienza en la pieza principal del flagelo donde se localiza CatSper (Fig. 21); excluyendo la posibilidad de que el ingreso inicial se deba a canales Cav3.2 o Cav2.3 que se ubican en la cabeza; 2) concentraciones de mibefradil que inhiben específicamente a CatSper lograron impedir el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y la RA inducidos por desanclaje de PKA (Fig. 19 y 20) y 3) el agregado de sHT31 provocó

apertura de CatSper (Fig. 22). Si bien el influjo de  $Ca^{2+}$  comienza en la pieza principal, queda aún sin elucidar cuál es el mecanismo de propagación del mensajero hasta la cabeza. En este sentido podría tratarse de la difusión misma del catión a lo largo del flagelo, aunque parece poco probable debido a la presencia de bombas de extrusión (Schuh et al. 2004; Withers et al. 2006) y a la fuerte compartimentalización en la región de la pieza media (revisado por Buffone et al., 2012). La alternativa más probable, es una activación secuencial de canales de calcio a lo largo de la célula espermática, culminando en la liberación de  $Ca^{2+}$  almacenado en el acrosoma (Spungin & Breitbart 1996). La detección de receptores de inositol 1,4,5-trifosfato en el acrosoma de varias especies es consistente con la función de la vesícula como reservorio de calcio (Walensky & Snyder 1995). Tanto PKA como CatSper localizan en el flagelo espermático de ratón (Chung et al., 2014; Moos et al., 1998; Wertheimer et al., 2013), pero la exocitosis acrosomal es un evento típicamente asociado a la cabeza. Si bien funciones claves como la RA y la motilidad espermática se encuentran estructuralmente compartimentalizadas en la cabeza y cola del espermatozoide, respectivamente, nuestros resultados demuestran por primera vez cómo eventos que ocurren en el flagelo (des-localización de PKA, apertura de CatSper), se comunican con la cabeza para influir sobre la RA. Los datos presentados en el presente trabajo se refuerzan con los obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Visconti (University of Massachusetts, Amherst): en espermatozoides de ratones knock-out en CatSper no fue posible inducir RA por desanclaje de PKA, probando la conexión entre ambos sucesos (Stival et al., 2018).

En contraste con el típico rol asignado a AKAPs de acercar a PKA a sus sustratos, podría pensarse una función opuesta durante ciertos momentos de la capacitación espermática, en donde el anclaje a AKAPs mantiene a la quinasa alejada de ciertos sustratos, previniendo RA espontánea o prematura. Esto abre la posibilidad de que la interacción con AKAPs mantenga confinada a PKA hasta el momento en que se active una señalización adecuada en los inicios de la exocitosis acrosomal. En este modelo, el agregado de sHT31 forzaría la disociación de PKA de AKAP, alterando el posicionamiento subcelular de la quinasa y permitiendo la fosforilación de nuevos sustratos involucrados en la RA. Sería interesante analizar los mecanismos por los cuales se daría una regulación diferencial de la asociación PKA-AKAPs en el espermatozoide. En este sentido, Breitbart y col. informaron que durante la capacitación de espermatozoides bovinos AKAP3 es fosforilada y dicha fosforilación actúa como marca para señalar su degradación. De esta

manera, se provoca la disociación de PKA y AKAP3 como resultado de la proteólisis de la proteína de anclaje y esto, a su vez co-relacionó con un mayor porcentaje de RA (Hillman et al., 2013). Otra alternativa de regulación diferencial en el anclaje podría incluir modificaciones post-traduccionales que a su vez ocasionen un cambio en la afinidad de unión entre las subunidades regulatorias de PKA y AKAPs, o incluso entre las subunidades PKAR y las subunidades PKAc que provoquen la liberación activa de estas últimas.

## **CAPÍTULO III.**

*Rol de Src en la adquisición de capacidad  
de respuesta acrosómica*

## INTRODUCCIÓN

El incremento en el patrón de fosfotirosinas (pY) se ha utilizado tradicionalmente como marcador molecular de la capacitación desde su descubrimiento en 1995 (Visconti et al. 1995). A pesar de que la aparición de un perfil de proteínas fosforiladas en tirosinas durante la capacitación está ampliamente documentada, la identificación de la(s) tirosina quinasa(s) responsable(s) ha probado ser un desafío. Hace apenas dos años mediante el uso de ratones knock-out se identificó inequívocamente a la quinasa no receptora FER como la responsable de este evento (Alvau et al., 2016).

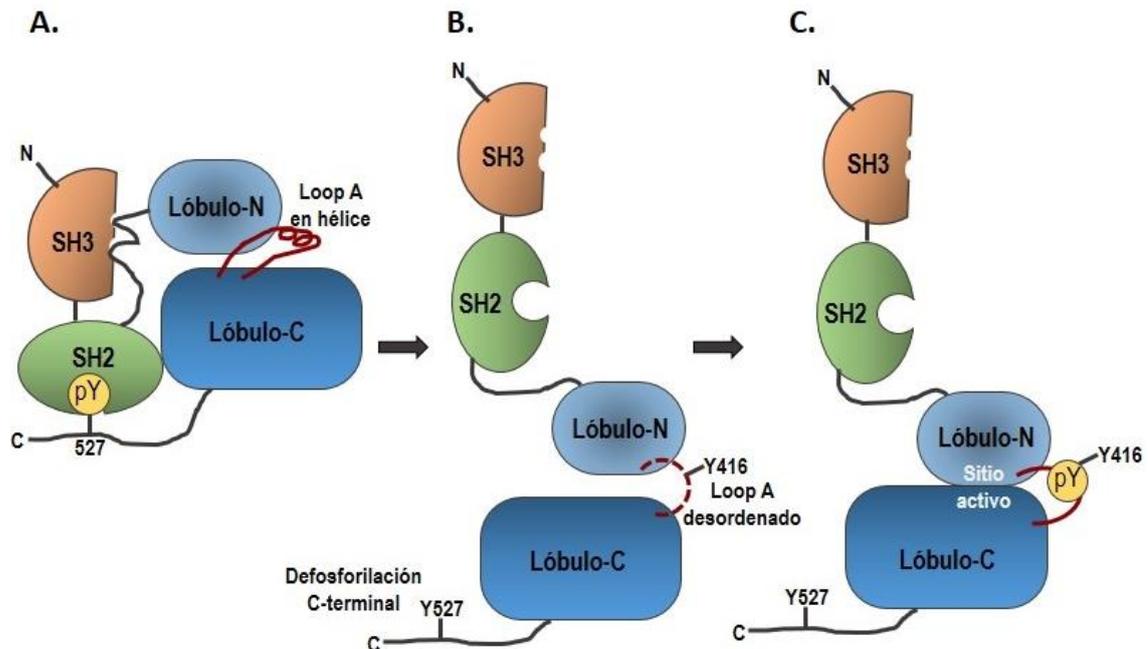
Antes de que la quinasa FER apareciera en escena, el grupo de Baker propuso a la tirosina quinasa **Src** como la responsable de la fosforilación de residuos de tirosinas (Baker et al. 2006). Esta interpretación se basó en trabajos con espermatozoides de ratón utilizando inhibidores de la familia Src quinasa, donde en presencia de ellos no sólo se bloqueaba la aparición de pY, sino también otros eventos asociados a capacitación (Baker et al. 2006). Sin embargo, las concentraciones de inhibidores utilizadas en dichos experimentos fueron al menos 30 veces más altas (30  $\mu\text{M}$ ) que las esperadas (0.1-1  $\mu\text{M}$ ) para el bloqueo específico de Src *in vivo* en otros modelos, resultando posiblemente en efectos inespecíficos (Blake et al., 2000; Boschelli et al., 2001). Trabajos posteriores con ratones knock-out en Src (Src-KO) demostraron que tanto el patrón de sustratos fosforilados de PKA (pPKAs) como el de pY ocurren naturalmente en ausencia de la quinasa, probando que su participación en estos fenómenos no es necesaria (Krapf et al., 2012). No obstante, los **ratones Src-KO resultaron infértiles** (Krapf et al., 2010) y sus espermatozoides no lograron fecundar *in vitro*, sugiriendo una función esencial de Src en el proceso global de capacitación. De esta manera, la pregunta que subyace es **¿cuál es el rol de Src en la capacitación espermática?**

### ***Src* tirosina quinasa**

Src es una enzima de expresión ubicua en distintos tipos celulares y pertenece a una familia de tirosina quinasa no receptoras, conocidas como SFKs (Src Family Kinases), que incluye a: Src, Fyn, Yes, Blk, Lyn, Hck, Lck, Frk, Yrk y Fgr (Amata et al. 2014). Todas ellas se caracterizan por presentar una alta homología de secuencia y una estructura con cinco dominios distintos: N-terminal, SH3, SH2, SH1 y C-terminal. La región N-terminal es donde se localiza la mayor divergencia de secuencia entre los miembros de la familia SFK y contiene residuos que pueden ser acilados para dirigirlos hacia un anclaje de membrana. Los dominios SH3 y SH2 son sitios de interacción proteína-proteína, en donde el primero presenta afinidad por regiones ricas en prolina, y el segundo una tirosina fosforilada (Boggon & Eck 2004). El sitio catalítico SH1 presenta una estructura similar a la de todas las quinasa (incluidas Ser/Thr quinasa), formado por un lóbulo C-terminal y otro lóbulo N-terminal, con el sitio de anclaje de sustratos en el medio de ambos. El estado de activación de Src se regula básicamente a través de dos tirosinas fosforilables: la Tyr527 inhibitoria y la **Tyr416 activadora**. Por un lado, cuando la Tyr527 está fosforilada, se asocia al dominio SH2 provocando un bloqueo sobre el sitio catalítico de Src (conformación “cerrada”) (Fig. 23). La defosforilación de la Tyr527 es un paso necesario para que la quinasa pueda salir de la conformación cerrada. Por otro lado, el residuo Tyr416 se ubica en el sitio activo (“Loop A”) y cuando se fosforila, provoca un cambio conformacional en los lóbulos N y C que permite el acceso al sitio catalítico (Boggon & Eck 2004). Así, la activación completa de Src requiere de la defosforilación de la Tyr527 y de la autofosforilación de la Tyr416 (Fig. 23). La numeración de los residuos se menciona tradicionalmente con la correspondiente a la proteína aislada de pollo, pero debido al alto grado de homología entre las Src de diferentes especies, estos aminoácidos tienen sus correspondencias en humano y ratón. Por ejemplo, la Tyr416, se corresponde a la Tyr424 en Src de ratón (Xu et al., 1999).

El rol de Src ha sido ampliamente estudiado en el contexto de enfermedades tumorales por décadas, pero su relevancia en la fisiología espermática es más reciente. La quinasa no se encuentra presente en espermatozoides murinos aislados a partir del caput epididimario, pero sí en espermatozoides de cauda o eyaculados, indicando que la misma es adquirida durante el tránsito epididimario (Krapf et al., 2012). Considerando que las gametas masculinas morfológicamente maduras no producen proteínas *de novo* (Ward &

Zalensky 1996), Krapf y col. demostraron que Src es incorporada al espermatozoide en tránsito por el epidídimo a partir de la fusión con vesículas secretadas por el epitelio de este órgano, denominadas epididimosomas (Krapf et al., 2012). Baker y col. establecieron que se ubica en el flagelo y que la fosforilación/activación de su Tyr416 depende de la activación previa de PKA (Baker et al. 2006).



**Figura 23. Modelo de activación de Src.** A) La conformación cerrada (o inactiva) de Src se estabiliza por interacciones intramoleculares entre el dominio quinasa (formado por los lóbulos N y C), los dominios SH2/SH3 y el residuo Y527 del extremo C-terminal. En esta situación, el loop A adopta una conformación inhibitoria ("loop A en hélice") que interfiere con la unión de sustratos e impide la fosforilación de la Y416. B) La defosforilación del residuo Y527 provoca el desplazamiento de los dominios SH2/SH3, permitiendo que la quinasa adquiera una conformación "abierta", alterando la estructuración del loop A y exponiendo la Y416. C) La fosforilación del residuo Y416 inicia una reorganización conformacional del loop A, permitiendo la unión de sustratos al sitio activo.

Debido a la ubicuidad con la que se expresa esta quinasa en la mayoría de las células somáticas, los ratones Src-KO tuvieron varios defectos de desarrollo, haciendo difícil el análisis aislado sobre la biología reproductiva (Krapf et al., 2012; Soriano et al., 1991). No obstante, estos ratones fueron infértiles y sus espermatozoides no mostraron respuesta acrosómica frente a progesterona, a pesar de exhibir patrones normales de fosforilación (pPKAs y pY) asociados a capacitación (Krapf et al., 2012). El hecho de que los ratones KO en Src presenten fallas sistémicas múltiples, propicia el trabajo con inhibidores

farmacológicos que, entre otras ventajas, permiten intervenir en momentos específicos de los procesos fisiológicos. Entre los inhibidores más utilizados para el estudio de Src, se encuentran **SU6656** y **SKI606** (también conocido como bosutinib) que afectan al sitio catalítico de la familia de quinasas SFKs (Blake et al., 2000; Boschelli et al., 2001).

Numerosos estudios en espermatozoides de distintas especies demostraron que Src se activa durante la capacitación. Esto se ha logrado ya sea siguiendo su nivel de fosforilación en Tyr416 por western-blot (Bragado et al. 2012; Krapf et al. 2010; Varano et al. 2008; Baker et al. 2006), así como también midiendo su actividad *in vitro* (Krapf et al., 2010). Algunos de estos trabajos determinaron que la inhibición farmacológica de Src no afecta la hiperactivación pero sí la capacidad de respuesta acrosómica frente a agonista (Bragado et al., 2012; Varano et al., 2008), en concordancia con los datos obtenidos a partir del modelo Src-KO. Esto sugiere que, durante la capacitación, Src regula eventos asociados a la exocitosis acrosomal. La naturaleza de dichos eventos y la manera en que lo hace no han sido estudiados en profundidad.

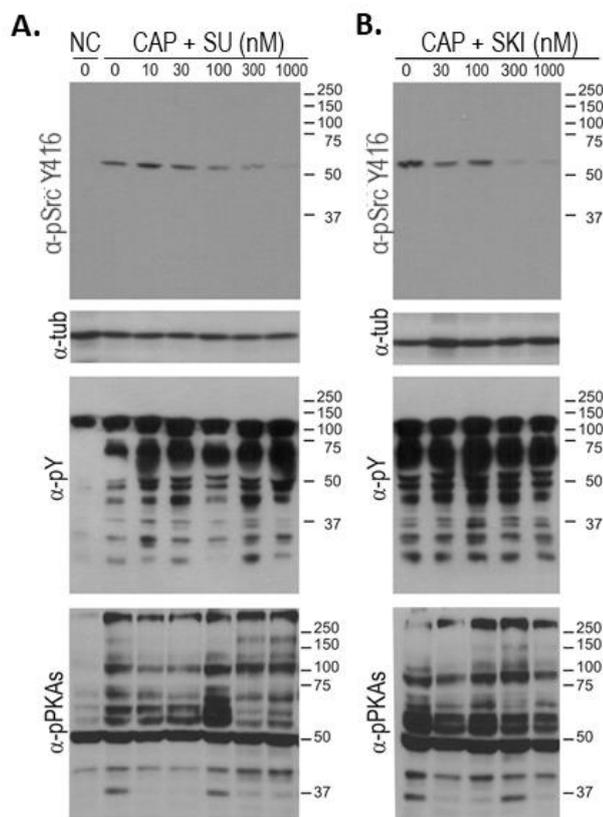
En este capítulo de tesis estudiamos el rol de la quinasa Src en la vía que conduce a la capacidad de respuesta acrosomal durante la capacitación en espermatozoides de ratón.

## RESULTADOS

### 3.1. *La inhibición de Src no afecta la fosforilación de proteínas asociadas a capacitación*

Como se explicó anteriormente, los miembros de la familia SFK de quinasas requieren de fosforilación en Tyr416 para alcanzar máxima actividad de manera que puede seguirse su estado de activación por western-blot, empleando anticuerpos que detecten específicamente este residuo fosforilado ( $\alpha$ -pY416). En trabajos previos de nuestro grupo se pudieron identificar por western-blot a las enzimas Src y Fyn en espermatozoides de ratón, y no a otros miembros de la familia de SFKs. (Stival et al., 2015). Además, se encontró que de ellas sólo Src sufre fosforilación en el residuo Tyr416 durante la capacitación, validando así el uso del anticuerpo  $\alpha$ -pY416 en la detección específica de Src fosforilada (de aquí en más nombrado " $\alpha$ -pSrc Y416", peso molecular predicho de pSrc = 60 kDa).

Con el fin de determinar la concentración de inhibidores de SFKs necesaria para impedir la fosforilación/activación de Src *in vivo*, se pre-incubaron espermatozoides en medio no capacitante (medio H-TYH) con distintas cantidades de SU6656 o SKI606 por 10 min y luego fueron capacitados (medio H-TYH suplementado con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 15 mM y BSA 5 mg/ml) durante 60 min manteniendo la presión de inhibición. Ambos compuestos impidieron eficazmente la activación de Src, con un efecto completo a partir de 1  $\mu$ M para SU6656 (Fig. 24A) y SKI606 (Fig. 24B). Sobre las mismas membranas se analizaron los patrones de fosforilación de proteínas asociadas a capacitación, resultando que **a las concentraciones donde Src fue inhibida, no se afectó la aparición de pPKAs ni de pY** (Fig. 24A y 24B). Este resultado está en concordancia con los estudios realizados en ratones Src-KO, donde la ausencia de Src no alteró la fosforilación en tirosinas asociada a capacitación (Krapf et al., 2010).

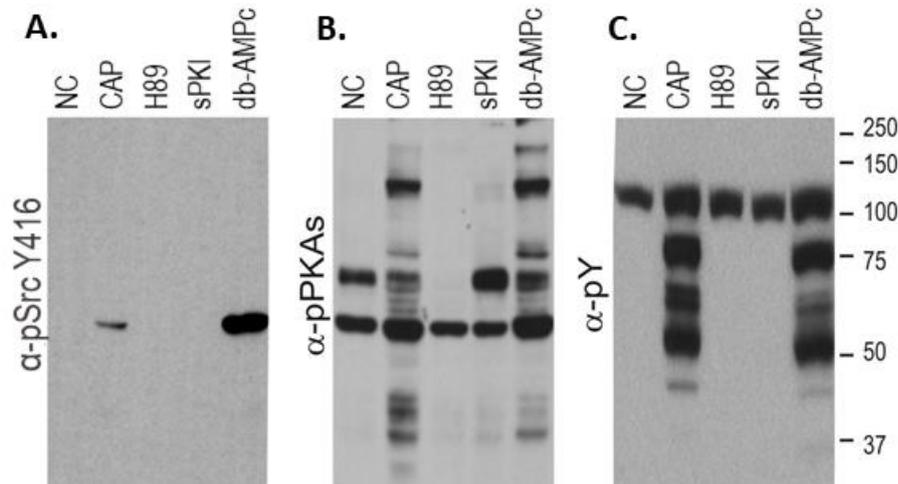


**Figura 24. Los inhibidores de SFKs bloquean la fosforilación/activación de Src sin afectar los patrones de fosforilación asociados a capacitación.** Espermatozoides de ratón fueron incubados por 60 min en medio capacitante (CAP) o no capacitante (NC), en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor SU6656 (A) o del inhibidor SKI606 (B). Se analizó la fosforilación de Src en Tyr416 ( $\alpha$ -pSrc Y416) por western-blot. Las membranas fueron luego tratadas para eliminar el primer revelado y analizadas secuencialmente con anti-sustratos fosforilados de PKA ( $\alpha$ -pPKAs), anti-fosfotirosinas ( $\alpha$ -pY) y anti-tubulina ( $\alpha$ -tub) como control de carga.

### 3.2. La activación de Src depende de PKA

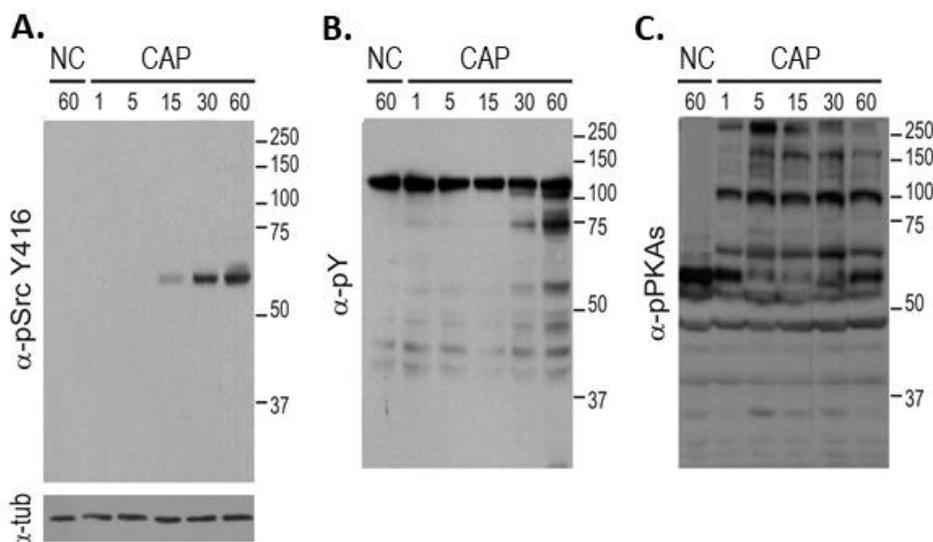
Debido a que Src se fosforila durante la capacitación y considerando que el eje AMPc/PKA modula una gran variedad de eventos asociados a este proceso, analizamos una posible regulación de Src por PKA. Así, cuando se pre-incubó a los espermatozoides con inhibidores catalíticos de PKA (H89 30  $\mu$ M o sPKI 10  $\mu$ M), no se detectó fosforilación/activación de Src luego de 60 min en medio capacitante (Fig. 25A). Por otro lado, al inducir la activación directa de PKA por agregado de un análogo permeable de AMPc (dibutiril-AMPc) y un inhibidor de fosfodiesterasas (isobutilmetilxantina, IBMX) en medio no capacitante, sí se logró la activación de Src (Fig. 25A). La eficiencia de los

tratamientos en el bloqueo o inducción del eje AMPc/PKA, se verificó por ausencia o presencia del patrón de sustratos fosforilados de PKA (Fig. 25B) y fosfotirosinas (Fig. 25C) analizados por western-blot sobre las mismas membranas.



**Figura 25. La fosforilación/activación de Src es dependiente de PKA.** Espermatozoides fueron incubados por 60 min en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) conteniendo H89 30 μM, sPKI 10 μM o dibutilil-AMPc 1 mM + IBMX 0.1 mM (db-AMPc), según se indica. Cada condición fue procesada y analizada por western-blot para la detección de Src activa (α-pSrc Y416, A). Como control, las membranas fueron tratadas para eliminar la señal de revelado anterior, y secuencialmente analizadas para la detección de sustratos fosforilados de PKA (α-pPKAs, B) y fosfotirosinas (α-pY, C).

Por otro lado, el estudio de la cinética de activación de Src reveló que **la fosforilación en Tyr416 comienza a detectarse luego de 15 min de incubación en medio capacitante**, alcanzando un máximo a los 30 min y manteniéndose constante a partir de este momento (Fig. 26A). Así, la activación de Src es un evento que ocurre luego de la aparición de sustratos de PKA (Fig. 26B), pero antes de la fosforilación en residuos de tirosinas (Fig. 26C).



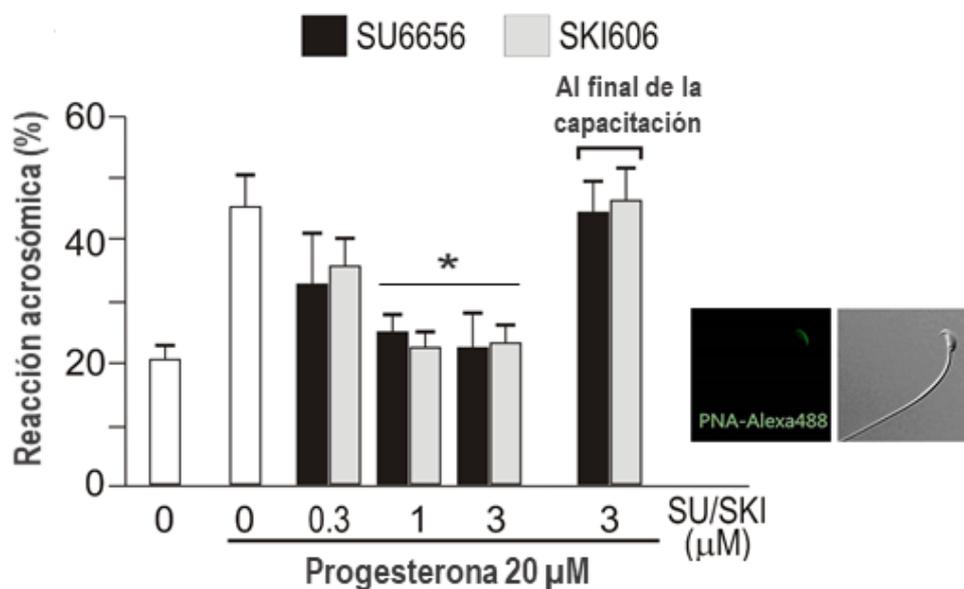
**Figura 26. La activación de Src es un evento de cinética intermedia que ocurre luego de la activación de PKA, pero antes de la fosforilación de tirosinas asociado a capacitación.** Espermatozoides fueron incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) durante distintos períodos de tiempo, según se indica. Cada condición fue procesada y analizada por western-blot para la detección de: A) Src activa ( $\alpha$ -pSrc Y416) y anti-tubulina ( $\alpha$ -tub), B) fosfotirosinas ( $\alpha$ -pY), y C) sustratos fosforilados de PKA ( $\alpha$ -pPKAs), de manera secuencial y previa eliminación de la señal del revelado anterior.

Tanto los resultados con farmacología para inhibir o activar PKA, como la cinética de fosforilación en Tyr416 durante la capacitación, están en concordancia con una **activación de Src corriente abajo y dependiente de PKA**. Lo observado coincide con trabajos de otros grupos que señalan a Src como posible sustrato de PKA (Lawson et al. 2008; Baker et al. 2006).

### **3.3. La activación de Src es necesaria para adquirir capacidad de respuesta acrosomal**

Para evaluar el rol de Src en la vía que conduce a la capacidad de respuesta acrosomal, se pre-incubaron espermatozoides con los inhibidores SU6656 o SKI606 durante 10 min en medio no capacitante, y luego se los sometió a medio capacitante durante 60 min, manteniendo la presión de inhibición. Pasado este tiempo, las células fueron enfrentadas a progesterona por 30 min adicionales, con el fin de inducir RA. La presencia o pérdida de la vesícula acrosomal se determinó por tinción fluorescente del acrosoma intacto con PNA-Alexa488. Los resultados mostraron que las mismas

concentraciones de SU6656 o SKI606 que habían logrado bloquear la activación de Src, también impidieron la exocitosis acrosomal inducida por progesterona (Fig. 27). Alternativamente, los espermatozoides fueron enfrentados a SU6656 o SKI606 *luego* de transcurridos 60 min en medio capacitante, y antes de la inducción de RA con progesterona (Fig. 27). En este caso, la inhibición de Src no logró bloquear la exocitosis acrosomal, indicando que **la actividad de la quinasa es necesaria durante la capacitación para adquirir potencialidad de respuesta acrosomal, pero no durante la inducción de la RA *per se*.**

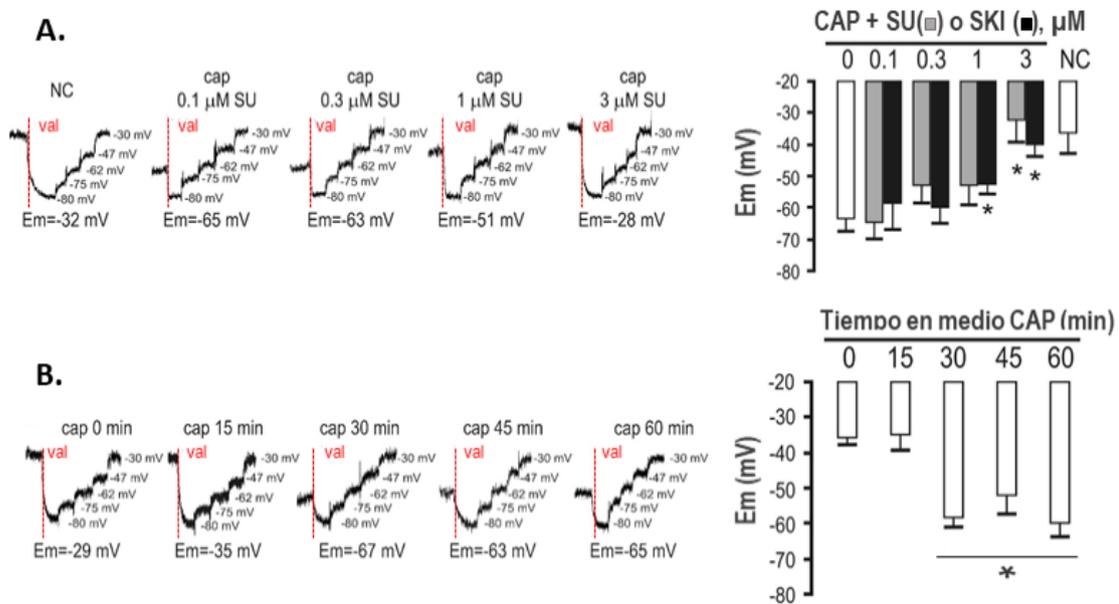


**Figura 27. La activación de Src durante la capacitación es necesaria para alcanzar potencial de respuesta acrosomal.** Espermatozoides fueron capacitados durante 60 min en presencia o ausencia de distintas concentraciones de los inhibidores SU6656 (SU) o SKI606 (SKI). Donde se indica, fueron enfrentados a progesterona 20 μM por 30 min adicionales. Alternativamente, se agregó SKI606 o SU6656 3 μM al final de la capacitación. El estado acrosomal fue evaluado por fluorescencia del acrosoma marcado con PNA-Alexa488. Las barras representan el promedio de al menos n = 3 + EE. Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas (p<0.01) entre condiciones.

### **3.4. La inhibición de Src impide la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación**

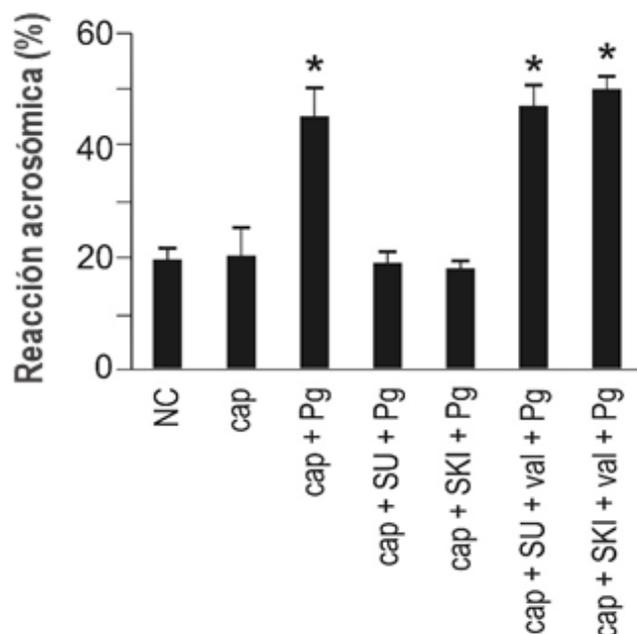
Debido a que la hiperpolarización de la membrana plasmática es un evento que se ha asociado con la vía que conduce a la capacidad de RA durante la capacitación (López-González et al. 2014; De la Vega-Beltrán et al. 2012; Zeng et al. 1995), quisimos evaluar si el efecto de los inhibidores de Src se debió a una interrupción en la hiperpolarización de las células. Para analizar esta posibilidad, realizamos ensayos de fluorimetría poblacional con la sonda DISC<sub>3</sub>(5), sensible a cambios en el potencial de membrana (Em). Este compuesto difunde hacia la membrana plasmática de la célula cuanto más negativo (hiperpolarizado) es el Em, resultando en una caída de su fluorescencia. En caso de una despolarización del Em, la sonda se difunde al medio externo donde su fluorescencia aumenta (Fig. 16, Capítulo II).

La suplementación del medio capacitante con SKI606 o SU6656, efectivamente bloqueó la hiperpolarización a concentraciones donde Src se encontraba inhibida (Fig. 28A), sugiriendo que el rol de la quinasa sobre la adquisición de capacidad de RA, está mediado por su regulación sobre el potencial de membrana. Incubando suspensiones de espermatozoides en medio capacitante durante distintos períodos de tiempo, determinamos también, que la hiperpolarización comienza a detectarse a partir de los 30 min y permanece relativamente constante hasta el final de la capacitación. De esta manera, las células pasan de un Em de  $\sim -30$  a  $-40$  mV en medio no capacitante a un valor de  $\sim -60$  a  $-90$  mV en medio capacitante (Fig. 28B). Estos resultados coinciden con los publicados por otros grupos (De la Vega-Beltrán et al. 2012; Santi et al. 2010; Zeng et al. 1995) y colocan a **la hiperpolarización** como un evento que cinéticamente **ocurre luego de la activación de Src**, haciendo temporalmente factible que sea regulado por la quinasa.



**Figura 28. La activación de Src es necesaria para alcanzar hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación.** Espermatozoides fueron incubados en distintas condiciones y cargados con la sonda DISC<sub>3</sub>(5). Luego se calculó el potencial de membrana (Em) para cada una de ellas, a partir de experimentos de fluorimetría poblacional. En los paneles izquierdo de A) y B) se muestran trazos representativos de fluorescencia vs tiempo para las condiciones señaladas. Cada condición experimental se acompaña de su propia curva de calibración que comienza con el agregado de valinomicina (val). **A)** Espermatozoides fueron incubados por 60 min en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores de Src, SU6656 (SU) o SKI606 (SKI). En el panel derecho se muestra el Em calculado para cada condición. **B)** Espermatozoides fueron incubados por distintos períodos de tiempo en medio capacitante (CAP) y luego se estimó el Em para cada condición (panel derecho). Tanto en A) como en B), las barras representan el promedio de al menos n = 3 + EE. Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas (p<0.01) entre condiciones.

Como se mostró en la Fig. 27, la inhibición de Src había impedido que los espermatozoides pudieran adquirir capacidad de RA al ser tratados con progesterona. Sin embargo, se logró sobrepasar dicho efecto al hiperpolarizar farmacológicamente a las células con valinomicina, un ionóforo de K<sup>+</sup> (Fig. 29), reforzando la hipótesis de que **la actividad de Src es necesaria para lograr hiperpolarización y finalmente capacidad de respuesta acrosomal durante la capacitación.**

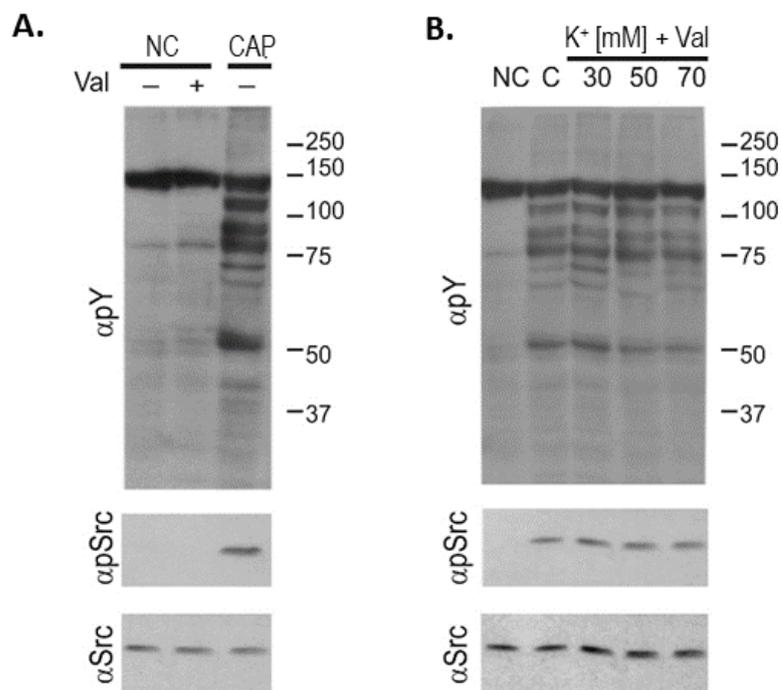


**Figura 29. La hiperpolarización farmacológica logra recuperar la capacidad de respuesta acrosomal en células tratadas con inhibidores de Src.** Espermatozoides fueron incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante (cap) por 60 min en presencia o ausencia de los inhibidores de Src, SU6656 3  $\mu$ M (SU) o SKI606 3  $\mu$ M (SKI). Cuando se indica, las células fueron farmacológicamente hiperpolarizadas con valinomicina 1  $\mu$ M (val), a 20 min de iniciada la incubación en medio capacitante. La reacción acrosómica fue inducida luego de 60 min de incubación en medio capacitante, con progesterona 20  $\mu$ M (Pg) durante 30 min y posteriormente se evaluó el estado acrosomal por tinción inmunofluorescente del acrosoma con PNA-Alexa488. Se muestran los controles de % de RA en condiciones NC, cap con y sin progesterona, y NC + Val + Pg. las barras representan el promedio de al menos  $n = 3 + EE$ . Los \* señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre condiciones.

Con el fin de evaluar si la hiperpolarización de la membrana plasmática condicionaba la activación de Src, se trató a espermatozoides en medio no capacitante (sin  $\text{HCO}_3^-$ ) con valinomicina 1  $\mu$ M durante 40 min, para forzar una hiperpolarización farmacológica. En este contexto no se produjo la fosforilación/activación de Src (Fig. 30A).

Con el objetivo de verificar que la activación de Src ocurre corriente arriba y es independiente del estado electrofisiológico de las células, se impidió que espermatozoides en medio capacitante logaran hiperpolarizar. Para ello, se fijaron las condiciones extracelulares con altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en presencia de valinomicina, lo cual permite que el catión difunda libremente y despolarice permanentemente la célula. El análisis por western-blot demostró que Src se fosforila normalmente en Tyr416 en

medio capacitante, aun en condiciones de despolarización permanente (Fig. 30B). Estos resultados añaden evidencia de que **la activación de Src depende de** la presencia de BSA y/o  $\text{HCO}_3^-$  en el medio (que activa al eje AMPc/PKA) y que ocurre antes que la hiperpolarización del Em observado durante la capacitación, siendo este paso necesario para la posterior inducción de RA con progesterona.



**Figura 30. La fosforilación/activación de Src se da independientemente del potencial de membrana de la célula.** A) Espermatozoides fueron incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante (CAP) durante 60 min, en presencia o ausencia de valinomicina 1  $\mu\text{M}$  (Val), para inducir la hiperpolarización farmacológica de las células. B) Espermatozoides fueron incubados en medio no capacitante (NC) o capacitante (C), y donde se indica se mantuvo el potencial de membrana permanentemente despolarizado agregando valinomicina 1  $\mu\text{M}$  (Val) y distintas concentraciones de potasio ( $\text{K}^+$ ). Tanto en A) como en B) se prepararon extractos totales de las distintas condiciones y se analizaron por western-blot para la detección de proteínas fosforiladas en tirosinas ( $\alpha\text{pY}$ ), Src fosforilada en Tyr416 ( $\alpha\text{pSrc}$ ) o Src total ( $\alpha\text{Src}$ ) a modo de control de carga y de presencia de la quinasa.

## DISCUSIÓN

Una de las primeras vías de señalización que se disparan durante la capacitación es la activación de la adenilato ciclasa sAC por acción del  $\text{HCO}_3^-$  presente en el medio, con un consecuente aumento en los niveles de AMPc intracelulares, el cual a su vez, activa a PKA (Kleinboelting et al. 2014; Hess et al. 2005; Lefievre et al. 2002; Visconti et al. 1995). Este aumento de AMPc ocurre inmediatamente y los niveles máximos de activación de PKA se observan en 1 min. Se ha demostrado previamente que la activación de PKA es necesaria para que ocurran otros eventos de señalización asociados a la capacitación. Entre dichos eventos se encuentran la hiperpolarización de la membrana plasmática (Escoffier et al. 2015; López-González et al. 2014; De la Vega-Beltrán et al. 2012; Zeng et al. 1995) y el aumento de proteínas fosforiladas en tirosinas (pY) (Tillo et al. 2017; Chung et al. 2014; Kuji et al. 2005; Tash & Bracho 1998; Visconti et al. 1995). Sin embargo, la identificación de las moléculas que median la conexión entre PKA y los eventos mencionados ha probado ser difícil. Notoriamente, la cinética de activación de PKA (1 min), hiperpolarización (30 min) y la fosforilación de tirosinas (45 min), sugiere que el rol de PKA en la regulación de estos eventos es indirecto. Considerando que PKA es una Ser/Thr quinasa, es predecible la existencia de al menos una tirosina quinasa que medie entre la activación de PKA y la aparición del patrón de pY. Al momento de la realización de este trabajo, la identidad de dicha quinasa aún permanecía indefinida, y unas de las principales candidatas propuestas era Src. Esta sugerencia se basó principalmente en el trabajo de Baker y col. en donde utilizando los mismos inhibidores de Src empleados en este proyecto (SU6656 y SKI606) habían logrado bloquear la aparición del pY. Esta hipótesis fue cuestionada por Krapf y col. que demostraron que el ratón knock-out de Src presenta niveles normales de fosforilación en tirosinas (Krapf et al., 2010) y que las altas concentraciones de inhibidores utilizadas en trabajos previos (Baker et al, 2006) no sólo podían estar inhibiendo a otras tirosina quinasas, sino que también bloqueaban la aparición de sustratos fosforilados de PKA, indicando que su efecto no era específico (Krapf et al., 2010). Sumado a esto, recientemente se ha identificado de manera concluyente a la quinasa FER como responsable directa de la fosforilación de residuos de tirosinas asociado a capacitación (Alvau et al., 2016).

A pesar de presentar pY normal, los ratones Src-KO son infértiles y sus espermatozoides no logran capacitarse, sugiriendo un rol relevante de la quinasa en este

proceso. En adición al fenotipo alterado de los espermatozoides maduro, estos ratones presentan deficiencias en el desarrollo del cauda epididimario, asociado a un menor número y tamaño de células claras, responsables de mantener la acidificación del fluido epididimario (Krapf et al., 2012). Por lo tanto, los mecanismos por los cuales la falta de Src afecta la función espermática no son claros. Las posibilidades incluyen que: 1) Src tenga una función esencial es espermatozoides maduros; 2) la falta de Src y su consecuente alteración sobre el fluido epididimario altere la maduración espermática o 3) una combinación de ambos. Con el objetivo de **estudiar el rol de Src** directamente **en espermatozoides maduros**, en este trabajo se siguió su activación durante la capacitación, utilizando un anticuerpo que detecta la fosforilación de la tirosina 416. Así, demostramos que **Src se activa** aproximadamente **tras 15 min** de incubación **en medio capacitante** (Fig. 26A) y la fosforilación en Tyr416 es bloqueada a concentraciones de SKI606 y SU6656 (1  $\mu$ M) mucho más bajas que aquellas que se necesitan para bloquear pY y pPKAs (Fig. 24).

Considerando el rol pivotante que juega PKA durante la capacitación, investigamos si su actividad era necesaria para la fosforilación/activación de Src, encontrando una correlación positiva. En primer lugar, Src no se activó en medio sin  $\text{HCO}_3^-$  (no capacitante), es decir medio donde no se estimuló la producción de AMPc y por lo tanto PKA está inactiva (Fig. 25). En segundo lugar, en medios carentes de  $\text{HCO}_3^-$ , pero donde se indujo la activación directa de PKA con análogos permeables de AMPc, sí se produjo la activación de Src (Fig. 25). Finalmente, la inhibición de PKA en medio capacitante, utilizando H89 o sPKI, también bloqueó la activación de Src (Fig. 25). En conjunto, estos resultados demuestran que **Src es activada corriente abajo de PKA** y dependiente de ella, similar a lo que ocurre con otros eventos de la capacitación. Si bien en otros sistemas se ha identificado que Src es activada directamente por receptores tirosina quinasas o receptores asociados a proteína G (Boggon & Eck 2004), no puede descartarse una acción directa de PKA sobre Src en el modelo espermático, donde además ambas quinasas se localizan en el flagelo de espermatozoide de ratón (Baker et al. 2006). En este sentido se ha caracterizado ampliamente la fosforilación de la Ser17 de Src por acción de PKA, aunque su relevancia biológica es aún poco clara (Amata et al. 2014). Se ha postulado que la fosforilación en dicho sitio podría estar regulando interacciones proteína-proteína o tener incidencia en la localización subcelular de Src. Por ejemplo, se ha observado que en el tratamiento de fibroblastos con PDGF (factor estimulante de plaquetas) resulta en la

translocación de Src desde la membrana al citosol, en asociación con un incremento en la fosforilación de Ser17 por PKA (Walker et al. 1993). Sin embargo, el hecho de que exista una demora sustancial entre la activación de PKA y la de Src abre la posibilidad de un efecto indirecto, por ejemplo, a través de la activación de una pTyr527 fosfatasa que permita la salida de Src de su conformación cerrada.

El rol de Src durante la capacitación parece estar asociado a la vía de respuesta acrosomal ya que **la inhibición de la quinasa bloqueó completamente la capacidad de inducir reacción acrosómica** con progesterona en espermatozoides incubados en medio capacitante (Fig. 27). Se ha demostrado anteriormente que la potencialidad de respuesta acrosómica inducida por sZP requiere de una previa hiperpolarización de la membrana plasmática (De la Vega-Beltrán et al. 2012; Santi et al. 2010; Zeng et al. 1995). Por lo tanto, investigamos si Src estaba asociada a la regulación del potencial de membrana. En este sentido, observamos que la cinética de activación de Src y la cinética de hiperpolarización son similares, ocurriendo entre 15-30 min desde la incubación en medio capacitante. Luego, determinamos que a concentraciones de SKI656 y SU6606 **donde Src se veía bloqueada**, también se **impidió que los espermatozoides alcanzaran un estado hiperpolarizado**. Sin embargo, la inhibición de la reacción acrosómica por bloqueo de Src pudo sobrepasarse cuando se indujo hiperpolarización farmacológica de las células con valinomicina (Fig. 29).

Las investigaciones recientes sugieren que la hiperpolarización asociada a capacitación en ratón, está regulada exclusivamente por el canal de K<sup>+</sup> Slo3. Esto se apoya en el hecho de que los ratones knock-out en Slo3 son infértiles, sus espermatozoides no sufren hiperpolarización y presentan deficiencias en la capacidad de reacción acrosómica (Santi et al., 2010). Por este motivo, consideramos que la acción de Src sobre el potencial de membrana podría cursar a través de Slo3. En colaboración con el grupo de la Dra. Celia Santi (Washington University, St. Louis), se hicieron registros de corrientes en ovocitos de *Xenopus* con expresión heteróloga de Slo3 por la técnica de patch-clamp en célula completa. En estos experimentos se determinó que los **inhibidores de Src bloquearon las corrientes de K<sup>+</sup> a través de Slo3**, reforzando la hipótesis de regulación de la quinasa sobre el canal (Stival et al., 2015). El homólogo más cercano a Slo3 es el canal Slo1, que en otros tipos celulares está regulado en forma directa por Src, a través de la fosforilación en el residuo de Tyr762 localizado en una región altamente conservada del extremo C-

terminal (Ling et al., 2000). Así, la inhibición de las corrientes de Slo3 por SU6656 y SKI606 observada es consistente con el efecto *in vivo* de bloqueo de la hiperpolarización, pero la posibilidad de una regulación de Src sobre este canal aún requiere de mayor investigación. Se ha propuesto que la hiperpolarización de las células espermáticas podría tener la función de sensibilizar canales de calcio (revisado por Ritagliati et al., 2018; Julio César Chávez et al., 2014; Linares-Hernández et al., 1998) que luego serían activados durante la reacción acrosómica. De esta forma, Src participaría en la vía que conduce a la capacidad de respuesta acrosomal activando al canal Slo3 con la consecuente hiperpolarización de la membrana plasmática, que finalmente acabaría en la sensibilización de canales de Ca<sup>2+</sup> involucrados en la RA.

## **CONCLUSIONES**

Durante años se ha aceptado que las moléculas involucradas en la señalización a través de AMPc (principalmente, fosforidesterasas y adenilato ciclasas), así como sus efectores y dianas, se encuentran adecuadamente compartimentalizadas en el espermatozoide (Wertheimer et al., 2013; revisado por Buffone et al., 2012; Zippin et al., 2003). Este confinamiento contribuye en asegurar una regulación precisa de diferentes procesos asociados a la capacitación. Aunque algunos efectos biológicos ocurren en la cabeza (por ejemplo, la reacción acrosómica), otros tienen lugar en el flagelo (por ejemplo, la hiperactivación). En espermatozoides, PKA es el principal efector del AMPc producido por la adenilato ciclasa sAC durante la capacitación (Wertheimer et al., 2013). Su activación es necesaria para que se activen las cascadas de señalización que permiten al espermatozoide adquirir potencialidad de respuesta acrosómica. Sin embargo, la actividad de PKA puede detectarse en menos de 1 min de incubación en medio capacitante, mientras que la capacidad de RA no se alcanza sino hasta 60 min de incubación en dicho medio, evidenciando la existencia de eventos intermedios entre ambos procesos (revisado por La Spina et al., 2017 y Buffone et al., 2012). En este sentido, demostramos que **la activación de la tirosina quinasa Src es requerida para que las células puedan hiperpolarizarse y adquirir un estado de latencia para llevar a cabo la exocitosis acrosomal** inducida por progesterona. Ambos fenómenos son dependientes de PKA y presentan cinéticas intermedias entre la activación de la quinasa y la capacidad de RA, reforzando el hecho de que son parte de esta vía de señalización. La conexión entre Src e hiperpolarización parece estar mediada por la **activación del canal de K<sup>+</sup> Slo3**, según se ha demostrado en experimentos de expresión heteróloga (Stival et al., 2015). Sin embargo, este punto requiere de mayor estudio para probar una interacción directa en células espermáticas.

Tanto la fosforilación de Src en Tyr416 como la hiperpolarización del potencial de membrana, son eventos que ocurren durante la capacitación y, como muchos otros dependen de que PKA se encuentre activa. Menos estudiado ha sido la importancia del posicionamiento subcelular de PKA. Sin embargo, en el campo de transducción de señales ha empezado a cambiar el paradigma entendiendo que es fundamental estudiar las cascadas con una mirada comprensiva de la localización relativa de los componentes (Teruel & Meyer, 2000). Por este motivo, actualmente los mecanismos de transducción de señales ya no se consideran sistemas estáticos de interacciones enzimas-sustratos, sino que requieren una visión más global que considere modificaciones reversibles y reguladas

de la localización de sus componentes. En el caso de espermatozoides donde sólo se encuentra una variedad no miristoilable de PKAc (PKAc<sub>s</sub>) (Nolan et al., 2004), parece que el anclaje de la quinasa viene dado exclusivamente por la interacción de las subunidades PKAR con las proteínas AKAPs. En este trabajo de tesis validamos en nuestro propio modelo de estudio el uso del péptido sHT31 para el estudio del anclaje de PKA. Demostramos que **cuando se interrumpe la interacción PKA-AKAPs** antes de iniciar la capacitación **se impide la actividad normal de PKA *in vivo***, y dicho efecto no puede sobrepasarse con el agregado de análogos difusibles de AMPc que la activan directamente. **El desanclaje de PKA impidió que los espermatozoides adquirieran el estado capacitado**, lo cual se evidenció en el bloqueo de todos los eventos estudiados asociados a capacitación: inhibición de patrones de fosforilación típicos (pPKAs y pY), incapacidad para adquirir un batido flagelar hiperactivado, inhibición de la hiperpolarización de membrana y, por lo tanto, impedimento para alcanzar potencial de reacción acrosómica. Debido a que se probó que sHT31 no interfiere con la actividad catalítica de PKA *in vitro* y que el bloqueo de pPKAs y pY no se pudo recuperar estimulando directamente a la quinasa con análogos permeables de AMPc, **se asoció este efecto al alejamiento de PKA de sus sustratos iniciales**. Estos resultados indican que PKA debe tener una localización subcelular adecuada, posiblemente dependiente de AKAP4, para dar inicio a los eventos de señalización que conducen a la capacitación.

Sorpresivamente, **la disrupción del anclaje de PKA gatilló la reacción acrosómica sólo en espermatozoides previamente capacitados**. Por el contrario, el desanclaje de PKA no indujo RA en espermatozoides no capacitados, indicando que la interrupción de la interacción PKA-AKAPs sólo puede provocar excitosis acrosomal en células que han adquirido capacidad fecundante, asociando este fenómeno a un estado fisiológico específico de las gametas. Una de las explicaciones posibles es que el ensamblaje de la maquinaria de fusión se encontraría preparada en espermatozoides capacitados pero no en los no capacitados. Si bien no se descarta que el agregado de sHT31 pueda alterar el posicionamiento de otras moléculas de señalización asociadas a los complejos AKAPs, el efecto de inducción de RA está mediado por PKA ya que este no se reproduce si la actividad de PKA se bloquea previamente con inhibidores catalíticos (sPKI y Rp-cAMPS). Por otra parte, la inducción de RA no pudo emularse simplemente bloqueando la actividad de PKA, es decir que no es su falta de acción catalítica o el alejamiento de un(os) sustrato(s) lo que gatilla la RA. Esto sugiere un modelo en el que la

deslocalización de la quinasa **activa**, la acerca a **nuevos** sustratos permitiendo su acción sobre los mismos y finalmente conduciendo a la exocitosis acrosomal.

La inducción de la RA por desanclaje de PKA lleva asociada un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que comienza en la pieza principal y desde allí se propaga a la cabeza, sitio donde se encuentra la vesícula acrosomal. Nuestros datos sostienen el rol del canal CatSper en este evento y que **la apertura de CatSper es promovida por desanclaje de PKA activa**. No se puede descartar la posibilidad de que haya otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados en la propagación de la señal desde la pieza principal a la cabeza, como por ejemplo el canal Cav2.3 que se ha sugerido que desempeña un rol en la RA (Darszon et al., 2011), pero sí se demuestra de forma concluyente que el inicio del mismo ocurre a través de CatSper.

Esto representa un modelo en donde sHT31 fuerza el **acercamiento de PKA a nuevos sustratos que sólo se encuentran accesibles en espermatozoides capacitados** y que de forma directa o indirecta acaban por activar al canal CatSper, estimulando un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma que concluye en la fusión de la vesícula acrosomal con la membrana plasmática. En este sentido el trabajo de Darszon, publicado posteriormente a los resultados obtenidos en esta tesis, demuestra que existe una regulación directa de PKA sobre CatSper, reforzando la evidencia aportada por nuestro trabajo (Orta et al., 2018).

Es posible pensar que la regulación diferencial del anclaje de PKA durante distintos estadios de la fisiología espermática, pueda ser un mecanismo novedoso de regulación de la reacción acrosómica *in vivo*. Así, los espermatozoides expuestos a señales hormonales (como progesterona) o señales parácrinas (como prostaglandinas presentes en los fluidos vaginales), podrían modular la re-localización de PKA. En este sentido, Harrison lideró uno de los primeros trabajos en donde se analizaba el rol del anclaje de PKA en la inducción de RA en espermatozoides humanos, en el cual las células capacitadas *in vitro* fueron luego enfrentados a distintas concentraciones del inhibidor de anclaje sHT31. Lo que obtuvieron fue una mayor inducción de RA por progesterona  $4 \mu\text{M}$  cuando PKA estaba activa y desanclada (Harrison et al., 2000), sugiriendo que la deslocalización de PKA sensibiliza al espermatozoides para sufrir RA frente a progesterona.

Este trabajo evidenció que los cambios en el posicionamiento de una dada molécula de señalización pueden tener efectos muy diversos y es un punto clave de regulación en el caso de PKA. Así, en un estado “pre-capacitado” la quinasa estaría conferida a un microdominio subcelular donde pueda regular un subconjunto de sustratos, de manera que al alejarla de ellos se inhibe la capacitación. Sin embargo, es posible pensar que una vez adquirido el estado capacitado un cambio regulado en su posicionamiento podría disparar la RA acercándola a nuevos sustratos. **Una relocalización dinámica se constituye entonces como un nuevo punto de control para dar especificidad espacio-temporal a una quinasa tan promiscua.** Sumado a la compartimentalización de vías de transducción de señales, **también queda en evidencia la existencia de mecanismos que coordinan eventos lejanos en la célula.** De esta manera, un cambio sentido en el flagelo (en este caso, una interrupción del anclaje de PKA y consecuente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por CatSper), resulta en la fusión del acrosoma en la cabeza.

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a lograr un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de capacidad fecundante de espermatozoides de mamíferos y abre nuevas posibilidades de estudio sobre la regulación del proceso de reacción acrosómica.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## ***Reactivos***

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: Albúmina sérica bovina (BSA libre de ácidos grasos), isobutilmetilxantina (IBMX) y 2'-O-dibutiril adenosín monofosfato-3',5' cíclico (db-AMPC) fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO). Fluo3-AM, DISC<sub>3</sub>(5) y PNA-Alexa488 se compraron en Molecular Probes. Todos los demás reactivos generales se compraron en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). A continuación se detalla la procedencia de los siguientes grupos de reactivos:

**Anticuerpos:**  $\alpha$ -PKAc (clon 5B) y  $\alpha$ -AKAP4 (clon 25/AKAP82) fueron comprados en BD Biosciences.  $\alpha$ -pY (anticuerpo que reconoce tirosinas fosforiladas, clon 4G10) se obtuvo de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).  $\alpha$ -pPKAs (anticuerpo contra sustratos fosforilados de PKA, clon 100G7E),  $\alpha$ -Src (clon 32G6),  $\alpha$ -pSrcY416 (clon D49G4),  $\alpha$ -IgG conejo conjugado a peroxidasa de rabanito -HRP- (#7074) y  $\alpha$ -IgG ratón conjugado a HRP (#7076) fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA).  $\alpha$ -PKARII (#38949) y  $\alpha$ -AKAP3 (clon EPR11261) se compraron en ABCAM.  $\alpha$ -Tubulina (clon E7) de Developmental Studies Hybridoma Bank, desarrollado por NICHD/National Institutes of Health y mantenido por University of Iowa Department of Biological Sciences, (Iowa City, IA).  $\alpha$ -cadena liviana de inmunoglobulina (Ig) de conejo conjugado a HRP,  $\alpha$ -cadena liviana de inmunoglobulina de ratón conjugado a HRP (#115035174) se compraron en Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA).

**Inhibidores:** sHT31 y sHT31p se adquirieron en Promega. sPKI 14-22 se obtuvo de Tocris. H89, KT5720 y SKI606 (bosutinib) fueron comprados en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI), mientras que SU6656 se obtuvo de Calbiochem.

## ***Preparación de espermatozoides murinos***

Las células espermáticas se obtuvieron a partir del cauda epididimario de ratones machos adultos (8-13 semanas de edad), cepa C57BL/6. Para ello, los adultos fueron sacrificados bajo la supervisión del CICUAL de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de Rosario (UNR) (Protocolos aprobados N° 7298/532) y luego operados para extirpar los caudas. Cada cauda epididimario fue tajeado para permitir la salida de los espermatozoides y colocado en 500-700  $\mu$ L de solución modificada de Krebs-Ringer

("H-TYH") conteniendo NaCl 119.3 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosa 5.6 mM, piruvato de sodio 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM y HEPES 20 mM (pH 7.4). El medio H-TYH con los componentes descritos corresponde al llamado "medio no capacitante" (NC). Luego de 15-20 min en medio NC a 37 °C, se ajustó la concentración de células a 1-2 x 10<sup>7</sup> espermatozoides/ml, agregando medio NC. Para lograr la capacitación, se incubó a los espermatozoides en medio H-TYH suplementado con BSA 5 mg/ml y NaHCO<sub>3</sub> 15 mM (medio CAP). Los espermatozoides de ratón son incubados 60 min a 37 °C en este medio para considerar que han adquirido estado capacitado.

Con el fin de evaluar el efecto de distintos inhibidores *sobre* la capacitación, las células fueron pre-incubadas con los respectivos reactivos en medio no capacitante por 10 min, antes de iniciar la incubación en medio capacitante, manteniendo la concentración del inhibidor. Cuando el experimento requirió la incubación con otros compuestos (IBMX, db-AMPC) estos fueron agregados al momento y concentraciones indicadas.

Las incubaciones de células en todos los experimentos se hicieron a 37 °C.

### ***Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunotransferencia (western-blot)***

De cada condición a analizar por wester-blot se hizo un extracto de proteínas totales. Para ello, los espermatozoides se lavaron dos veces por centrifugación (700 g, 5 min) en 0.7 ml de TBS (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.4), y luego se colectaron por centrifugación (10 000 g, 3 min). Los pellets fueron resuspendidos en solución Laemmli de siembra (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 10 %, Azul de Bromofenol 0.001 %) sin β-mercaptoetanol (Laemmli, 1970), vortexeados por 5 s y hervidos por 5 min. Estas muestras se centrifugaron (13 000 g, 3 min) con el objetivo de precipitar y eliminar los núcleos, y a los sobrenadantes se les añadió β-mercaptoetanol 5 % y se los hirvió por 3 min. Cada extracto de proteína equivalente a 1-2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides se sembró en una calle, se separó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 10-12 % de acuerdo con el método de (Laemmli, 1970) y se transfirió a membranas de PVDF (Bio-Rad) a 250 mA por 1.5 h y 0 °C, en solución de transferencia (Tris-HCl 3.0 g pH 8.3, glicina 14.4 g y metanol 20 % en 1 L de volumen final). Las membranas se bloquearon con BSA 3 % (Sigma) en T-

TBS (buffer TBS con agregado de Tween-20 0.1 %), durante 1 h a temperatura ambiente. Luego del bloqueo y de 3 lavados en T-TBS de 5 min cada uno, se incubó a las membranas con la dilución del anticuerpo primario correspondiente durante 12 h, 4 °C. Luego de tres lavados con T-TBS de 5 min cada uno, se incubó a las membranas con la dilución de anticuerpo secundario correspondiente ( $\alpha$ -IgG conejo o  $\alpha$ -IgG ratón, ambos conjugados a la peroxidasa de rabanita –HRP-) durante 1.5-2 h a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución BSA 1 % en T-TBS, de la siguiente manera:  $\alpha$ -pY 1/10 000,  $\alpha$ -pPKAs 1/3 000,  $\alpha$ -PKARII 1/3 000,  $\alpha$ -AKAP4 1/3 000,  $\alpha$ -AKAP3 1/3 000,  $\alpha$ -Src 1/2 000,  $\alpha$ -pSrcY416 1/2 000. Los anticuerpos secundarios fueron diluidos 1/15 000 en leche 1 % en T-TBS.

Las bandas reactivas se visualizaron utilizando el kit de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, GE Healthcare), según indicaciones del proveedor y se expusieron frente a películas fotográficas CL-Xposure (Pierce) para su detección. Cuando fue necesario, las membranas de PVDF fueron sometidas a un proceso para eliminar la señal revelada (“stripping”) antes de realizar una nueva inmunodetección. Para ello, se las incubó a 60 °C en solución SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.74 % y Tris 62.5 mM (pH 6.5) durante 15 min. Luego, las membranas fueron lavadas 10 veces con agua destilada por 30 s y 2 veces más con T-TBS por 10 min cada lavado, a temperatura ambiente.

En todos los experimentos la masa molecular se expresó en kilodaltons (kDa). Se utilizó el software ImageJ 1.48k (NIH, EE.UU.) para el análisis de las imágenes de western-blot siguiendo las especificaciones de la Guía del usuario ImageJ, IJ 1.46r (T. Ferreira, 2012).

### ***Ensayo de fosforilación de sustratos de PKA en sistema libre de células***

Las células espermáticas ( $5 \times 10^6$  espermatozoides en 60  $\mu$ L de volumen final) fueron incubados en presencia de distintos inhibidores (sHT31 3  $\mu$ M o sPKI 15  $\mu$ M) por 30 min a 37 °C en medio NC suplementado con: Tritón X-100 1 %, ATP 40  $\mu$ M, dibutilil-AMPc 1 mM, IBMX 0.1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas de Sigma, orto-vanadato

de sodio 100  $\mu\text{M}$ , p-nitrofenil fosfato (NPP) 5 mM,  $\beta$ -glcierolfosfato 40 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. La presencia de Tritón X-100 induce la lisis celular, permitiendo la liberación al medio de los componentes citoplasmáticos (incluidos PKA y sus sustratos) y convirtiendo a la reacción en un ensayo “libre de células”. Las muestras fueron luego sujetas a SDS-PAGE y western-blot, seguido de inmunodetección de sustratos fosforilados de PKA ( $\alpha$ -pPKAs, clon 100G7E), como se describió más arriba.

### ***Ensayo radiactivo de actividad de PKA in vitro***

Espermatozoides en medio NC fueron centrifugados (10 000 g, 3 min) y resuspendidos en solución conteniendo Tris-HCl 25 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y Tritón X-100 1 %. Las suspensiones fueron incubadas en hielo por 30 min y luego centrifugadas (10 000 g, 10 min, 4 °C). El pellet (fracción insoluble en Tritón X-100) fue resuspendido en 330  $\mu\text{L}$  de la misma solución. Estas fracciones insolubles en Tritón X-100 se emplearon como fuente de PKA espermática (Moos et al., 1998) y la actividad catalítica de las mismas fue medida como la cantidad de marca radiactivaiva de fosfato ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) incorporado al sustrato sintético “Kémtido” (Sigma). Para ello los tubos de reacción se prepararon con un tercio de extracto de PKA espermática en buffer quinasa (Hepes 25 mM pH 7.3, ATP 40  $\mu\text{M}$ , ATP- $\text{P}^{32}$  1 uCi/ensayo,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Sigma), orto-vanadato de sodio 100  $\mu\text{M}$ , NPP 5 mM,  $\beta$ -glcierolfosfato 40 mM, kémtido 100  $\mu\text{M}$ , BSA 1 mg/ml, AMPc 1 mM e IBMX 0.1 mM). Donde se indica, la mezcla de reacción fue suplementada con inhibidores de PKA como se señala en “Resultados” del Capítulo I y se mantuvo la concentración constante de DMSO <5 % en todas las condiciones experimentales analizadas. Los tubos de reacción fueron incubados a 37 °C durante 30 min para permitir que la quinasa catalice la fosforilación del sustrato kémtido. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo con agregado de ácido tricloro acético 25 % por 20 min en hielo. Se centrifugó a 10 000 g por 3 min y 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se sembró en papel P81 de manera de que el kémtido quede adsorbido sobre el mismo. Los papeles fueron lavados 6 veces en 1 L de ácido orto-fosfórico 5 mM por 5 min, se dejaron secar y finalmente se cuantificó la marca radiactivaiva con contador de centelleo.

En paralelo se procesó un control de fosforilación espontánea del kémtido (sin PKA), así como un control de marca radiactivaiva basal presente en el buffer de reacción, que fueron considerados para corregir los cálculos de actividad quinasa.

### ***Co-inmunoprecipitación de PKARII, AKAP3 y AKAP4.***

Espermatozoides fueron incubados en medio capacitante durante 60 min. Cuando se indica, se añadió SHT31 3  $\mu\text{M}$  y se incubó por 30 min adicionales a todas las condiciones. Las muestras fueron centrifugadas (1700 g, 1 mi) y los pellets resuspendidos en solución RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7.2, NaCl 50 mM, SDS 0.1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 1 mM, fluoruro de sodio 20 mM,  $\beta$ -glcierolfosfato 40 mM y mezcla de inhibidores de proteasas comercial de Sigma), incubados en hielo por 30 min, vortexeados (3 x 30 s) y centrifugados (2500 g, 5 min, 4 °C). Los sobrenadantes conteniendo  $1 \times 10^8$  células en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  fueron incubados con 3  $\mu\text{g}$  de anticuerpo  $\alpha$ -PKARII por 2 h a temperatura ambiente y agitación constante. Luego de la adición de 30  $\mu\text{L}$  de proteína G-Sefarosa (GE Healthcare), cada condición fue incubada por 1 h más a temperatura ambiente y agitación constante. El inmunocomplejo (es decir, el anticuerpo  $\alpha$ -PKARII, PKARII y proteínas interactuando con PKARII) fue recuperado por centrifugación, lavado 4 veces en solución RIPA y finalmente procesado para SDS-PAGE y western-blot.

Debido a que las cadenas pesadas de los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación tienen un peso molecular (50 kDa) que podría interferir con la detección de las proteínas de interés, se evitó la detección de señales inmunoreactivas correspondientes a las cadenas pesadas utilizando anticuerpos secundarios contra las cadenas livianas de las Ig de conejo y ratón (25 kDa) conjugados a HRP.

### ***Ensayos de motilidad espermática mediante Computer-Assisted Semen Analysis (CASA)***

Alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de suspensiones de espermatozoides fueron cargadas sobre una cámara de 20  $\mu\text{m}$  de profundidad (Leja Slide, Spectrum Technologies) y ubicada sobre una platina de microscopio termostatizada a 37 °C. El movimiento de los espermatozoides fue analizado utilizando el programa computer-assisted semen analysis (CASA) (Microptic,

SCA evolution). Los parámetros empleados fueron: adquisición de 30 cuadros, velocidad de captura de 60 Hz, tamaño mínimo de célula de 4 píxeles, valor de corte de velocidad promedio de desplazamiento 5 mm/s, tamaño estático de la cabeza de 0.2 - 2.99 píxeles, intensidad de la cabeza estática de 0.26 - 1.31 píxeles, y elongación de la cabeza estática menor a 100 píxeles. En cada experimento se analizaron al menos 20 campos microscópicos correspondientes a un mínimo de 200 células. Los espermatozoides fueron clasificados como hiperactivados si reunían las siguientes condiciones: velocidad curvilínea ( $VCL \geq 271 \mu\text{m/s}$ ), linealidad ( $LIN < 50 \%$ ), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $ALH \geq 3.5 \mu\text{m}$ ).

### ***Tinción acrosomal fluorescente y tinción con coomassie***

Luego de los tratamientos indicados, los espermatozoides fueron colectados por centrifugación (600 g, 5 min), lavados con Buffer Fosfato Salino ("PBS": NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) y luego de una nueva centrifugación (500 g, 5 min) fueron resuspendidos en un volumen adecuado de PBS para ajustar la concentración a  $1-2 \times 10^5$  espermatozoides/ml. Se sembraron 20  $\mu\text{L}$  de esta suspensión en pocillos de silicona sobre portaobjetos de vidrios, y se dejaron secar al aire durante 20 min. Las células fueron fijadas con formaldehído 3.7 % diluido en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con T-PBS (PBS + Tween-20 0.1 %) y luego se permeabilizaron las células con Tritón X-100 0.5 % por 5 min. Nuevamente se realizaron 3 lavados con T-PBS y se incubaron con aglutinina de maní conjugada a Alexa Fluor-488 (PNA-Alexa488, dilución 1/500 en solución BSA 1 %-PBS) (Molecular Probes, Oregon) durante 12 h a 4 °C.

En este paso se marcarán los acrosomas intactos, por unión de las glicoproteínas acrosomales a la aglutinina (lectina), conjugada al fluoróforo (Lybaert et al., 2009). Finalmente, se lavó 5 veces con T-PBS antes del montaje con el reactivo Slow-Fade Light (Molecular Probes, Oregon). El recuento de células no reaccionadas (es decir, con acrosoma intacto que se visualiza como una medialuna fluorescente continua en la región acrosomal) o reaccionadas (es decir, sin tinción fluorescente en el acrosoma), se realizó por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio BH2 Olympus. En paralelo

se obtuvieron imágenes de contraste de interferencia diferencial como control de la morfología espermática.

En los experimentos donde la tinción acrosomal se realizó con coomassie, se reemplazó el paso de agregado de PNA-Alexa488 por agregado de coomassie-G250 0.22 % disuelto en 50 % metanol/10 % ácido acético. Se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente, se enjuagó el portabojetos con abundante agua destilada y se dejó secar antes de montar con glicerol 50 % en PBS. En estos casos, el conteo de células se realizó con microscopio óptico Olympus CH30. Este protocolo deriva del desarrollado por (Larson & Miller, 1999). En todos los casos se contaron al menos 150 células por condición.

### ***Recolección de ovocitos y ensayos de fecundación in vitro***

A ratones hembras CD1 de entre 6-8 semanas (Charles River Laboratories) se les realizó una inyección intraperitoneal de gonadotrofina coriónica humana (Sigma) para estimular la super-ovulación. Luego de 13 h, se colectaron ovocitos arrestados en metafase II. Las células del cumulus fueron removidas por incubación 5 min en medio H-TYH conteniendo  $\text{NaHCO}_3$  7 mM, BSA 5 mg/ml y se las dejó recuperar por 30 min en una incubadora con  $\text{CO}_2$  5 % a 37 °C. Espermatozoides de ratones machos CD1 fueron capacitados en medio conteniendo diferentes concentraciones de sHT31, durante 60 min y concentrados por centrifugación (600 g, 3 min). Gotas de fecundación de 200  $\mu\text{L}$  cada una, conteniendo 10-20 ovocitos fueron inseminadas con los espermatozoides tratados ( $2.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml), en presencia de sHT31 0.1  $\mu\text{M}$  (que no afectó la fecundación). Luego de 4 h de inseminación, los ovocitos fueron lavados por pasajes consecutivos en 3 gotas de medio H-TYH suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  22 mM y BSA 15 mg/ml, utilizando una pipeta de calibre fino para separar cualquier espermatozoide que haya permanecido unido a los ovocitos. Se incubaron los ovocitos por 3 h más en el medio mencionado y luego fueron fijados 15 min en paraformaldehído/PBS 3.7 %, lavados y teñidos con Hoechst 3342 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma) en PBS por 10 min, a temperatura ambiente. El estado fecundado se determinó por visualización de los pro-núcleos femenino y masculino.

## ***Medición de potencial de membrana ( $E_m$ ) en ensayos poblacionales y ensayo de apertura de CatSper***

Luego del tratamiento indicado, los espermatozoides fueron colectados por centrifugación (700 g, 5 min) y la concentración se ajustó a  $2.7 \times 10^6$  células/ml con medio NC. Luego, los espermatozoides fueron cargados con la sonda sensible a  $E_m$ , DISC<sub>3</sub>(5) 1  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes, Oregon) durante 5 min a 37 °C. No se añadieron desacoplantes mitocondriales ya que su contribución al potencial de reposo es despreciable y no modifican las medidas de  $E_m$  (Chávez et al., 2013). La suspensión de espermatozoides fue transferida a una cubeta de cuarzo, a 37 °C y con agitación suave, y la señal de fluorescencia se monitoreó con un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse ( $\lambda = 620/670$  nm excitación/emisión). Las mediciones se iniciaron registrando fluorescencia inicial constante y luego dentro de cada medición experimental se realizó una curva de calibración interna que inicia con el agregado de valinomicina 1  $\mu\text{M}$  y continúa con agregados secuenciales de KCl, como se describe en (Demarco et al., 2003). Brevemente, a través de la ecuación de Nernst se puede calcular el  $E_m$  teórico para cada punto de la curva de calibración, conociendo la concentración de  $\text{K}^+$  agregado. Luego, se asocia cada valor de fluorescencia (medido en unidades arbitrarias de fluorescencia) de un punto de la curva de calibración, con su correspondiente valor teórico de  $E_m$ . De esta manera se obtiene una curva lineal de Fluorescencia vs  $E_m$ , en la cual se puede intrapolar el valor de fluorescencia inicial para calcular el  $E_m$  de esa condición experimental. Esta curva de calibración interna para cada determinación, compensa variables que pudieran incidir en los valores de fluorescencia absoluta (por ejemplo: distintas cantidades de fluoróforo, diferencias en el estado de vitalidad de las células, variaciones en la carga de los espermatozoides con el fluoróforo, etc.).

En los experimentos en donde se midió apertura de CatSper, luego de la medición de fluorescencia inicial, se secuestró el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por agregado de EGTA 3.5 mM (dejando un valor de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de 138 nM, según estimado por MaxChelator), mientras se continuó con el registro. La ausencia de cationes divalentes en el medio, permite el flujo de  $\text{Na}^+$  a través de CatSper, el cual al ingresar a las células provoca una despolarización que se registra como un aumento de la fluorescencia en la cubeta. Luego, se agregó sHT31 al medio para estudiar la inducción o no de una mayor despolarización por ingreso de  $\text{Na}^+$

a través de CatSper. La magnitud de dicha despolarización y en consecuencia, la magnitud del aumento de fluorescencia, es un estimador indirecto de la proporción de canales CatSper abiertos en la población bajo estudio (Torres-Flores et al., 2011). Se calculó el cambio de fluorescencia ocasionado por el agregado de sHT31 como:  $(F_{\text{sHT31}} - F_{\text{EGTA}})/(F_{\text{EGTA}} - F_0)$ , en donde  $F_{\text{sHT31}}$  es la fluorescencia luego del agregado de sHT31,  $F_{\text{EGTA}}$  es la fluorescencia luego del agregado de EGTA, y  $F_0$  es la fluorescencia al inicio de la medición.

### ***Análisis de niveles de $\text{Ca}^{2+}$ por microscopía en vivo***

Luego de la incubación en medio no capacitante o capacitante, los espermatozoides fueron incubados con la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo3-AM 2  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes, Oregon) en ácido plurónico 0.05 % (manteniendo una concentración de DMSO inferior a 0.2 %) por 30 min a 37 °C en oscuridad. Luego, el fluoróforo excedente se lavó por centrifugación (700 g, 5 min) y el pellet de espermatozoides fue resuspendido en medio NC ajustando la concentración a  $1 \times 10^7$  células/ml. Estas células fueron inmovilizadas sobre cubreobjetos pre-tratados con laminina (0.1 mg/ml), la cual permite que los espermatozoides queden adheridos por sus cabezas, dejando los flagelos libres. El preparado se colocó sobre platina termostatzada a 37 °C en la cámara de grabación, la cual a su vez se llenó con medio de grabación (medio NC) para permitir la captura de imágenes. En los casos donde se evaluó el efecto de sPKI y mibefradil, el medio de grabación también incluyó las concentraciones indicadas de esos inhibidores. En estas condiciones se comenzó con el registro de fluorescencia constante durante 1 min. Todos los agregados sucesivos de drogas, se hicieron pre-diluyéndolas en 100  $\mu\text{L}$  de medio de grabación. Así se siguió la señal antes, durante y luego del agregado de sHT31 o sHT31p. Al final de cada registro se agregó el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ionomicina 10  $\mu\text{M}$  como control de viabilidad y respuesta del sistema, así como para la posterior normalización de los valores de fluorescencia.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio invertido Z1 con cabezal de escaneo Zeiss LSM880, objetivo de inmersión 60 X (apertura numérica 1.4). La excitación a 488 nm se realizó con láser de argón, combinado con detector espectral GaAsP con un ancho de banda de 508-588 nm. Se llevó a cabo un escaneo bidireccional con un tiempo de permanencia de 1.03  $\mu\text{s}$  y una resolución de 512x512 pixeles, resultando

en una velocidad de adquisición de imagen de 3 cuadros/s, por periodos de 8-10 min. Las películas obtenidas fueron procesadas y analizadas con el programa ImageJ (versión 1.38, NIH). Para el análisis en el cambio de fluorescencia se seleccionaron aquellas células dentro de cada campo que respondieron a ionomicina (es decir, células vivas y responsivas). Las regiones de interés ("ROIs") fueron delimitados sobre la cabeza de cada espermatozoide para cuantificar los cambios de fluorescencia en las mismas. Los cambios en la fluorescencia de Fluo3 son representados como  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$ , donde F representa la intensidad de fluorescencia a un dado tiempo,  $F_0$  es el promedio de los valores de fluorescencia registrados durante el primer minuto de adquisición antes de la adición de sHT31/sHT31p, y  $F_{\max}$  corresponde al valor de fluorescencia máximo obtenido tras el agregado de ionomicina (equivalente a 100 % de respuesta).

La respuesta promedio de todas las células del experimento fue usada para comparar respuestas entre distintos experimentos, y el número n representa la cantidad total de experimentos.

Aquellas células con un cambio de fluorescencia (equivalente a cambios en  $[Ca^{2+}]_i$ ) mayor o igual a 15 % respecto a los cambios ocasionados por ionomicina (100 %), fueron contadas como "responsivas". Al menos 40 células fueron analizadas en cada experimento, empleando un pool de espermatozoides provenientes de 3 ratones.

Para la determinación de la cinética de aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular provocada por sHT31, los espermatozoides capacitados fueron cargados con Fluo3-AM como se describió arriba. A continuación, fueron agregados sobre cubreobjetos pre-tratados con concanavalina-A (1 mg/ml), de manera que las células quedan adheridas tanto por la cabeza como por el flagelo, inmovilizándolas para poder analizar los cambios de señal en estos compartimentos. Las señales de fluorescencia se registraron utilizando un microscopio invertido Eclipse TE300 Nikon, acoplado a una fuente de excitación pulsada de tipo LED, y objetivo de inmersión 60 X (PlanApo N, apertura numérica 1.42). Las imágenes fueron capturadas con una cámara AndorIxon-DU8970 EMCCD, controlada por un programa iQ (Andor Technology, Belfast, UK), a 10 cuadros/s con un pulso de excitación de 2 ms utilizando un led de color cian único. Para seleccionar las longitudes de ondas deseadas, se empleó un filtro de excitación (HQ485/25X), asociado a espejo

dicroico (Q-505 LP), y filtro de emisión (HQ510 LP) (Chroma Technology, Bellows Falls, VT). La adquisición de imágenes se realizó a 10 cuadros/s por períodos de tiempo no mayores de 5 min. La fluorescencia inicial constante se registró por 30 s, luego se añadió sHT31 1  $\mu\text{M}$  a la cámara de grabación y se continuó con el registro de la señal durante 3-4 min adicionales. Al final de cada medición se agregó ionomicina 10  $\mu\text{M}$  como control de respuesta. Utilizando el programa de análisis ImageJ, se definieron 3 ROIs distintos para cabeza, pieza media y pieza principal. Los valores de fluorescencia para cada ROI se normalizaron calculando  $\Delta F = ((F-F_0)/ F_0) \times 100$ , donde  $\Delta F$  es el porcentaje en el cambio de fluorescencia.

Para cada trazo se determinó el momento en que la intensidad de fluorescencia comenzó a aumentar y se estimó el tiempo de respuesta para cada espermatozoide.

### ***Análisis estadístico***

De todos los experimentos se realizaron al menos tres repeticiones independientes. Los datos se presentan como la media + el error estándar. El análisis estadístico se realizó por T de Student, Mann-Whitney no paramétrico y Análisis de Varianza (ANOVA), según corresponda. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron significativas si presentaron una probabilidad de error tipo I de 5 % o menos ( $p < 0.05$ ). Las pruebas de comparaciones múltiples se realizaron mediante test de Holm-Sidak.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Aitken, R. J. (2013). Human spermatozoa: revelations on the road to conception. *F1000Prime Reports*, 5(39).

Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., De la Vega-Beltrán, J.L., Da Ros, V. G., Greer, P. A., Darszon, A., Krapf, D., Salicioni, A.M., Cuasnicú, P. S. & Visconti, P. E. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development*, 143(13).

Amata, I., Maffei, M., & Pons, M. (2014). Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Frontiers in Genetics*, 5, 181.

Andrade-Rocha, F. T. (2017). On the Origins of the Semen Analysis: A Close Relationship with the History of the Reproductive Medicine. *J Hum Reprod Sci*, 10(4), 242-255.

Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326.

Baker, M. A., Hetherington, L., & Aitken, R. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci*, 119(15), 3182-3192.

Bannai, H., Yoshimura, M., Takahashi, K., & Shingyoji, C. (2000). Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J Cell Sci*, 113(5), 831-839.

Barratt, C. L. R. (2011). The mystery is solved: CatSper is the principal calcium channel activated by progesterone in human spermatozoa. *Asian J Androl*, 13(3), 351-352.

Bauman, A. L., Soughayer, J., Nguyen, B. T., Willoughby, D., Carnegie, G. K., Wong, W., Hoshi, N., Langeberg, L. K., Cooper, D. M. F., Dessauer, C. W. & Scott, J. D. (2006). Dynamic Regulation of cAMP Synthesis through Anchored PKA-Adenylyl Cyclase V/VI Complexes. *Mol Cell*, 23(6), 925-931.

Bavister, B. (1969). Environmental factors important for in vitro fertilization in the hamster. *J Reprod Fertil*, 18(3), 544-545.

Baxendale, R. W., & Fraser, L. R. (2005). Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev*, 71(4), 495-508.

Bedford, J. M. (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(2), 429-460.

Belmonte, S. A., López, C. I., Roggero, C. M., De Blas, G. A., Tomes, C. N., & Mayorga, L. S. (2005). Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. *Dev Biol*, 285(2), 393-408.

Belmonte, S. A., Mayorga, L. S., & Tomes, C. N. (2016). The molecules of sperm exocytosis. En *Adv Anat Embryol Cell Biol* (Springer, Vol. 220, pp. 71-92). Luxemburgo.

Bielfeld, P., Faridi, A., Zaneveld, L., & De Jonge, C. J. (1994). The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil Steril*, 61(3), 536-541.

Blake, R. A., Broome, M. A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L., & Courtneidge, S. A. (2000). SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol cell biol*, 20(23), 9018-9027.

Boggon, T. J., & Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23(48), 7918-7927.

Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., & O'Bryan, M. K. (2009). Phenotyping male infertility in the mouse: How to get the most out of a «non-performer». *Hum Reprod Update*, 16(2), 205-224.

Boschelli, D. H., Ye, F., Wang, Y. D., Dutia, M., Johnson, S. L., Wu, B., Miller, K., Powell, D. W., Yaczko, D., Young, M., Tischler, M., Arndt, K., Discafani, C., Etienne, C., Gibbons, J., Grod, J., Lucas, J., Weber, J. M. & Boschelli, F. (2001). Optimization of 4-phenylamino-3-quinolinecarbonitriles as potent inhibitors of Src kinase activity. *J Med Chem*, 44(23), 3965-3977.

Bragado, M. J., Gil, M. C., Martin-Hidalgo, D., De Llera, A. H., Bravo, N., Moreno, A. D., & Garcia-Marin, L. J. (2012). Src family tyrosine kinase regulates acrosome reaction but not motility in porcine spermatozoa. *Reproduction*, 144(1), 67-75.

Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K., & Gerton, G. L. (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev*, 79(1), 4-18.

Carlson, A. E., Burnett, L. A., del Camino, D., Quill, T. A., Hille, B., Chong, J. A., Moran, M., Babcock, D. F. (2009). Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS ONE*, 4(8), e6844.

Carr, D. W., Fujita, A., Stentz, C. L., Liberty, G. A., Olson, G. E., & Narumiya, S. (2001). Identification of Sperm-specific Proteins that Interact with A-kinase Anchoring Proteins in a Manner Similar to the Type II Regulatory Subunit of PKA. *J Biol Chem*, 276(20), 17332-17338.

Carr, D. W., Hausken, Z. E., Fraser, I. D. C., Stofko-Hahn, R. E., & Scott, J. D. (1992). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein: Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem*, 267(19), 13376-13382.

Carr, D. W., Stofko-Hahn, R. E., Fraser, I. D. C., Bishop, S. M., Acott, T. S., Brennan, R. G., & Scott, J. D. (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem*, 266(22), 14188-14192.

Carrera, A., Gerton, G. L., & Moss, S. E. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: Structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev Bio*, 165(1), 272-284.

Chang, H., & Suarez, S. S. (2010). Rethinking the Relationship Between Hyperactivation and Chemotaxis in Mammalian Sperm. *Biol Reprod*, 83(4), 507-513.

Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697-698.

Chávez, J. C., De La Vega-Beltran, J. L., Escoffier, J., Visconti, P. E., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C. M. (2013). Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization. *PLoS ONE*, 8(4), e60578.

Chávez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega-Beltran, J. L., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., Santi, C. M. (2014). SLO3 K<sup>+</sup> channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem*, 289(46), 32266-32275.

Chung, J. J., Shim, S. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2014). Structurally distinct Ca<sup>2+</sup> signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell*, 157(4), 808-822.

Cuasnicú, P. S., Da Ros, V. G., Weigel Muñoz, M., & Cohen, D. J. (2016). Acrosome reaction as a preparation for gamete fusion. En *Adv Anat Embryol Cell Biol* (Springer, pp. 159-172). Luxemburgo.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev*, 91(4), 1305-1355.

De Blas, G. A., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A., & Mayorga, L. S. (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*, 277(51), 49326-49331.

De Jonge, C. J., Barratt, C. L. R., RADWANSKA, E., & COOKE, I. D. (1993). The Acrosome Reaction-Inducing Effect of Human Follicular and Oviductal Fluid. *J Androl*, 14(5), 359-365.

De Jonge, C. J., Han, H. L., Lawrie, H., Mack, S. R., & Zaneveld, L. J. D. (1991). Modulation of the Human Sperm Acrosome Reaction by Effectors of the Adenylate Cyclase/Cyclic AMP Second-Messenger Pathway. *J Exp Zool*, 258(1), 113-125.

De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E., Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem*, 287(53), 44384-44393.

Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf G.S., Darszon A. & Visconti, P. E. (2003). Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*, 278(9), 7001-7009.

Dessey, J. L., Burton, K. a, & McKnight, G. S. (2000). Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6433-6438.

Eddy, E. M., Toshimori, K., & O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 61(1), 103-115.

- Escoffier, J., Navarrete, F. A., Haddad, D., Santi, C. M., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2015). Flow Cytometry Analysis Reveals That Only a Subpopulation of Mouse Sperm Undergoes Hyperpolarization During Capacitation. *Biol Reprod*, 92(5), 121.
- Fetterolf, P. M., Jurisicova, A., Tyson, J. E., & Casper, R. F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biol Reprod*, 51(2), 184-192.
- Garde, J., & Roldan, E. R. S. (1996). Rab3-Peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites. *FEBS Letters*, 391(3), 263-268.
- Hanada, A., & Chang, M. C. (1978). Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro. *J Exp Zool*, 203(2), 277-285.
- Harayama, H., & Nakamura, K. (2008). Changes of PKA and PDK1 in the principal piece of boar spermatozoa treated with a cell-permeable cAMP analog to induce flagellar hyperactivation. *Mol Reprod Devel*, 75(9), 1396-1407.
- Harrison, D. A., Carr, D. W., & Meizel, S. (2000). Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod*, 62(3), 811-820.
- Harrison, R. (2004). Rapid PKA-Catalysed Phosphorylation of Boar Sperm Proteins Induced by the Capacitating Agent Bicarbonate. *Mol Reprod Devel*, 67(3), 337-352.
- Harrison, R., & Miller, N. (2000). cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Devel*, 55(2), 220-228.
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., Levin, L. R., Williams, C. J., Buck, J., Moss, S. B. (2005). The «soluble» adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell*, 9(2), 249-259.
- Hillman, P., Ickowicz, D., Vize, R., & Breitbart, H. (2013). Dissociation between AKAP3 and PKARII Promotes AKAP3 Degradation in Sperm Capacitation. *PLoS ONE*, 8(7), e68873.
- Hirohashi, N., Gerton, G. L., & Buffone, M. G. (2011). Video imaging of the sperm acrosome reaction during in vitro fertilization. *Comm Integr Biol*, 4(4), 471-476.

Imai, H., Niwa, K., & Iritani, A. (1977). Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J Reprod Fert*, 51, 495-497.

Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., & Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(50), 20008-20011.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(12), 4892-4896.

Kennedy, E. J., & Scott, J. D. (2015). Selective disruption of the AKAP signaling complexes. *En cAMP Signaling: Methods and Protocols* (Springer, pp. 137-150). Luxemburgo.

Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 439(7077), 737-740.

Kleinboelting, S., Diaz, A., Moniot, S., van den Heuvel, J., Weyand, M., Levin, L. R., Buck J & Steegborn, C. (2014). Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(10), 3727-3732.

Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V, Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem*, 285(11), 7977-7985.

Krapf, D., Chun Ruan, Y., Wertheimer, E. V, Battistone, M. A., Pawlak, J. B., Sanjay, A., Pilder, S. H., Cuasnicú, P. S., Breton, S., & Visconti, P. E. (2012). cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Dev Biol*, 369(1), 43-53.

Kuji, N., Tanaka, Y., Komatsu, S., & Yoshimura, Y. (2005). Protein kinase A activity and protein phosphorylation during the mouse sperm acrosomal reaction. *Arch Androl*, 51(1), 55-64.

La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N. & Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol*, 411(2), 172-182.

- La Spina, F. A., Stival, C., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2017). Molecular and Cellular Aspects of Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. En H. Schatten & G. M. Constantinescu (Eds.), *Animal Models and Human Reproduction* (pp. 409-426). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev*, 52(4), 445-449.
- Lawson, C., Goupil, S., & Leclerc, P. (2008). Increased Activity of the Human Sperm Tyrosine Kinase SRC by the cAMP-Dependent Pathway in the Presence of Calcium. *Biol of Reprod*, 79(4), 657-666.
- Leclerc, P., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1996). Cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate-Dependent Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Relation to Human Sperm Capacitation and Motility. *Biol of Reprod*, 55(3), 684-692.
- Lefievre, L., Jha, K. N., De Lamirande, E., Visconti, P. E., & Gagnon, C. (2002). Activation of Protein Kinase A During Human Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *J Androl*, 2323(5), 709-716.
- Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J., & González-Martínez, M. T. (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta*, 1372(1), 1-12.
- Ling, S., Woronuk, G., Sy, L., Lev, S., & Braun, A. P. (2000). Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel in the presence of Src tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 275(39), 30683-30689.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391.
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*, 20(7), 619-629.

- Luconi, M., Cantini, G., Baldi, E., & Forti, G. (2011). Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Frontiers Biosci*, 16, 1315-1330.
- Luconi, M., Carloni, V., Marra, F., Ferruzzi, P., Forti, G., & Baldi, E. (2004). Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A *J Cell Sci*, 117(7), 1235-1246.
- Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G., & Baldi, E. (2005). Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol of Reprod*, 72(1), 22-32.
- Lybaert, P., Danguy, A., Leleux, F., Meuris, S., & Lebrun, P. (2009). Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histology and Histopathology*, 24(8), 999-1007.
- Mack, K., & Fischer, M. J. M. (2017). Disrupting sensitization of TRPV4. *Neuroscience*, 352, 1-8.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N., & Belmonte, S. A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life*, 59(4-5), 286-292.
- McConnachie, G., Langeberg, L. K., & Scott, J. D. (2006). AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med*, 12(7), 317-323.
- Miyamoto, H., & Chang, M. C. (1972). Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 30(1), 135-137.
- Moos, J., Pěkníková, J., Geussova, G., Philimonenko, V., & Hozák, P. (1998). Association of protein kinase A type I with detergent-resistant structures of mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev*, 50(1), 79-85.
- Murray, A. J. (2008). Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems. *Sci Signal*, 1(22), re4.
- Navarrete, F. A., García-Vázquez, F. A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sánchez-Cárdenas, C., Salicioni, A. M., Darszon, A. & Visconti, P. E. (2015). Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. *J Cell Physiol*, 230(8), 1758-1769.

- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(3), 1149-1158.
- Nolan, M. a, Babcock, D. F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K. a, & McKnight, G. S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(37), 13483-13488.
- Nygren, K. G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G. D., & De Mouzon, J. (2011). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: Assisted reproductive technology 2003. *Fertility and Sterility*, 95(7).
- O'Flaherty, C., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (2004). Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Molecular Human Reproduction*, 10(5), 335-363.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., & Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(2), 828-833.
- Osycka-Salut, C., Diez, F., Burdet, J., Gervasi, M. G., Franchi, A., Bianciotti, L. G., Davio, C. & Perez-Martinez, S. (2014). Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*, 20(1), 89-99.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2015). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*, 19(1), 5-14.
- Poppinga, W. J., Heijink, I. H., Holtzer, L. J., Skroblin, P., Klussmann, E., Halayko, A. J., Timens, W., Maarsingh, H. & Schmidt, M. (2015). A-kinase-anchoring proteins coordinate inflammatory responses to cigarette smoke in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308(8), 766-775.
- Puga Molina, L., Pinto, N., Torres, N., González-Cota, A., Luque, G., Balestrini, P., Romarowski, A., Krapf, D., Santi, C. M., Treviño, C. L., Darszon, A. & Buffone, M. G. (2018). CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *J Biol Chem*, 293(25), 9924-9936.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A., Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are

required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(4), 1219-1223.

Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la Real Academia Española*. Recuperado de <http://dle.rae.es/>

Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech Dev*, 154(1), 33-43.

Roldan, E. R. S., Murase, T., & Shi, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*, 266(5190), 1578-1581.

Romarowski, A., Sánchez-Cárdenas, C., Ramírez-Gómez, H. V., Puga Molina, L. del C., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A., Darszon, A., & Buffone, M. G. (2016). A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. *Biol Reprod*, 94(3), 63.

Ruete, M. C., Lucchesi, O., Bustos, M. A., & Tomes, C. N. (2014). Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm's acrosome during exocytosis. *Cell Commun Signal*, 12, 43.

Saling, P. M., Sowinski, J., & Storey, B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: Sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool*, 209(2), 229-238.

San Agustin, J. T., Wilkerson, C. G., & Witman, G. B. (2000). The unique catalytic subunit of sperm cAMP-dependent protein kinase is the product of an alternative Calpha mRNA expressed specifically in spermatogenic cells. *Mol Biol Cell*, 11(9), 3031-3044.

Santi, C. M., Martínez-López, P., De La Vega-Beltran, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., & Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*, 584(5), 1041-1046.

Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobloch, K. P. & Neyses, L. (2004). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem*, 279(27), 28220-28226.

- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., & Bradley, A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 64(4), 693-702.
- Spungin, B., & Breitbart, H. (1996). Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci*, 109(7), 1947-1955.
- Stauss, C., Votta, T., & Suarez, S. S. (1995). Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona Pellucida. *Biol Reprod*, 53, 1280-1285.
- Stival, C., La Spina, F. A., Graf, C. B., Arcelay, E., Arranz, S. E., Ferreira, J. J., Le Grand, S., Dzikunu, V. A., Santi, C. M., Visconti, P. E., Buffone, M. G. & Krapf, D. (2015). Src kinase is the connecting player between Protein Kinase A (PKA) activation and hyperpolarization through SLO3 potassium channel regulation in mouse sperm. *J Biol Chem*, 290(30), 18855-18864.
- Stival, C., Puga Molina, L. D. C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *En Adv Anat Embryol Cell Biol (Springer, Vol. 220, pp. 93-106)*. Luxemburgo.
- Stival, C., Ritagliati, C., Xu, X., Gervasi, M. G., Luque, G. M., Baro Graf, C., De La Vega-Beltran, J. L., Torres, N. I., Darszon, A., Krapf, D., Buffone, M. G., Visconti, P. E. & Krapf, D. (2018). Disruption of protein kinase A localization induces acrosomal exocytosis in capacitated mouse sperm. *J Biol Chem*, 293(24), 9435-9447.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382-386.
- Suarez, S. S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim*, 37(3), 140-143.
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*.
- Suarez, S. S., & Dai, X. (1992). Hyperactivation Enhances Mouse Sperm Capacity for Penetrating Viscoelastic Media. *Biol Reprod*, 46(4), 686-691.
- Sueldo, C., Oehninger, S., Subias, E., Mahony, M., Alexander, N., Burkman, L., & Acosta, A. (1993). Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertility and Sterility*, 60(1), 137-140.

- Tash, J. S., & Bracho, G. E. (1998). Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(2), 557-563.
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J., Keshwani, M., & Kornev, A. (2013). PKA: Lessons learned after twenty years. *Biochim Biophys Acta*, 1834(7), 1271-1278.
- Teruel, M. N., & Meyer, T. (2000). Translocation and reversible localization of signaling proteins: A dynamic future for signal transduction. *Cell*, 103(2), 181-184.
- Tillo, S. E., Xiong, W. H., Takahashi, M., Miao, S., Andrade, A. L., Fortin, D. A., Yang, G., Qin, M., Smoody, B. F., Stork, P. J. S. & Zhong, H. (2017). Liberated PKA Catalytic Subunits Associate with the Membrane via Myristoylation to Preferentially Phosphorylate Membrane Substrates. *Cell Reports*, 19(3), 617-629.
- Torres-Flores, V., Picazo-Juárez, G., Hernández-Rueda, Y., Darszon, A., & Gonzalez-Martínez, M. T. (2011). Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod*, 26(10), 2626-2635.
- Tourzani, D., Paudel, B., Miranda, P., Visconti, P. E., & Gervasi, M. (2018). Changes in Protein O-GlcNAcylation During Mouse Epididymal Sperm Maturation. *Front Cell Dev Biol*, 6(60).
- Toyoda, Y., Yokoyama, M., & Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap J Anim Reprod*, 16, 147.
- Treviño, C. L., Felix, R., Castellano, L. E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., Pacheco, J., López-González, I., Gomora, J. C., Tsutsumi, V., Hernández-Cruz, A., Fiordeliso, T., Scaling, A. L. & Darszon, A. (2004). Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett*, 563(1-3), 87-92.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, 18(1-2), 25-38.
- Varano, G., Lombardi, A., Cantini, G., Forti, G., Baldi, E., & Luconi, M. (2008). Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 23(12), 2652-2662.

- Vijayaraghavan, S., Goueli, S. A., Davey, M. P., & Carr, D. W. (1997). Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem*, 272(8), 4747-4752.
- Visconti, P. E., Bailey, J., Moore, G. D., Pan, D., Olds-clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.
- Visconti, P. E., Johnson, L. R., Oyaski, M., Fornés, M., Moss, S. B., Gerton, G. L., & Kopf, G. S. (1997). Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol*, 192(2), 351-363.
- Visconti, P. E., Moore, G., Bailey, J., Leclerc, P., Connors, S., Pan, D., Olds-Clarke P & Kopf, G. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4), 1139-1150.
- Walensky, L. D., & Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol*, 130(4), 857-869.
- Walker, F., DeBlaquiere, J., & Burgess, A. W. (1993). Translocation of pp60(c-src) from the plasma membrane to the cytosol after stimulation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 268(26), 19552-19558.
- Ward, W. S., & Zalensky, A. O. (1996). The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 6(2-3), 139-147.
- Wertheimer, E. V, Krapf, D., De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F. A., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A. M., Levin, L. R., Buck, J., & Visconti, P. E. (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem*, 288(49), 35307-35320.
- Withers, S., Cartwright, E. J., & Neyses, L. (2006). Sperm phenotype of mice carrying a gene deletion for the plasma membrane calcium/calmodulin dependent ATPase 4. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 93-97.
- Wojtal, K., De Vries, E., Hoekstra, D., & van IJzendoorn, S. (2006). Efficient trafficking of MDR1/P-glycoprotein to apical canalicular plasma membranes in HepG2 cells requires PKA-RIIalpha anchoring and glucosylceramide. *Mol.Biol.Cell*, 17(8), 3638-3650.

- Wu, L., & Sampson, N. S. (2014). Fucose, mannose, and  $\beta$ -N-acetylglucosamine glycopolymers initiate the mouse sperm acrosome reaction through convergent signaling pathways. *ACS Chemical Biology*, 9(2), 468-475.
- Xia, J., & Ren, D. (2009). The BSA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 119.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., & Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular Cell*, 3(5), 629-638.
- Yanagimachi, R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil*, 18(2), 275-286.
- Yao, Y. qing, Ho, P. chung, & Yeung, W. S. B. (2000). Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 73(4), 680-686.
- Zanetti, N., & Mayorga, L. S. (2009). Acrosomal Swelling and Membrane Docking Are Required for Hybrid Vesicle Formation During the Human Sperm Acrosome Reaction. *Biol Reprod*, 81(2), 396-405.
- Zarelli, V. E. P., Ruete, M. C., Roggero, C. M., Mayorga, L. S., & Tomes, C. N. (2009). PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis. *J Biol Chem*, 284(16), 10491-10503.
- Zeng, X., Yang, C., Kim, S., Lingle, C., & Xia, X. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated  $\text{K}^+$  current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14), 5879-5884.
- Zeng, Y., Clark, E., & Florman, H. (1995). Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*, 171(2), 554-563.
- Zippin, J. H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M. S., Fischman, D. A., Levin, L. R., & Buck, J. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(1), 82-84.