



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales
Escuela de Cuarto Nivel
Carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas**

Tesis Doctoral

**“Caracterización molecular del rol del AMPc en la
exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos”**

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM) - CONICET

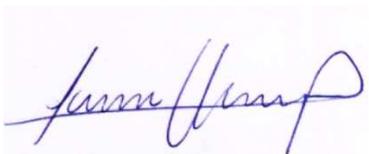
Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo

Autor: Lic. Ornella Lucchesi

Directora: Dra. Claudia Tomes

Codirectora: Dra. Laura Giojalas

2015



Lic. Ornella Lucchesi



Dra. Claudia Tomes



Dra. Laura Giojalas

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas e instituciones que me permitieron concretar esta carrera de doctorado, porque sin ellos las metas hubiesen sido muy difíciles de alcanzar.

A CONICET por otorgarme la oportunidad y los medios para realizar la carrera de doctorado.

A la Universidad Nacional de Córdoba y en especial a la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas por permitirme realizar el doctorado en su institución.

A la Universidad Nacional de Cuyo, en especial a la Facultad de Ciencias Médicas y al IHEM por brindarme el lugar físico para la realización de mi carrera de doctorado.

A la Dra. Claudia Tomes por sus enseñanzas, tiempo y dedicación brindados y la buena predisposición mostrada durante estos 5 años de tesis.

A la Dra. Laura Giojalas por sus consejos, seguimiento y buena predisposición durante estos 5 años de tesis.

A los miembros de mi Comisión Asesora de tesis la Dra. Mónica Vazquez-Levin y el Dr. Carlos Coronel por su seguimiento, sugerencias y consejos aportados durante el transcurso de mi tesis.

Al Dr. Luis Mayorga por sus consejos y sugerencias.

Al Jurado de tesis por la lectura crítica de mi trabajo.

A Julio Linares, Victoria Varberis, Ivana Palacio y Eugenia Haro de la Secretaría del Doctorado en Ciencias Biológicas por su paciencia y eficiente ayuda.

A las personas del IHEM que de una forma u otra ayudaron en mi formación y facilitaron los medios para poder llevar a cabo este doctorado.

A aquellas personas que de una forma u otra aportaron su ayuda o colaboración para poder concretar este doctorado.

A mis padres por su continuo apoyo, contención y consejos durante este trayecto.

A mis hermanas por ser mi contención y mi pilar en la vida.

A mis compañeros de laboratorio Celeste, Matías y Florencia porque gracias a sus consejos, enseñanzas, ayuda, compañía y gran contención conseguí llegar finalmente hasta aquí.

A mi amiga y gran compañera Celeste porque siento que sin su ayuda y apoyo esto no hubiese sido posible; gracias por el aguante, consejos, fuerzas, aliento y cariño brindados cada día de estos 5 años.

A mi amigo y compañero de vida Julián por el aguante, paciencia, cariño y contención compartidos día a día.

A los amigos que este doctorado me permitió hacer: Julián, Matilde, Anahí, Milagros, Eugenia, Jimena y Marcelo; por darme el coraje y la alegría para seguir adelante y por los importantes momentos compartidos.

A mis amigos de la vida que siempre estuvieron y me brindaron su apoyo.

A aquellas personas que me brindaron su ayuda y contención en momentos difíciles.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
1. Secreción regulada y constitutiva	9
2. Exocitosis regulada	9
2.1. Etapas de la exocitosis	11
2.2. Proteínas que participan en la exocitosis	12
2.2.1. <i>Proteínas SNAREs</i>	12
2.2.2. <i>Proteínas Rabs</i>	13
3. Fecundación	15
4. El espermatozoide	21
5. Procesos fisiológicos del espermatozoide	24
5.1. Capacitación	24
5.2. Motilidad hiperactivada	24
5.3. Reacción acrosomal	25
6. La RA como modelo de exocitosis	27
6.1. Estudio mediante permeabilización de la membrana plasmática	27
6.2. Estudio mediante la translocación de proteínas recombinantes permeables	28
7. Rol del calcio durante la RA	29
8. Proteínas involucradas en la fusión de membranas durante la RA	31
8.1. SNAREs	31
8.2. NSF/ α -SNAP	32
8. 3. Rabs	32
8.3.1. <i>Rab3</i>	32
8.3.2. <i>Rab27</i>	33
9. AMPc	33
10. Adenilato ciclasas	35
11. Fosfodiesterasas	37
12. Blancos del AMPc	38
12.1. Proteína Quinasa A (PKA)	38
12.2. Canales operados por nucleótidos cíclicos	40
12.3. Epac	41
13. Rap	47
14. PLCϵ	50
15. Cascada de señalización que conduce a la RA	54

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO	56
1. Hipótesis	57
2. Objetivo general	57
3. Objetivos específicos	58
III. MATERIALES Y MÉTODOS	60
1. MATERIALES	61
1.1. Reactivos	61
1.2. Anticuerpos	61
1.3. Plásmidos	62
2. MÉTODOS	63
2.1. Espermatozoides	64
2.1.1. Preparación de los espermatozoides	63
2.1.1.1. <i>Swim-up</i> y <i>capacitación</i>	63
2.1.2. Ensayos de reacción acrosomal (RA)	64
2.1.2.1. <i>Ensayo de RA en células sin permeabilizar</i>	64
2.1.2.2. <i>Ensayo de RA en células permeabilizadas con SLO</i>	64
2.1.2.3. <i>Determinación del porcentaje de RA</i>	65
2.2. Proteínas recombinantes	65
2.2.1. Expresión de proteínas recombinantes	65
2.2.2. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST	66
2.2.3. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a His ₆	67
2.2.4. Ensayos de protección a tripsina para verificar la incorporación de la esponja de AMPc a espermatozoides humanos	67
2.2.4.1. <i>Calibración de la concentración de tripsina</i>	67
2.2.4.2. <i>Tratamiento de las muestras para Western blot</i>	67
2.2.4.3. <i>Tratamiento de las muestras para inmunofluorescencia indirecta</i>	68
2.2.5. Isoprenilación de proteínas Rabs in vitro	68
2.2.6. Activación de proteínas Rabs	69
2.3. Determinaciones inmunológicas	69
2.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	69
2.3.1.1. <i>Calibración de la técnica "Far-inmunofluorescencia indirecta" para detectar Rap1-GTP</i>	70
2.3.1.2. <i>"Far-inmunofluorescencia indirecta" en espermatozoides sin permeabilizar</i>	70
2.3.2. Western blot	71

2.3.2.1. <i>Obtención de extractos de espermatozoides humanos</i>	71
2.3.2.2. <i>Precipitación de proteínas</i>	71
2.3.2.3. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blots</i>	72
2.4. Microscopía	72
2.4.1. Microscopía electrónica de transmisión	72
2.4.2. Mediciones de la concentración de calcio intra-acrosomal en célula única en tiempo real	73
IV. RESULTADOS	75
Objetivo específico 1	76
1. Diseño de una proteína permeable capaz de capturar el AMPc intracelular	76
1.1. Estructura de la esponja de AMPc	76
1.2. Incorporación de la esponja de AMPc en espermatozoides vivos	77
Objetivo específico 2	80
1. Efecto de la esponja de AMPc en la fosforilación en tirosina de proteínas durante la capacitación de espermatozoides humanos	81
2. Efecto de la esponja de AMPc sobre la reacción acrosomal	81
2.1. La exocitosis acrosomal inducida por progesterona y A23187 requiere AMPc endógeno	82
2.2. La esponja de AMPc inhibe la RA porque secuestra el AMPc endógeno	83
2.3. Calcio requiere cAMP endógeno para inducir la RA	84
3. El hinchamiento del acrosoma producido por inductores de la RA es un evento dependiente de AMPc	85
Objetivo específico 3	87
1. Influencia del AMPc sobre la maquinaria proteica que participa en el ensamblaje de la maquinaria de fusión	87
1.1. La reacción acrosomal inducida por Rab3A y Rab27A recombinantes requiere AMPc	88
1.2. Progesterona activa las pequeñas GTPasas Rab3A y Rab27 a través de una vía que utiliza AMPc endógeno	89
2. Influencia del AMPc sobre la rama de señalización que conduce a la movilización de calcio acrosomal	92
2.1. El AMPc es requerido previo a la salida de calcio acrosomal	92
2.2. La movilización de calcio acrosomal sucede a través de una vía dependiente de Epac e independiente de PKA	94

Objetivo específico 4	102
1. Diseño de un método que permite la detección simultánea de la localización y el estado de activación de Rap1 endógena por microscopía de fluorescencia	102
1.1. Desarrollo del método	103
1.2. Validación del método	104
2. Rap1 es activada en respuesta a inductores de la exocitosis acrosomal	106
3. Progesterona activa a la pequeña GTPasa Rap1 a través de una vía que utiliza AMPc endógeno	109
4. Rap1 es activada a través de una vía dependiente de Epac e independiente de PKA	110
5. Cinética de activación de Rap1 en respuesta a progesterona y 8-pCPT-2-O-Me-AMPc	111
6. Diacilglicerol activa a Rap1 a través de una vía independiente de Epac	112
7. Rab3A activa a Rap1 mediante una vía dependiente de AMPc	114
 Objetivo específico 5	 115
1. Presencia de PLCϵ en espermatozoides humanos	116
2. PLCϵ participa en la exocitosis acrosomal	117
3. Mapeo del sitio de acción de PLCϵ en la cascada de señalización que lleva a la exocitosis acrosomal	118
3.1. PLC ϵ actúa posterior a la activación de Rap1	118
3.2. PLC ϵ es requerida previo a la salida de calcio acrosomal	122
3.3. PLC ϵ forma parte de la vía de señalización activada por Epac que conduce a la movilización de calcio acrosomal	123
3.4. Epac moviliza calcio del acrosoma a través de una vía que utiliza Rap y PLC ϵ	124
 V. DISCUSIÓN	 126
 VI. CONCLUSIONES	 136
 VII. REFERENCIAS	 139

I. INTRODUCCIÓN

1. Secreción regulada y constitutiva

Las células eucariotas contienen organelas rodeadas de membranas que se comunican unas con otras a través del tráfico de vesículas. Este tráfico usualmente involucra la generación de vesículas desde un precursor de membrana, el transporte hacia su destino y por último, la fusión con el compartimento diana. El tráfico de vesículas secretorias a la membrana plasmática es esencial para el funcionamiento celular normal. Este proceso también constituye la base de la comunicación intercelular en organismos multicelulares a través de la liberación de un amplio rango de moléculas que actúan extracelularmente. Existen dos tipos de secreción, la constitutiva y la regulada, en ambos casos las vesículas migran a través del citoplasma, se acercan a la membrana plasmática y se fusionan con ella liberando su contenido al espacio extracelular.

Las vías de secreción constitutiva son utilizadas por las células eucariotas para transportar proteínas solubles y de membrana hacia la membrana plasmática y el exterior con el fin de mantener el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular. Este tipo de exocitosis se caracteriza porque las proteínas transportadas en las vesículas son secretadas continuamente y no requieren de un estímulo externo. Mediante esta vía son secretadas moléculas extracelulares como proteínas plasmáticas, anticuerpos, componentes de la matriz extracelular, etc. (Burgoyne and Morgan, 2003).

En muchos tipos celulares, también existe una segunda vía en la cual la exocitosis puede estar altamente regulada para permitir la liberación controlada del contenido de las vesículas o regular la inserción de nuevos componentes de membrana en respuesta a una señal fisiológica. La exocitosis regulada ha sido extensivamente estudiada en las sinapsis donde constituye el mecanismo fundamental por el cual los neurotransmisores son rápidamente liberados desde las vesículas sinápticas para mediar la neurotransmisión. Este tipo de secreción también está presente en células especializadas incluyendo células endocrinas, neuroendocrinas y exocrinas, así como también en células donde la exocitosis sirve para funciones más especializadas y transitorias como en el espermatozoide o el ovocito (Burgoyne and Morgan, 2003).

2. Exocitosis regulada

La secreción regulada asegura que las células puedan liberar una gran variedad de sustancias al espacio extracelular en respuesta a señales. Este proceso depende del tipo celular

estudiado y varía en cuanto a la naturaleza de la de sustancia secretada (neurotransmisores, neuropéptidos, enzimas digestivas, hormonas, etc.), a la cinética de secreción (1 ms para neurotransmisores; segundos a minutos para hormonas) e incluso en el número de eventos que ocurren por célula durante el proceso de secreción (uno para el espermatozoide y múltiples para neuronas) (Kasai et al., 2012). Las sustancias almacenadas pueden ser neurotransmisores, polipéptidos como glucagón o insulina o proteínas enteras como enzimas digestivas, receptores de la superficie celular o transportadores específicos. La liberación de estas sustancias permite la comunicación intercelular a distancia mediante hormonas endocrinas como la insulina, localmente mediante mediadores paracrinos como la histamina o a corto rango mediante neurotransmisores (Söllner, 2003). En estado de reposo, las células acumulan la sustancia que va a ser liberada en vesículas, donde es almacenada en una forma osmóticamente inerte. Existe una gran variedad de vesículas densas o gránulos densos, que se forman en el Golgi y luego son transportadas a través del citoplasma hasta las cercanías de la membrana plasmática. Luego de sufrir procesos madurativos, una subpoblación de estas vesículas permanece lista para ser secretada. En neuronas, además de las vesículas densas existen las vesículas sinápticas que almacenan en su interior neurotransmisores, ambos tipos son necesarios para regular la transmisión neuronal. A diferencia de las vesículas densas, la formación de las vesículas sinápticas se realiza por reciclaje de membranas mediado por endocitosis y el posterior relleno de las vesículas con neurotransmisores. Al igual que las vesículas densas, una subpoblación de vesículas sinápticas se ubica próxima a la membrana plasmática, donde aguarda la llegada del estímulo que conduce a la exocitosis (Gondré-Lewis et al., 2012).

Durante la secreción regulada, las señales extracelulares se transforman en incrementos en la concentración de calcio intracelular (Barclay et al., 2005). Este incremento de calcio es sentido por la maquinaria de fusión y como consecuencia la vesícula se fusiona con la membrana plasmática. Esto conlleva a la liberación del contenido de la vesícula al espacio extracelular y la incorporación de la membrana de la vesícula a la membrana plasmática (Burgoyne and Morgan, 2003).

La fusión de las vesículas con la membrana plasmática sucede gracias a una maquinaria de fusión conservada. Muchas de las moléculas que pertenecen o están asociadas con esta maquinaria de fusión han sido identificadas y caracterizadas e incluyen GTPasas de la familia Rab, componentes integrales de membranas como proteínas SNAREs y proteínas accesorias que interactúan con las SNAREs, como por ejemplo miembros de la familia SM (del

inglés, *sec1p/Munc18-like*), complexinas, sinaptotagminas, NSF y α -SNAP (Jahn and Fasshauer, 2012; Jahn and Scheller, 2006; Südhof and Rizo, 2011).

2.1. Etapas de la exocitosis

En múltiples modelos se ha descrito una serie de pasos secuenciales que ocurren previos a la fusión de las vesículas secretorias con la membrana plasmática y que incluyen el reclutamiento, *tethering* (asociación laxa), *docking* (anclaje) y *priming* (maduración) de la vesícula con la membrana plasmática. Lamentablemente la descripción exacta de qué es y cuándo sucede cada etapa es confusa debido a los diferentes usos que se le dan a la terminología *tethering*, *docking* y *priming* en la literatura. Han sido propuestos diferentes modelos dependiendo del sistema exocítico estudiado, que varían en el orden en que ocurren estos pasos y los componentes del aparato exocítico involucrados (Tomes, 2007a). En algunos casos se ha propuesto que inicialmente, las vesículas son reclutadas a la cercanía de la membrana plasmática, luego algunas de ellas se asocian laxamente con la membrana celular en un proceso denominado *tethering*. El *tethering* productivo de las vesículas con la membrana plasmática es seguido por el *docking* de las membranas, una interacción más fuerte y espacialmente más cercana de las dos bicapas comprometidas en la fusión. Posteriormente, las vesículas pasan a través de una serie de reacciones preparatorias conocidas como *priming*. Se considera *priming* a todos los mecanismos moleculares que facilitan la fusión, como el desensamblaje de complejos *cis* SNAREs, la reorganización del citoesqueleto de actina, etc. (Kasai et al., 2012; Söllner, 2003). Finalmente, en respuesta a un estímulo, se produce la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. Como mencionamos, esta secuencia no es universal ni ha sido establecida en todos los sistemas. Por ejemplo, hasta el momento, son muy pocos los modelos exocíticos donde se propone el *tethering*. Además, dependiendo del tipo celular, el *priming* puede ser pre- o post-*docking* (Tomes, 2007a).

En ciertos tipos celulares se propone que en condiciones de reposo existen grupos de vesículas en cada uno de estos estadios (*tethered*, *docked* y *primed*). El arribo de la señal estimuladora provoca, no sólo la exocitosis de una subpoblación de vesículas, sino también la interconversión de un grupo a otro. En neuronas, la liberación de neurotransmisores es activada principalmente por la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje (VOCCs) en respuesta a los potenciales de acción. En células secretoras no neuronales, además de calcio participan otras señales intracelulares como AMPc y quinasas (Kasai et al., 2012).

En células secretoras típicas, luego de la fusión de la vesícula con la membrana plasmática se produce el reciclaje de membranas y parte de la maquinaria proteica de fusión a

través de un proceso de endocitosis. Por ejemplo, en neuronas luego de la exocitosis, las membranas que pertenecían a las vesículas sinápticas y se incorporaron a la membrana plasmática son endocitadas, recicladas y luego rellenas con neurotransmisores para sufrir una nueva ronda de exocitosis (Südhof, 2004). En espermatozoides, debido a la morfología particular del acrosoma, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan durante la exocitosis y se pierden, sin incorporación de la membrana acrosomal a la plasmática ni reciclado posterior (ver más adelante).

2.2. Proteínas que participan en la exocitosis

2.2.1. Proteínas SNAREs

Las proteínas SNAREs (del inglés *soluble NSF attachment receptor proteins*) forman una superfamilia de pequeñas proteínas con 25 miembros en *Saccharomyces cerevisiae*, 36 miembros en humanos y 54 en *Arabidopsis thaliana*. Ellas tienen un dominio estructural único y característico denominado “motivo SNARE”, que consiste en un tramo de 60-70 aminoácidos que están dispuestos en repeticiones. En el extremo C-terminal, la mayoría de estas proteínas tienen un único dominio transmembrana que está conectado al motivo SNARE por un enlace corto. Muchas SNAREs tienen dominios independientemente plegados que están posicionados hacia el extremo N-terminal del motivo SNARE y puede variar entre los subgrupos de familias (Jahn and Scheller, 2006). La mayoría de las proteínas SNAREs contienen un motivo SNARE, mientras que SNAP-25 y sus homólogos (SNAP-23, -29, y -47) incluyen dos motivos SNAREs (Südhof and Rizo, 2011). Estas proteínas son clasificadas estructuralmente como R-SNAREs o Q-SNAREs basados en la identidad de un residuo altamente conservado (Fasshauer et al., 1998). Sintaxina y SNAP-25 son Q-SNAREs mientras que sinaptobrevina es una R-SNARE. Frecuentemente, una R-SNARE está localizada en la vesícula de transporte que luego se fusiona con un aceptor de membrana que contiene tres Q-SNAREs. Durante la fusión, las proteínas SNAREs se ensamblan en complejos de cuatro hélices altamente empaquetados (configuración *trans*: una R-SNARE en una membrana y tres Q-SNAREs en la otra) desde el extremo amino hacia el carboxilo terminal (Figura 1) (Südhof and Rizo, 2011).

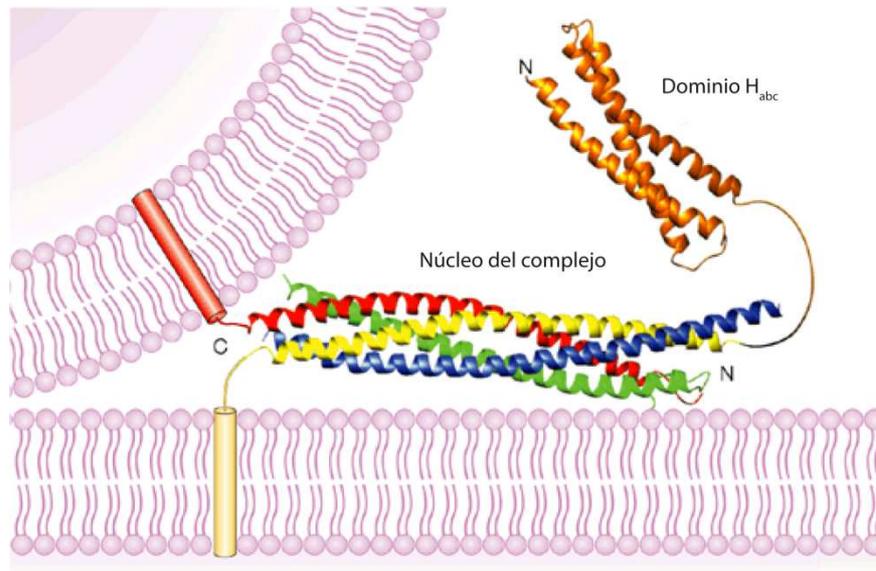


Figura 1. Modelo de la estructura del complejo trans-SNARE sináptico. El diagrama de lazos representa la estructura cristalina del núcleo del complejo SNARE y la estructura NMR del dominio amino-terminal Habc de syntaxina1. El dominio Habc está coloreado en naranja y las SNAREs están coloreadas de la siguiente manera: sinaptobrevina2 en rojo, syntaxina en amarillo, el dominio N-terminal de SNAP-25 en azul y el dominio C-terminal en verde. Los cilindros representan las regiones transmembrana de sinaptobrevina2 y syntaxina1, las cuales están insertas en la vesícula sináptica y la membrana plasmática respectivamente. Las líneas curvas representan secuencias cortas que conectan los motivos SNARE y las regiones transmembrana, así como también la región conectora entre el dominio Habc y el motivo SNARE de syntaxina1 (imagen modificada de Rizo and Südhof, 2012).

Previo a la fusión, las proteínas SNAREs de las dos membranas destinadas a unirse se ensamblan desde el extremo amino hacia carboxilo terminal. Al ensamblarse los complejos *trans* se produce la liberación de una gran cantidad de energía y las membranas son forzadas a aproximarse y eventualmente fusionarse. Como consecuencia, la membrana de la vesícula se incorpora a la membrana plasmática y el contenido se libera al exterior (Wiederhold and Fasshauer, 2009). Luego de la fusión, los complejos SNAREs quedan en configuración *cis* (las tres proteínas en la misma membrana), los cuales pueden ser desensamblados para que la maquinaria se recicle. El desensamble de los complejos *cis* SNAREs requiere la acción concertada de α -SNAP, la ATPasa NSF y la energía de la hidrólisis del ATP (Zhao et al., 2007). En la actualidad se ha postulado que la formación de complejos *trans* SNAREs en células no es espontánea, sino que es regulada principalmente por cuatro grupos de proteínas: Munc13 y Munc18, complexina y sinaptotagmina (Jahn and Fasshauer, 2012; Südhof, 2013).

2.2.2. Proteínas Rabs

Las proteínas Rabs monoméricas son miembros de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. En humanos existen más de 60 miembros de la familia Rab que están localizados en

distintas membranas intracelulares (Pereira-Leal and Seabra, 2001; Schwartz et al., 2007; Zerial and McBride, 2001). Estas GTPasas se asocian reversiblemente a membranas mediante grupos hidrofóbicos geranilgeranilo, lo cual cumple un rol fundamental en la regulación del tráfico de membranas. A través de interacciones con componentes de cubierta, proteínas motoras y SNAREs y factores de *tethering*, las Rabs sirven como organizadores multifacéticos de la mayoría de los procesos de tráfico de membranas en células eucariotas (Stenmark, 2009).

Las Rabs controlan una multitud de procesos celulares vitales incluyendo la endocitosis y exocitosis de proteínas, la señalización intracelular, la diferenciación y el desarrollo. Estas funciones generales son conseguidas mediante la regulación de la dinámica de vesículas, desde su formación hasta su fusión con la membrana diana. Las proteínas Rabs controlan la biogénesis de las vesículas desde el compartimento donador mediante la formación de complejos regulatorios que interactúan con proteínas de cubierta (Angers and Merz, 2011). Además, determinan la especificidad de la vesícula transportadora dirigiéndola al compartimento aceptor mediante la interacción directa o indirecta con proteínas motoras (Hammer and Wu, 2002; Jordens et al., 2001; Kuroda and Fukuda, 2005). Finalmente, las GTPasas Rabs también participan en los eventos de *tethering* y *docking* y organizan microdominios competentes para la fusión en la membrana aceptor (Wickner and Schekman, 2008). Toda esta variedad de funciones indican que las proteínas Rabs son componentes claves necesarios para orquestar la organización intracelular del sistema de endomembranas.

Las proteínas Rabs actúan como interruptores moleculares que ciclan entre un estado inactivo citosólico, unido a GDP y un estado activo asociado a membranas, unido a GTP (Pfeffer, 2005; Pfeffer and Aivazian, 2004; Seabra and Wasmeier, 2004). El control de la actividad de este ciclo, que depende de un amplio espectro de proteínas relacionadas con la transducción de señales, es la clave para conferir la coordinación espacial y temporal de la respuesta celular (Figura 2).

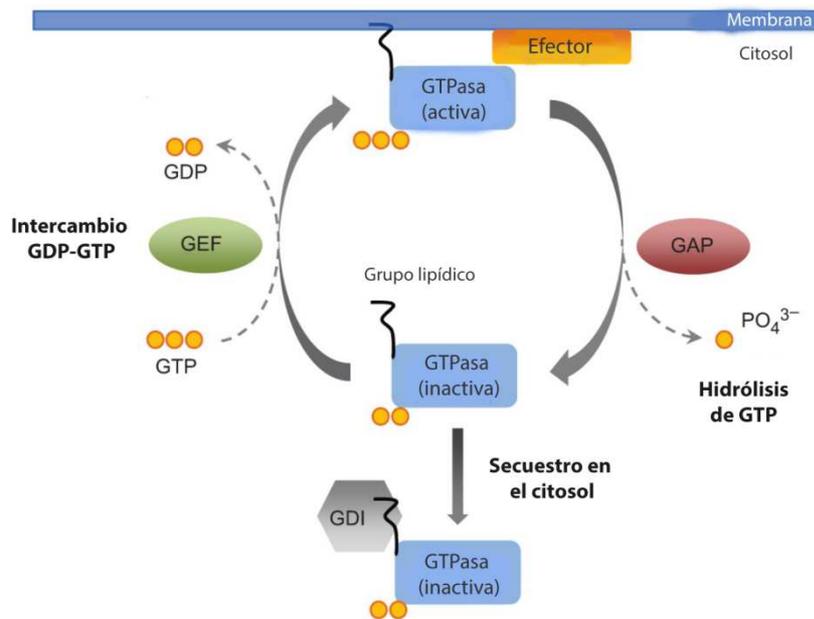


Figura 2. Ciclo de activación/inactivación de las proteínas Rabs. Las pequeñas GTPasas Rabs ciclan entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. Estas proteínas además poseen actividad GTPasa intrínseca que hidroliza el GTP a GDP y Pi. La activación cíclica, inactivación y translocación de las Rabs son reguladas por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que catalizan el intercambio de GDP por GTP; inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) que impiden el intercambio de GDP por GTP (manteniendo a las Rabs en estado inactivo en el citosol) y proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs) que incrementan el índice de hidrólisis de GTP por GDP. Las Rabs interactúan con múltiples efectores río abajo que modulan su actividad y/o localización. La mayoría de las GTPasas poseen modificaciones lipídicas que son necesarias para la unión de estas proteínas a membranas y reguladores y para la activación de diversos efectores (imagen modificada de Bento et al., 2013).

Rab3 y Rab27 constituyen las dos subfamilias principales de Rabs directamente implicadas en la exocitosis regulada. Estas Rabs se encuentran localizadas en vesículas y gránulos secretorios de una variedad de tipos celulares (Burgoyne and Morgan, 2003; Fukuda, 2008; Pavlos et al., 2010; Tolmachova et al., 2004). Ellas controlan el reclutamiento, *tethering* y/o *docking* de las vesículas secretorias a la membrana plasmática a través de la interacción con distintos efectores (Kasai et al., 2005; Tsuboi and Fukuda, 2005, 2006). Además, están involucradas en la formación y/o maduración de las vesículas secretoras (Fukuda, 2008).

3. Fecundación

La fertilización es un proceso altamente sincronizado en el cual dos células haploides especializadas denominadas gametas femenina y masculina -ovocito y espermatozoide- se unen para producir un embrión que eventualmente formará un individuo genéticamente distinto de sus progenitores. En una gran variedad de especies, la fertilización consiste en

múltiples pasos que involucran la maduración y desarrollo de las gametas en las gónadas, seguido de la migración del espermatozoide dentro del tracto reproductor femenino y que culminan con la interacción ovocito-espermatozoide y su fusión dentro del oviducto (Ikawa et al., 2010).

Los ovocitos son células inmóviles que poseen una cubierta protectora y gran cantidad de material de reserva requerido para el crecimiento y desarrollo del embrión. En humanos, los ovarios están dotados al nacer con un número fijo de ovocitos contenidos en los folículos primordiales. Estos ovocitos se encuentran arrestados en la primera división meiótica. Alcanzada la pubertad, un grupo de ovocitos entran en una fase de crecimiento, incrementando notablemente su tamaño. Durante esta fase, el ovocito forma una matriz extracelular denominada “zona pelúcida” (ZP) mediante la secreción constitutiva de glicoproteínas. La ZP de ovocitos humanos consiste en 4 glicoproteínas (ZP1 a ZP4), mientras que los ovocitos de ratón contienen 3 ZP (ZP1 a ZP3, Zp4 en ratón es un pseudogen). El crecimiento completo de esta gameta es sustentado por las células circundantes de la granulosa que proliferan y forman múltiples capas de células del cúmulo que rodean al ovocito. En respuesta a señales hormonales, uno o más ovocitos son ovulados y transportados a través de la fimbrias del oviducto mediante la interacción entre la matriz extracelular de las células del cúmulo y la células del oviducto. Una vez alcanzada la región de la *ampulla* del oviducto, aguardan la llegada de los espermatozoides para que se lleve a cabo la fertilización (Clift and Schuh, 2013; Gupta et al., 2012; Okabe, 2013; Talbot et al., 2003).

Los espermatozoides son células móviles capaces de trasladarse con rapidez y eficiencia. En mamíferos, se encuentran altamente diferenciados en el momento que abandonan los testículos; sin embargo, aún no poseen la habilidad de moverse progresivamente ni de interactuar o fertilizar al ovocito. Parte de estas características son adquiridas mediante el pasaje a lo largo del epidídimo donde sufren numerosas modificaciones bioquímicas y funcionales que permiten su maduración y activación de la motilidad (Busso et al., 2007; Frenette et al., 2010; Yanagimachi, 1994). Si bien los espermatozoides eyaculados han sufrido un proceso de maduración a lo largo de todo el tracto reproductor masculino, aún son incapaces de fecundar al ovocito. El proceso mediante el cual el espermatozoide se vuelve competente para fecundar al ovocito se denomina capacitación y transcurre en el tracto reproductor femenino. Durante este proceso ocurren varios cambios fisiológicos que lo preparan para la fecundación (ver más adelante).

Relativamente pocos espermatozoides son encontrados en el sitio de fertilización (~100–150) comparado con el número que son depositados en el tracto reproductor femenino (~ 10^7); esto indica, que un muy bajo porcentaje de espermatozoides eyaculados llegan a la posición del ovocito en el oviducto (~0.002%) (Wassarman et al., 1999). En las especies en las cuales los espermatozoides son depositados en el útero durante el coito, la unión útero-tubal es la principal barrera para el ascenso de los espermatozoides hacia la *ampulla*. Los numerosos pliegues de la mucosa y el estrecho lumen de la unión útero-tubal permiten la migración de una muy pequeña fracción de espermatozoides dentro del oviducto. En especies en las cuales el semen es depositado en la vagina durante el coito, los espermatozoides deben sortear previamente la mucosa altamente plegada del cérvix antes de entrar al útero. Esta mucosa está recubierta por un *mucus* secretado por el epitelio. Los espermatozoides que ingresan al cérvix intentan atravesar la microestructura longitudinal de las glicoproteínas del *mucus* para acceder a la superficie del epitelio secretorio. Muchos quedan atrapados, pero otros consiguen nadar a lo largo de los pliegues longitudinales y surcos pocos profundos del epitelio y alcanzan el útero. Una vez en el útero, ascienden fundamentalmente gracias a la actividad contráctil de la pared uterina. Aquellos espermatozoides que pasan a través de la unión útero-tubal quedan retenidos en el segmento inferior del itsmo hasta el comienzo de la ovulación. Durante el almacenamiento en el itsmo, el epitelio crea un microambiente que retrasa la capacitación y estabiliza a los espermatozoides. Cuando la ovulación se aproxima, los espermatozoides abandonan el reservorio y se dirigen a la *ampulla*. Esta liberación depende de cambios asociados con la capacitación que permiten, mediante un movimiento hiperactivado y el batido asimétrico del flagelo, que el espermatozoide escape del epitelio. Tanto la motilidad del espermatozoide como los movimientos contráctiles del oviducto posibilitan la migración de los espermatozoides libres desde el itsmo a la *ampulla* (Figura 3) (Ikawa et al., 2010; Yanagimachi, 1994).

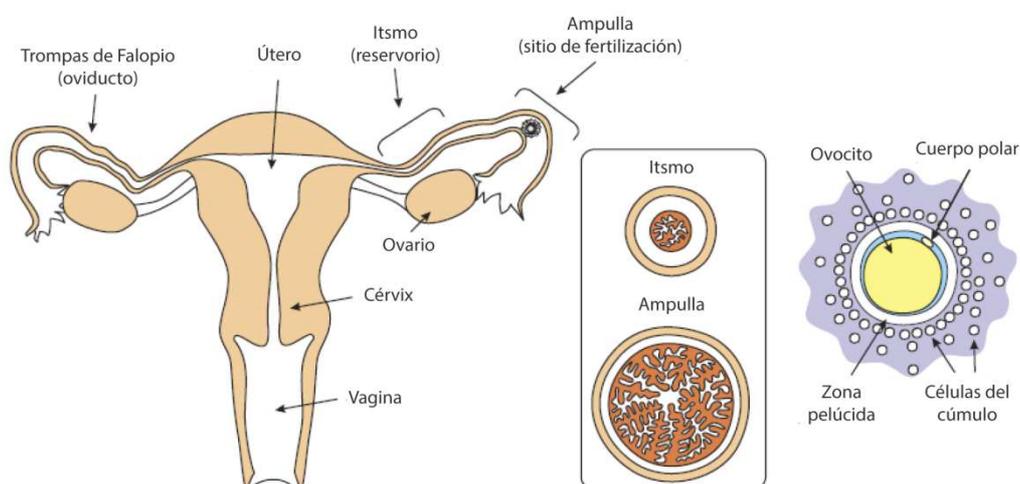


Figura 3. Diagrama del sistema reproductor femenino de mamíferos. Izquierda: se muestra la arquitectura y los componentes principales del tracto reproductor femenino. La vagina es el sitio de eyaculación y el punto de inicio del camino que el espermatozoide debe seguir para alcanzar al ovocito. El nado y las contracciones musculares permiten al espermatozoide atravesar el cérvix y el útero y alcanzar el istmo, localizado en las trompas de Falopio. En ausencia de ovocitos, los espermatozoides permanecen unidos al epitelio durante varios días, dependiendo de la especie. La *ampulla* es el segundo segmento de las trompas de Falopio y constituye el sitio donde se produce la fecundación. Durante la ovulación, el ovocito migra a la *ampulla* y el espermatozoide se separa del epitelio oviductal para alcanzar al ovocito. Centro: secciones transversales de regiones del istmo y la *ampulla* mostrando las grandes invaginaciones del epitelio en estos segmentos. Derecha: diagrama del ovocito rodeado por la zona pelúcida y las células del cúmulo (imagen modificada de Darszon et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, de la enorme cantidad de espermatozoides eyaculados durante el coito, solamente unos pocos alcanzan la *ampulla* del oviducto donde se encuentran con el ovocito. La chance de que las gametas se encuentren en el oviducto es promovida por un gradiente químico de estímulo denominado "quimiotaxis". La quimiotaxis se define como la reorientación de la motilidad del espermatozoide en respuesta a un gradiente químico de moléculas secretadas tanto por el ovocito como por las células del cúmulo (Eisenbach and Giojalas, 2006; Kaupp et al., 2008). Durante este proceso, el ovocito o los componentes de su cubierta secretan una sustancia quimioatrayente que a medida que difunde genera un gradiente de concentración (mayor cerca del ovocito y se va volviendo gradualmente menor a medida que aumenta la distancia desde el mismo). Los espermatozoides pueden sentir este quimioatrayente y orientar su dirección de nado dentro del gradiente de concentración hacia el ovocito. Una de las sustancias quimioatrayentes más estudiada es la progesterona. Esta hormona es secretada por las células del cúmulo en el tracto reproductor femenino y está presente en concentraciones micromolares en la vecindad del ovocito (Correia et al., 2007). La distribución radial de las células del cúmulo ayuda a formar un gradiente de concentración de progesterona desde el centro a la periferia (Teves et al., 2006). Ha sido comprobado que un gradiente de concentraciones muy bajas de progesterona (picomolar) es suficiente para atraer espermatozoides humanos capacitados (Gatica et al., 2013; Teves et al., 2006, 2009). Este gradiente de progesterona genera un incremento continuo en la concentración de calcio dentro de los espermatozoides y, como consecuencia, se produce una alteración de su batido flagelar y el redireccionamiento hacia el sitio del quimioatrayente (Eisenbach and Giojalas, 2006; Kaupp et al., 2008; Publicover et al., 2008). Una característica distintiva de la quimiotaxis en humanos es que está restringida solamente a espermatozoides capacitados (Cohen-Dayag et al., 1995; Eisenbach, 1999a).

Para que la fertilización sea exitosa, el espermatozoide debe atravesar todas las capas que rodean al ovocito. Un ovocito típico de mamíferos está circundado por una capa externa

de alrededor de 3000 células del cúmulo embebidas en una matriz extracelular rica en ácido hialurónico. Los espermatozoides, atraviesan esta capa de células y alcanzan la zona pelúcida del ovocito gracias a su motilidad hiperactivada y la acción de la enzima hialuronidasa que permite degradar la matriz rica en ácido hialurónico y penetrar a través de las células del cúmulo (Lin et al., 1994; Primakoff and Myles, 2002). Posteriormente, el espermatozoide penetra la ZP y alcanza el espacio perivitelino ubicado entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito (oolema). Finalmente, la membrana del espermatozoide se fusiona con el oolema facilitando la entrada del pronúcleo masculino dentro de citoplasma del ovocito (Figura 4). La fusión de la membrana del espermatozoide con el oolema desencadena la exocitosis de los gránulos corticales del ovocito, proceso conocido como “reacción cortical”. Como consecuencia, la ZP pierde su habilidad de unir nuevos espermatozoides, lo que previene subsecuentes penetraciones, impidiendo de esta forma la polispermia. La entrada del pronúcleo masculino al citoplasma del ovocito dispara una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que conducen a la división/diferenciación celular y conllevan a la formación de un nuevo individuo (Clift and Schuh, 2013; Gadella, 2013; Gupta et al., 2012; Klinovska et al., 2014; Primakoff and Myles, 2002; Wassarman et al., 1999).

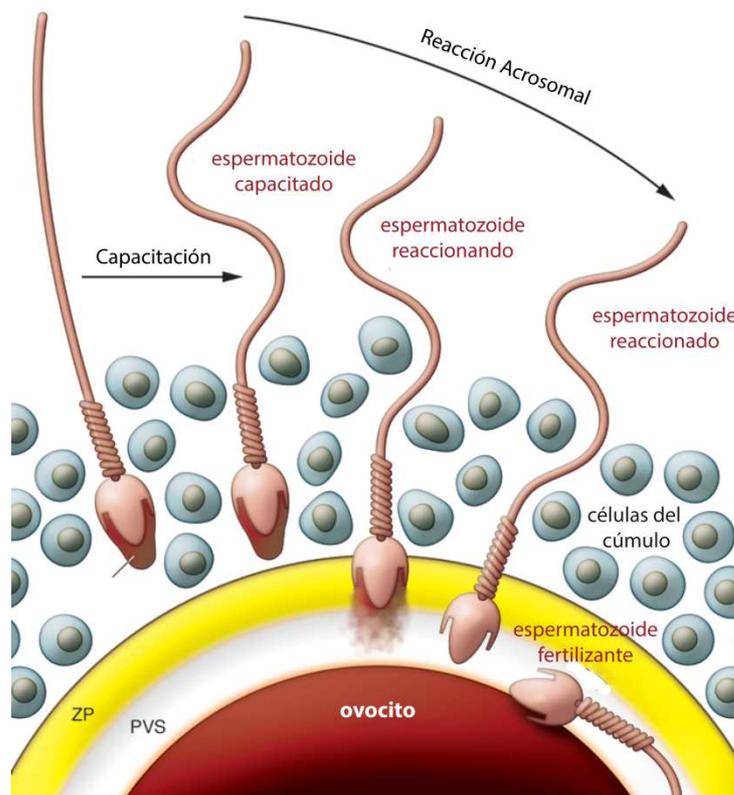


Figura 4. Diagrama del proceso de fertilización de mamíferos. Para que la fertilización de mamíferos sea exitosa el espermatozoide debe atravesar la cobertura del ovocito en la *ampulla* del oviducto y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Durante este proceso, el espermatozoide atraviesa

la masa de células del cúmulo que rodean al ovocito, se une temporalmente a la ZP y luego penetra a través de ella para alcanzar el espacio perivitelino. En algún punto durante la penetración del espermatozoide a través de la cobertura del ovocito, ocurre la exocitosis del contenido acrosomal. Finalmente, la membrana acrosomal interna del espermatozoide se fusiona con el oolema y se produce la entrada del pronúcleo masculino dentro de citoplasma del ovocito (imagen modificada de Ikawa et al., 2010).

Los espermatozoides que se aproximan al ovocito en el tracto reproductor femenino tienen su acrosoma intacto. Previo a la fusión con el oolema, la membrana acrosomal externa del espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática resultando en la exocitosis del contenido acrosomal, proceso conocido como reacción acrosomal (RA). En el espacio perivitelino del ovocito sólo son encontrados espermatozoides con acrosomas reaccionados y únicamente este tipo de espermatozoides son los que se fusionan con el ovocito. Por lo tanto, en algún punto durante la penetración a través de las capas del ovocito ocurre la exocitosis del acrosoma (Avella and Dean, 2011). Hasta hace poco, el modelo prevalente era que los espermatozoides con su acrosoma intacto atravesaban el *cumulus oophorus* y la exocitosis se disparaba al unirse a la ZP. Este modelo es respaldado por observaciones realizadas mediante microscopía electrónica (ME) que muestran que en la superficie de la zona pelúcida sólo se encuentran espermatozoides con acrosomas intactos y que todos los espermatozoides observados en el espacio perivitelino tienen sus acrosomas reaccionados (Saling et al., 1979); como así también por trabajos que reportan que distintos componentes de la ZP son capaces de inducir la RA (Bleil and Wassarman, 1983; Gupta et al., 2012). Sin embargo, una investigación reciente demostró, mediante imágenes *in vivo* de espermatozoides murinos con acrosomas marcados fluorescentemente, que los espermatozoides fertilizantes ya han perdido su acrosoma cuando se encuentran con la ZP (Jin et al., 2011). Estos datos son consistentes con el trabajo publicado por Inoue y colaboradores que reporta que los espermatozoides sin acrosoma pueden penetrar la zona pelúcida y fertilizar al ovocito (Inoue et al., 2011). En forma conjunta, todos estos resultados sugieren que la RA podría ser inducida de manera diferente dependiendo de las condiciones encontradas por el espermatozoide fertilizante (Figura 5). Los espermatozoides que alcanzan al ovocito relativamente temprano luego de la ovulación pasarían a través de la masa del *cumulus oophorus*, lo cual podría inducir la exocitosis del acrosoma. Aquellos espermatozoides que llegan más tarde podrían encontrar una masa de *cumulus* más dispersada y por lo tanto requerir de la interacción con la ZP para sufrir la RA (Avella and Dean, 2011). Sin embargo, hasta el momento, tanto el sitio donde se induce la RA como su mecanismo disparador continúan siendo una incógnita.

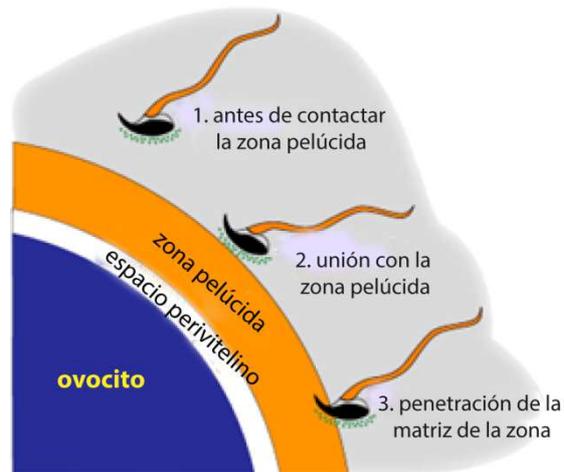


Figura 5. Posibles sitios donde ocurriría la RA durante la fecundación. El espermatozoide capacitado que va a fertilizar al ovocito viaja a través del tracto reproductor femenino y debe sufrir RA antes de llegar al espacio perivitelino. Se ha propuesto que el sitio en el cual ocurre la RA podría ser: (1) mientras el espermatozoide pasa a través del *cumulus ooforus* (fondo gris), (2) al unirse a la superficie de la ZP o (3) durante el pasaje a través de la matriz de glicoproteínas que forman la ZP (imagen modificada de Avella and Dean, 2011).

4. El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis que procede a través de sucesivas divisiones/fases mitóticas, meióticas y posmeióticas dentro de los tubos seminíferos del testículo. Estos eventos resultan en una célula altamente diferenciada en estructura y función y potencialmente capaz de combinarse con el ovocito para formar un nuevo individuo. Los dos componentes principales de esta célula son la cabeza y el flagelo, los cuales se encuentran unidos a través de la pieza conectora o cuello (Figura 6). Tanto el flagelo como la cabeza, están firmemente contenidos por la membrana plasmática y contienen una escasa cantidad de citoplasma.

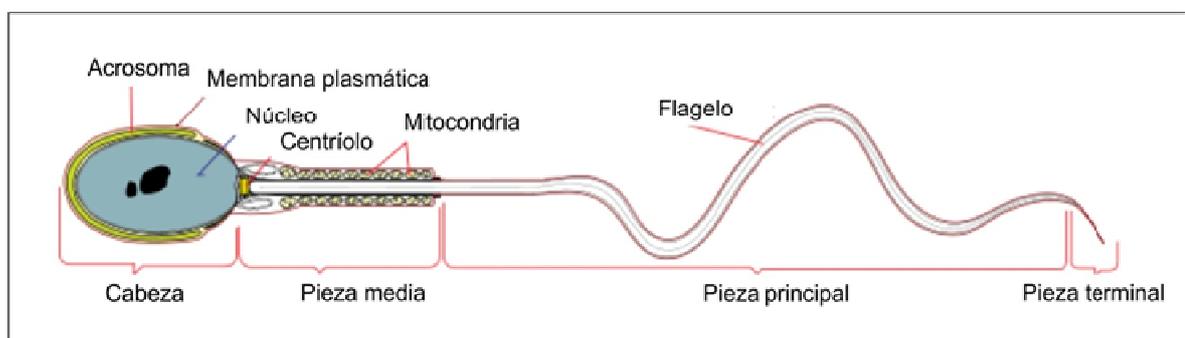


Figura 6. Esquema de las principales estructuras del espermatozoide. Cabeza: acrosoma, núcleo y membrana plasmática. Flagelo o cola: se representan la pieza media, pieza principal y pieza terminal (Imagen tomada de internet <http://es.wikipedia.org/wiki/Acrosoma>).

La cabeza del espermatozoide de mamíferos contiene el núcleo, el acrosoma, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo está compuesto por cromatina altamente condensada gracias a la acción de protaminas nucleares. El acrosoma es un gránulo secretorio propio del espermatozoide que se origina en el complejo de Golgi. Esta organela consiste en una vesícula rodeada por membrana situada como un capuchón por encima del núcleo en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide. Aunque el acrosoma se encuentra rodeado por una membrana continua, es posible distinguir dos zonas: la membrana acrosomal interna, cercana al núcleo y la membrana acrosomal externa, ubicada por debajo de la membrana plasmática (Figura 7A) (Yanagimachi, 1994). Estructuralmente, el acrosoma consiste en dos segmentos: el capuchón acrosomal, repleto de enzimas hidrolíticas y el segmento ecuatorial, que carece de enzimas (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Tomes, 2007b; Yanagimachi, 1994). El acrosoma almacena en su interior una gran cantidad de enzimas hidrolíticas (hialuronidasa, acrosina/proacrosina, catepsina D y H, β -N-acetilglucosaminidasa, etc.) (Moreno and Alvarado, 2006) y también funciona como un reservorio de calcio (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005; O'Toole et al., 1996).

El flagelo del espermatozoide de mamíferos tiene cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora adyacente a la cabeza, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza media está constituida por una hélice de mitocondrias firmemente empaquetadas que rodean las estructuras del citoesqueleto del flagelo. Las principales estructuras del citoesqueleto son el axonema, las fibras densas externas y la vaina fibrosa. El axonema contiene un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes externos y está localizado en el centro del flagelo, a lo largo de toda su extensión (Figura 7C). Esta estructura se encuentra rodeada, en la pieza media y en la pieza principal, por las fibras densas externas. La mayor longitud del flagelo está constituida por la pieza principal, definida por la presencia de la vaina fibrosa, la cual se encuentra por debajo de la membrana plasmática y rodea a las fibras densas externas (Figura 7B). Los componentes del citoesqueleto son responsables de generar el movimiento flagelar y modular su forma. La interacción del ATP con ATPasas en los brazos de dineína del doblete de microtúbulos promueve su deslizamiento y causa que el flagelo se curve. Las fibras densas externas y la vaina fibrosa parecen imponer restricciones a la curvatura del flagelo y al deslizamiento del doblete de microtúbulos (Eddy et al., 2003).

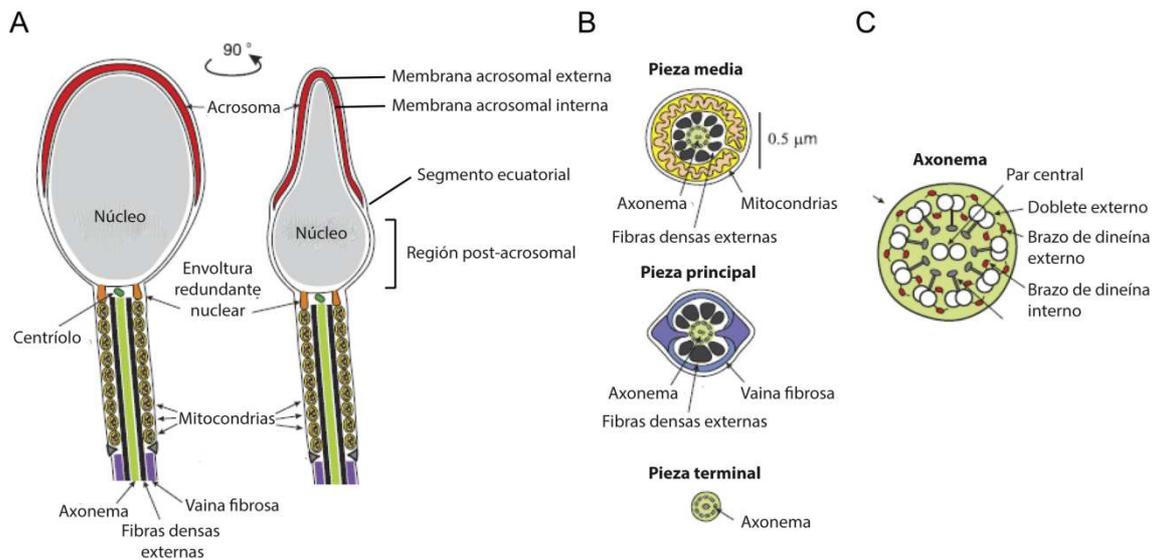


Figura 7. Estructuras del espermatozoide. (A) Secciones transversales de la cabeza y pieza media del espermatozoide humano desde dos ángulos diferentes (rotación de 90°). El núcleo ocupa el mayor espacio de la cabeza y está cubierto por el acrosoma. El acrosoma está rodeado por la membrana acrosomal interna que se ubica por encima de la membrana nuclear y por la membrana acrosomal externa, dispuesta por debajo de la membrana plasmática. El centríolo y la envoltura nuclear redundante están localizados en la base de la cabeza. (B) Sección transversal aumentada del flagelo del espermatozoide. El axonema se dispone a lo largo de todo el flagelo y está rodeado por las fibras densas externas en la pieza media y en la pieza principal. Las fibras densas externas están rodeadas por mitocondrias en la pieza media y por la vaina fibrosa en la pieza principal. La pieza terminal contiene sólo el axonema. (C) Sección aumentada del flagelo que muestra la estructura clásica de 9+2 dobletes de microtúbulos, en los cuales nueve dobletes rodean al par central (imagen modificada de Darszon et al., 2011).

Si bien la mayoría de los espermatozoides de mamíferos tienen estas características generales, hay diferencias sustanciales especie-específicas en el tamaño y forma de la cabeza y en la longitud y la cantidad relativa de los distintos componentes del flagelo. Las características estructurales especializadas reflejan las funciones únicas de este tipo celular. El acrosoma contiene enzimas esenciales que permiten el desarrollo de la RA (Meizel, 1984; Meizel and Lui, 1976), la unión secundaria de la cabeza con la zona pelúcida (Jones, 1991; Töpfer-Petersen and Henschen, 1988) e incluso la fusión del espermatozoide con el oolema (Takano et al., 1993); mientras que el flagelo contiene la fuente de energía y la maquinaria para generar la motilidad necesaria para alcanzar al ovocito dentro del tracto reproductor femenino y penetrar su cubierta hasta llegar al oolema. Estas funciones son esenciales para la distribución del material genético contenido en el núcleo del espermatozoide hacia el citoplasma del ovocito donde se combinan los pronúcleos masculino y femenino para dar lugar al cigoto.

5. Procesos fisiológicos del espermatozoide

5.1. Capacitación

La capacitación es definida como los cambios fisiológicos que ocurren en el tracto reproductor femenino y que vuelven al espermatozoide capaz de fertilizar al ovocito. Estos cambios involucran una serie de procesos, algunos de los cuales suceden tan pronto cuando el espermatozoide es eyaculado, mientras que otros ocurren durante un periodo mayor de tiempo en el tracto femenino (Visconti, 2009). La capacitación está asociada con cambios en la fisiología celular y bioquímica del espermatozoide que incluyen: alteraciones en el metabolismo, modificaciones de las características fisiológicas de la membrana, cambios en el estado de fosforilación de proteínas, elevaciones del pH intracelular y los niveles de calcio y la hiperpolarización de la membrana plasmática. Esta extensiva reprogramación fisiológica confiere al espermatozoide la capacidad de penetrar las cubiertas del ovocito (gracias a las alteraciones en la motilidad flagelar) y la habilidad de interactuar con el mismo (debido a modificaciones que ocurren principalmente en la región de la cabeza) (Ducibella and Florman, 2005; Tomes, 2007b).

Estos eventos maduracionales pueden ser reproducidos *in vitro* en medios de composición definida que se aproxima al ambiente del tracto reproductor femenino. Iones como bicarbonato y calcio y proteínas aceptoras de colesterol como albúmina son componentes fundamentales del medio que juegan un importante rol regulatorio durante el proceso de capacitación (Visconti, 2009)

5.2. Motilidad hiperactivada

En la mayoría de las especies, los espermatozoides permanecen inmóviles dentro del epidídimo hasta que son liberados y comienzan a nadar rápidamente. Durante este nado, generan batidos flagelares casi simétricos, describiendo trayectorias lineales. Cuando el espermatozoide ingresa al tracto reproductor femenino, sufre un cambio en sus movimientos conocido como “motilidad hiperactivada”. Durante este proceso, la amplitud de la curvatura flagelar aumenta, lo que produce un patrón de batido altamente asimétrico que le permite modificar el curso de su trayectoria (Figura 8A). Gracias a este movimiento, el espermatozoide consigue desprenderse de las paredes del oviducto, moverse a través del lumen, atravesar las sustancias mucosas y, finalmente, penetrar la ZP del ovocito (Figura 8 B y C) (Suarez, 2008; Suarez and Ho, 2003). Desde el punto de vista molecular, cuando el espermatozoide entra en contacto con las altas concentraciones de calcio y bicarbonato presentes en el tracto

reproductor femenino, se estimula la actividad catalítica de la adenilato ciclasa soluble (ACs) y se genera un incremento en los niveles de AMPc intracelulares. Como consecuencia, se produce la activación de la proteína quinasa A (PKA) quien fosforila varias proteínas involucradas en las vías de señalización que participan en la motilidad hiperactivada (Visconti, 2009).

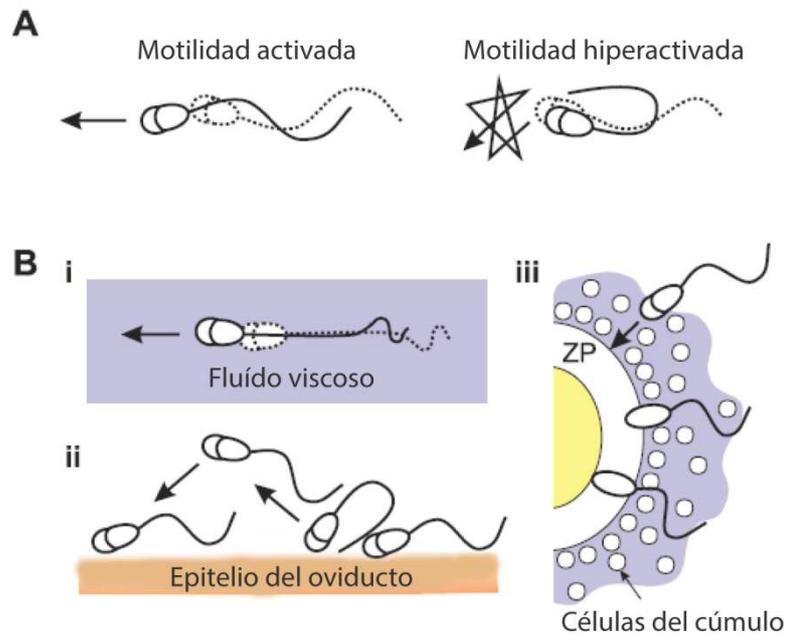


Figura 8. Propiedades fisiológicas de la hiperactivación. (A) Curvatura flagelar de un espermatozoide activado (izquierda) e hiperactivado (derecha) y la dirección de la motilidad (flechas) exhibida en un medio viscoso. El espermatozoide activado avanza mostrando una curvatura flagelar simétrica, mientras que el espermatozoide hiperactivado gira y no avanza eficientemente debido al patrón asimétrico del batido flagelar. (B) Importancia de la motilidad hiperactivada: i) permite el avance de los espermatozoides en el fluido altamente viscoso del tracto genital femenino, ii) posibilita la separación del espermatozoide del reservorio del *isthmus* y el avance hacia la *ampulla* y iii) facilita la penetración del espermatozoide a través de la matriz del cúmulo y la zona pelúcida (imagen modificada de Darszon et al., 2011).

5.3. Reacción acrosomal

La RA es una exocitosis regulada mediante la cual el contenido del gránulo acrosomal es secretado con el fin de liberar las enzimas hidrolíticas necesarias para la fertilización. Este proceso, si bien comparte características comunes con otras exocitosis reguladas, se diferencia por ser un evento del todo o nada que ocurre una única vez en la vida del espermatozoide. Otro aspecto propio de esta secreción es que las membranas plasmática y acrosomal externa se fusionan en múltiples puntos, la membrana acrosomal no se incorpora a la membrana celular y una vez que el contenido es liberado, no ocurre reciclaje de membranas (Tomes, 2007b). Morfológicamente, la RA en mamíferos procede a través de una serie de pasos que

comienzan con el hinchamiento del contenido acrosomal lo que permite la aposición en múltiples puntos de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en la región anterior de la cabeza del espermatozoide (Figura 9B). Posteriormente, se produce la fusión de ambas membranas en los múltiples puntos de aposición, lo que lleva a la formación de poros a lo largo de todo el acrosoma. La apertura de los poros provoca la fenestración de las membranas que se van a fusionar y la formación de vesículas híbridas compuestas por porciones de membrana acrosomal externa y de membrana plasmática (Figura 9C) (Barros et al., 1967; Zanetti and Mayorga, 2009). Finalmente, el contenido acrosomal es liberado y queda expuesta la membrana acrosomal interna en la porción anterior de la cabeza (Figura 9D) (Tomes, 2007b). Las consecuencias celulares de la RA incluyen la externalización del contenido de la vesícula acrosomal, la exposición de un nuevo dominio de la superficie celular en la región apical del espermatozoide y la adquisición de la capacidad fusogénica de la membrana plasmática de la región ecuatorial de la célula. Estos eventos resultan fundamentales para la fusión con la membrana del ovocito (Ducibella and Florman, 2005).

La RA puede ser estimulada *in vitro* en espermatozoides capacitados por diferentes tipos de inductores. Las glicoproteínas ZP_3 y ZP_4 que componen la ZP pueden disparar la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos, aunque por vías aparentemente diferentes (Gupta et al., 2012). Otro inductor de la RA ampliamente caracterizado es la progesterona, un esteroide secretado por las células del *cumulus oophorus* que se encuentra también presente en altas concentraciones en el fluido de folículos preovulatorios (Witte and Schäfer-Somi, 2007). Además, existe una gran variedad de inductores de la RA cuyos mecanismos de acción varían de acuerdo a las vías de señalización afectadas, entre los que se encuentran: ionóforos de calcio, análogos de AMPc y lípidos como el ácido lisofosfatídico, esfingosina-1-fosfato y diacilglicerol (DAG) (Branham et al., 2006; Lopez et al., 2007; Suhaiman et al., 2010; Yanagimachi, 1994).

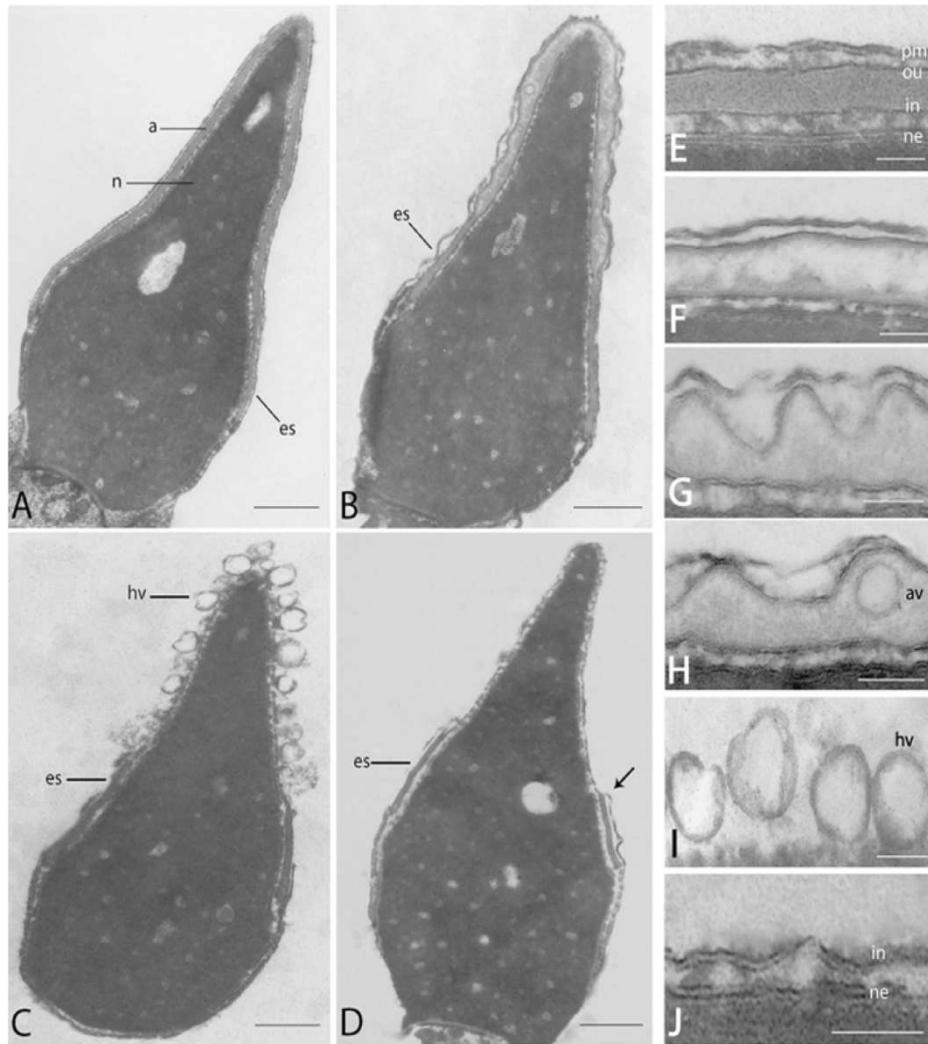


Figura 9. Cambios morfológicos durante la RA de espermatozoides humanos. (A-D) Micrografías electrónicas que ilustran las diferentes etapas de la RA (a, acrosoma; es, segmento ecuatorial; n, núcleo; hv, vesículas híbridas). (A) Espermatozoide intacto (sin reaccionar), (B) espermatozoide con el acrosoma hinchado, (C) espermatozoide con el acrosoma vesiculizado y (D) espermatozoide reaccionado. (E-J) Las imágenes muestran detalles con mayor aumento y definición de los cambios que suceden en la cabeza durante la RA. (E) Imagen característica de espermatozoides no reaccionados donde se observa el acrosoma electrón denso. (F) Acrosoma hinchado con ondulación de la membrana acrosomal externa. (G) Acrosoma hinchado con deformación de la membrana acrosomal externa. (H) Acrosoma hinchado con deformación de la membrana acrosomal externa y vesícula interna (av). (I) Acrosoma vesiculizado con muchas vesículas híbridas (hv). (J) Espermatozoide reaccionado donde sólo se observa la membrana acrosomal interna (in) y la membrana nuclear (ne). Barras = 500 nm (A–D) y 100 nm (E–J) (Zanetti and Mayorga, 2009).

6. La RA como modelo de exocitosis

6.1. Estudio mediante permeabilización de la membrana plasmática

Al igual que otros procesos de secreción regulada, la exocitosis acrosomal requiere una maquinaria molecular conservada. Nuestro laboratorio se enfoca en el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la RA, como así también los cambios morfológicos que suceden durante el proceso. Nuestro modelo de estudio posee ciertas ventajas respecto a otros modelos de exocitosis ya que el espermatozoide tiene una única y gran vesícula exocítica de fácil visualización que es completamente secretada en respuesta a un estímulo. Estas dos propiedades permiten determinar fácilmente si hubo o no exocitosis evaluando la presencia o ausencia del acrosoma en respuesta a distintos tratamientos. Sin embargo, la ausencia de transcripción y traducción por parte de los espermatozoides restringe los abordajes disponibles para el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la exocitosis acrosomal (Tomes, 2007b). Para superar esta limitación, nuestro laboratorio ha adaptado a espermatozoides humanos un método ampliamente utilizado en células somáticas que consiste en la permeabilización controlada de la membrana plasmática con estreptolisina O (SLO) (Yunes et al., 2000). Este método permite introducir en las células iones, proteínas recombinantes, anticuerpos y otros reactivos impermeables a membranas para determinar la función y caracterizar la etapa modulada por una molécula blanco endógena. El sistema es fácilmente manipulable, refleja la organización *in vivo* de la célula y posibilita la medición de una RA morfológicamente indistinguible de aquella en espermatozoides sin permeabilizar. La técnica de permeabilización con SLO ha sido adoptada por otros laboratorios para estudiar la RA (Ackermann et al., 2007; Hu et al., 2010; Hutt et al., 2005) y motilidad (Johnson et al., 1999).

6.2. Estudio mediante la translocación de proteínas recombinantes permeables

Los péptidos permeables que atraviesan la membrana plasmática (CPPs, del inglés *cell-penetrating peptides*) son poderosos vectores de transporte para la distribución intracelular de una variedad de moléculas tales como nanopartículas, péptidos, proteínas, RNA de interferencia, DNA de doble cadena y liposomas (Bechara and Sagan, 2013). Estos agentes tienen la propiedad de transportar macromoléculas a través de la membrana plasmática de la célula mediante diferentes mecanismos. Los CPPs más conocidos no son específicos del tipo celular ni tejido, contienen secuencias de aminoácidos cargados positivamente al pH fisiológico (principalmente arginina y lisina) y tienen la capacidad de establecer interacciones electrostáticas con las glicoproteínas de superficie cargadas negativamente previo a su internalización. El grupo guanidina de la arginina forma puentes hidrógeno con los fosfatos y sulfatos cargados negativamente de la superficie de la membrana que pueden llevar a la internalización celular bajo condiciones fisiológicas de pH. El número y orden de los

aminoácidos en la secuencia del péptido, mayormente argininas, es crítico para determinar las propiedades de transducción de los CPPs. Si bien el mecanismo de acumulación de los CPPs en el citoplasma no está completamente entendido, está claro que existen dos tipos de ingreso a las células. Además de las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno que son responsables de la transducción directa de pequeñas moléculas a través de la bicapa lipídica, varios CPPs entran a la célula usando diferentes mecanismos de endocitosis que son responsables de la distribución intracelular de grandes moléculas y nanopartículas y la subsecuente liberación desde endosomas dentro del citoplasma. La variedad de vías de ingreso se correlaciona con la alta variabilidad de las propiedades físicas y químicas de las secuencias peptídicas de transducción, su concentración, las características biofísicas de la molécula a transportar y la composición de la membrana plasmática del tipo celular (Koren and Torchilin, 2012).

Como los espermatozoides no presentan mecanismos de endocitosis, se postula que la incorporación de estos péptidos podría darse a través de un mecanismo de translocación directa. Han sido descritos varios modelos de translocación directa que involucran la desestabilización de la membrana plasmática de una manera independiente de energía y temperatura (Bechara and Sagan, 2013). La incorporación de dominios proteicos de transducción típicos, tales como el péptido TAT del HIV, transportan 10 y otros péptidos biotinilados ha sido monitoreada en espermatozoides bovinos (Jones et al., 2013). Mediante el uso de péptidos ricos en argininas nuestro laboratorio diseñó versiones permeables de Rab3A (Lopez et al., 2007) y Rab27 (datos no publicados) que permiten el estudio del rol de estas proteínas en la RA de espermatozoides humanos vivos y móviles.

7. Rol del calcio durante la RA

Las vías de transducción de señales moduladas por calcio son las más estudiadas y mejor caracterizadas en espermatozoides (De Blas et al., 2002; Darszon et al., 2006a; O'Toole et al., 1996, 2000). En espermatozoides la señalización de calcio regula procesos clave como capacitación (Visconti et al., 2011), motilidad e hiperactivación (Carlson et al., 2003; Publicover et al., 2008; Suarez, 2008; Suarez and Ho, 2003), quimiotaxis (Eisenbach, 1999b; Publicover et al., 2008) y la RA (Branham et al., 2006; González-Martínez et al., 2001; Kirkman-Brown et al., 2002). Se han descrito varias estructuras del espermatozoide que funcionan como reservorios de calcio, entre ellas se encuentran el acrosoma, las mitocondrias, la envoltura nuclear redundante y las estructuras vesiculares del cuello que contienen calreticulina (Costello et al., 2009; Darszon et al., 2006b). Además, existe una gran diversidad de canales de calcio que

participan en la regulación de la señalización (Darszon et al., 2006a). Se ha reportado que la hiperactivación está asociada a oscilaciones de calcio independientes de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), mientras que durante la RA se producen movilizaciones de calcio desde el acrosoma a través de canales de calcio regulados por IP_3 ubicados en la membrana acrosomal externa (Jimenez-Gonzalez et al., 2006).

El modelo actual propuesto para la regulación de la RA por calcio es que la unión de los espermatozoides a ZP_3 induce una respuesta bifásica de calcio que implica la participación secuencial de al menos tres tipos de canales. La farmacología y la cinética indican que la primera entrada de calcio es rápida y transitoria y se produce a través de canales Ca_v tipo-T. Esta familia de canales posee tres miembros, todos ellos han sido detectados mediante inmunolocalización en espermatozoides de mamíferos. $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ se localizan en la región acrosomal, mientras que $Ca_v3.3$ ha sido descrito en flagelo (Treviño et al., 2004). Sin embargo, los ratones *knock-out* para las isoformas $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ son fértiles (Chen et al., 2003; Stamboulian et al., 2004), sugiriendo que podrían también estar participando otro tipo de canales permeables a calcio. La elevación inicial de calcio estimulada por ZP_3 es seguida de una elevación de calcio prolongada y lenta que puede durar varios minutos y es necesaria para que la RA ocurra (Arnoult et al., 1996a, 1996b; Florman et al., 1989). La elevación inicial transitoria de calcio activa a una fosfolipasa $C\delta$ (Fukami et al., 2001) que hidroliza PIP_2 y produce DAG e IP_3 . El hecho de que los ratones nulos para $PLC\delta$ son infértiles e incapaces de sufrir RA inducida por ZP_3 (Fukami et al., 2001) apoya este modelo. La unión de IP_3 a su receptor ubicado en el acrosoma libera calcio desde este compartimento (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005; O'Toole et al., 2000; Walensky and Snyder, 1995). Al vaciarse este reservorio intracelular, se produce la apertura canales de calcio SOCCs (del inglés *store operated calcium channels*) presentes en la membrana plasmática, lo cual produce un ingreso masivo de calcio que dispara la exocitosis acrosomal. Se cree que los canales que actúan como SOCCs pertenecen a la familia de los Trp (del inglés *transient receptor potencial*) y que son los responsables de la elevación lenta y prolongada de la concentración de calcio citoplasmática descrita anteriormente (Darszon et al., 2006a).

De acuerdo con este modelo, el rol del calcio intra-acrosomal es dirigir la apertura de los canales SOCCs en la membrana plasmática. La incubación de espermatozoides no permeabilizados con ionóforos de calcio o de espermatozoides permeabilizados con calcio permite la libre difusión de estos iones hacia el interior de la célula, lo que simula la situación fisiológica de su entrada a través de los canales SOCCs. Como consecuencia, estos tratamientos permiten el estudio de pasos relativamente tardíos de la cascada exocítica, que ocurren luego

del ingreso sostenido de calcio, ya que se eluden todos aquellos eventos que ocurren previos a la apertura de los SOCCs. Resultados previos en espermatozoides permeabilizados demostraron que la movilización de calcio intracelular no puede ser eliminada sin comprometer la exocitosis (De Blas et al., 2002). Estos datos indican que la RA requiere una liberación de calcio desde el acrosoma posterior a la apertura de los SOCCs. Esta fase que conduce a la exocitosis, utiliza canales sensibles a IP_3 (De Blas et al., 2002; Branham et al., 2009; Ruete et al., 2014) y se lleva a cabo una vez que la maquinaria bioquímica de fusión ha sido ensamblada. La función de esta salida de calcio altamente localizada sería la de activar a sinaptotagmina, proteína que forma parte de la maquinaria de fusión y que es requerida para conseguir el ensamblaje completo de las proteínas SNAREs que finalmente lleva a la fusión del acrosoma con la membrana plasmática (ver abajo).

8. Proteínas involucradas en la fusión de membranas durante la RA

8.1. SNAREs

Las proteínas SNAREs han sido descritas en espermatozoides de una amplia variedad de especies, incluidas el erizo de mar (Schulz et al., 1997), cerdo (Tsai et al., 2012), caballo (Gamboa and Ramalho-Santos, 2005), hámster (Katafuchi et al., 2000) , ratón (Hutt et al., 2005) y humano (Tomes et al., 2002). En espermatozoides humanos han sido identificados tres miembros de la familia de proteínas SNAREs que son requeridos durante la RA (sinaptobrevina2, syntaxina-1 y SNAP-25) mediante el uso de anticuerpos específicos y de toxinas que clivan selectivamente a estas proteínas (De Blas et al., 2005; Tomes et al., 2002) . A diferencia de lo que sucede en otras células donde R- y Q-SNAREs están insertas en las dos membranas que van a fusionarse, experimentos realizados con neurotoxinas sugieren que en espermatozoides en reposo las proteínas SNAREs se encuentran formando complejos *cis* heterotriméricos tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal externa. El inicio de la RA induce indirectamente el desensamble de estos complejos *cis* y, como consecuencia, las proteínas pasan por una configuración monomérica donde son sensibles al corte por neurotoxinas. Posteriormente, mediante la ayuda de múltiples factores, comienzan a ensamblarse en complejos *trans* entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Las SNAREs permanecen frenadas en complejos *trans* parcialmente ensamblados por acción de complexina hasta que la salida de calcio acrosomal activa a sinaptotagmina (Roggero et al., 2007). Finalmente, sinaptotagmina libera el bloqueo impuesto por complexina,

permitiendo el ensamblaje completo de las SNAREs en *trans* y consiguiendo la fusión de ambas membranas (De Blas et al., 2005).

8.2. NSF/ α -SNAP

NSF ha sido detectado en la región acrosomal de espermatozoides de múltiples especies (Gamboa and Ramalho-Santos, 2005; Michaut et al., 2000; Ramalho-Santos and Schatten, 2004). Asimismo, α -SNAP exhibe una localización similar en espermatozoides humanos (Tomes et al., 2005) y en espermátides de ratón (Ramalho-Santos et al., 2001). Antecedentes previos han reportado que α -SNAP y NSF son requeridos para la RA estimulada por calcio, Rab3A (Michaut et al., 2000; Tomes et al., 2005) y AMPc (Branham et al., 2006). Estas proteínas muestran un rol relativamente temprano, previo a la salida de calcio acrosomal. En espermatozoides en reposo, la actividad de NSF (ver 2.2.1) está reprimida por fosforilación en tirosina. Una vez que se inicia la exocitosis, PTP1B desfosforila a NSF y desreprime su actividad (Zarelli et al., 2009). Ayudado por α -SNAP, NSF desaparea los complejos *cis* SNAREs y deja a las SNAREs monoméricas disponibles para el subsecuente ensamblaje en *trans* y la fusión.

8.3. GTPasas monoméricas Rabs

8.3.1. Rab3

Rab3A ha sido descrita en la región acrosomal de espermatozoides humanos (Yunes et al., 2000), de rata (Iida et al., 1999) y ratón (Ward et al., 1999) y se ha reportado que estimula la RA de carnero (Garde and Roldan, 1996) y humanos (Yunes et al., 2000) e inhibe la de rata (Iida et al., 1999).

Existen numerosos trabajos que caracterizan el rol de Rab3A en la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos. Tanto los anticuerpos como un dominio específico para Rab3A-GTP que secuestran la proteína endógena, bloquean la RA estimulada por calcio (De Blas et al., 2005; Branham et al., 2009) o AMPc (Branham et al., 2006). Además, ha sido comprobado que el estímulo de espermatozoides con diversos inductores de la RA (calcio, el inóforo de calcio A23187, y el análogo de AMPc 8-(4-clorofeniltio)-2'-O-metil-AMPc (8-pCPT-2-O-Me-AMPc)) produce un incremento en los niveles de Rab3A-GTP (Branham et al., 2009; Bustos et al., 2014, 2012; Michaut et al., 2000; Ruete et al., 2014). Asimismo, se ha reportado que el anticuerpo anti-Rab3A previene el *docking* del acrosoma a la membrana plasmática (Bello et al., 2012) y la movilización de calcio acrosomal inducida por calcio externo (Ruete et al., 2014). Estos datos proponen a Rab3A endógena como un modulador positivo de la RA. Resultados recientes indican que Rab3 modula la exocitosis diferencialmente dependiendo de

su estado de activación, e indican que es necesario que se produzca la hidrólisis de GTP para conseguir la apertura de los poros y conducir a la liberación del contenido acrosomal (Bustos et al., 2014). Asimismo, ensayos realizados con Rab3A recombinante (prenilada y activada *in vitro*) demostraron que la proteína se comporta como un inductor de la RA tanto en espermatozoides humanos permeabilizados (Yunes et al., 2000) como sin permeabilizar (Lopez et al., 2007). Para estimular la RA, Rab3A requiere la participación de la misma maquinaria molecular utilizada por el calcio. Esta maquinaria incluye a la vía de Epac-Rap1-PLC (Branham et al., 2009) y también implica la participación de proteínas SNAREs (sinaptobrevina2, syntaxina1 y SNAP25) (De Blas et al., 2005), sinaptotagmina (Michaut et al., 2001), PTP1B (Zarelli et al., 2009), NSF/ α -SNAP (Michaut et al., 2000; Rodríguez et al., 2011; Ruete et al., 2014; Tomes et al., 2005) y complexina (Roggero et al., 2007). Asimismo, ha sido comprobado que Rab3A recombinante no requiere calcio extracelular, pero sí necesita la salida de calcio acrosomal a través de canales sensibles a IP_3 , para inducir la RA (De Blas et al., 2002; Lopez et al., 2007).

8.3.2. Rab27:

Rab27 está presente en espermatozoides humanos y es requerida para la exocitosis acrosomal inducida por calcio y 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Bustos et al., 2012). En respuesta al estímulo con calcio, los niveles de Rab27-GTP incrementan en la región acrosomal de las células. Asimismo, fue comprobado que la adición a los espermatozoides de Rab27 recombinante cargada con GTP- γ -S produce un incremento en el número de células con Rab3A-GTP. El mecanismo molecular de esta activación parece ser a través de una cascada Rab-GEF, dado que Rab27 recluta a un GEF de Rab3 presente en extractos de espermatozoides humanos (Bustos et al., 2012).

9. AMPC

Las células eucariotas responden por medio de la generación de segundos mensajeros a las múltiples señales extracelulares que reciben. Estos segundos mensajeros disparan una gran variedad de respuestas al orquestar una red de eventos de señalización intracelular. El AMPC (adenosin 3',5'-monofosfato cíclico) fue el primer segundo mensajero identificado (Rall and Sutherland, 1958) y juega roles fundamentales en múltiples respuestas celulares. En las células secretorias, incluyendo neuronas, células endocrinas, exocrinas y neuroendocrinas, el AMPC es una importante señal en la regulación de la secreción de hormonas, neurotransmisores y enzimas (Seino et al., 2009).

Los niveles intracelulares de AMPc son regulados por el balance entre las actividades de dos familias de enzimas: las adenilato ciclasas (AC) y las fosfodiesterasas (PDEs). Las diferentes isoformas de estas enzimas son codificadas por un gran número de genes que difieren en sus patrones de expresión y mecanismos de regulación, generando respuestas celulares tipo y estímulo-específicas (McKnight, 1991). Las AC, sintetizan AMPc a partir del ATP a través de una reacción de ciclación que remueve dos grupos fosfato y las PDEs lo degradan a 5'AMP (Figura 10). El balance entre AC y PDEs permite un control local y temporal estricto de las concentraciones de AMPc en la célula (Taskén and Aandahl, 2004).

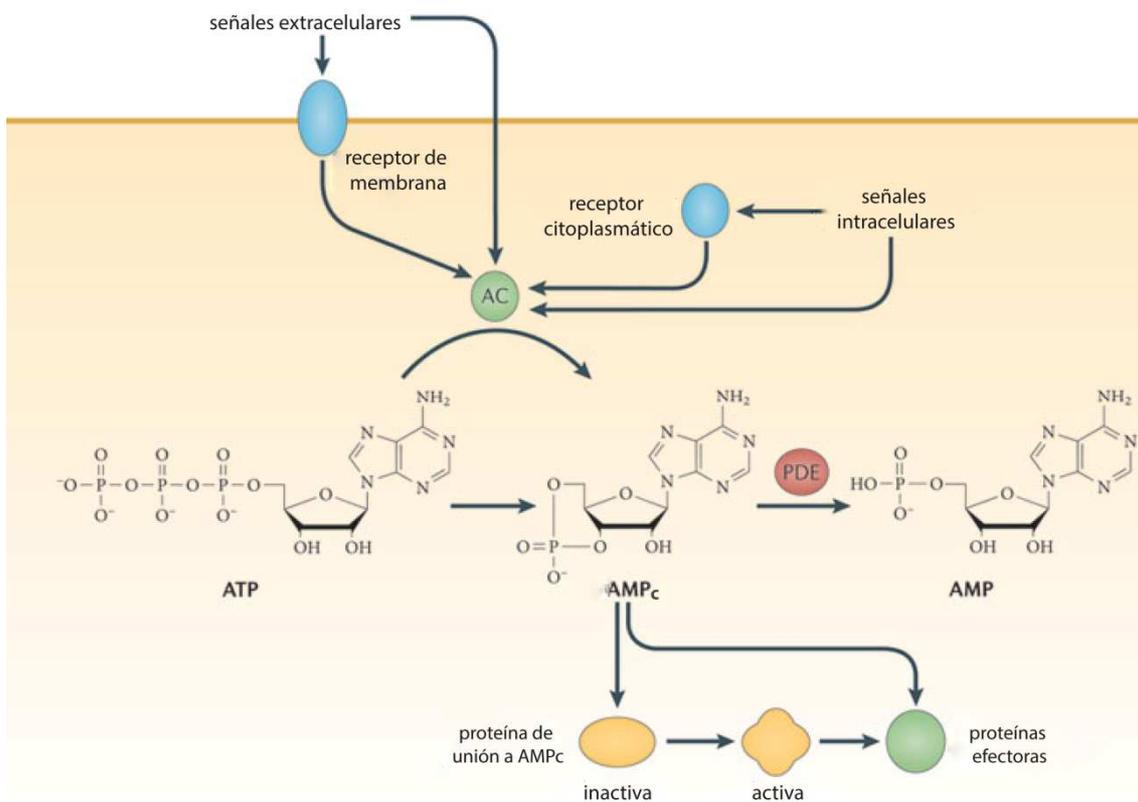


Figura 10. Señalización mediada por AMPc. Las adenilato ciclasas (AC) catalizan la conversión de ATP a AMPc y un pirofosfato inorgánico, mediante la unión del fosfato 5' remanente con el carbono 3' de la ribosa. El AMPc es degradado por fosfodiesterasas (PDEs) quienes catalizan la hidrólisis de la unión 3'-5' fosfodiéster, liberando 5'-AMP. Las AC pueden ser activadas directamente o indirectamente por múltiples señales ambientales. El AMPc luego transmite la señal a proteínas efectoras río abajo directamente, mediante la interacción con ellas; o indirectamente, mediante la activación de proteínas que unen AMPc (imagen modificada de McDonough and Rodriguez, 2012).

En espermatozoides, el AMPc se encuentra implicado en múltiples eventos de señalización que ocurren durante la capacitación, como son la activación de la motilidad, la motilidad hiperactivada y la RA. Muchos de estos efectos están mediados por la activación de PKA; sin embargo, también se ha descrito la participación de otras proteínas de unión a AMPc. AMPc y PKA regulan una variedad de eventos de señalización inducidos durante la

capacitación como: la remodelación de lípidos de membrana, la hiperpolarización de la membrana plasmática, el incremento del pH, los niveles de calcio intracelulares y la fosforilación de proteínas en residuos tirosina (Buffone et al., 2014). Nuestro grupo ha demostrado que el AMPc tiene un rol fundamental en la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos. La incubación de espermatozoides permeabilizados con el análogo permeable de AMPc dibutilil-AMPc o el inhibidor de PDEs 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), induce la RA. Además, la introducción de una PDE recombinante provoca la inhibición de la RA estimulada por calcio, demostrando que calcio requiere AMPc endógeno para estimular la exocitosis (Branham et al., 2006).

10. Adenilato ciclasas

Las AC de mamíferos son una gran familia de enzimas codificadas por diez genes independientes y los diferentes subtipos celulares son expresados como patrones discretos en un limitado número de tejidos. En mamíferos, han sido identificadas nueve isoformas de AC unidas a membrana (AC1-AC9) y una forma soluble (AC10 o ACs). Todas estas enzimas poseen propiedades regulatorias diferentes (Buffone et al., 2014).

La familia de enzimas AC unidas a membrana (AC_{tm}) comprende glicoproteínas de alrededor de 120 kDa. Ellas comparten una gran homología de secuencia en la estructura primaria de sus sitios catalíticos y poseen la misma estructura tridimensional predicha. Cada isoforma de AC_{tm} consiste de dos dominios hidrofóbicos (con seis motivos transmembrana cada uno) y dos dominios citoplasmáticos, lo que resulta en una proteína pseudosimétrica. Los dominios citoplasmáticos (C1 y C2) –que constituyen el sitio catalítico– están sujetos a regulaciones intracelulares específicas para cada subtipo. Todas estas isoformas poseen una actividad basal que se incrementa luego de la unión a la subunidad α de la proteína G estimuladora ($G_s\alpha$) y se reduce luego de la unión a la subunidad α de la proteína G inhibitoria ($G_i\alpha$). Además, las diferentes isoformas pueden recibir señales de una variedad de fuentes, incluyendo otras proteínas G, proteínas quinasas, fosfatasas, calcio y calcio/CaM; indicando que pueden integrar vías regulatorias diferenciales a través de un diálogo cruzado con otros sistemas de transducción de señales (Hanoune and Defer, 2001; Taskén and Aandahl, 2004).

Una actividad AC no asociada a membrana fue descrita casi 40 años atrás en extractos citosólicos de testículos de mamíferos y en la fracción particulada de homogenatos de espermatozoides (Braun and Dods, 1975). El gen que codifica esta AC soluble (ACs) codifica

una proteína de alrededor de 187 kDa con una actividad específica baja y una isoforma de alrededor de 50 kDa que posee una alta actividad específica (Buck et al., 1999; Jaiswal and Conti, 2001). Tanto la proteína completa como la truncada poseen dos dominios que son similares a los dominios catalíticos de las AC de cianobacterias y mixobacterias, revelando una conexión evolutiva entre los sistemas de señalización de bacterias y mamíferos. Ambas isoformas de ACs difieren bioquímicamente de las ACtm debido a que son insensibles a los moduladores clásicos de las ciclasas transmembrana, como forskolina, AlF_3 y proteínas G heterotriméricas (Buck et al., 1999); además, su actividad es dependiente de Mn^{+2} en lugar de Mg^{+2} (Braun and Dods, 1975; Kornblihtt et al., 1981). Las ACs son directamente estimuladas por bicarbonato (Chen et al., 2000; Visconti et al., 1990) y calcio (Jaiswal and Conti, 2003; Litvin et al., 2003), ambos iones requeridos durante la capacitación. Asimismo, la actividad ACs (Neer and Murad, 1979), el ARNm (Sinclair et al., 2000; Xie and Conti, 2004) y la proteína (Chen et al., 2000; Xie and Conti, 2004) son más prevalentes en testículo de mamíferos que en tejidos somáticos, sugiriendo que la ACs tiene un rol crítico en la espermatogénesis.

La presencia de ACtm en espermatozoides ha sido investigada por numerosos grupos utilizando ensayos enzimáticos, abordajes inmunológicos, espectrometría de masa y análisis genéticos. A pesar de estos esfuerzos, tanto la función como la presencia de la ACtm en espermatozoides de mamíferos continúan siendo controvertidas. Numerosos trabajos han reportado en espermatozoides una elevación de las concentraciones de AMPc intracelular dependiente de forskolina (Baxendale and Fraser, 2003a; Fraser and Adeoya-Osiguwa, 1999; Livera et al., 2005; Monks et al., 1986). Estos resultados concuerdan con los datos de Leclerc y Kopf (Leclerc and Kopf, 1995, 1999) que muestran un efecto de forskolina en la actividad AC medida en fracciones de membrana de espermatozoides capacitados de ratón. Mediante ensayos de inmunodetección, se ha descrito la presencia de las isoformas de ACtm 2, 3, 4 y 8 en cabeza y flagelo de espermatozoides de ratón. Estas isoformas parecen ser versiones truncadas de las ACtm presentes en células somáticas, ya que presentan un peso molecular menor (50-60 kDa) (Baxendale and Fraser, 2003b). En un trabajo reciente, fue reportada la expresión en espermatozoides de ratón de las isoformas 6 a 9 mediante RT-PCR. Asimismo, fue demostrado que forskolina incrementó los niveles de AMPc en espermatozoides de ratones *knock-out* para la ACs. Además, se reportó la presencia de una proteína $G\alpha_s$ en el acrosoma de los espermatozoides (Wertheimer et al., 2013).

Hasta el momento el rol de las ACs y ACtm en la RA es discutido, ya que dependiendo de la especie, se ha reportado la participación tanto de la forma soluble como de las isoformas

transmembrana. Previamente, nuestro grupo demostró que la ACs es requerida para la RA de espermatozoides humanos mediante la inhibición con KH7 de la RA disparada por progesterona, el ionóforo de calcio A23187 y calcio (Branham et al., 2009; Teves et al., 2009). Resultados obtenidos en espermatozoides de erizo de mar mostraron que KH7 inhibe la síntesis de AMPc y la RA inducida por la gelatina del ovocito. Por otro lado, 2', 5'-dideoxyadenosine (2',5'-DDA), un inhibidor de la ACtm, bloquea parcialmente la producción de AMPc y la RA. Estos resultados sugieren que ambas isoformas estarían implicadas en la RA de los espermatozoides de erizo de mar (Beltrán et al., 2007). El rol de estas enzimas durante la RA de espermatozoides de ratón es controvertido. Experimentos utilizando ratones *knock-out* para la ACs demostraron que cuando espermatozoides capacitados con ciclodextrina y sin CaCl_2 son tratados con ZP solubilizada o A23187, los valores de RA son los mismos que para los ratones de la cepa salvaje (Hess et al., 2005). Por otra parte, cuando espermatozoides de estos mismos ratones *knock-out* capacitados en presencia de albúmina sérica bovina y CaCl_2 son estimulados con A23187, presentan menor sensibilidad al ionóforo de calcio (Xie et al., 2006). Recientemente, Wertheimer y col. comprobaron que la incubación con forskolina estimula la RA en espermatozoides de ratón capacitados y además incrementa las concentraciones de calcio intracelulares, sugiriendo un rol de las ACtm en la RA de los espermatozoides de ratón (Wertheimer et al., 2013).

11. Fosfodiesterasas

Las PDEs son las enzimas responsables de catalizar la hidrólisis de nucleótidos cíclicos y juegan un importante rol en el control de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. Estas enzimas también contribuyen a establecer gradientes locales de estos nucleótidos cíclicos estando localizadas en compartimentos subcelulares y siendo reclutadas a complejos multiproteicos de señalización. Esto favorece una especificidad espacial y temporal de la señalización de nucleótidos cíclicos mediante la regulación de la disponibilidad de AMPc o GMPc a sus efectores (Taskén and Aandahl, 2004). Hasta el momento, se han identificado en mamíferos 20 genes que codifican 11 familias de PDE. Si bien existe una similitud estructural entre ellas, cada familia presenta diferente especificidad de sustrato y sensibilidad farmacológica (Soderling and Beavo, 2000). PDE4, PDE7 y PDE8 son más eficientes en hidrolizar AMPc; mientras que PDE5, PDE6 y PDE9 son específicas de GMPc. Por otro lado, PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11 hidrolizan ambos nucleótidos (Mehats et al., 2002). Las PDEs influyen una gran variedad de procesos fisiológicos incluyendo la producción y acción de mediadores

proinflamatorios, la función de canales iónicos, la contracción muscular, la diferenciación, la apoptosis, etc. (Jeon et al., 2005).

En espermatozoides de mamíferos, han sido reportadas seis PDEs (1, 4, 6, 8, 10 y 11) mediante técnicas inmunológicas. Específicamente, la inhibición de PDE1 o PDE4 aumenta los niveles intracelulares de AMPc (Baxendale and Fraser, 2005). En espermatozoides humanos, la inhibición de PDE4 incrementa la motilidad espermática sin afectar la RA; por otra parte, inhibidores de PDE1 estimulan selectivamente la RA. Mediante tinción inmunohistoquímica, PDE4 fue localizada principalmente en la pieza media de espermatozoides, mientras que PDE1 se encontró predominantemente en la cabeza. Estas localizaciones diferenciales dentro del espermatozoide indicarían que las PDEs pueden modular selectivamente las funciones espermáticas a través de la regulación de distintos subdominios celulares ricos en AMPc (Fisch et al., 1998). El uso de diversos inhibidores de PDE ha permitido el estudio de las funciones del AMPc en el espermatozoide. Por ejemplo, IBMX, cafeína y pentoxifilina aumentan la capacitación, fosforilación en tirosina (Galantino-Homer et al., 1997; Leclerc et al., 1996), motilidad (Cheng and Boettcher, 1981; Nassar et al., 1999) y RA (Branham et al., 2006; Fisch et al., 1998; Mendoza et al., 1992).

12. Blancos del AMPc

Existen tres efectores no transcripcionales del AMPc: la PKA, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Epac y los canales iónicos operados por nucleótidos cíclicos.

12.1. Proteína quinasa dependiente de AMPc

La PKA es una serina/treonina quinasa ubicua presente en células de mamíferos como una holoenzima tetramérica compuesta por una subunidad regulatoria dimérica (R) y dos subunidades catalíticas (C). La unión de cuatro moléculas de AMPc al tetrámero R_2C_2 inactivo (dos moléculas por cada subunidad regulatoria) conduce a un cambio conformacional de la holoenzima. Cada subunidad regulatoria posee dos sitios de unión a AMPc denominados A y B. En la holoenzima inactiva, sólo el sitio B está expuesto para la unión de AMPc. Cuando los niveles intracelulares de AMPc se elevan, la ocupación del sitio B por AMPc induce la unión de otra molécula de AMPc al sitio A (Francis and Corbin, 1994). Como consecuencia de esta unión, disminuye la afinidad de la subunidad R por la subunidad C aproximadamente cuatro órdenes de magnitud (Bramson et al., 1984). Esto provoca la disociación del dímero de subunidades regulatorias (con cuatro moléculas de AMPc unidas) y dos monómeros de subunidades catalíticas (Johnson et al., 2001). Una vez disociadas, las subunidades catalíticas libres

fosforilan sustratos proteicos específicos (Figura 11). Existen dos clases de subunidades regulatorias (RI y RII) y cada una de ellas posee dos subtipos α y β . Estas isoformas funcionalmente no redundantes son los mecanismos primarios que logran la especificidad en la señalización de PKA. Las holoenzimas tipo I tienen afinidades relativamente altas por AMPc, mientras que las holoenzimas tipo II poseen bajas afinidades por el nucleótido cíclico (Dostmann and Taylor, 1991; Taylor et al., 2005, 2013). La subunidad RII típicamente se encuentra anclada a proteínas de membrana a través de AKAPs (del inglés *A kinase anchoring proteins*) (Scott and McCartney, 1994).

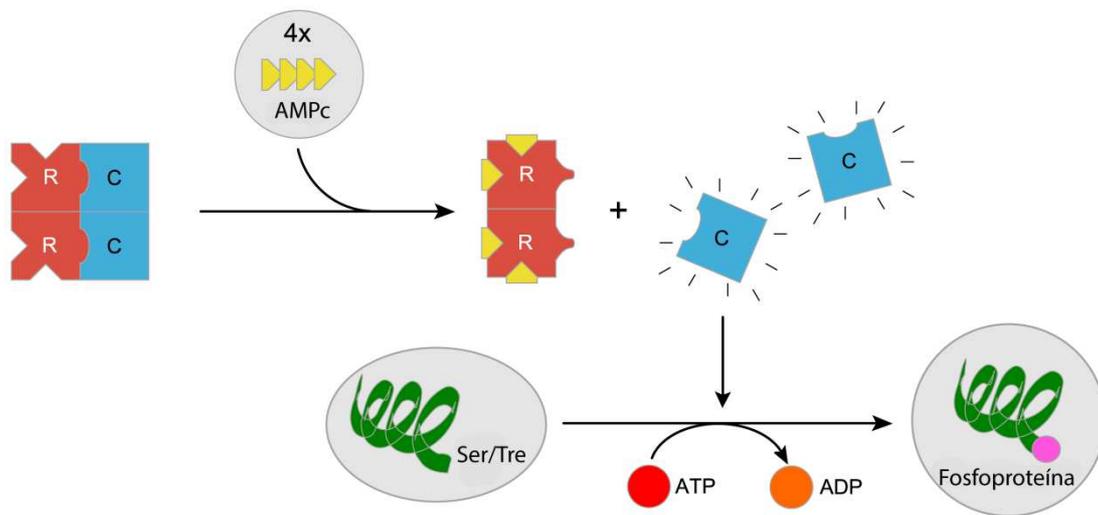


Figura 11. Representación esquemática de la activación de PKA por AMPc. La unión de AMPc a la subunidad R induce un cambio conformacional en la molécula que resulta en la disociación de la subunidad C la cual se vuelve catalíticamente activa. Las subunidades catalíticas fosforilan sustratos proteicos específicos en residuos de serina/treonina. Imagen modificada de http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_kinase_A.

Los blancos intracelulares y la compartimentalización de PKA están determinados principalmente por su asociación con AKAPs, una familia de proteínas relacionadas estructuralmente conformadas por más de 50 miembros (Taskén and Aandahl, 2004). Las proteínas AKAPs dirigen a PKA hacia sustratos específicos y compartimentos subcelulares especializados. Las AKAPs también sirven como proteínas andamio que ensamblan a PKA con otras proteínas regulatorias como fosfatasas y PDEs (Colledge and Scott, 1999). En espermatozoides de mamíferos se ha descrito la presencia de AKAP110 en el capuchón acrosomal y flagelo, AKAP220 en el centrosoma, S-AKAP84, AKAP220, AKAP82, AKAP110 y TAKAP-80 en flagelo (Taskén and Aandahl, 2004).

Debido a que los espermatozoides maduros son transcripcionalmente y traduccionalmente inactivos, se ha analizado la expresión de las diferentes subunidades de

PKA en células germinales testiculares. Durante la espermatogénesis han sido encontrados los ARNm de R1 α , R11 α , C α 1, C α 2 (Buffone et al., 2014). La subunidad catalítica C α 2 ha sido descrita en espermatozoides de ratón (Nolan et al., 2004) y recientemente localizada en el flagelo (Wertheimer et al., 2013).

PKA ha sido asociada a múltiples eventos relacionados con la capacitación. Una vez que PKA es activada, fosforila proteínas en serina y treonina, activa -directa o indirectamente- proteínas quinasas e inhibe fosfatasas, lo cual finalmente produce un incremento de la fosforilación de proteínas en tirosina (Visconti et al., 2011). Inhibidores específicos de PKA (como H-89 y Rp-AMPC) previenen el incremento de la fosforilación de proteínas en tirosina en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes (Battistone et al., 2013; Leclerc et al., 1996; Visconti et al., 1995). Estas aproximaciones farmacológicas han sido validadas utilizando modelos de *knock-out* genéticos. Considerando que C α 2 es la única subunidad C presente en espermatozoides maduros (Nolan et al., 2004), fue posible anular la actividad PKA mediante la generación de ratones *knock-out* para la subunidad C α 2 por recombinación homóloga. Estos ratones son estériles y el fenotipo infértil está relacionado a defectos en la motilidad y capacitación (Nolan et al., 2004; Skálhegg et al., 2002). La activación de la subunidad catalítica de PKA incrementa el batido flagelar y la frecuencia durante la capacitación (Carlson et al., 2007). La participación de PKA en la RA no está aún muy bien definida. Por un lado, de Jonge y colaboradores demostraron que la incubación con inhibidores específicos de PKA inhibe la RA inducida por dibutilil AMPc en espermatozoides humanos (De Jonge C, 1996; De Jonge et al., 1991). Sin embargo, nuestro grupo ha descrito una vía de señalización mediada por AMPc que conduce a la RA de espermatozoides humanos que resulta ser independiente de la activación de PKA (Branham et al., 2009). Un mecanismo regulatorio propuesto de la participación de PKA en la RA es mediante la activación de canales de calcio ubicados en la membrana acrosomal externa (Breitbart and Spungin, 1997).

12.2. Canales operados por nucleótidos cíclicos

Los canales operados por nucleótidos cíclicos (CNG, del inglés *cyclic nucleotide-gated channels*), son canales iónicos cuya actividad responde a la unión de nucleótidos cíclicos. Los CNG han sido encontrados en una variedad de tipos celulares y tejidos incluyendo riñón, testículo, corazón y el sistema nervioso central. Estos canales se abren en respuesta a la unión directa de nucleótidos cíclicos intracelulares y contribuyen al control del potencial de membrana y de los niveles de calcio intracelulares.

Los CNG consisten en la combinación de dos subunidades α (CNG α 1 a 4) y dos subunidades β (CNG β 1 a 3) que se expresan diferencialmente en cada tejido (Cukkemane et al., 2011). Desde el punto de vista estructural, cada subunidad posee seis segmentos transmembrana y un único sitio de unión al nucleótido cíclico cercano a la región C-terminal de la proteína (Weitz et al., 2002). El dominio de unión al nucleótido cíclico está conectado al último segmento transmembrana del canal por 90 aminoácidos denominados “*C-linker*” (Flynn et al., 2001). La unión del nucleótido cíclico promueve la apertura del canal. Dependiendo de la combinación de las subunidades, los CNG muestran selectividad diferencial hacia AMPc o GMPc (Pifferi et al., 2006) y frecuentemente generan corrientes de Na⁺ o calcio hacia el interior de la célula (Mazzolini et al., 2010).

Las subunidades α 3 y β 1 han sido localizadas en el flagelo de espermatozoides de ratón (Kaupp and Seifert, 2002). La adición de un análogo permeable del GMPc a espermatozoides de ratón resulta en un incremento de la concentración de calcio intracelular (Wiesner et al., 1998). El mismo efecto fue observado con análogos permeables de AMPc, pero con menor efectividad que los análogos de GMPc (Kobori et al., 2000). A pesar de que originalmente se propuso que los CNG participaban en el transporte de calcio hacia el interior de la célula, posteriormente fue comprobado que los espermatozoides que carecen del canal específico de calcio CatSper, no muestran incrementos de calcio intracelulares, incluso cuando los CNG están presentes (Ren et al., 2001). Actualmente, el rol de los CNG en la fisiología espermática no está claro debido a que los ratones que portan una delección de α 3 muestran fertilidad normal (Biel et al., 1999). Estos canales juegan un importante papel en la quimiotaxis del erizo de mar (Kaupp et al., 2008). Sin embargo, su rol en la capacitación de espermatozoides no está claro.

12.3. Epac

Las variantes de Epac, Epac1 y Epac2, fueron descubiertas durante una búsqueda informatizada en la base de datos de proteínas que pudieran explicar la insensibilidad de la activación inducida por AMPc de la pequeña GTPasa Rap1 a inhibidores de PKA (de Rooij et al., 1998, 2000). Las mismas proteínas fueron descritas independientemente en un monitoreo de genes del cerebro, en el cual se identificaron dos genes caracterizados por la presencia de motivos de unión a AMPc y de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la superfamilia Ras (Kawasaki et al., 1998).

Epac1 y Epac2 son codificadas por genes distintos -RAPGEF3 y RAPGEF4- en mamíferos. La isoforma original Epac2 fue renombrada como Epac2A luego de que fueron encontradas dos variantes de empalme que carecen del dominio adicional de unión a AMPc (CNB-A) en glándula adrenal (Epac2B) (Niimura et al., 2009) e hígado (Epac2C) (Ueno et al., 2001). Las dos isoformas de Epac, exhiben una amplia expresión tanto en los niveles de ARNm como de proteínas. Epac1 es más abundante en corazón, riñón, vasos sanguíneos, sistema nervioso central, ovario y útero (Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 1998); mientras que las variantes de Epac2 son mayormente expresadas en el sistema nervioso central (Epac2A), glándula adrenal (Epac2B), hígado (Epac2C) y páncreas (Epac2A) (Kawasaki et al., 1998; Niimura et al., 2009; de Rooij et al., 1998; Ueno et al., 2001).

Epac1 y Epac2 son proteínas multidominios que comparten una alta homología de secuencia. Ambas isoformas contienen una región regulatoria N-terminal y una región catalítica C-terminal. La región regulatoria contiene un dominio Disheveled/Egl-10/pleckstrin (DEP) seguido de un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (CNB-B) conservado evolutivamente. La región catalítica consiste de un motivo de intercambio para Ras (REM) que estabiliza el dominio GEF, un dominio de asociación a Ras (RA) que juega un rol en la translocación de Epac2 a la membrana plasmática (Li et al., 2006) y el clásico dominio de homología a CDC25 (CDC25HD) que promueve el intercambio de GDP por GTP en Rap (Figura 12A) (Bos, 2006). Epac2 posee en la región N-terminal un dominio adicional de unión a AMPc (CNB-A) que presenta una afinidad por AMPc 20 veces menor que el CNB-B. Este dominio no es estrictamente necesario para la activación de Epac (Rehmann et al., 2003, 2007) y está involucrado en la localización subcelular de Epac2A (Niimura et al., 2009). El dominio DEP en Epac1 es requerido para su translocación a la membrana plasmática inducida por AMPc (Ponsioen et al., 2009). Asimismo, AMPc puede inducir cambios conformacionales adicionales en Epac1 que permiten la unión a ácido fosfatídico mediada por el dominio DEP, promoviendo aún más la localización de Epac1 en la membrana plasmática y la subsecuente activación de Rap (Consonni et al., 2012).

La arquitectura de Epac define su modo de activación. Estudios de cristalografía de rayos X de Epac2 aportaron nuevas ideas de los cambios conformacionales que sufre la proteína en respuesta a la unión de AMPc. En ausencia de AMPc, la región regulatoria bloquea estéricamente la región catalítica e inhibe su actividad GEF. La unión de AMPc a Epac induce un cambio conformacional dentro de la proteína y libera el efecto autoinhibitorio impuesto por la región N-terminal, permitiendo la activación de Rap (Figura 12B) (Rehmann, 2006; Rehmann et al., 2007, 2008).

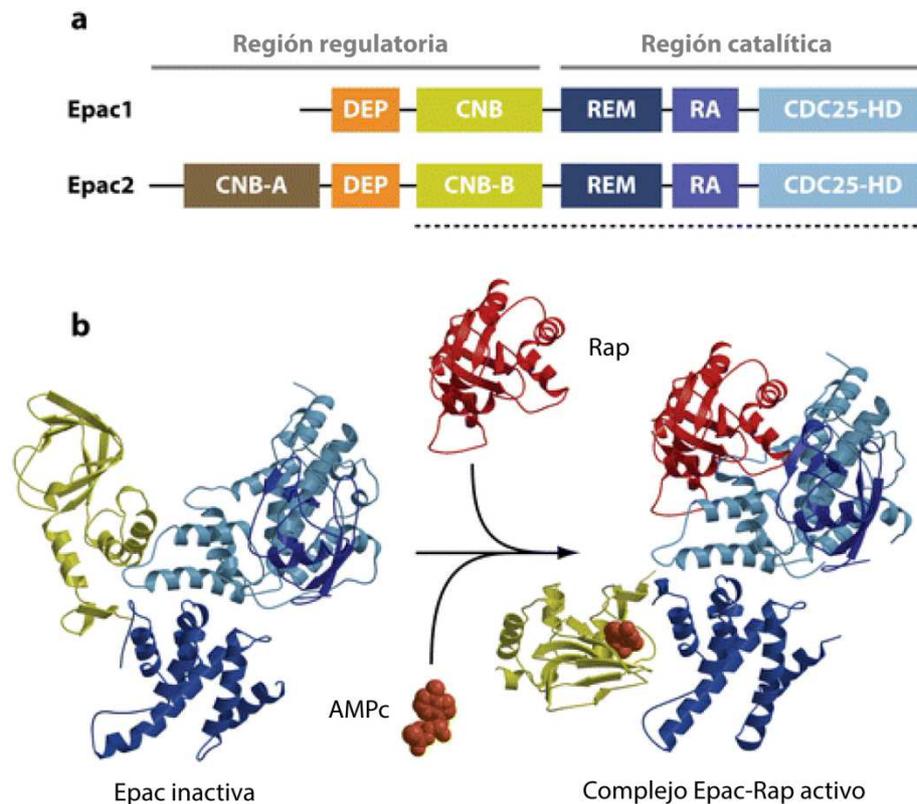


Figura 12. Estructura de las proteínas Epac. (A) Diagrama esquemático de la organización de los dominios de Epac1 y Epac2. La región regulatoria está formada por un dominio Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin (DEP) seguido por un dominio de unión a AMPc (CNB). Epac2 además posee un dominio CNB adicional en el extremo N-terminal. La región catalítica de ambas proteínas está formada por un dominio REM, un dominio de asociación a Ras (RA) y un dominio homólogo al CDC25 (CDC25HD). **(B)** Representación tridimensional de la estructura de Epac2 y los cambios conformacionales inducidos por la unión de AMPc. En su estado inactivo Epac2 se encuentra en una conformación cerrada y la subunidad catalítica se encuentra cubierta por la subunidad regulatoria, indicando que la inhibición podría deberse a un impedimento estérico. La unión de AMPc al CNB induce un cambio conformacional en la molécula exponiendo al sitio catalítico y permitiendo la unión a Rap1 (imagen modificada de Gloerich and Bos, 2010).

Estudios iniciales afirmaban que se requería una alta concentración de AMPc para activar Epac en lugar de PKA. Sin embargo, trabajos posteriores reportaron que las constantes de afinidad de unión a AMPc de PKA y Epac son muy similares ($K_d \sim 2,9 \mu\text{M}$) (Dao et al., 2006). Esto indicaría que tanto la compartimentalización celular del AMPc, como la disponibilidad de proteínas efectoras pueden determinar si Epac y/o PKA son activadas en respuesta a incrementos moderados de AMPc celular (Dao et al., 2006). El uso de sensores de AMPc basados en la sonda Epac-FRET ha permitido la identificación de la dinámica espacio-temporal de la señalización por AMPc en la membrana plasmática, citoplasma, mitocondrias y el núcleo de células en cultivo; indicando que las concentraciones celulares de AMPc aumentan a un nivel suficiente como para activar a las proteínas Epac (DiPilato et al., 2004; Nikolaev et al., 2004; Ponsioen et al., 2004). Con el fin de estudiar los procesos celulares en los que se

encuentra involucrada Epac, fue necesario el desarrollo de una estrategia que permitiese discriminar entre las vías de señalización activadas por AMPc dependientes de Epac o PKA. Para ello, fueron diseñados análogos de AMPc permeables a membranas como el 8-pCPT-2-O-Me-AMPc. Estos análogos son usados como herramientas farmacológicas para estudiar los efectos de AMPc mediados por Epac e independientes de PKA (Christensen et al., 2003; Enserink et al., 2002; Holz et al., 2008). 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, exhibe una alta afinidad por Epac (Kd 2.2 μ M para Epac1) y una afinidad reducida por PKA (Kd 200–300 μ M) (Enserink et al., 2002) y activa a Rap1 con una mayor potencia y eficacia que el propio AMPc, por lo que se lo llama “super activador” (Enserink et al., 2002; Rehmann et al., 2003). Otra estrategia utilizada para validar las vías de señalización dependientes de Epac es el uso de inhibidores de PKA (Holz et al., 2008).

Las proteínas Epac fueron inicialmente caracterizadas como factores GEF activados por AMPc para las proteínas Rap1 y Rap2 (Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 1998). Epacs también parecen representar un nexo molecular entre los diferentes miembros de la superfamilia Ras (Krugmann et al., 2004; Li et al., 2006; Maillet et al., 2003; Morel et al., 2005). Las Epacs no sólo se unen a las GTPasas, sino que también interactúan con reguladores de la exocitosis inducida por calcio y con la red de microtúbulos del citoesqueleto (Gupta and Yarwood, 2005; Mei and Cheng, 2005; Ozaki et al., 2000). Estas proteínas están implicadas en una variedad de respuestas celulares tales como: secreción (Maillet et al., 2003; Robert et al., 2005), adhesión celular mediada por integrinas (Gupta and Yarwood, 2005; Rangarajan et al., 2003), formación de uniones célula-célula (Cullere et al., 2005; Kooistra et al., 2005), movilización de calcio intracelular (Evellin et al., 2002; Oestreich et al., 2007; Schmidt et al., 2001; Yip, 2006), proliferación y diferenciación celular (Bryn et al., 2006; Cass et al., 1999; Misra and Pizzo, 2005; Shi et al., 2006) y expresión génica (Lotfi et al., 2006; Sands et al., 2006; Ulucan et al., 2007). Todos estos hallazgos confirman la importancia de las proteínas Epac, las cuales probablemente ejercen esta variedad de funciones a través de la señalización de una plétora de proteínas efectoras (Figura 13).

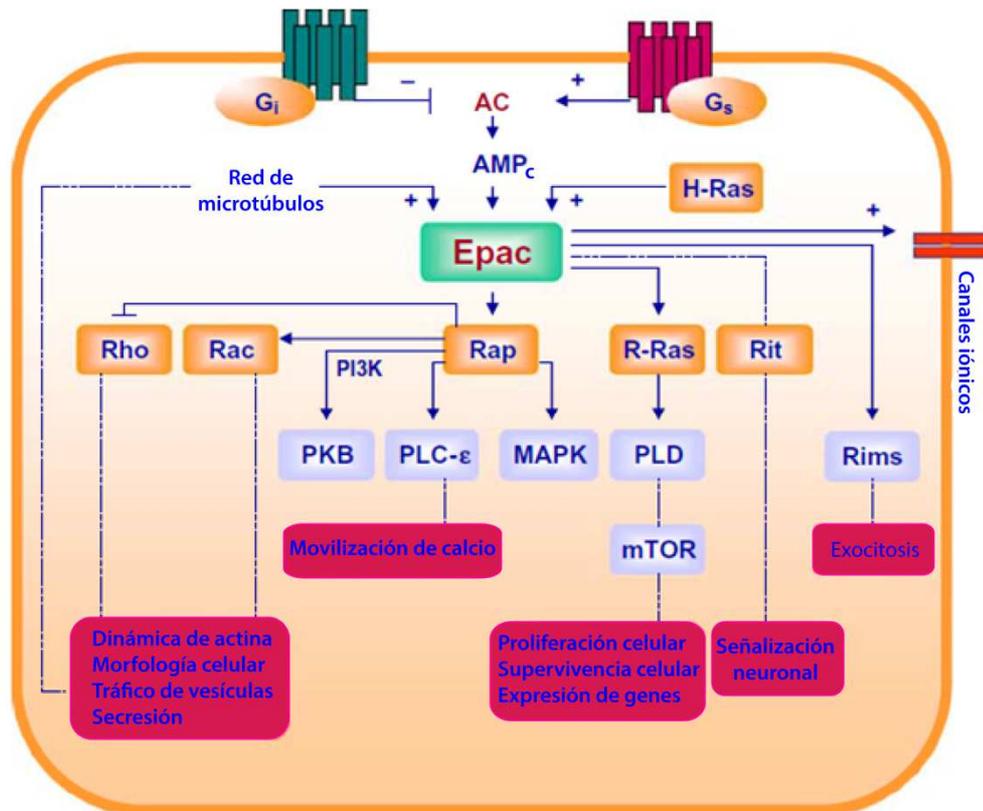


Figura 13. Representación de las vías de señalización en las que participa Epac. Epac interacciona con una plétora de proteínas efectoras induciendo diversas respuestas celulares. Por ejemplo, la señalización Epac-Rap-PLCε está asociada a eventos de movilización de calcio, Epac-R-Ras a proliferación y supervivencia celular y Epac-Rim a exocitosis (imagen modificada de Roscioni et al., 2008).

Existen numerosas evidencias que indican que Epac tiene un rol fundamental en la regulación de la exocitosis de una variedad de tipos celulares. Los primeros hallazgos reportaron que Epac2 interactúa con Rim2 y media la secreción inducida por AMPc de la hormona de crecimiento en células PC12 y la liberación del péptido C en células MIN6 (Ozaki et al., 2000). La activación de Epac, acoplada a la movilización de calcio, ha sido implicada en la estimulación de la actividad secretoria de melanotrofos pituitarios (Sedej et al., 2005), así como también en la inducción de una exocitosis rápida en células cromafines de rata a través de la activación de canales de calcio (Giancippoli et al., 2006). Numerosos estudios han implicado a Epac2 en el control de la secreción de insulina en células β-pancreáticas. Se ha propuesto que Epac2 modula la liberación de calcio de reservorios intracelulares inducida por calcio (CICR) (Dzhura et al., 2010; Kang et al., 2003). Existe un número de posibles mecanismos por los que Epac2 podría promover la movilización de calcio intracelular, uno de los mecanismos factibles es a través de la estimulación dependiente de Rap de la fosfolipasa PLCε, como se ha visto en cardiomiocitos (Oestreich et al., 2007; Schmidt et al., 2007) y en células β-pancreáticas (Dzhura et al., 2010). Además, existe evidencia que sugiere que Rap1 puede

asociar directamente la señalización de Epac con la movilización de calcio a través de interacciones directas con la bomba SERCA ATPasa en el retículo endoplasmático (Lacabartz-Porret et al., 1998). Epac también juega un rol central en las etapas tardías de la liberación de gránulos secretorios. La activación directa de Epac por 8-pCPT-2'-O-Me-AMPC incrementa el número de sitios de exocitosis en células β -pancreáticas (Kwan et al., 2007a). Asimismo, las elevaciones de AMPc intracelular incrementan la densidad de gránulos de insulina subyacentes a la membrana plasmática, facilitando su fusión inducida por glucosa (Shibasaki et al., 2007). La habilidad de Epac para potenciar la exocitosis rápida puede ser parcialmente debida a la formación de complejos entre Epac2, Rim2 y Munc13 (Kwan et al., 2007b). El acoplamiento de la exocitosis de vesículas a la elevaciones intracelulares de calcio probablemente involucra interacciones adicionales entre el complejo Epac2-Rim2 y el sensor de calcio Piccolo, el cual forma un heterodímero con Rim2 de una manera dependiente de calcio (Fujimoto et al., 2002). El *priming* de gránulos secretores de insulina también parece estar regulado por la interacción proteica entre Epac2 y el receptor de sulfonilurea 1 (SUR-1). El modelo sugerido es que el reclutamiento de Epac2 a los gránulos secretorios mediado por SUR-1 lleva a la estimulación de canales dependientes de cloro, generando una fuerza que conduce a la captación de H^+ por la H^+ -ATPasa. Esto lleva al *priming* de la exocitosis a través de la acidificación de las vesículas (Lotfi et al., 2006).

Ambas isoformas de Epac han sido identificadas en espermatozoides de distintas especies, presentando una localización subcelular diferencial. Epac1 ha sido encontrada en la región acrosomal de espermatozoides de ratón y caballo (Amano et al., 2007; McPartlin et al., 2011); mientras que Epac2, fue identificada en células espermatogénicas de ratón (Aivatiadou et al., 2009), en el flagelo de espermatozoides de hámster (Kinukawa et al., 2006) y pieza media de espermatozoides de caballo (McPartlin et al., 2011). Diversos trabajos han demostrado la participación de Epac en procesos involucrados en la fisiología espermática, estando asociada a incrementos de la RA (McPartlin et al., 2011), regulación del desplazamiento de microtúbulos implicado en la curvatura flagelar (Kinukawa et al., 2006) o modulación del potencial de membrana (McPartlin et al., 2011). Además, la vía de AMPc-Epac-Rap1 ha sido involucrada en la espermatogénesis. Experimentos con ratones transgénicos que expresan una mutante de Rap1 inactiva resultó en la liberación anómala de espermátides inmaduras dentro del lumen del túbulo seminífero (Aivatiadou et al., 2009). Resultados previos de nuestro grupo demostraron que Epac está presente y se localiza en la región acrosomal de espermatozoides humanos (Branham et al., 2006). Asimismo, cuando los espermatozoides fueron incubados con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC se indujo la exocitosis acrosomal, que resultó ser

independiente de PKA y del calcio externo (Branham et al., 2006). Por otra parte, la incubación de espermatozoides permeabilizados con anticuerpos anti-Epac abolió la RA inducida por AMPc, calcio (Branham et al., 2006; Ruete et al., 2014) y Rab3A- recombinante (Branham et al., 2009), indicando que Epac tiene un rol fundamental en la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos. Resultados de nuestro grupo ubican a Epac en un punto central de la cascada de señalización que conduce a la RA, demostrando que actúa como un GEF para Rap1, activando una vía que lleva a la salida de calcio acrosomal y es a su vez, un activador indirecto de Rab3A, impulsando el ensamblaje de la maquinaria proteica requerida para la fusión de membranas (Branham et al., 2009; Ruete et al., 2014).

13. Rap

Uno de los principales blancos de Epac son las proteínas Rap. Las Rap pertenecen a la familia Ras de pequeñas proteínas G y, como se describió anteriormente para Rabs, se caracterizan por ciclar entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. En su estado activo interactúan con sus proteínas efectoras disparando eventos de señalización corriente abajo. El estado de activación de estas proteínas es regulado por GEFs y GAPs (Figura 14) (Gloerich and Bos, 2011). Los GEFs de Rap son proteínas multidominios que contienen un dominio de homología a CDC25 que media la actividad GEF y un motivo de intercambio para Ras (REM). Ha sido reportado que Rap es activada por los siguientes GEFs: C3G, Epac1, Epac2, RasGRP2, PDZ-GEF1, PDZ-GEF2 y PLC ϵ (Bos et al., 2007). Asimismo, la hidrólisis de GTP en Rap es catalizada por Rap1GAP y la familia de GAPs Spa-1 (Spa-1, Spa-1-like, and E6TP1) (Bos et al., 2007). Todos estos RapGEFs y RapGAPs están regulados por distintas señales cuesta arriba que afectan su actividad, distribución celular o estabilidad.

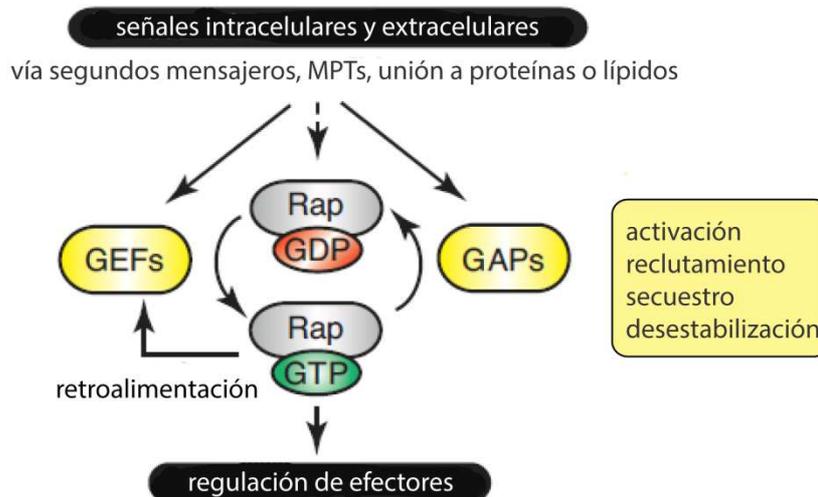


Figura 14. Modelo simplificado de la regulación espacio-temporal de Rap. La señalización de Rap es controlada por señales intra y extracelulares que impactan en los RapGEFs y RapGAPs y de esta forma determinan cuándo y cómo Rap se encuentra en su estado activo unido a GTP. Señales río arriba pueden ser transmitidas por segundos mensajeros, a través de modificaciones postraduccionales (MPTs) de los GEFs y GAPs o mediante su interacción con proteínas y lípidos. Estas señales también afectan la actividad de RapGEFs y RapGAPs, median su reclutamiento local a compartimentos celulares específicos, los secuestran para la señalización de Rap o modulan su estabilidad. En la conformación unida a GTP, Rap puede interactuar con diversas proteínas efectoras para activar eventos río abajo. Además, Rap-GTP interactúa con múltiples RapGEFs para proveer una retroalimentación positiva a la activación local de Rap (imagen modificada de Gloerich and Bos, 2011).

Existen 2 isoformas de esta proteína, Rap1 y Rap2, las cuales comparten un 60% de homología de secuencia pero señalizan a través de diferentes vías. En mamíferos han sido descritas dos variantes de Rap1 (Rap1A y Rap1B) y tres de Rap2 (Rap2A, Rap2B y Rap2C). Estas proteínas se localizan en membrana plasmática y múltiples compartimentos membranosos, incluidos el aparato de Golgi perinuclear y el retículo endoplásmico, vesículas endocíticas, vesículas secretorias y la envoltura nuclear de una variedad de tipos celulares (Roscioni et al., 2008). El anclaje a membranas está mediado por modificaciones lipídicas en el extremo C-terminal y, debido a variaciones en la secuencia de los motivos, las proteínas Rap son modificadas diferencialmente (Béranger et al., 1991). Asimismo, la localización dinámica de Rap parece ser también controlada por otras modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo, la fosforilación en el extremo C-terminal de Rap1 por PKA, que altera tanto su localización como su interacción con efectores (Edreira et al., 2009).

Mediante la interacción con moléculas efectoras, las proteínas Rap están implicadas en una variedad de procesos biológicos que frecuentemente involucran un efecto en el citoesqueleto, moléculas de adhesión y/o tráfico intracelular (Gloerich and Bos, 2011). Típicamente, los efectores de Rap contienen un dominio RBD (Ras/Rap-binding domain) o RA

(Rap-Ras association. Además, han sido identificados dominios de unión a Rap-GTP que son capaces de discriminar entre Rap1 y Rap2 (Kukimoto-Niino et al., 2006; Taira et al., 2004). Un gran número de proteínas son efectores de Rap, entre las que se encuentran los adaptadores RAPL, Riam, AF-6 y Krit1; los RacGEFs Tiam1 y Vav2 y los RhoGAPs RA-RhoGAP y Arap3 (Raaijmakers and Bos, 2009).

Un gran número de evidencias demuestran que el módulo AMPc/Epac/Rap gobierna múltiples respuestas biológicas en una variedad de células. La señalización Epac-Rap1 ha sido descrita en la adhesión celular mediada por integrinas (Rangarajan et al., 2003) y el funcionamiento de la barrera endotelial (Cullere et al., 2005; Kooistra et al., 2005), diferenciación (Bryn et al., 2006) y procesos inflamatorios (Sands et al., 2006). Asimismo, Rap1 ha sido implicada en múltiples eventos exocíticos, tales como la secreción de gránulos de insulina dependiente de AMPc/Epac en células β -pancreáticas (Shibasaki et al., 2007), la liberación de amilasa pancreática (Sabbatini et al., 2008), la exocitosis mediada por AMPc de los cuerpos de Weibel-Palade en células endoteliales (van Hooren et al., 2012), la regulación de la liberación de neurotransmisores en neuronas corticales (Subramanian et al., 2013), la secreción de la forma soluble noamiloidogénica del precursor proteico amiloide (Maillet et al., 2003), etc. Por otra parte, Epac-Rap2 han sido descritas en la activación de PLC ϵ a través de una vía regulada por AMPc que resulta en la generación IP₃ y lleva a un incremento de calcio intracelular (Evellin et al., 2002; Schmidt et al., 2001); como así también en la secreción de cloro en células epiteliales intestinales humanas (Hoque et al., 2010).

Las proteínas Rap han sido descritas en espermatozoides de múltiples especies. Rap1 ha sido detectada en la región acrosomal y pieza media de espermatozoides de cerdo (Miro-Moran et al., 2012) y humanos (Branham et al., 2009), en la cabeza de espermatozoides de ratón (Amano et al., 2007) y Rap2 en espermatozoides de hámster (Kinukawa et al., 2006). La RA inducida por 8-pCPT-2-O-Me-AMPc, Rab3A-GTP- γ -S recombinante y calcio requieren Rap endógena activa (Branham et al., 2009). Asimismo, los niveles de Rap1-GTP aumentan al estimular los espermatozoides con 8-pCPT-2-O-Me-AMPc (Amano et al., 2007; Branham et al., 2009; Miro-Moran et al., 2012), sugiriendo que el módulo de señalización AMPc/Epac/Rap es importante en espermatozoides. Resultados recientes de nuestro grupo demostraron que el estímulo de espermatozoides con calcio provoca la activación de Rap en la región acrosomal, además de que Rap es requerida para la movilización de calcio acrosomal inducida por calcio externo (Ruete et al., 2014).

14. Fosfolipasa C épsilon (PLCε)

La familia de fosfolipasas C (PLC) incluye 13 isoenzimas agrupadas en seis clases distintas basadas en su homología de secuencia (PLCβ, PLCγ, PLCδ, PLCε, PLCζ and PLCη). Estructuralmente, todas las isoformas contienen dos dominios X e Y altamente conservados que se pliegan para formar el núcleo catalítico de la enzima, un dominio de unión a fosfolípidos C2 y un dominio EF (Figura 15 A, B y C) (Essen et al., 1996; Harden and Sondek, 2006; Harden et al., 2011). Las PLC catalizan la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para generar IP₃ y DAG. Las consecuencias inmediatas de esta reacción son iniciadas a través de dos vías de señalización que consisten en la regulación de la liberación de calcio desde reservorios intracelulares en respuesta al IP₃ y la activación de cascadas activadas por PKC por el DAG (Smrcka et al., 2012). La producción de estos segundos mensajeros provee un nexo entre receptores altamente específicos para hormonas, neurotransmisores, antígenos y factores de crecimiento y blancos intracelulares ubicados río abajo y, por lo tanto, contribuye a la regulación de una variedad de funciones biológicas tan diversas como motilidad celular, fertilización y transducción sensorial (Bunney and Katan, 2006).

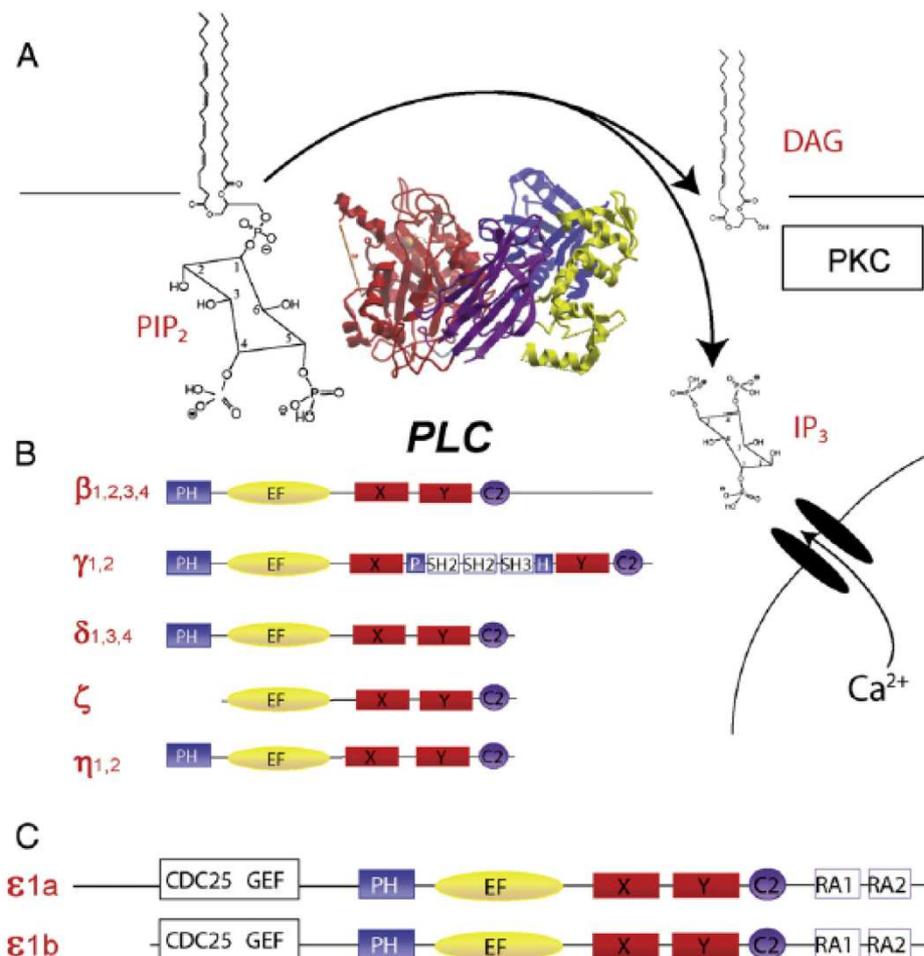


Figura 15. Estructura e isoformas de PLCs. (A) Reacción catalizada por PLC y estructura tridimensional completa de PLC β 2. Las enzimas PLC están conformadas por un dominio catalítico comprendido por los dominios X e Y (rojo), un dominio de homología a plecstrina (PH, azul), un dominio EF (amarillo) y un dominio C2 (violeta). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de PIP₂ y generan los segundos mensajeros DAG e IP₃ involucrados en la activación de PKC y la movilización de calcio desde reservorios intracelulares, respectivamente. **(B)** Isoformas de PLC con sus dominios estructurales. **(C)** Estructura de las dos variantes de empalme de PLC ϵ . Las PLC ϵ poseen dominios adicionales a las demás isoformas: un dominio de homología a CDC25 en el extremo N-terminal que posee actividad GEF y dos dominios de asociación a Ras (RA1 y RA2) ubicados en la región C-terminal de la proteína (Smrcka et al., 2012).

Entre las isoformas de PLC, PLC ϵ constituye un nexo único con vías de señalización tanto de la familia Ras de GTPasas como de proteínas G heterotriméricas. Esto se debe a características estructurales propias de esta isoforma, que no están presentes en ninguno de los demás integrantes de la familia PLC. Además de los dominios clásicos PLC, la isoforma ϵ posee en la región amino-terminal un dominio de homología a CDC25 con actividad RasGEF y dos dominios RA en tándem carboxilo-terminales (Figura 15C). Han sido descritas dos isoformas de PLC ϵ que surgen del empalme alternativo del extremo N-terminal. Estas isoformas, designadas como PLC ϵ 1a y PLC ϵ 1b, difirieron en tamaño por 25 kDa (Sorli et al., 2005) pero no presentan ninguna diferencia funcional.

La actividad catalítica de esta enzima es activada a través de sus dominios RA por una variedad de moléculas de señalización incluidas H-Ras (Kelley et al., 2001), TC21/R-Ras2 (Murphy et al., 2002), Rap1 y Rap2 (Song et al., 2002). Por lo contrario, otras pequeñas GTPasas (RalA, RhoA y Rac1), como así también algunas subunidades (G α 12, G α 13 o G $\beta\gamma$) de proteínas G heterotriméricas estimulan la actividad fosfolipasa mediante mecanismos independientes de la interacción con RA (Figura 16) (Lopez et al., 2001; Wing et al., 2001). Uno de los mecanismos propuestos de la activación de PLC ϵ inducida por Ras y Rap podría involucrar la translocación de las PLC ϵ citosólicas a membrana, donde tendrían acceso al sustrato PIP₂. Existen numerosas evidencias que apoyan esta hipótesis. Por un lado, ha sido demostrado que Ras favorece la asociación de PLC ϵ a la membrana plasmática (Song et al., 2002); mientras que Rap promueve la translocación a las regiones perinucleares y al aparato de Golgi (Jin et al., 2001). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también promueve la translocación de PLC ϵ a la membrana plasmática o del Golgi dependiente de la activación de Ras o Rap respectivamente (Jin et al., 2001; Song et al., 2002). Estos datos sugieren que la translocación desde el citosol a la membrana puede, en parte, ser la base del mecanismo de activación de PLC ϵ .

Además de la actividad hidrolítica de PIP₂, PLC ϵ tiene un dominio de homología a CDC25, lo que sugiere una función como factor intercambiador de nucleótidos. En un ensayo *in vitro* con proteínas purificadas, se comprobó que Rap1A-GDP es sustrato de PLC ϵ . Similarmente, la coexpresión de PLC ϵ o un fragmento N-terminal que contiene el dominio CDC25 provocó un incremento en los niveles intracelulares de Rap1-GTP (Jin et al., 2001). Asimismo, ratones *knock-out* para PLC ϵ mostraron una disminución de la activación hormonal de Rap (Citro et al., 2007). Además, la expresión de PLC ϵ o del dominio CDC25 llevó a la activación de efectores de Rap, como así también, la activación sostenida de Rap por EGF fue incrementada si PLC ϵ contenía el dominio CDC25 intacto (Jin et al., 2001). Similarmente, se comprobó que la actividad CDC25 era requerida para la activación sostenida de PLC ϵ en una línea celular que expresa el receptor PDGF (Song et al., 2002). Estos datos refuerzan el concepto que la proteína Rap activa generada por el dominio CDC25 retroalimenta a PLC ϵ por la unión al dominio RA2 para mantener la activación de PLC. Estos datos sugieren que la actividad GEF de PLC ϵ es importante para generar una señal de amplificación que mantiene una actividad sostenida de PLC ϵ en sitios subcelulares específicos (Figura 16).

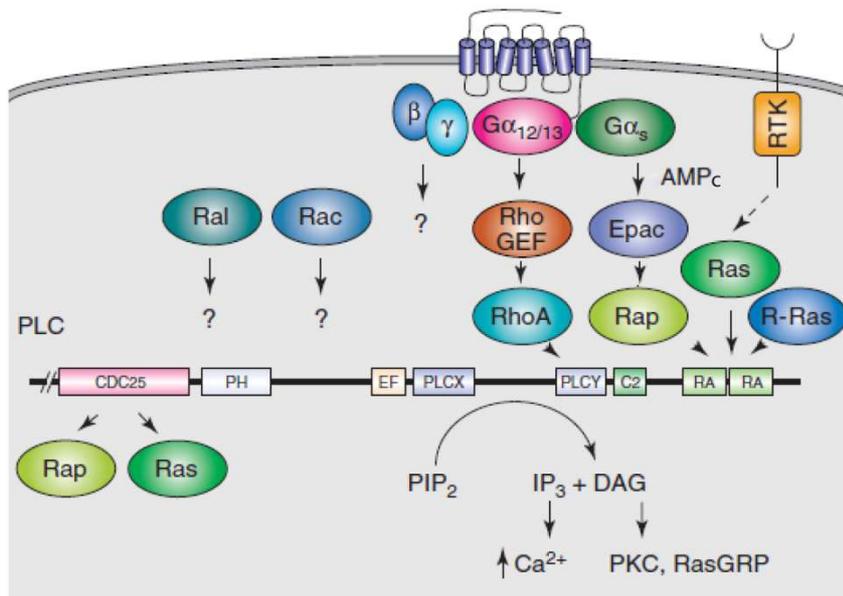


Figura 16. Activación de PLC ϵ mediada por pequeñas GTPasas. Las proteínas Ras, Rap1, Rap2 y R-Ras activas promueven la actividad lipasa de PLC ϵ a través de la interacción con los dominios RA; mientras que RhoA y Ral activas y las subunidades G α y G $\beta\gamma$ activan a PLC ϵ mediante un mecanismo que es independiente de la interacción con el dominio RA. Por otro lado, el dominio CDC25 actúa como un GEF sobre las proteínas Ras y Rap, produciendo nuevamente proteínas activas que van a interactuar

localmente con el dominio RA, generando un mecanismo de retroalimentación que amplifica la señalización mediada por PLC ϵ en sitios subcelulares específicos (Mitin et al., 2005).

Existe un gran número de efectores que son reclutados o activados por Rap-GTP para inducir respuestas biológicas, uno de ellos es PLC ϵ (Raaijmakers and Bos, 2009). Ha sido reportado que Epac estimula específicamente a PLC ϵ a través de la activación de Rap2, resultando en la generación de IP $_3$ y la subsecuente liberación de calcio desde reservorios intracelulares en líneas celulares HEK293 y de neuroblastoma (Schmidt et al., 2001). Este acoplamiento funcional de Epac con PLC puede ser explicado a través de la unión de Rap al dominio RA de PLC ϵ . En cardiomiocitos de ratón, el efecto de Epac en la movilización de calcio intracelular es regulado por receptores β -adrenérgicos y es dependiente de Rap1, PLC ϵ y PKC ϵ (Oestreich et al., 2007, 2009). PLC ϵ es el único efector implicado en respuestas secretorias mediadas por Epac. En células β -pancreáticas se ha descrito una cascada de transducción que comprende a Epac2, Rap1 y PLC ϵ que lleva a la movilización de calcio intracelular y a la potenciación de la liberación de insulina inducida por glucosa (Dzhura et al., 2010, 2011).

Hasta el momento, varias isoformas de PLC han sido implicadas en diferentes procesos de la fisiología espermática. PLC ζ es liberada dentro del ovocito luego de la fusión de las gametas y estimula la señalización intracelular de calcio en el ovocito no fertilizado, llevando a la iniciación del desarrollo embrionario (Nomikos et al., 2013). La isoforma γ ha sido descrita en espermatozoides de ratón formando parte de la cascada que acopla la unión del espermatozoide a la matriz extracelular del ovocito con la exocitosis acrosomal (Tomes et al., 1996). PLC β fue detectada en la región acrosomal de espermatozoides de ratón y relacionada con la vía que conduce a la RA mediante la liberación de calcio intracelular inducida por IP $_3$. Por otro lado, recientemente fue demostrado que PLC γ es activada durante el proceso de capacitación y es necesaria para la despolimerización de F-actina que se produce durante la capacitación, como así también, para la inducción de la exocitosis acrosomal (Finkelstein et al., 2010). Fukami y colaboradores demostraron la participación de una PLC δ 4 en la RA inducida por ZP (Fukami et al., 2001). Asimismo, reportaron que esta isoforma está involucrada en la elevación de calcio sostenida a través de los SOCCs que se produce en respuesta a progesterona y ZP (Fukami et al., 2003). En espermatozoides humanos permeabilizados, la RA inducida por calcio, Rab3A persistentemente activa, 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Branham et al., 2009), DAG y un análogo no hidrolizable (Lopez et al., 2012) es sensible al inhibidor de múltiples PLCs, U73122. Además, 8-pCPT-2-O-Me-AMPC dispara una señal de calcio en poblaciones de células no permeabilizadas y este efecto es abolido por U73122 (Branham et

al., 2009). Estos resultados confirman el rol de una PLC en la vía de señalización activada por AMPc-Epac que conduce a la salida de calcio acrosomal; sin embargo, hasta el momento no ha sido identificada la isoforma involucrada.

15. Cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal

En base a los antecedentes obtenidos por nuestro grupo de trabajo, hemos propuesto una vía de señalización activada por calcio que conduce a la exocitosis del contenido acrosomal cuando los espermatozoides son incubados con diversos inductores o estímulos.

En respuesta a un estímulo, el calcio entra desde el medio extracelular a través de canales ubicados en la membrana plasmática. El incremento de calcio activa directa o indirectamente, el intercambio de GDP por GTP en Rab27. Asimismo, el calcio que ingresa al citoplasma estimula la síntesis de AMPc endógeno por la ACs. El aumento de AMPc intracelular provoca la activación de Epac y, a partir de este punto, la cascada de señalización se divide en dos ramas. En una de ellas, Epac cataliza el intercambio de GDP por GTP en Rap y en la otra Epac participa indirectamente en la activación de Rab3A. La activación de Rap1 induce la síntesis de IP₃ a través de la estimulación de una PLC. Este incremento en los niveles de IP₃ provoca la salida de calcio desde el reservorio acrosomal a través de canales activados por IP₃ presentes en la membrana acrosomal externa. Por otra parte, la activación indirecta de Rab3 desencadena el *tethering* del acrosoma con la membrana plasmática. Durante o como consecuencia del *tethering* se inicia la activación y/o reclutamiento de PTP1B, quien desfosforila y activa a NSF. Posteriormente, NSF/ α -SNAP y otras proteínas participan en el ensamblaje de las proteínas SNAREs, lo cual lleva al anclaje del acrosoma a la membrana plasmática. Finalmente, tanto la salida de calcio acrosomal como el ensamblaje de las SNAREs, convergen para desencadenar los pasos finales de la fusión de membranas (Figura 17).

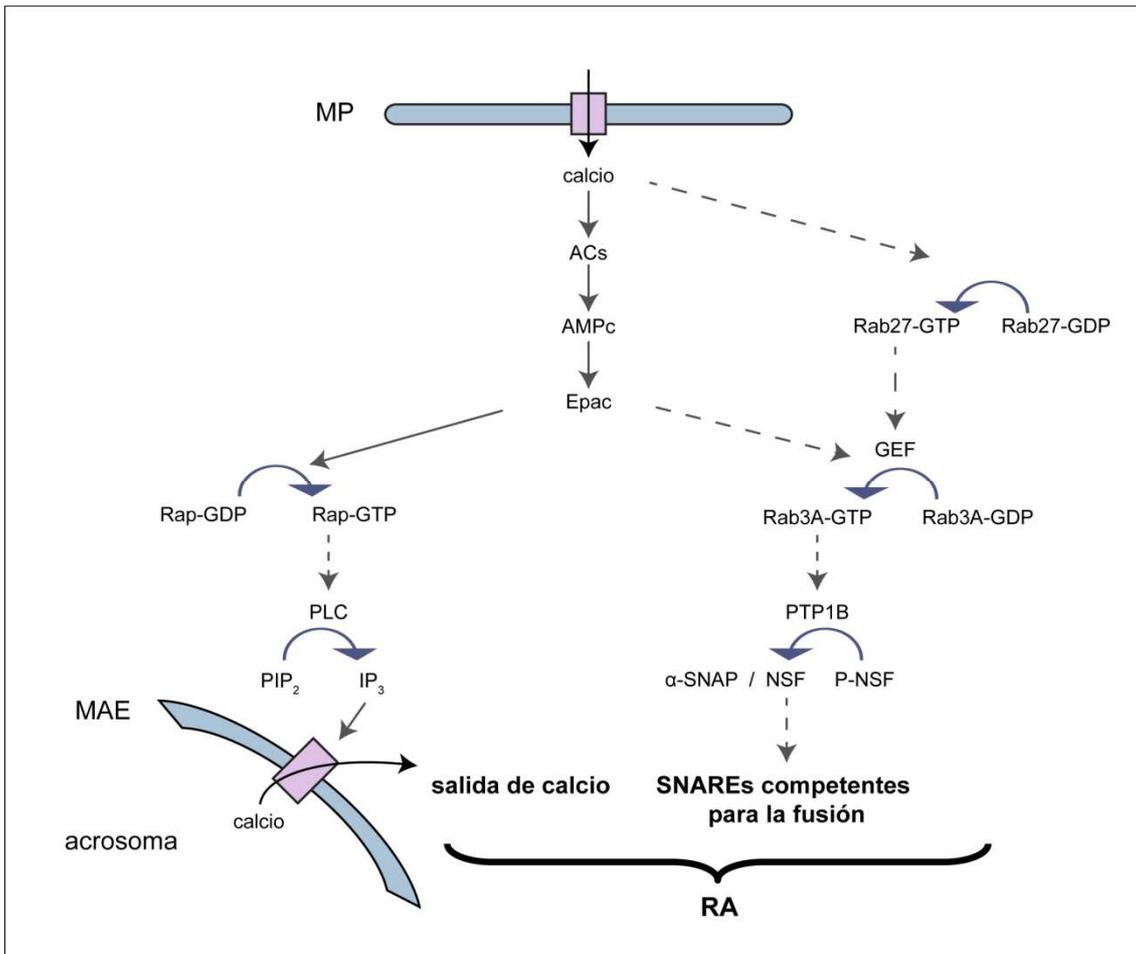


Figura 17. Modelo de las vías de señalización que conducen a la RA. El calcio ingresa a la célula a través de canales activados por progesterona o a través de los poros generados por la SLO. El incremento de calcio citosólico activa la ACs. Calcio también estimula –directa o indirectamente- el intercambio de GDP por GTP en Rab27. El AMPc sintetizado por la ACs activa a Epac y, a partir de este punto, la vía de señalización se divide en dos ramas. Una de las vías está encabezada por la activación directa de Rap por Epac y conduce a la activación de una PLC y consecuente producción de IP_3 . El IP_3 generado induce la liberación del calcio intracelular a través de canales operados por IP_3 presentes en la membrana acrosomal externa. La otra rama conduce a la activación indirecta de Rab3A, lo cual lleva al tethering de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Posteriormente, PTP1B es activada y/o reclutada y conduce a la desfosforilación y activación de NSF. NSF/ α -SNAP dejan a las SNAREs competentes para la fusión. El paso catalizado por las SNAREs activas converge con el incremento local de calcio proveniente del acrosoma para conseguir finalmente la fusión entre la membrana acrosomal externa y la plasmática. MAE, membrana acrosomal externa, MP, membrana plasmática. Las flechas sólidas significan que existe un paso entre las vías implicadas, mientras que las flechas punteadas indican que el número de pasos entre ellas es desconocido (esquema modificado de Ruete et al., 2014).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

1. Hipótesis

1. El AMPc es una molécula fundamental para múltiples eventos de la fisiología espermática. En espermatozoides humanos permeabilizados el AMPc agregado exógenamente y la inhibición farmacológica de PDEs estimulan la RA. Asimismo, hemos demostrado que calcio requiere AMPc para estimular la exocitosis y que la inhibición de la ACs bloquea la RA disparada por varios inductores. Basados en estos precedentes, sugerimos que ***el AMPc tiene un rol regulatorio central sobre la rama movilizadora de calcio y la rama proteica de fusión que convergen para conseguir la exocitosis del acrosoma.***

2. AMPc y Epac están implicados en la cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal. Además, también ha sido establecido que Epac es un GEF para las proteínas Rap. En base a estos antecedentes proponemos que ***Rap1 es activada por diversos inductores de la RA a través de una vía dependiente de AMPc/Epac.***

3. La movilización de calcio acrosomal es fundamental para que se produzca la RA. Además, datos previos indican que 8-pCPT-2-O'-Me-AMPc induce un incremento transitorio de calcio interno en espermatozoides, el cual es bloqueado cuando las células son incubadas en presencia de un inhibidor de PLC. Asimismo, la movilización de calcio acrosomal inducida por calcio externo se inhibe al incubar los espermatozoides con bloqueantes que actúan a nivel de la ACs o Epac. Por otra parte, en otros sistemas secretorios ha sido descrito que la vía Epac-Rap-PLC ϵ moviliza calcio a partir de reservorios intracelulares. En base a estos antecedentes proponemos que ***el reservorio de calcio acrosomal se vacía en respuesta a la vía AMPc \rightarrow Epac \rightarrow Rap1 \rightarrow PLC ϵ \rightarrow IP₃.***

2. Objetivo general

La exocitosis es un proceso complejo y altamente regulado que comprende un gran número de componentes que se generan y destruyen, asocian y disocian de manera secuencial y transiente, originando una serie de etapas definibles bioquímica, morfológica, cinética o funcionalmente. El objetivo de esta tesis es definir el rol del AMPc en las etapas tardías de la cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos.

3. Objetivos específicos

1. Generar una herramienta que permita capturar el AMPc de espermatozoides. En espermatozoides humanos el AMPc tiene un rol fundamental en la cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal. Herramientas farmacológicas como análogos permeables de AMPc e inhibidores de PDEs y ACs han permitido establecer un rol positivo de este segundo mensajero en la RA. Sin embargo, una prueba irrefutable de que este evento es mediado por AMPc sólo puede conseguirse si la exocitosis del acrosoma es abolida cuando el AMPc endógeno no se encuentra disponible. Nos proponemos resolver esta limitación mediante la expresión y purificación en bacterias de una proteína recombinante permeable (esponja de AMPc) que tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática y capturar el AMPc endógeno. Analizaremos su incorporación a espermatozoides humanos mediante Western blot e inmunofluorescencia indirecta. Es esperable que la proteína diseñada ingrese eficientemente a las células.

2. Establecer la influencia de la esponja de AMPc en los fenómenos de la fisiología espermática en los que está involucrado el AMPc. El AMPc ha sido implicado en procesos fundamentales de la fisiología espermática tales como la capacitación, motilidad hiperactivada y RA. En respuesta a un estímulo específico, se produce un incremento de los niveles de AMPc endógeno que lleva a la activación de distintos componentes de cascadas de señalización involucradas en estos procesos. Nos proponemos comprobar si la esponja de AMPc es capaz de capturar el AMPc endógeno mediante el análisis de su efecto en diversos fenómenos del espermatozoide en los que se hipotetiza, se sabe o se quiere investigar si está involucrado el AMPc. Para ello realizaremos ensayos funcionales, Western blot y microscopía electrónica. Esperamos que la esponja de AMPc ingrese, capture el AMPc endógeno disponible y esto influya en los procesos analizados.

3: Identificar el lugar específico de la cascada donde se requiere el AMPc y establecer una conexión con la movilización de calcio y la maquinaria proteica que interviene en la exocitosis regulada. En la cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal, se ha propuesto que en respuesta a la entrada de calcio se activa una ACs quien sintetiza AMPc. Asimismo, sabemos que la activación de Epac con un análogo de AMPc selectivo pone en marcha dos ramas de la vía de señalización: una que conduce a la salida de calcio desde el reservorio acrosomal y la otra que lleva al ensamblaje de la maquinaria proteica de fusión. Con el fin de determinar de manera directa el sitio específico de la cascada donde es requerido el AMPc endógenamente sintetizado y establecer su conexión con ambas ramas de la vía de

señalización, analizaremos el efecto de la incubación de los espermatozoides con la esponja de AMPc sobre varios estadios de las mismas. Para ello, nos valdremos de ensayos funcionales, de determinaciones del estado de activación de GTPasas monoméricas por microscopía de fluorescencia y de mediciones de las fluctuaciones en los niveles de calcio acrosomal en ensayos de célula única por microscopía confocal. Esperamos comprobar que ambas ramas de la vía de señalización son afectadas como consecuencia de la carencia de AMPc.

4. Desentrañar la vía de señalización en la cual se encuentra implicada la proteína Rap1. La cascada de señalización que conduce a la salida de calcio acrosomal estaría encabezada por la activación mediada por Epac de la proteína Rap1. El estímulo de espermatozoides con 8-pCPT-2-O-Me-AMPc activa a Rap1, sin embargo, no se conocen suficientes detalles de la vía de señalización en la que se encuentra involucrada esta activación. Además, Rap1-GTP es necesaria para que se produzca la exocitosis del acrosoma. Nos proponemos desarrollar un método basado en las técnicas de far Western blot e inmunofluorescencia indirecta que permita detectar y cuantificar el estado de activación de Rap1, como así también su localización subcelular. Una vez estandarizada la técnica, pretendemos indagar las vías en las que está involucrada esta activación. Esperamos encontrar que Rap1 se activa en una población sustancial de células en respuesta a inductores de la RA, mostrando una localización consecuente con el rol de esta proteína en la exocitosis acrosomal. Además, creemos que esta activación será dependiente de Epac e independiente de PKA.

5. Identificar la PLC involucrada en la vía de señalización que lleva a la salida de calcio acrosomal durante la RA. En la cascada de señalización que conduce a la RA ha sido descrito el rol de una PLC y propuesto que su actividad regula la salida de calcio desde el reservorio acrosomal. Asimismo, en otros tipos celulares la exocitosis dependiente de AMPc conduce a la movilización de calcio a partir de reservorios internos a través de una vía que involucra a Epac, Rap y PLCε. En base a estos antecedentes pretendemos determinar si la isoforma épsilon se encuentra presente en espermatozoides humanos y si está involucrada en la cascada de señalización activada por Epac-Rap1 que conduce a la salida de calcio acrosomal. Evaluaremos la presencia de esta isoforma mediante Western blot e inmunofluorescencia y posteriormente analizaremos su rol en la exocitosis acrosomal mediante ensayos funcionales y mediciones de fluctuaciones en la concentración de calcio intra-acrosomal en tiempo real. Esperamos encontrar a PLCε en los espermatozoides formando parte de la rama de señalización que conduce a la salida de calcio acrosomal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos

La estreptolisina O (SLO) recombinante se compró al Dr. Bhakdi (Universidad de Mainz, Mainz, Alemania). Polivinilpirrolidona (PVP) y guanosina 5'-(β -tio)-difosfato sal disódica (GDP- β -S) fueron comprados a ICN Biochemicals (Representante local Eurolab S.A. Buenos Aires, Argentina). Albúmina sérica bovina, poli-L-lisina, la lectina *Pisum sativum* conjugada al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC), tritón X-100, Mowiol 4-88, 1,2-dioctanoil-sn-glicerol, guanosina 5'-(γ -tio)-difosfato sal trilitio (GTP- γ -S) y progesterona se compraron a Sigma-Aldrich™ (Buenos Aires, Argentina). EGTA-AM, *O*-nitrofenil EGTA-acetoximetil ester (NP-EGTA-AM), BAPTA-AM y Fluo3-AM de Molecular Probes se obtuvieron de Invitrogen (Buenos Aires, Argentina). 2- aminoetoxi-difenilborato (2APB) y A23187 fueron comprados a Calbiochem (Merck Química Argentina S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, N6-benzoiladenosin-3'-5'- monofosfato cíclico (6-Bnz-AMPC) y KH7 fueron comprados a BioLog-Life Science Institute (Bremen, Alemania). H89 (N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolina-sulfonamida) se obtuvo de LC Laboratories (Woburn, Massachusetts, Estados Unidos). Los marcadores de peso molecular fueron de Boston BioProducts Inc (Worcester, Massachusetts, Estados Unidos). La resina de glutatión-sefarosa fue de GE Healthcare (Buenos Aires, Argentina) y la resina de Ni-NTA-agarosa fue de Qiagen (Hilden, Alemania). Todos los reactivos de microscopía electrónica fueron de Pelco (Ted Pella, California, Estados Unidos). Todos los demás reactivos fueron de Genbiotech o TecnoLab (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada fue de calidad analítica (18 M Ω .cm a 25°C).

1.2. Anticuerpos

El anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (IgG purificada) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina (clon 4G10) se obtuvieron de Millipore (Massachusetts, Estados Unidos). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-His₆ (IgG2a purificada) se obtuvo de GE Healthcare. El anticuerpo policlonal de conejo anti-PLC ϵ 1 (ARP50613_P050) fue comprado en Aviva Systems Biology (San Diego, California, Estados Unidos). El anticuerpo policlonal de conejo anti- α -tubulina fue comprado en Synaptic Systems (Göttingen, Alemania). El anticuerpo policlonal de conejo anti-Epac fue generado por Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, California, Estados Unidos) utilizando el péptido sintético LREDNCHFLRVDK como inmunógeno y como ligando para su purificación por afinidad (Branham et al., 2006). El anticuerpo policlonal de conejo anti-Rap1 fue generado utilizando el péptido sintético

EDERVVGKEQGQNLG y purificado por afinidad por GenScript Corporation (Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos) (Branham et al., 2009). El anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la peroxidasa de rábano picante (IgG, H+L) se compró en Kierkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). El anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP), el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy™3 y el anticuerpo de cabra anti- conejo conjugado con Cy™3 (IgGs, H+L) se compraron en Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pensilvania, Estados Unidos).

1.3. Plásmidos

Una versión modificada (permeable y para expresar en *E.coli*) de la esponja de AMPc (Lefkimmatis et al., 2009) fue sintetizada por Genscript (Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos). El ADN que codifica para los aminoácidos 132 a 381 de la subunidad regulatoria I β de la PKA humana fue optimizado para su expresión en bacterias. El inserto fue subclonado con la secuencia TAT del virus de HIV (RKKRRQRRR) para la transducción de la proteína en un vector pET28a(+) en el sitio de clonado HindIII-BamHI. También fue sintetizada una versión mutante de la esponja para ser utilizada como control negativo. Esta versión mutante es incapaz de unir AMPc ya que presenta 4 mutaciones puntuales (E202G, R211G, E226G, R335G) en los sitios de unión del AMPc. Sin embargo, tras muchos intentos de purificar la proteína mutante, utilizando diversas condiciones y tratamientos, no tuvimos éxito por lo que no pudo ser utilizada como control negativo de los experimentos con la esponja de AMPc. En consecuencia, diseñamos un control alternativo para probar la especificidad de la esponja preincubando la proteína con un análogo de AMPc y revirtiendo su efecto inhibitorio sobre la exocitosis acrosomal en células estimuladas con progesterona (ver sección 2.2 de Resultados).

El ADN copia (ADNc) que codifica para His₆-TAT-Rab27A se sintetizó de novo en el plásmido pUC por GenScript. El inserto generado se subclonó en un vector pET28a+ (Stratagene, La Jolla, California; distribuido por GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina) siguiendo procedimientos estándar. El plásmido de expresión pQE80L (Qiagen) que contiene el ADNc que codifica una versión permeable a membranas de la Rab3A humana que contiene una mutación puntual Q81L (R-Rab3A, (Lopez et al., 2007)) fusionada con el péptido His₆ fue cedido por la Dra. C. López (Universidad de Cuyo, Mendoza, Argentina). El ADNc que codifica para el dominio RBD (del inglés *Rab binding domain*) de la proteína RIM de rata (aminoácidos 11-398; (Coppola et al., 2002)) inserto en el plásmido pGEX-2p, fue cedido por el Dr. R. Regazzi (Universidad de Lausanna, Lausanna, Suiza). El ADNc que codifica para el dominio SHD de Slac2-b (del inglés *synaptotagmin-like protein homology domain*; aminoácidos 1-79; (Kondo et

al., 2006)) inserto en el plásmido pGEX-2T se obtuvo del Dr. R. Shirakawa (Universidad de Kioto, Kioto, Japón). El plásmido pQE3 (Qiagen) que codifica para la cadena liviana de la toxina botulínica B (BoNT/B) fusionada con el péptido His₆ fue cedido por el Dr. T. Binz (Facultad de Medicina de Hannover, Hannover, Alemania). El cassette de unión a Rap1-GTP, Ral-GDS-RBD unido a GST (van Triest et al., 2001) fue provisto por el Dr. O. Coso (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).

2. MÉTODOS

2.1. Espermatozoides

2.1.1. Preparación de los espermatozoides

2.1.1.1. *Swim-up* y *capacitación*

Muestras de semen humano obtenidas a partir de donantes voluntarios sanos fueron procesadas de acuerdo a un protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (se adjunta al final del manuscrito el certificado de aprobación). Las muestras de semen se incubaron a 37°C durante 30-60 min, hasta lograr su licuefacción. Posteriormente, se colocaron 800 µl de medio HTF (*human tubal fluid*, 5,94 g/L NaCl, 0,35 g/L KCl, 0,05 g/L MgSO₄-7 H₂O, 0,05 g/L KH₂PO₄, 0,3 g/L CaCl₂-H₂O, 2,1 g/L NaHCO₃, 0,51 g/L D-glucosa, 0,036 g/L piruvato de Na, 2,39 lactato de Na, 0,06 g/L penicilina, 0,05 g/L estreptomina, 0,01 g/L rojo fenol) suplementado con BSA 0,5% final (HTF/BSA) en tubos de plástico de 5 ml y luego se adicionaron 300 µl de muestra en el fondo de cada tubo. Los tubos se incubaron inclinados en ángulo de 45°C durante 1 hora, en estufa a 37°C con 95% de aire/ 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo, se recolectó la fase superior con la fracción mótil de espermatozoides.

La concentración de espermatozoides recuperada del swim-up se estimó en cámara de Makler contando al microscopio de campo claro. Las células recuperadas fueron ajustadas a una concentración de 10 x10⁶ células/ml con medio HTF/BSA. Luego se incubó durante 2 horas adicionales en las mismas condiciones de temperatura y oxigenación, completando un tiempo total de capacitación de al menos 3 horas. En el caso de los experimentos realizados para medir fosforilación de proteínas durante la capacitación, las células fueron incubadas durante 4 horas, consiguiendo un tiempo total de capacitación de 5 horas. En experimentos con células no capacitadas, los espermatozoides fueron recuperados por swim-up con HTF sin BSA, se ajustó su concentración a 10 x10⁶ células/ml y se incubó durante 4 horas.

2.1.2. Ensayos de reacción acrosomal (RA)

2.1.2.1. Ensayo de RA en células sin permeabilizar

Células capacitadas fueron lavadas por centrifugación a 3.018 x g durante 2 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en un volumen de HTF y se dividieron en alícuotas de 50 μ l a las que se agregaron los diferentes reactivos a estudiar incubando durante 15 minutos a 37°C luego de cada adición. Para los experimentos de inhibición con la esponja de AMPc, se agregaron concentraciones crecientes de la esponja y luego se adicionó progesterona 15 μ M o A23187 10 μ M, incubando durante 15 minutos a 37°C luego de cada adición.

Al finalizar las incubaciones, las células fueron centrifugadas a 6.160 x g durante 2 minutos y el sobrenadante fue descartado. Finalmente, las células se resuspendieron en metanol frío e incubaron en hielo durante 10 minutos. Se sembraron 10 μ l de cada condición en portaobjetos excavados (teflón-printed slides) y se secaron al aire.

2.1.2.2. Ensayo de RA en células permeabilizadas con SLO

Células capacitadas fueron lavadas dos veces con PBS frío, centrifugando a 6.160 x g durante 2 min cada vez. Posteriormente, los espermatozoides fueron resuspendidos en un volumen de PBS e incubados en presencia de SLO (3 U/ml) durante 15 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas con PBS, centrifugando a 6.160 x g durante 2 min y resuspendidas en un volumen de medio HB-EGTA frío (20 mM Hepes-K, pH 7, 250 mM sacarosa, 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT). Una vez permeabilizadas, las células fueron divididas en alícuotas de 50 μ l y se agregaron los inhibidores y/o inductores secuencialmente como se indica en las leyendas de las figuras, incubando durante 8-15 minutos a 37°C luego de cada adición.

En el caso de los experimentos realizados con el quelante de calcio fotosensible NP-EGTA-AM, células permeabilizadas con SLO se cargaron con NP-EGTA-AM durante 10 min a 37°C antes de ser incubadas con los inhibidores y/o el inductor (CaCl_2 0,5 mM). Todos los pasos fueron llevados a cabo en oscuridad. Inmediatamente después de la última incubación, se indujo la fotólisis exponiendo las células dos veces (1 minuto cada vez) en un transiluminador U.V. (FBTIV-614, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos) y luego se incubó durante 5 minutos adicionales a 37°C.

Al finalizar las incubaciones, se sembraron 10 μ l de cada condición en portaobjetos excavados (teflón-printed slides) y las células se fijaron por secado al aire.

2.1.2.3. Determinación del porcentaje de RA

Las muestras sembradas en los portaobjetos, se permeabilizaron con metanol frío durante 20 segundos y se tiñeron con 10 µl de lectina PSA-FITC (25 µg/ml en PBS) en cámara húmeda durante 40 min a temperatura ambiente en oscuridad. La lectina PSA acoplada a FITC tiene la capacidad de unirse a residuos de manosa presentes en la matriz acrosomal permitiendo la detección de células con sus acrosomas intactos mediante observación por microscopía de fluorescencia (Mendoza et al., 1992). El exceso de lectina se lavó con agua destilada durante 20 minutos en cubeta Coplin y los portaobjetos se almacenaron en la oscuridad hasta posterior evaluación de la RA. Se contaron al menos 200 células clasificándolas en “reaccionadas” o “no reaccionadas” de acuerdo al patrón de tinción de las mismas en el microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot II con un objetivo de inmersión 63x.

Los controles basal (“control”, sin estimulación) y positivo (“calcio”, CaCl_2 0,5 mM; “Pg”, progesterona 15 µM, A23187 10 µM u “8pCPT”, 8-pCPT-2-O-Me-AMPC 50 µM) se incluyeron en todos los experimentos. La concentración de CaCl_2 0,5 mM, corresponde a 10 µM de calcio libre en HB-EGTA estimado por MAXCHELATOR, una serie de programa(s) para determinar la concentración de metales libres en presencia de quelantes; disponible en <http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html> (Chris Patton, Universidad de Stanford, Standord, California, Estados Unidos). Los valores de índice de RA o exocitosis acrosomal relativa se calcularon sustrayendo el número de espermatozoides espontáneamente reaccionados de todos los valores y expresando el resultado como un porcentaje de RA comparado con el control positivo (considerado como 100%). Solamente se incluyeron en los análisis los resultados de experimentos donde se producen respuestas similares y en donde las diferencias entre los controles basal y estímulo son al menos de ocho por ciento antes de normalizar. Las muestras con alto porcentaje de células reaccionadas (mayor al 30%) se excluyeron del análisis. Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5, se utilizó el test de Tukey-Kramer post hoc para pares de comparaciones. Las diferencias se consideraron significativas cuando P fue menor a 0,05.

2.2. Proteínas recombinantes

2.2.1. Expresión de proteínas recombinantes

Los ADNc que codifican para GST y las proteínas fusionadas a GST se transformaron en *E.coli* BL21(DE3) T1R. Alícuotas de los glicerol stocks de cada cultivo se inocularon en 2 ml de medio LB conteniendo 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, los cultivos fueron expandidos en 100 ml de medio LB líquido durante 3 horas a 37°C. La expresión de las proteínas GST-Slac2-b y GST se indujo con 0,5 mM isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG) por 3 horas a 37°C. En el caso de los dominios GST-RIM-RBD-GST y Ral-GDS-RBD-GST las condiciones de inducción fueron de 0,5 y 0,1 mM IPTG respectivamente durante toda la noche a 22°C. Finalmente, los cultivos fueron centrifugados a 2.885 x g durante 30 minutos y los pellets de bacterias congelados a -20°C hasta su uso.

Los plásmidos que codifican para las proteínas acopladas a His₆ fueron transformados en cepas de *E.coli* BL21(DE3) T1R. Alícuotas de los glicerol stocks de cada proteína se inocularon en 2 ml de medio LB líquido conteniendo 30 µg/ml de kanamicina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, los cultivos fueron expandidos en 100 ml de medio LB líquido durante 3 horas a 37°C. Las proteínas His₆-Rab27A, His₆-Rab3A fueron expresadas mediante la inducción con 0,5 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C y la esponja de AMPc fue expresada mediante la inducción con 0,5 mM de IPTG durante toda la noche a 22°C. El plásmido que codifica para BoNT/B fue transformado en *E.coli* M15pRep4 y la expresión de la proteína fue inducida durante 4 horas a 30°C con 1 mM de IPTG. Finalmente, los cultivos fueron centrifugados a 2.885 x g durante 30 minutos y los pellets obtenidos congelados a -20°C hasta su uso.

2.2.2. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST

Las proteínas acopladas a GST fueron purificadas mediante el protocolo estándar de lisis y purificación por cromatografía de afinidad en glutatión-sefarosa. Los pellets congelados obtenidos a partir de 100 ml de cultivos inducidos para la expresión de proteínas fueron resuspendidos en 5 ml de buffer de lisis GST (PBS pH 7,4, DTT 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)) y sonicados 2 veces 15 segundos a 20 Hertz. Luego, se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20.817 x g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de GST-sefarosa durante 1 hora a 4°C (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La resina con la proteína pegada se lavó 2 veces con 1 ml de PBS y 1 vez en 1 ml de Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 120 mM. Posteriormente, las proteínas fueron eluidas en alícuotas de 50 µl de buffer de

elución (Tris HCl 100 mM pH8, NaCl 120 mM, glutatión reducido 20 mM). Los eluidos obtenidos fueron conservados a -80°C con 20% de glicerol.

2.2.3. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a His₆

Las proteínas acopladas al tag de 6 histidinas fueron purificadas mediante el protocolo estándar de lisis y purificación con la resina de afinidad Ni-NTA-agarosa (Qiagen). Los pellets congelados obtenidos a partir de 100 ml de cultivos inducidos para la expresión de proteínas fueron resuspendidos en 5 ml de buffer de lisis (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 10 mM, un cóctel conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma P2714)) y sonicados 2 veces 15 segundos a 20 Hertz. Luego, se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente, centrifugado a 20.817 x g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de Ni-NTA-agarosa durante 1 hora a 4°C (se utilizó 1 ml de resina por cada 10 ml de lisado clarificado). La resina con la proteína pegada se lavó 3 veces con 1 ml de buffer de lavado (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 50m M) y posteriormente, las proteínas fueron eluidas en alícuotas de 150 µl de buffer de elución (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 200mM, imidazol 250mM). La esponja de AMPc fue eluída con el buffer de elución con 400 mM de imidazol y los eluidos obtenidos fueron filtrados en columnas de Sephadex G25 equilibradas con PBS/BSA 0,1% para eliminar el imidazol. Los eluidos fueron conservados a -80°C con 20% de glicerol.

2.2.4. Ensayos de protección a tripsina para verificar la incorporación de la esponja de AMPc a espermatozoides humanos

2.2.4.1. Calibración de la concentración de tripsina

720 ng de la esponja de AMPc (equivalente a 1 µM en los 200 µl utilizados en los ensayos de incorporación) fueron incubados con distintas concentraciones de tripsina (0 a 100 µg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 20 µl de SB reductor y las muestras se hirvieron durante 3 minutos a 100°C. Las muestras procesadas se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y se analizaron por Western blot usando el anticuerpo anti-His₆ como sonda (ver más abajo).

2.2.4.2. Tratamiento de las muestras para Western blot

Espermatozoides capacitados (10 x 10⁶ células/ml) se lavaron una vez con HTF centrifugando a 3.018 x g por 2 min y se resuspendieron en 200 µl de HTF (20 x 10⁵ células por

condición). Posteriormente, las células fueron incubadas con la esponja de AMPc (1 μ M final) durante 15 minutos a 37°C y luego tratadas con 0,1 (control negativo) o 1 μ g/ml de tripsina durante 20 minutos a 37°C para favorecer la proteólisis de la proteína no incorporada. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 1.540 x g durante 3 minutos y resuspendidas en 60 μ l de sample buffer (SB) (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (p/vol), glicerol 10% (p/vol) y azul de bromofenol 0.05%) no reductor. Los sobrenadantes (con las proteínas no incorporadas) se recuperaron, se precipitaron con metanol/cloroformo/agua y se resuspendieron en 60 μ l de SB reductor (SB con β -mercapto etanol 5% (vol/vol)). Las muestras procesadas se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y se analizaron por Western blot usando el anticuerpo anti-His₆ como sonda (ver más abajo).

2.2.4.3. Tratamiento de las muestras para inmunofluorescencia indirecta

Espermatozoides capacitados (10 x 10⁶ células/ml) se lavaron una vez con HTF centrifugando a 3.018 por 2 min y se resuspendieron en 50 μ l de HTF (5 x 10⁵ células por condición). Posteriormente, las células fueron incubadas con la esponja de AMPc (1 μ M final) durante 15 minutos a 37°C y luego tratadas con 1 μ g/ml de tripsina durante 20 minutos a 37°C para favorecer la proteólisis de la proteína no incorporada. Luego del proceso de digestión, las células fueron centrifugadas a 6.160 x g, fijadas en paraformaldehído al 2% y se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia indirecta (ver más abajo).

2.2.5. Isoprenilación de proteínas Rabs *in vitro*

Las proteínas recombinantes His₆-Rab3A y His₆-Rab27A se isoprenilaron en fase sólida, siguiendo un ensayo desarrollado en nuestro laboratorio. Brevemente, 10-20 μ M de proteínas Rabs inmovilizadas en Ni-NTA-agarosa se incubaron en una mezcla de geranilgeranilación (80 μ M geranilgeranil pirofosfato, 200 μ M GDP, 1 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 1 mg/ml de BSA, 1 mg/ml de citosol de cerebro bovino como fuente de Rab geranilgeranil transferasa (RGGT) y Rab escort protein (REP), inhibidores de proteasas y 20 mM Hepes-K, pH 7) durante 2 horas a 37°C. Luego de la incubación, se adicionaron cuatro volúmenes de buffer de lavado (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 50 mM) usado durante la purificación de las proteínas fusionadas a His₆ y se incubó la mezcla durante 30 minutos a 4°C (este paso favorece el pegado de aquellas Rabs preniladas que se habían disociado de la resina). La resina se lavó tres veces con buffer de lavado y las Rabs geranilgeraniladas se eluyeron con buffer de elución (300 mM NaCl, 400 mM imidazol, 20 mM TrisHCl, pH 7,4).

2.2.6. Activación de proteínas Rabs

Las proteínas Rab3A y Rab27A fueron cargadas con 0,125 mM de los nucleótidos GTP- γ -S o GDP- β -S en buffer de activación (Hepes-K 50 mM pH 7,2, MgCl₂ 5 mM, Igepal 0,03%, DTT 1 mM y EDTA 25 mM) durante 1 hora a 37°C. Luego, las proteínas fueron separadas de los nucleótidos libres mediante filtración en columnas de Sephadex G25 equilibradas con PBS/BSA 0,1%. Una vez filtradas, se les agregó MgCl₂ 1 mM y se conservaron a -20°C hasta su uso.

2.3. Determinaciones inmunológicas

2.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Espermatozoides capacitados (50 μ l, 5 x 10⁵ células por condición) se lavaron con HTF y se fijaron con paraformaldehído 2% (PAF 2%) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron centrifugados a 6.160 x g y el pellet resuspendido en glicina 100 mM en PBS pH 7,2 para neutralizar el fijador. Posteriormente, las células se pegaron en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (1 μ l stock 0,1% p/v Sigma, diluída en 20 μ l de agua milliQ) durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los espermatozoides se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0,1% PVP (PBS/PVP). Posteriormente, se incubó con BSA 5% en PBS/PVP durante 1 hora a 37°C para bloquear los sitios inespecíficos y luego se realizó una inmunotinción con los anticuerpos primarios anti-His₆ de ratón (4 μ g/ml en BSA 3% en PVS-PVP) (este anticuero se utilizó para la detección de la esponja de AMPc) o anti-PLC ϵ de conejo (10 μ g/ml en BSA 3% en PVS-PVP) durante 1 hora a 37°C. Las células fueron lavadas 3 veces en PBS-PVP durante 6 minutos y luego teñidas con los anticuerpos secundarios acoplados al colorante Cy3 (2,5 μ g/ml en BSA 1% en PBS/PVP) durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-PVP de 6 minutos cada uno las células se permeabilizaron con metanol durante 20 segundos y se teñieron con la lectina PSA-FITC para evaluación del estado acrosomal. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS-PVP 0,1% durante 10 minutos, montados en portaobjetos con Mowiol 4-88 con Hoechst 33342 2 μ M y almacenados a temperatura ambiente en oscuridad. La observación de los preparados se llevó a cabo en un microscopio Nikon Eclipse TE-2000 equipado con un objetivo de inmersión Plan Apo 40x/1,40 y una cámara digital Hamamatsu C4742-95 operada con el programa MetaMorph 6,1 (Universal Imaging Corp., USA). Finalmente, se sustrajo el ruido de fondo y se ajustó el brillo/contraste con el programa Image J (software libre del N.I.H., imagej.nih.gov/ij/) para obtener patrones de tinción de todo o nada.

2.3.1.1. Calibración de la técnica “Far-inmunofluorescencia indirecta” para detectar Rap1-GTP

Espermatozoides capacitados permeabilizados con SLO (50 μ l, 5×10^5 células por condición) fueron incubados durante 10 min a 37°C con 2-APB 100 μ M (bloqueante de canales de calcio sensibles a IP_3 que inhibe la salida de calcio acrosomal) para inhibir la exocitosis e impedir la pérdida de membranas. Posteriormente, las células fueron incubadas con EDTA 5 mM/ $MgCl_2$ 1 mM (Burstein and Macara, 1992) durante 10 min a 37°C con el fin de liberar los nucleótidos endógenos de las proteínas G. Las células se cargaron con GDP- β -S o GTP- γ -S 40 μ M durante 10 minutos a 37°C y los nucleótidos unidos se estabilizaron con $MgCl_2$ 15 mM por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con PAF 2% durante 15 min a temperatura ambiente, neutralizadas con glicina 100 mM en PBS pH 7,2 y pegadas a cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Se llevó a cabo una permeabilización con Tritón X-100 0,1 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces (6 minutos cada vez) con PBS/PVP 0,1% y los sitios inespecíficos se bloquearon con BSA 5% en PBS/PVP durante 1 hora a 37°C. A continuación, los espermatozoides fueron incubados con las proteínas GST o Ral-GDS-RDB-GST 140 nM en BSA 3% en PBS/PVP durante 1 hora a 37 °C y se lavaron tres veces (6 minutos cada vez con PBS/PVP). Se realizó un inmunomarcado con el anticuerpo primario de conejo anti-GST (31,5 μ g/ml en BSA 3% en PBS/PVP) durante 1 hora a 37°C y luego se realizaron 3 lavados de 6 minutos cada uno con PBS/PVP. Las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Cy3 (2,5 μ g/ml en BSA 1%) durante 1 hora a 37°C, luego se lavó 3 veces con PBS/PVP durante 6 minutos y se continuó como se describe en el protocolo de “Inmunofluorescencia indirecta”. Finalmente, se contaron manualmente entre 100 y 200 células con tinción positiva en la región acrosomal observando al microscopio de fluorescencia. Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5.

2.3.1.2. “Far-inmunofluorescencia indirecta” en espermatozoides sin permeabilizar

Espermatozoides capacitados (50 μ l, 5×10^5 células por condición) fueron incubados con 2-APB 100 μ M 10 minutos a 37°C, tratados con inhibidores (cuando corresponde) durante 15 minutos a 37°C y luego estimulados con A23187 10 μ M o progesterona 15 μ M durante 15 minutos más. Una vez finalizadas las incubaciones, las células fueron fijadas en suspensión con PAF 2% durante 15 minutos y neutralizadas con glicina 100 mM en PBS pH 7,2. Posteriormente, los espermatozoides fueron pegados a cubreobjetos con polilisina, permeabilizados con Tritón X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y

bloqueados con BSA 5% en PBS-PVP durante 1 hora a 37°C. Luego, se incubaron con las proteínas recombinantes Ral-GDS-RDB-GST 140 nM, RIM-RBD-GST o Slac2b-SHD-GST 140 nM en BSA 3% en PBS-PVP durante 1 hora a 37°C y se realizaron 3 lavados con PBS/PVP de 6 minutos cada uno. La inmunotinción fue llevada a cabo incubando con el anticuerpo primario anti-GST de conejo (31,5 µg/ml en BSA 3%) durante 1 hora a 37°C y luego con el anticuerpo secundario anti-rabbit Cy3 (2,5 µg/ml en BSA 1%) durante 1 hora a 37°C. Se continuó como se describe en el protocolo de “Inmunofluorescencia indirecta”. Finalmente, se contaron manualmente entre 100 y 200 células con tinción positiva en la región acrosomal observando al microscopio de fluorescencia. Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5.

2.3.2. Western blot

2.3.2.1. Obtención de extractos de espermatozoides humanos

Espermatozoides capacitados (100×10^6 células) se lavaron dos veces con PBS y luego se lisaron en 1 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 5 mM MgCl₂) con inhibidores de proteasas (cóctel de Sigma P2714) mediante sonicación a 20 Hertz durante 15 segundos con tres repeticiones. El lisado se incubó a 4 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 20.817 x g durante 20 min a 4°C. Los extractos clarificados fueron recuperados y se llevó a cabo la precipitación de las proteínas extraídas.

2.3.2.2. Precipitación de proteínas

Por cada 300 µl de extracto fueron adicionados 400 µl de metanol, 200 µl de cloroformo y 100 µl de agua bidestilada, vortexeando vigorosamente después de cada adición. La mezcla se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 12.074 x g durante 5 minutos. Luego de descartar la fase superior (preservando la interfase), se adicionaron 300 µl de metanol y se vortexeó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 12.074 x g durante 1 minuto y se removió el sobrenadante completamente. Finalmente, se lavó el pellet de proteínas con 1 ml de metanol al 50% y se centrifugó a 12.074 x g 1 minuto. El metanol se removió y el pellet de proteínas se secó al aire. Los pellets secos se resuspendieron en SB y se calentaron a 60 °C durante 10 min. Luego, las muestras fueron hervidas durante 5 minutos a 95°C.

2.3.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blots

Las proteínas fueron corridas en geles de poliacrilamida ajustando el grado de entrecruzamiento según el tamaño de las proteínas a resolver. Una vez resueltas, fueron teñidas con Comassie blue R250 o transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm (Hybond, GE Healthcare) durante 1 hora a 100V (voltaje constante). Luego de la transferencia, las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (leche descremada al 3% o 5% en buffer de lavado (PBS pH 7,6, tween 20 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente para prevenir la reactividad inespecífica. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-His₆ (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de bloqueo) o el anticuerpo policlonal de conejo anti-tubulina (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado. Finalmente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-ratón (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de lavado) o anti-conejo (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de lavado) conjugados con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se removió lavando 3 veces de 5 minutos cada una con solución de lavado. La detección se realizó con un sistema de quimioluminiscencia Millipore (WBKLS, Biopore, Buenos Aires, Argentina) en el analizador de imágenes Luminescent Image Analyzer, LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Las cuantificaciones de las intensidades de las bandas obtenidas se analizaron con el programa Image J.

En el caso de los Western blots anti-fosfotirosina (anti-PY) se utilizaron las siguientes condiciones: la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante 1 hora a 37°C con BSA al 1,5% en solución de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 137 mM y Tween 20 0.1%) , luego se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-PY (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en BSA 1.5%), se realizaron 3 lavados con solución de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a HRP (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de lavado) durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.4. Microscopía

2.4.1. Microscopía electrónica de transmisión

Espermatozoides capacitados (200 μl , 5×10^6 células por condición) fueron incubados con la esponja de AMPc 100 nM o el inhibidor permeable de la adenilato ciclasa soluble KH7 10 μM durante 15 minutos a 37°C y luego estimulados con progesterona 15 μM o A23187 10 μM

15 minutos a 37°C. Como control positivo de hinchamiento acrosomal se incubaron células con el quelante de calcio permeable BAPTA-AM 20 μM durante 15 minutos a 37°C (con el fin de bloquear la salida de calcio acrosomal en respuesta al tratamiento con los inductores y evitar la pérdida de membranas) y luego se estimuló la exocitosis acrosomal con progesterona 15 μM o A23187 10 μM durante 15 minutos a 37°C. Luego de las incubaciones, se agregó ácido tánico 1,6 mM durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron fijadas con glutaraldehído 2,5% en HTF durante toda la noche a 4°C, lavadas con PBS (20 minutos a 4°C cada una) y fijadas nuevamente con tetróxido de osmio 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS a 4°C de 20 minutos cada uno y se llevó a cabo una deshidratación secuencial con concentraciones crecientes de acetona. Una vez alcanzada una concentración de 100% acetona, las células fueron infiltradas en la mezcla acetona:Spurr (resina epoxy de baja viscosidad) 1:1 toda la noche a temperatura ambiente y finalmente embebidas en resina pura durante toda la noche. La resina fue polimerizada a 70°C durante 24 horas, luego cortada en secciones de 60-80 nm en un ultramicrotomo Leica Ultracut que se colectaron en grillas de 200 mesh. Las grillas fueron teñidas con una solución de acetato de uranilo y observadas en el microscopio electrónico Zeiss 900 a 50 kV. Se cuantificaron al menos 100 células por tratamiento y se clasificaron de acuerdo a los siguientes patrones: acrosomas intactos, acrosomas hinchados (incluye patrones engrosados, deformados y deformados vesiculizados) y acrosomas reaccionados (incluye patrones vesiculizados y reaccionados). Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5, se utilizó el test de Chi cuadrado para pares de comparaciones. Las diferencias se consideraron significativas cuando P fue menor a 0,05.

2.4.2. Mediciones de la concentración de calcio intra-acrosomal en célula única en tiempo real

Espermatozoides capacitados permeabilizados con SLO (250 μl , 4×10^7 células) fueron incubados con BoNT/B 100 nM (preactivada con DTT 1 mM 15 minutos a 37°C) durante 15 minutos a 37°C para prevenir la pérdida de membranas y luego cargados con Fluo3-AM (2 μM)/ácido plurónico (1 μM) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas, resuspendidas en HB-EGTA y tratadas o no con inhibidores de la exocitosis acrosomal durante 15 minutos a 37°C. 25 μl de células fueron pegadas a cubreobjetos de 25 mm de diámetro cubiertos con poli-L-lisina (dilución 1:100 en agua milliQ) colocados en una cámara termostatzada para llevar a cabo las mediciones de fluorescencia. Una vez adaptada la cámara en el microscopio, los cubreobjetos fueron lavados con medio HB-EGTA para eliminar las

células que no se pegaron y las células correctamente pegadas fueron mantenidas en medio termostatzado a 37°C. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en un microscopio confocal Olympus FV 1000 equipado con un objetivo de inmersión Plan Apo 60x. Las imágenes fueron tomadas cada 3 segundos utilizando un láser con una longitud de onda de excitación a 473 nm que al excitar el fluoróforo Fluo3-AM emite a una longitud de onda de 535 nm. Para cada experimento se realizaron videos de 300 segundos de duración. Durante los primeros 30 segundos fueron registrados los valores de fluorescencia basal (período control), al tiempo $t=30$ segundos se agregó el estímulo y durante los 270 segundos restantes, se registraron los valores de fluorescencia luego del estímulo. Se tomaron un total de 100 imágenes por experimento utilizando el programa Fluoview FV-1000 y luego se procesaron con el programa Image J. Fueron descartados del procesamiento aquellos espermatozoides que se movieron durante el curso del experimento o que no se cargaron con la sonda. Luego de sustraer el ruido de fondo, se midió la intensidad de fluorescencia de cada espermatozoide dibujando manualmente una región de interés alrededor del acrosoma y pieza media de cada célula. Los valores obtenidos fueron importados al programa Microsoft Excel y normalizados mediante la relación F/F_0 , donde F es la intensidad de fluorescencia al tiempo t y F_0 es la intensidad de fluorescencia basal calculada a partir del promedio de las primeras 10 tomas previas a la adición del estímulo. Se consideraron como células respondedoras aquellas que alcanzaron una disminución en el valor de F/F_0 en la región acrosomal mayor al 50% posterior a la adición del estímulo. Para la representación de los cambios de intensidad en una única célula se seleccionaron imágenes cada 30 segundos y se realizó un montaje de 10 fotos (0 a 270 segundos). Los montajes fueron representados en imágenes de pseudocolor de concentraciones intracelulares de calcio ($[Ca^{+2}]_i$), donde el blanco y azul indican alta y baja $[Ca^{+2}]_i$ respectivamente. Los cambios en los valores de fluorescencia F/F_0 respecto al tiempo fueron graficados para el acrosoma y pieza media de las células representadas en cada montaje. Los porcentajes de fluorescencia relativa (%) son los valores de fluorescencia normalizados a los obtenidos previos a la adición del estímulo. Los valores obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5. Los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces, cada repetición se llevó a cabo con una muestra distinta.

IV. RESULTADOS

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: *Generar una herramienta que permita capturar el AMPc de espermatozoides.*

Las estrategias ampliamente utilizadas para atribuir respuestas celulares a AMPc se basan en el incremento de los niveles de AMPc con análogos permeables a membranas, inhibidores de PDEs y/o estimuladores de proteínas G/AC. Si bien que estas estrategias han resultado fructíferas, una prueba irrefutable de que un mecanismo es mediado por AMPc sólo puede conseguirse si dicho mecanismo o respuesta celular es abolido cuando el AMPc endógeno no se encuentra disponible. Con la intención de resolver esta inquietud, nos propusimos diseñar una herramienta que, al ser incorporada a espermatozoides humanos, nos permitiera capturar el AMPc disponible en la célula, con el fin de estudiar los procesos en los cuales se encuentra implicado. Esto nos permitiría medir de manera directa en espermatozoides vivos, el rol que cumple el AMPc endógeno en las vías de señalización implicadas en la RA, algo que hasta el momento no se ha conseguido.

1. Diseño de una proteína permeable capaz de capturar el AMPc intracelular

1. 1. Estructura de la esponja de AMPc

PKA es el efector primario del AMPc y consta de dos subunidades catalíticas (PKA-C) unidas no covalentemente a un dímero de subunidades regulatorias (PKA-R). La subunidad regulatoria RI tiene una alta afinidad por AMPc, sus primeros 100 aminoácidos contienen los dominios biológicamente activos responsables de la homodimerización y unión a las subunidades PKA-C; mientras que los dos dominios de unión a AMPc están ubicados en el extremo C-terminal (Saraswat et al., 1988; Taylor et al., 1990). A partir del dominio C-terminal de la subunidad RI β de la PKA humana (AA 133-380), Lefkimmiatis y col crearon un constructo denominado “esponja de AMPc” que posee la capacidad de unir AMPc con una alta afinidad. Al ser expresada en líneas celulares, esta proteína suprime significativamente las señales inducidas por agonistas de AMPc y la activación de PKA debido a la disminución de los niveles de AMPc intracelulares (Lefkimmiatis et al., 2009).

Basados en la estructura de esta proteína, en nuestro laboratorio diseñamos un constructo que posee el fragmento C-terminal de la PKA-RI β humana más un péptido TAT (que le confiere permeabilidad a membranas) y una secuencia de 6 histidinas (para la purificación con resinas de Ni-NTA-agarosa y detección con anticuerpos anti-His₆). El constructo fue clonado en el plásmido pET-28a para su expresión en *E.coli* (Figura 18).

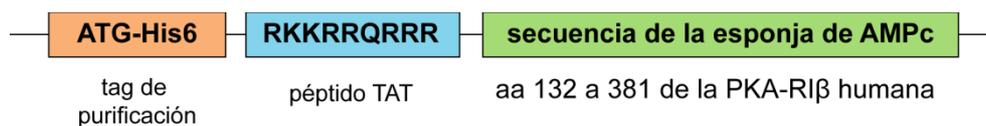


Figura 18: Estructura de la proteína esponja de AMPc. Esquema representativo de la estructura de la proteína.

1. 2. Incorporación de la esponja de AMPc en espermatozoides vivos

Como el espermatozoide es una célula transcripcionalmente y traduccionalmente inactiva (Ward and Coffey 1991), es imposible evaluar la función o el efecto de una proteína mediante su sobreexpresión o silenciamiento, herramientas comunes utilizadas en otros sistemas celulares. Una alternativa es la permeabilización controlada de la membrana plasmática con SLO (Yunes et al., 2000). Otra alternativa es el uso de proteínas permeables que contienen secuencias ricas en residuos básicos y que ingresan a la célula por diversos mecanismos (Joliot and Prochiantz, 2004). Proteínas recombinantes permeables que contienen péptidos ricos en arginina fueron utilizadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo para evaluar su función en la RA (Lopez et al., 2007). Basados en esta estrategia, a la secuencia de la esponja de AMPc agregamos un péptido TAT (Fawell et al., 1994) que le confiere permeabilidad a membranas para evaluar su efecto en un entorno fisiológico al introducir las en espermatozoides vivos.

Con el propósito de comprobar la incorporación de la proteína permeable a los espermatozoides, incubamos las células con la esponja de AMPc y posteriormente las tratamos con tripsina; de esta forma, toda aquella proteína que es incorporada a la célula queda protegida del corte por la enzima. En primer lugar, evaluamos la concentración de tripsina necesaria para digerir 720 ng de la esponja recombinante en experimentos *in vitro* como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se realizó un Western blot con anticuerpos anti-His₆ para detectar la esponja intacta. La mínima concentración de tripsina que impidió la detección de la esponja fue de 1 µg/ml (Figura 19A) y por lo tanto seleccionamos esta concentración para los experimentos subsecuentes.

Los espermatozoides fueron incubados con 1 µM de la esponja de AMPc y luego tratados con dos concentraciones diferentes de tripsina: una que elimina la señal detectada por los anticuerpos anti-His₆ completamente (1 µg/ml) y otra que no la afecta (0,1 µg/ml) (Figura 19A) como se describe en Materiales y Métodos. Se incluyó un control adicional de células incubadas con la esponja de AMPc y sin tratamiento con tripsina (0 µg/ml). Los

extractos obtenidos fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10% y analizados por Western blot con anticuerpos anti-His₆ para detectar la proteína incorporada a las células y anti-tubulina como control de carga. La esponja de AMPc se mantuvo protegida del corte con 1 µg/ml tripsina. Estos resultados indican que la proteína ingresó a los espermatozoides y descartan que simplemente se estuviera adsorbiendo a su superficie, en cuyo caso sería sensible a la tripsina (Figura 19B). Los anticuerpos no detectaron la proteína remanente en el medio luego de incubar con 1 µg/ml de tripsina, indicando que la tripsina estaba activa y la concentración seleccionada era adecuada (Figura 19B). Estos resultados demuestran que la proteína diseñada es permeable e ingresa a los espermatozoides humanos en nuestras condiciones experimentales.

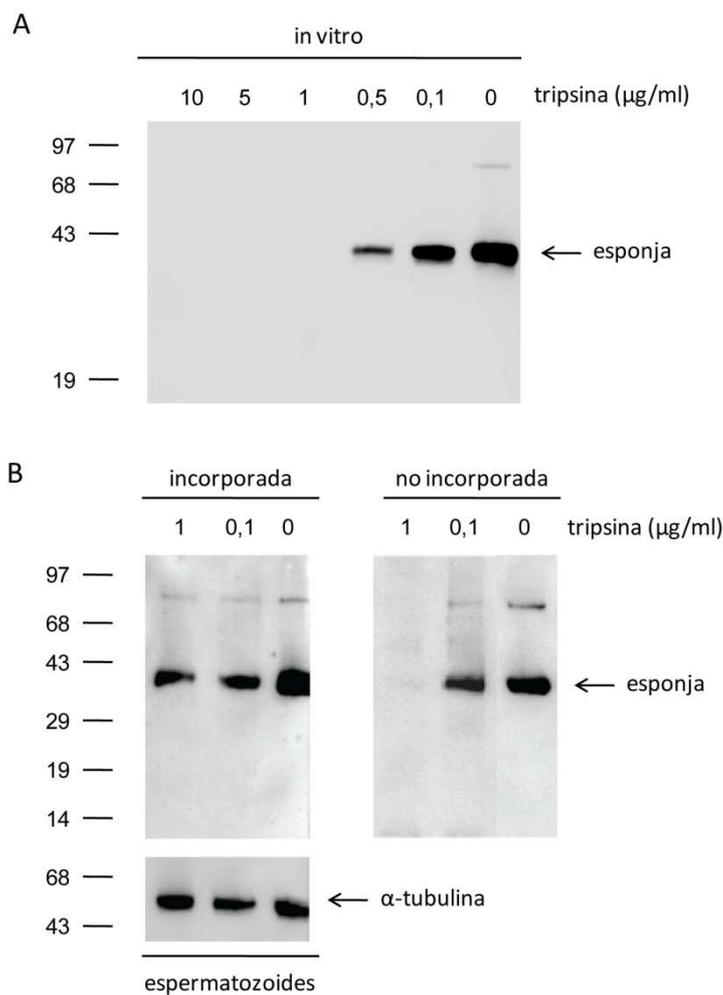


Figura 19. La proteína permeable esponja de AMPc es incorporada en espermatozoides humanos. A: 720 ng de la esponja de AMPc fueron incubados con concentraciones crecientes de tripsina (0 a 100 µg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Se realizó un Western blot anti-His₆ para analizar la presencia de la esponja de AMPc. **B:** Espermatozoides humanos capacitados se incubaron con 1 µM de esponja de AMPc durante 30 min a 37 °C. Luego se adicionó 0,1 o 1 µg/ml de tripsina y se incubó durante 20 min a 37°C para cortar la proteína no incorporada en espermatozoides. La detección de la proteína incorporada a las células (incorporada), como la remanente en el medio extracelular (no incorporada) se

analizó por Western blot con el anticuerpo anti-His₆. Se realizó un Western blot con el anticuerpo anti- α -tubulina como control de carga de proteína de espermatozoides. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda. Se muestra un experimento representativo de dos repeticiones.

Con el fin de evaluar el porcentaje y sitio de incorporación de la esponja de AMPc a los espermatozoides, llevamos a cabo una inmunofluorescencia indirecta de células incubadas con la proteína y posteriormente tratadas con tripsina para distinguir entre la proteína incorporada y la simplemente adherida a la membrana celular. Luego de la digestión con tripsina, las células fueron fijadas y se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-His₆ (ver Materiales y Métodos). Se utilizaron como controles células sin incubar con la proteína y células tratadas sólo con el anticuerpo anti-rabbit-Cy3 para comprobar la especificidad del anticuerpo primario. Las células fueron observadas en microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron procesadas con los programas Image J y Adobe Illustrator.

Como resultado de la incubación de los espermatozoides con la proteína permeable, se observó alrededor de un 86% de células marcadas con el anticuerpo anti-His₆ (Figura 20, panel rojo superior). Tanto en ausencia de la proteína (panel rojo central), como en ausencia del anticuerpo primario (panel rojo inferior) no se observaron células marcadas, corroborando que la marca de la proteína fue específica. A partir de estos resultados, pudimos comprobar que la esponja de AMPc fue incorporada en la cabeza y cola de un alto porcentaje de espermatozoides.

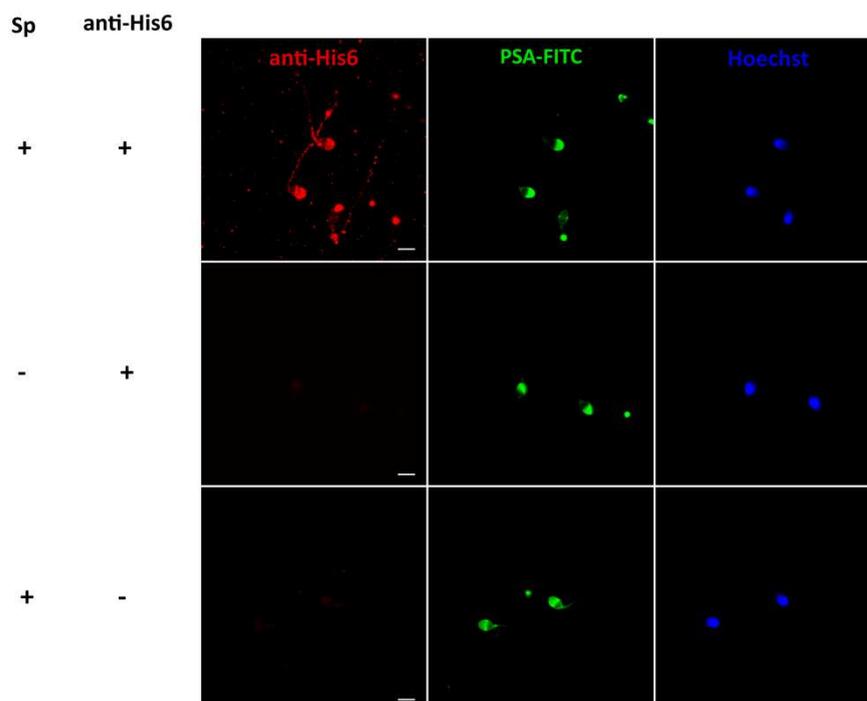


Figura 20: La proteína permeable “esponja de AMPc” se incorpora en cabeza y cola de espermatozoides humanos. Espermatozoides capacitados fueron incubados con 1 μ M de la esponja de

AMPc durante 30 minutos y luego tratados con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tripsina por 20 minutos con el fin de digerir la proteína que no fue incorporada a las células. Finalizado el tiempo de incubación con la tripsina, las células fueron lavadas y fijadas en solución con PAF 2%. Posteriormente, se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta realizando una triple tinción con el anticuerpo anti-His₆ (paneles rojos), con la lectina PSA-FITC (paneles verdes) y con Hoechst 33342 (paneles azules). La esponja de AMPc se incorporó a lo largo de todo el espermatozoide en un alto porcentaje de células (panel rojo superior). Se realizaron controles sin incubar con la esponja de AMPc (sp, paneles centrales) o el anticuerpo primario (anti-His₆, paneles inferiores), observándose que la marca de la esponja de AMPc fue específica (barras = 5 μm). Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: *Establecer la influencia de la esponja de AMPc en los fenómenos de la fisiología espermática en los que está involucrado el AMPc.*

1. Efecto de la esponja de AMPc en la fosforilación en tirosina de proteínas durante la capacitación de espermatozoides humanos

Ha sido ampliamente estudiado que el proceso de capacitación está relacionado con un aumento en la motilidad flagelar (hiperactivación), un incremento en la fosforilación de proteínas en tirosina y la capacidad de desencadenar la RA. Si bien las bases moleculares de este proceso no están completamente establecidas, ha sido comprobado que la capacitación está asociada con un incremento de los niveles de AMPc intracelular dependiente de bicarbonato (Chen et al., 2000). El AMPc luego activa a la PKA, la cual lleva indirectamente a la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas que se encuentran cascada abajo (Visconti et al., 1998).

En base a esto, nos propusimos evaluar el efecto de la esponja de AMPc sobre la fosforilación de proteínas en tirosina que se lleva a cabo durante el proceso de capacitación de espermatozoides humanos. Para ello, los espermatozoides se recuperaron por swim-up en medio HTF, se ajustó la concentración de células a 10 millones/ml y se capacitaron durante 5 horas en presencia de BSA 0.5% incubando con 500 nM de la esponja de AMPc. Se realizó un control de capacitación con células incubadas en HTF/BSA 0.5% durante 5 horas y un control de los niveles basales de fosforilación con células sin capacitar incubadas durante 5 horas en ausencia de BSA 0,5%. Luego de la incubación, las células fueron lisadas, las proteínas extraídas y analizadas por Western blot con anticuerpos anti-fosfotirosina (anti-PY) como se describe en Materiales y Métodos.

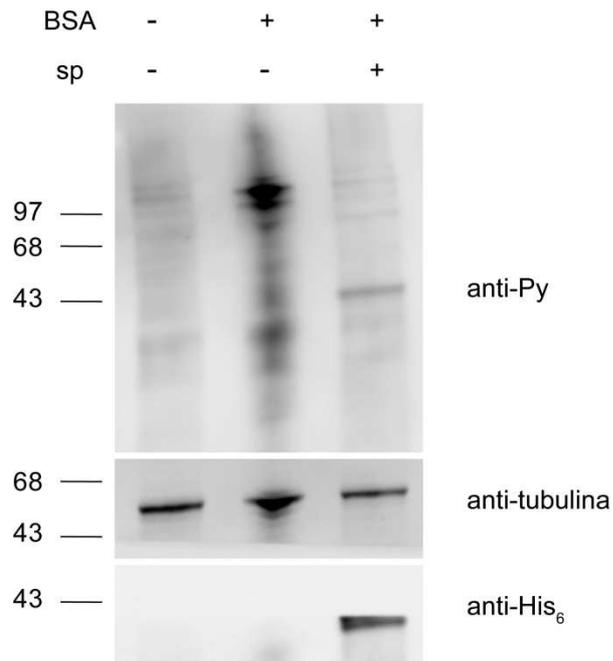


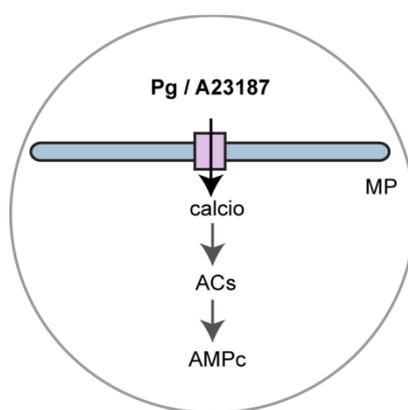
Figura 21: La esponja de AMPc afectó los niveles de fosforilación en tirosina de proteínas que participan en la capacitación de espermatozoides humanos. Espermatozoides recuperados por swim-up (20×10^6 células por tratamiento) fueron incubados en ausencia (calle 2) o presencia (calle3) de la esponja de AMPc $1 \mu\text{M}$ (Sp) y capacitados en presencia de BSA 0,5% durante 5 horas. Se utilizaron como control células sin capacitar incubadas en ausencia de BSA 0,5% (calle 1). Los extractos obtenidos fueron corridos en gel de poliacrilamida 10%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un Western blot anti-PY. Se realizó un Western blot anti-His₆ para confirmar la presencia de la esponja de AMPc y un Western blot anti-tubulina como control de carga de proteína de espermatozoides. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular. Se muestra un experimento representativo de cuatro repeticiones.

Como puede observarse en la Figura 21, durante el proceso de capacitación hubo un incremento en los niveles de fosforilación en tirosina de varias proteínas celulares. Cuando las células fueron incubadas con la esponja de AMPc en condiciones capacitantes (BSA 0.5%), se produjo una notable disminución de los niveles de fosforilación comparado con las células capacitadas en ausencia de la esponja. Este experimento permitió concluir que la proteína permeable que ingresó a la célula, disminuyó los niveles de AMPc, afectando la fosforilación en tirosina de proteínas que participan en el proceso de capacitación. Este resultado demuestra que la proteína se comporta como un quelante de AMPc, afectando un proceso fundamental en el que participa el AMPc, como lo es la capacitación.

2. Efecto de la esponja de AMPc sobre la reacción acrosomal

Como mencionamos anteriormente, la expresión de la esponja de AMPc en células epiteliales en cultivo, captura el AMPc citosólico inhibiendo las cascadas de señalización

dependientes de AMPc (Lefkimiatis et al., 2009). Nos propusimos utilizar la proteína permeable diseñada como una herramienta para analizar el rol del AMPc en las vías de señalización involucradas en la RA. Estudios previos demostraron que KH7, un inhibidor selectivo de la ACs, inhibe la exocitosis acrosomal inducida por progesterona y A23187 en células intactas (Branham et al., 2009; Teves et al., 2009), así como también la disparada por calcio en células permeabilizadas (Branham et al., 2009). En base a estos antecedentes, evaluamos el efecto de la esponja sobre la RA en ensayos funcionales con espermatozoides intactos y permeabilizados.



Esquema representativo de la vía de señalización que se describe a continuación.

2. 1. La exocitosis acrosomal inducida por progesterona y A23187 requiere AMPc endógeno

Tanto la progesterona como el ionóforo de calcio A23187 dependen de la síntesis de AMPc por la ACs para lograr la exocitosis. Con la finalidad de analizar el efecto de la esponja de AMPc en la exocitosis, los espermatozoides fueron incubados con concentraciones crecientes de la esponja permeable y luego estimulados con progesterona o A23187. La esponja de AMPc inhibió de manera dosis-dependiente la RA estimulada por ambos inductores. La respuesta a progesterona fue significativamente disminuída por 100 nM de esponja (Figura 22A), proveyendo una evidencia directa de que progesterona requiere AMPc endógeno para inducir la exocitosis acrosomal. Consistente con los resultados obtenidos con progesterona, A23187 también requirió AMPc endógeno para lograr la exocitosis, aunque debido quizás a la magnitud de la respuesta, fueron necesarias mayores concentraciones de esponja (1 a 3 μ M) para lograr una inhibición completa (Figura 22B). Estos datos confirman que la esponja de AMPc es una herramienta confiable para estudiar las vías de señalización relacionadas con AMPc en células vivas.

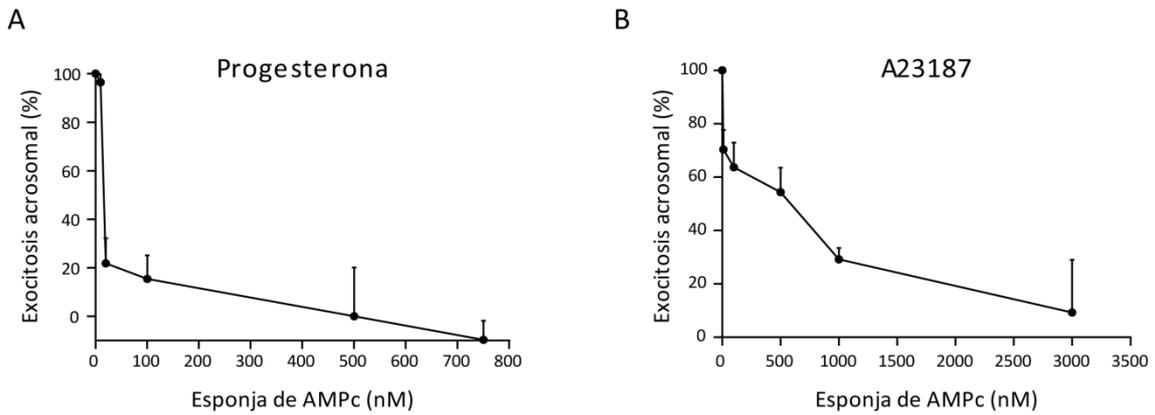


Figura 22: La esponja de AMPc inhibe la RA inducida por progesterona y A23187 en espermatozoides humanos. Espermatozoides capacitados fueron incubados con concentraciones crecientes de la esponja de AMPc durante 15 min a 37°C. Posteriormente, la RA fue estimulada agregando progesterona 15 μ M (A) o A23187 10 μ M (B) e incubando a 37°C por 15 min. El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes.

2.2. La esponja de AMPc inhibe la RA porque secuestra el AMPc endógeno

Hasta el momento, la hipótesis planteada es que la esponja permeable inhibe la RA estimulada por inductores de la exocitosis acrosomal mediante la captura del AMPc intracelular, desprovveyendo a las células de este nucleótido cíclico y colapsando las vías de señalización en las que se encuentra involucrado. Con el fin de comprobar si la esponja de AMPc efectivamente inhibe la RA mediante este mecanismo, evaluamos si este efecto inhibitorio podía ser abolido al preincubar la esponja de AMPc con un análogo permeable de AMPc y de esta forma, ocupar sus sitios de unión al AMPc. Para ello, se preincubó la esponja de AMPc con el doble de la concentración de dibutilil AMPc (dbAMPc) in vitro durante 15 minutos a 37°C (se utilizaron 200 nM de dbAMPc para 100 nM de esponja, ya que existen dos sitios de unión a AMPc por cada molécula de esponja). Posteriormente, la mezcla fue incubada con los espermatozoides y se indujo la exocitosis acrosomal con progesterona.

Progesterona indujo exocitosis acrosomal en espermatozoides incubados con la mezcla de esponja-dbAMPc, mientras que la mezcla por sí sola o la misma concentración de dbAMPc fueron incapaces de hacerlo (Figura23). La respuesta obtenida al estimular células con la esponja preincubada con el análogo permeable alcanzó valores de inducción similares a los obtenidos al incubar las células sólo con progesterona (Figura 23), demostrando que el dbAMPc es capaz de impedir el efecto inhibitorio de la esponja al ocupar los sitios de unión al nucleótido cíclico. Estos datos, nos permitieron comprobar que es mediante el secuestro de

AMPc endógeno que la proteína esponja ejerce su efecto inhibitorio sobre la exocitosis acrosomal, ya que al ocupar sus sitios activos con otra molécula, la proteína se vuelve incapaz de bloquear la RA.

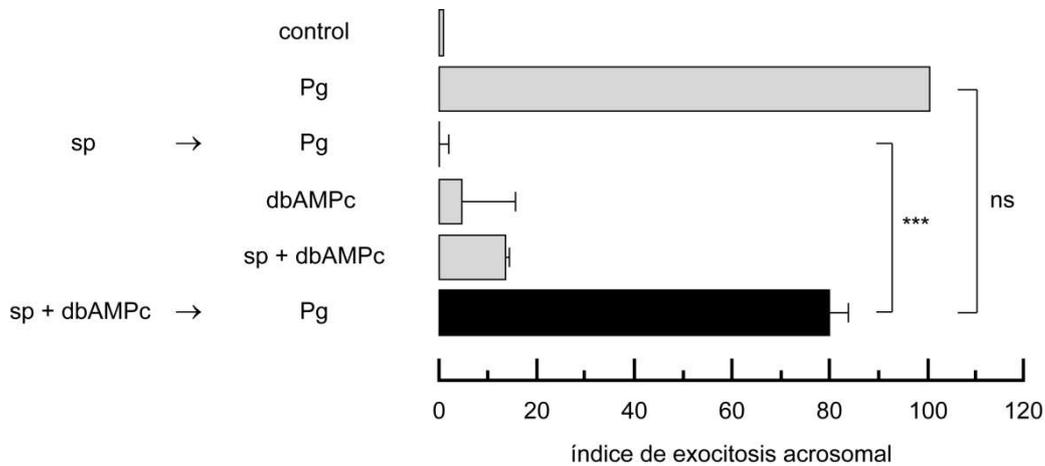


Figura 23. Dibutiril AMPc revierte la inhibición de la RA producida por la esponja de AMPc. La esponja de AMPc (sp) 100 nM fue incubada in vitro con 200 nM de dibutiril AMPc (dbAMPc) durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, espermatozoides capacitados fueron incubados con la mezcla de esponja y db AMPc (sp + dbAMPc) durante 15 minutos a 37°C y posteriormente, estimulados con progesterona 15 µM. Se incluyeron los siguientes controles: células estimuladas con progesterona (Pg), células preincubadas con la esponja de AMPc y luego estimuladas con progesterona (sp → Pg), células incubadas con dbAMPc 200 nM (dbAMPc) y células incubadas con la mezcla sp + dbAMPc. El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes.

2.3. Calcio requiere cAMP endógeno para inducir la RA

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, probaron que la digestión temprana del AMPc endógeno con la PDE 4D recombinante (Branham et al., 2006) o la inhibición de su síntesis con el bloqueante de la ACs KH7 (Branham et al., 2009) impiden que el calcio estimule la exocitosis del acrosoma en espermatozoides permeabilizados con SLO. Por lo tanto, se esperaba que la preincubación con la esponja permeable previniera la RA. Cuando células permeabilizadas fueron incubadas con concentraciones crecientes de la proteína y luego estimuladas con calcio, la esponja de AMPc inhibió la exocitosis de una manera dosis-dependiente, alcanzando un máximo de inhibición a concentraciones de 100 nM (Figura 24).

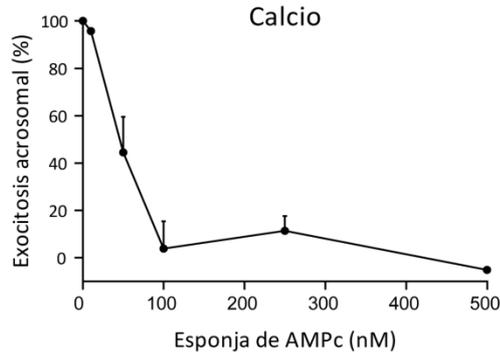


Figura 24. La esponja de AMPc inhibe la RA inducida por calcio en espermatozoides permeabilizados. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con concentraciones crecientes de la esponja de AMPc durante 15 min a 37°C. Posteriormente, la RA fue iniciada agregando CaCl₂ 0,5 mM e incubando a 37°C por 15 min. El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

3. El hinchamiento del acrosoma producido por inductores de la RA es un evento dependiente de AMPc

El hinchamiento osmótico de vesículas y gránulos secretorios se ha propuesto como un paso intermediario en la fusión exocítica de los gránulos con la membrana plasmática (Finkelstein et al., 1986). El hinchamiento del acrosoma durante la RA ha sido descrito tanto en espermatozoides humanos (Russell et al., 1979; Yudin et al., 1988; Zanetti and Mayorga, 2009) como de otras especies (Barros et al., 1967; Green, 1978; Szöllösi and Hunter, 1978), sugiriendo que es un evento habitual en la exocitosis del gránulo. Cuando espermatozoides humanos son estimulados con algún inductor de la RA se observan cambios morfológicos característicos que afectan principalmente al acrosoma e implican el hinchamiento del gránulo, la ondulación de la membrana acrosomal externa y la aposición con la membrana plasmática. Antecedentes de nuestro grupo de trabajo indican que la maquinaria proteica de fusión cumple un rol fundamental en estos eventos, en donde la formación de complejos SNAREs es un paso fundamental para que se generen aposiciones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Zanetti and Mayorga, 2009).

Nos propusimos evaluar si el hinchamiento del acrosoma que se produce en respuesta a un estímulo de la RA es un evento dependiente de AMPc. Para ello, incubamos células en presencia de la esponja de AMPc o el inhibidor KH7, luego estimulamos la RA con progesterona o A23187 y evaluamos el porcentaje de acrosomas hinchados en los distintos tratamientos mediante microscopía electrónica de transmisión. Los acrosomas hinchados son observados

raramente por microscopía electrónica en espermatozoides en reposo, pero son fácilmente detectados en células que han iniciado la exocitosis pero no han perdido completamente sus acrosomas. Para capturar las células con sus acrosomas hinchados es necesario utilizar un bloqueante de la exocitosis acrosomal previo al tratamiento con inductores de la RA. Con este fin utilizamos BAPTA-AM, un quelante de calcio permeable, que bloquea la salida de calcio acrosomal en respuesta al tratamiento con inductores de la RA y de esta forma, evita la pérdida de membranas. Con el fin de evaluar el efecto de la esponja de AMPc en el hinchamiento acrosomal producido por los inductores progesterona y A23187, fue necesario realizar algunos controles para establecer una comparación con los patrones obtenidos. Incluimos como control las siguientes condiciones: células sin tratamiento y células preincubadas con BAPTA-AM y luego estimuladas con progesterona o A23187 (ver Materiales y Métodos).

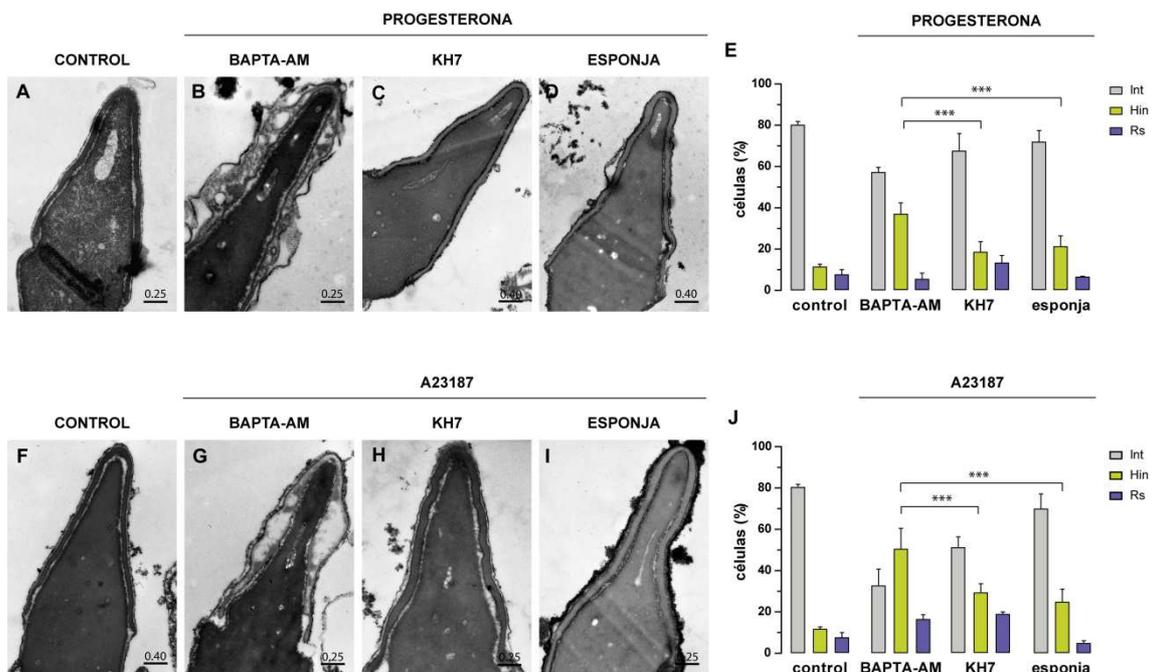


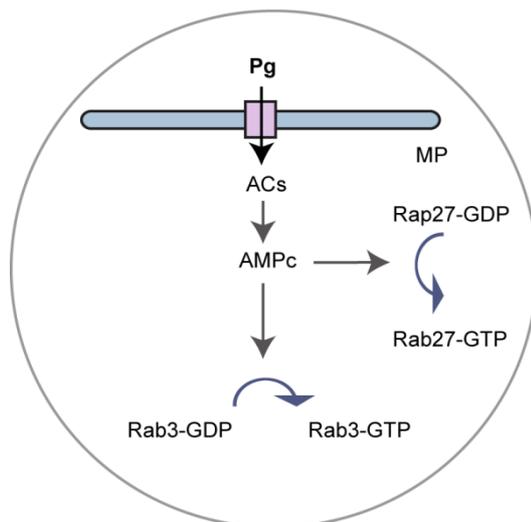
Figura 25. El hinchamiento del acrosoma inducido por progesterona y A23187 en espermatozoides humanos es dependiente de AMPc. Microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides tratados con la esponja de AMPc y luego estimulados con progesterona (D) o A23187 (I) o células incubadas con KH7 y luego estimuladas con progesterona (C) o A23187 (H). Se incluyeron los siguientes controles: células sin tratar (A y F) y células precargadas con BAPTA-AM y estimuladas con progesterona (B) o A23187 (G). Los espermatozoides fueron fijados, tratados para microscopía electrónica de transmisión y se cuantificaron los distintos patrones acrosomales. Los gráficos (E y J) muestran la cuantificación de las células luego de los diferentes tratamientos. Se contaron alrededor de 100 células por condición y se clasificaron en los siguientes patrones: células con acrosomas intactos (Int), células con acrosomas hinchados (Hin) o células reaccionadas (Rs). Los resultados representan la media (rango)

del número de espermatozoides analizados (***) $p < 0.001$). (Barra = μm). Se muestra un experimento representativo de dos repeticiones.

Como puede observarse en las micrografías, el tratamiento con progesterona (Figura 25B) y A23187 (Figura 25G) produjo un incremento en el número de células con acrosomas hinchados respecto a la condición control sin tratamiento (Figura 25 A y F). El efecto contrario fue observado cuando los espermatozoides fueron incubados tanto con el inhibidor KH7 (Figura 25 C y H) como con la esponja de AMPc (Figura 25 D e I) antes de inducir, donde los patrones acrosomales se asemejaron notablemente a la condición control sin tratamiento. Al cuantificar los patrones encontrados, comprobamos que el porcentaje de espermatozoides con acrosomas hinchados fue muy bajo (12%) en la condición control sin tratamiento (Figura 25 E y J). Este porcentaje incrementó a 37% luego del tratamiento con progesterona (Figura 25E). La preincubación con la esponja de AMPc o el inhibidor KH7 impidió que la progesterona estimulase el hinchamiento del acrosoma, el cual se observó sólo en un 21% y 19% de las células incubadas con la esponja de AMPc o KH7, respectivamente (Figura 25E). Asimismo, el estímulo con A23187 provocó el hinchamiento en un 51% de las células; este porcentaje se redujo a 25% y 29% en las condiciones preincubadas con la esponja de AMPc o KH7 respectivamente (Figura 25J). Estos datos indican que el hinchamiento del acrosoma que se produce en respuesta al tratamiento con inductores de la RA depende de los niveles de AMPc intracelulares. A partir de estos resultados podemos inferir que la esponja de AMPc, al capturar el AMPc intracelular, impide el hinchamiento acrosomal y evita que se lleve a cabo la excitosis.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3: *Identificar el lugar específico de la cascada donde se requiere el AMPc y establecer una conexión con la movilización de calcio y la maquinaria proteica que interviene en la excitosis regulada.*

1. Influencia del AMPc sobre la maquinaria proteica que participa en el ensamblaje de la maquinaria de fusión



Esquema representativo de la vía de señalización que se describe a continuación.

1.1. La reacción acrosomal inducida por Rab3A y Rab27A recombinantes requiere AMPc

Las proteínas Rab27 y Rab3 son proteínas G monoméricas de la familia Rab que actúan controlando el reclutamiento, *tethering* y *docking* de vesículas secretorias con la membrana plasmática a través de la interacción con diversos efectores (Tsuboi and Fukuda, 2005, 2006). En la cascada de señalización que lleva a la RA se ha descrito el rol de estas dos Rabs secretorias. La proteína Rab27A actúa activando o reclutando un GEF para Rab3A. Cuando Rab3A es activada, se desencadena la activación de otros factores, lo que finalmente posibilita el ensamblaje de las proteínas SNAREs para llevar a cabo el acercamiento íntimo entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Bustos et al., 2012). Tanto Rab27A (resultados no publicados) como Rab3A (Lopez et al., 2007) recombinantes inducen exocitosis acrosomal cuando se encuentran isopreniladas y en su estado GTP. En espermatozoides permeabilizados con SLO la exocitosis acrosomal inducida por Rab3A necesita AMPc sintetizado por la ACs (Branham et al., 2009), por lo que nos propusimos evaluar en espermatozoides vivos el efecto que provoca la ausencia de AMPc sobre la RA inducida por ambas proteínas G recombinantes permeables.

Con el fin de determinar si el AMPc es requerido en la vía de señalización en la que se encuentran implicadas las proteínas Rab3 y Rab27, se midió el efecto de la ausencia de AMPc en células incubadas con la esponja de AMPc y posteriormente estimulados con las proteínas Rab27A y Rab3A permeables, isopreniladas y cargadas in vitro con GTP- γ -S. Los valores de RA obtenidos fueron comparados con los de células estimuladas con progesterona. Las células fueron fijadas, teñidas con la lectina PSA-FITC y cuantificadas (Figura 26).

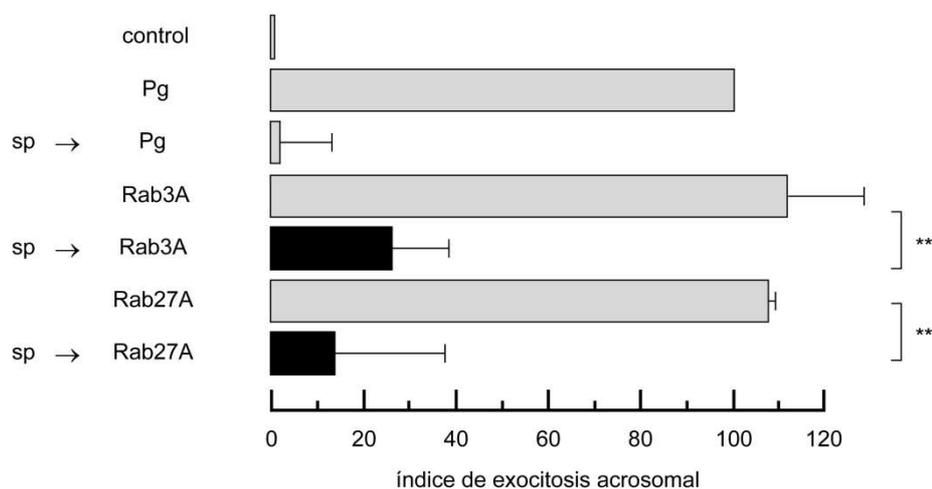


Figura 26. La esponja de AMPc inhibe la RA inducida por Rab27A y Rab3A. Espermatozoides capacitados fueron incubados con la esponja de AMPc (100 nM final) durante 15 min a 37°C y posteriormente estimulados con las proteínas Rab27A y Rab3A permeables, geranilgeraniladas y cargadas *in vitro* con GTP- γ -S (300 nM final) durante 15 min a 37°C. Se utilizaron como control células incubadas con progesterona 15 μ M (Pg), Rab3A-GTP- γ -S (Rab3A) o Rab27A-GTP- γ -S 300 nM (Rab27A) a 37°C por 15 min. El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control (progesterona, Pg). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$).

El porcentaje de células que reaccionaron cuando se incubó con Rab3A o Rab27A fue similar al alcanzado por progesterona. La esponja de AMPc inhibió la exocitosis acrosomal inducida por ambas proteínas en su estado activo (Figura 26, barras negras). Estos resultados sugieren que, similarmente a progesterona y A23187, Rab3A y Rab27A requieren AMPc endógeno para que la exocitosis se lleve a cabo.

1.2. Progesterona activa las pequeñas GTPasas Rab3 y Rab27 a través de una vía que utiliza AMPc endógeno

Como mencionamos anteriormente el AMPc tiene un rol central en la cascada de señalización que conduce a la RA, ya que lleva a la activación de Epac y, a partir de este punto, se ponen en marcha dos ramas de la vía que resultan fundamentales para que pueda conseguirse la exocitosis del acrosoma. Una de las ramas activada por Epac es la que conduce al ensamblaje de las proteínas SNAREs, requerido para que la membrana acrosomal y la plasmática puedan fusionarse. Esta rama está encabezada por la activación de la pequeña GTPasa Rab3A (Figura 27). En estudios previos de nuestro laboratorio, fue confirmado que Epac activa indirectamente a Rab3A (Branham et al., 2009). Resultados posteriores demostraron que existe otra Rab secretoria, Rab27, que se encuentra involucrada en la cascada de señalización que conduce a la RA y es requerida previo a la activación de Rab3

(Bustos et al., 2012). Recientemente reportamos que, en células permeabilizadas con SLO, KH7 previene la activación de Rab3 inducida por calcio (Ruete et al., 2014). Basados en rol primordial de estas GTPasas en la rama de la vía de señalización que conduce al ensamblaje de la maquinaria de fusión y a los antecedentes que sugieren que existe una dependencia entre su activación y el AMPc, nos propusimos evaluar si progesterona requiere AMPc para activar a estas proteínas. Para ello, llevamos a cabo experimentos de Far-inmunofluorescencia (Far-IFI), pero desprovocando a los espermatozoides de AMPc mediante la preincubación con la esponja de AMPc.

Para la detección de estas GTPasas en su estado activo se utilizaron las proteínas de fusión RIM-RBD-GST que contiene el dominio de unión (RBD) a Rab3-GTP de la proteína RIM (aminoácidos 11-398) (Coppola et al., 2002) y Slac2b-SHD-GST que contiene el dominio de unión (SHD) a Rab27-GTP de la proteína Slac2b (aminoácidos 1-79) (Kuroda et al., 2002). Ambas proteínas se encuentran fusionadas a GST. Espermatozoides capacitados fueron tratados con 2-APB 100 μ M durante 10 minutos, luego incubados con la esponja de AMPc 100 nM 15 minutos y finalmente estimulados con progesterona 15 μ M durante 15 minutos (todas las incubaciones se realizaron a 37°C). Una vez finalizadas las incubaciones, las células fueron fijadas en suspensión con PAF 2% y se continuó con el protocolo de Far-IFI (ver sección de Materiales y Métodos). Finalmente, las células fueron montadas y observadas en microscopio de fluorescencia (Figura 27 A y B). Para la cuantificación del porcentaje de espermatozoides con Rab3A o Rab27 activas fueron contadas alrededor de 200 células por condición, tomándose como patrón de tinción positivo aquellas células con marca acrosomal del anticuerpo acoplado a Cy3. Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5 (Figura 27 C y D).

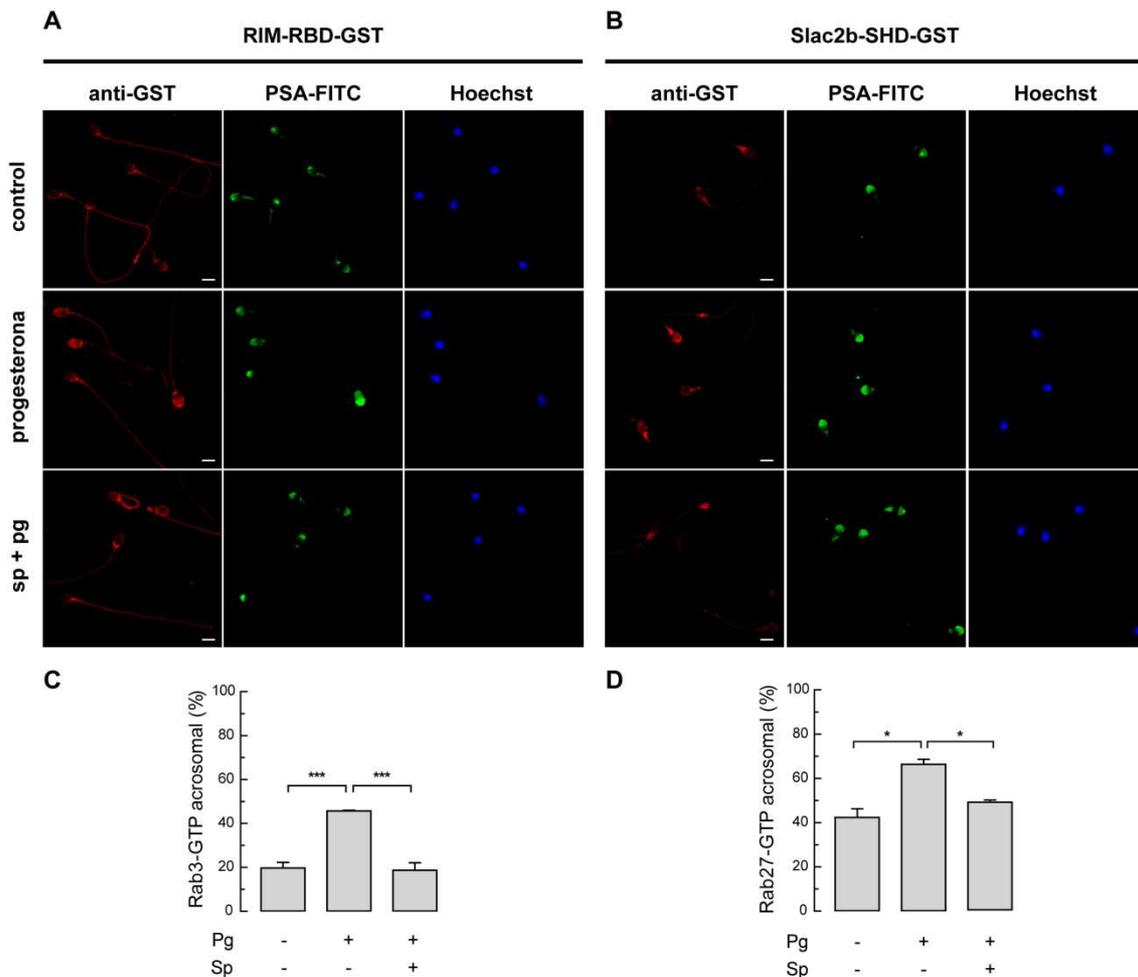
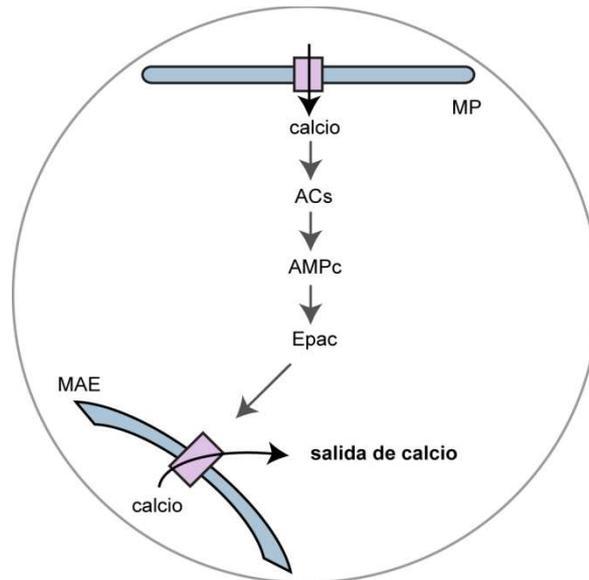


Figura 27. Rab3A y Rab27 son activadas por progesterona por una vía que requiere AMPc endógeno. Far-IFI de espermatozoides incubados con la esponja de AMPc y posteriormente estimulados con progesterona (Sp + Pg, paneles inferiores). Se utilizaron como control células sin tratamiento (Co, paneles superiores) y tratadas con progesterona (paneles medios). Luego de las incubaciones, las células fueron fijadas con PAF 2%, neutralizadas con glicina, pegadas a cubreobjetos y bloqueadas con BSA 5%. Posteriormente, fueron incubadas con el *cassette* RIM-RBD (A) o Slac2b-SHD (B) fusionados a GST. Todas las condiciones se trataron con el anticuerpo anti-GST y luego, se realizó una triple tinción con el anticuerpo anti-rabbit acoplado a Cy3 (paneles rojos), con la lectina PSA-FITC (paneles verdes) y con Hoechst 33342 (paneles azules). Los gráficos muestran la cuantificación del porcentaje de células con Rab3 (C) o Rab27 (D) activas. Se contaron alrededor de 200 células por condición, tomándose como patrón de tinción positivo aquellas células con marca acrosomal del anticuerpo acoplado a Cy3. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$).

Al cuantificar las células pudimos observar que los valores basales fueron del 19% para Rab3A-GTP y 42% para Rab27-GTP. Luego del estímulo con progesterona, los valores aumentaron a un 45% y 66% para Rab3A y Rab27 en su estado GTP, respectivamente. Al preincubar las células con la esponja de AMPc y luego estimular la RA con progesterona, pudimos comprobar que los valores de activación para Rab3A y Rab27 fueron de 18% y 49% respectivamente. En el caso de ambas proteínas, el porcentaje de espermatozoides con tinción acrosomal aumentó en respuesta al estímulo con progesterona y disminuyó a valores basales

cuando las células fueron preincubadas con la esponja de AMPc. Estos resultados indican que la cascada de señalización iniciada por progesterona activa a Rab3A y Rab27 mediante una vía que utiliza AMPc endógeno.

2. Influencia del AMPc sobre la rama de señalización que conduce a la movilización de calcio acrosomal



Esquema representativo de la vía de señalización que se describe a continuación.

2.1. El AMPc es requerido previo a la salida de calcio acrosomal

El NP-EGTA-AM es un quelante de calcio fotosensible que posee un grupo acetoximetil (AM) que le confiere permeabilidad a membranas. La entrada a una organela rodeada por membrana, lleva al clivaje del grupo AM mediante la acción de esterasas, quedando como consecuencia, el NP-EGTA retenido en la organela. Este compuesto posee una alta afinidad por calcio (80 nM), por lo que tiene la capacidad de secuestrarlo eficientemente. Cuando es sometido a luz ultravioleta (UV), el NP-EGTA es destruido dando lugar a compuestos de baja afinidad por calcio (1 mM), liberando este ión y restaurando las condiciones iniciales (Ellis-Davies and Kaplan, 1994).

En nuestro modelo de espermatozoides permeabilizados, el NP-EGTA-AM atraviesa la membrana plasmática a través de los poros generados por la SLO y una vez en el citosol, ingresa por difusión al acrosoma donde el grupo AM es clivado por esterasas acrosomales. En la oscuridad, el NP-EGTA secuestra el calcio acrosomal –y por ende inhibe su salida desde el acrosoma– interrumpiendo la RA disparada por todos los inductores conocidos. Cuando células

estimuladas son expuestas a luz UV, el NP-EGTA es destruido, permitiendo que el acrosoma recupere el calcio y consecuentemente, se produzca su salida hacia el citoplasma, reanudando la exocitosis (De Blas, 2002; Ackermann, 2008). De esta forma, al agregar secuencialmente e incubar en la oscuridad NP-EGTA-AM, un inductor de la RA, un bloqueante de la RA y posteriormente iluminar, el sistema se hace resistente a inhibidores que afectan integrantes de la cascada requeridos antes de la salida del calcio intracrosomal y permanece sensible a inhibidores que afectan componentes necesarios después de la salida del calcio (ver diagrama en Branham et al., 2006). El uso de esta herramienta en nuestro modelo nos permite clasificar los sitios de acción de inhibidores de la RA previos o posteriores a la salida de calcio acrosomal.

Basados en los resultados obtenidos con NP-EGTA-AM, hemos demostrado que la PDE 4D inhibe la RA antes de la liberación de calcio desde el reservorio intracelular (Branham et al., 2006). Por lo tanto nos preguntamos si la esponja permeable es capaz de frenar la exocitosis en el mismo momento. Testeamos esta hipótesis y encontramos que en espermatozoides permeabilizados cargados con NP-EGTA-AM, la esponja de AMPc bloqueó la exocitosis cuando fue agregada antes, pero no después de la iniciación de la RA por calcio (Figura 28, barra negra). Estos datos indican que el AMPc juega su rol en la exocitosis previo a la salida de calcio intra-acrosomal y que la esponja lo previene manteniendo el nucleótido cíclico capturado.

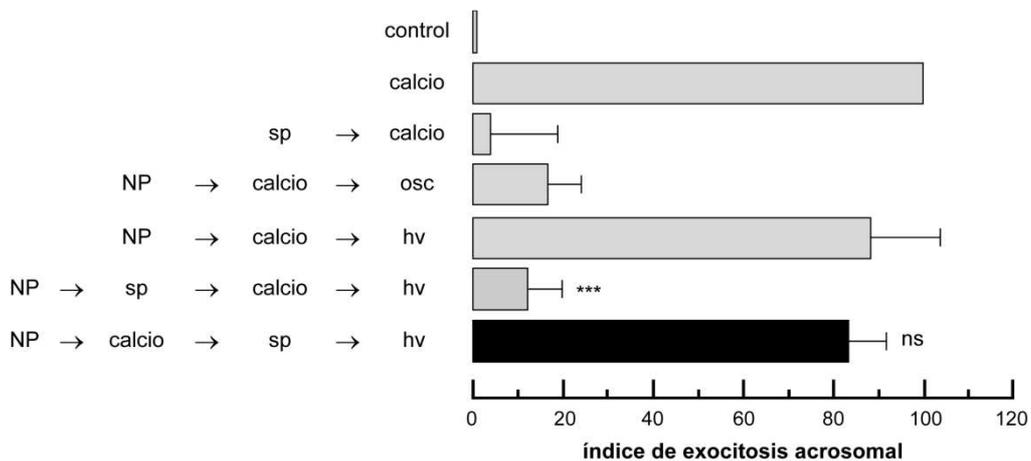


Figura 28. Localización del AMPc en la cascada de señalización. Espermatozoides permeabilizados se cargaron con NP-EGTA-AM 10 μ M (NP) durante 10 min a 37 °C para quelar el calcio intraacrosomal. Luego, las células fueron estimuladas con CaCl_2 0,5 mM durante 15 minutos a 37 °C para permitir que la RA proceda hasta el punto en que se requiere la salida del calcio acrosomal. Las células se preincubaron con la esponja de AMPc 100 nM durante 15 min a 37°C. Todas estas incubaciones se realizaron en la oscuridad. La fotólisis del quelante con luz UV se indujo al final de las incubaciones (hv) y las muestras se incubaron por 5 min adicionales a 37°C (NP → calcio → sp → hv, barra negra). Se realizaron los siguientes controles (barras grises): RA espontánea en ausencia de estímulo (control), RA estimulada con CaCl_2 0,5 mM (calcio), efecto inhibitorio del NP-EGTA-AM en oscuridad (NP → calcio → osc),

recuperación de la RA luego de iluminar con luz UV (NP → calcio → hv) y la esponja de AMPc agregada antes de estimular la RA (NP → sp → calcio → hv). El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

2.2. La movilización de calcio acrosomal sucede a través de una vía dependiente de Epac e independiente de PKA

El AMP cíclico se une tanto a PKA como a Epac para regular la liberación de calcio intracelular, pero los mecanismos moleculares que asocian el AMPc a calcio no están bien establecidos. En muchos modelos, AMPc/PKA y/o AMPc/Epac inducen la apertura de canales de calcio ubicados en reservorios intracelulares; tal liberación es importante para lograr respuestas biológicas. En los espermatozoides, el acrosoma por sí mismo se comporta como el reservorio interno de calcio necesario para que se lleve a cabo la exocitosis (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005). Cuando ciertos inductores de la RA se unen a sus receptores, se produce un ingreso transiente de calcio dentro del citosol a través de canales ubicados en la membrana plasmática. Esto inicia una compleja cascada de señalización que lleva a la movilización de calcio intracelular; el vaciamiento del reservorio interno conduce a la apertura de canales de calcio operados por reservorios presentes en la membrana plasmática y a un aumento sostenido de la concentración de calcio citosólica. El ingreso de calcio externo producido por ionóforos de calcio remedia la apertura de canales de calcio operados por reservorios e induce la RA. Este mismo efecto es logrado al adicionar CaCl₂ a células con su membrana plasmática permeabilizada con toxinas (Pocognoni et al., 2013; Yunes et al., 2000).

Fluo3-AM es un indicador fluorescente de calcio intracelular que prácticamente no emite fluorescencia en su forma libre, no unida al ligando. Cuando espermatozoides con su membrana plasmática permeabilizada con SLO son incubados con Fluo3-AM, el marcador difunde dentro del acrosoma, donde esterases remueven el grupo AM, atrapando el sensor en este compartimento. Una vez dentro del acrosoma, Fluo3 se vuelve fluorescente luego de la unión a calcio. Gracias al protocolo de permeabilización con SLO, hemos podido visualizar el reservorio de calcio acrosomal en espermatozoides humanos con la sonda Fluo3-AM (De Blas et al., 2002; Lopez et al., 2012; Ruete et al., 2014), algo imposible de conseguir en células no permeabilizadas donde las esterases citosólicas remueven el grupo AM, atrapando el sensor Fluo3 en el citosol.

Nos propusimos evaluar, mediante el uso de este modelo, si los componentes de la vía señalizada a través de AMPc están implicados en la movilización de calcio del reservorio

acrosomal. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con BoNT/B para inhibir la etapa final de la exocitosis acrosomal (el clivaje de SNAREs con toxinas no afecta la movilización de calcio interno (De Blas et al., 2002; Lopez et al., 2012)) y luego cargados con el sensor Fluo3-AM como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En algunos tratamientos las células se preincubaron con la esponja de AMPc 100 nM, KH7 10 μ M o H89 10 μ M durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron pegadas a cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina y los cubreobjetos montados en una cámara termostatzada adaptada a un microscopio confocal. Los espermatozoides adheridos fueron mantenidos en medio HB-EGTA climatizado a 37°C. Durante los primeros 30 segundos se registraron los valores de fluorescencia basal (período control), inmediatamente se agregó el estímulo (CaCl_2 0,5 mM, 8-pCPT-2-O'-Me-AMPc 50 μ M o 6-Bnz-AMPc 200 μ M) y se continuó grabando la fluorescencia durante 300 segundos totales. Los videos fueron analizados y se obtuvieron los valores medios de fluorescencia para cada célula. A partir de los valores obtenidos se calcularon los valores de fluorescencia relativos, se graficaron y analizaron estadísticamente. Se realizaron montajes de una célula representativa de la población para cada condición.

En una primera instancia, nos propusimos analizar si el estímulo con calcio extracelular es capaz de inducir el vaciamiento del reservorio acrosomal. Primero medimos la concentración de calcio en células sin estimular para comprobar que la fluorescencia no decayera a lo largo del tiempo. La concentración de calcio en el gránulo permaneció alta y sin cambios apreciables durante los primeros 5 minutos de incubación a 37°C (Figura 29A), sugiriendo que el acrosoma no se vacía por difusión pasiva en este lapso de tiempo. Posteriormente, estimulamos células con CaCl_2 y medimos las fluctuaciones en la fluorescencia. Las altas concentraciones de calcio intra-acrosomal típicas de células en reposo, disminuyeron apreciablemente durante los primeros 30 segundos de incubación con calcio externo y cayeron casi a niveles no detectables después de los 120 segundos (Figura 29B). Como era de esperar, el calcio no fue movilizado en la pieza media de los espermatozoides en respuesta al estímulo de la exocitosis, por lo que este reservorio fue utilizado para establecer una comparación (control de fotoblanqueo) con las fluctuaciones de fluorescencia acrosomales. Con este experimento, demostramos por primera vez de forma directa, que el calcio extracelular promueve la movilización de calcio intracelular.

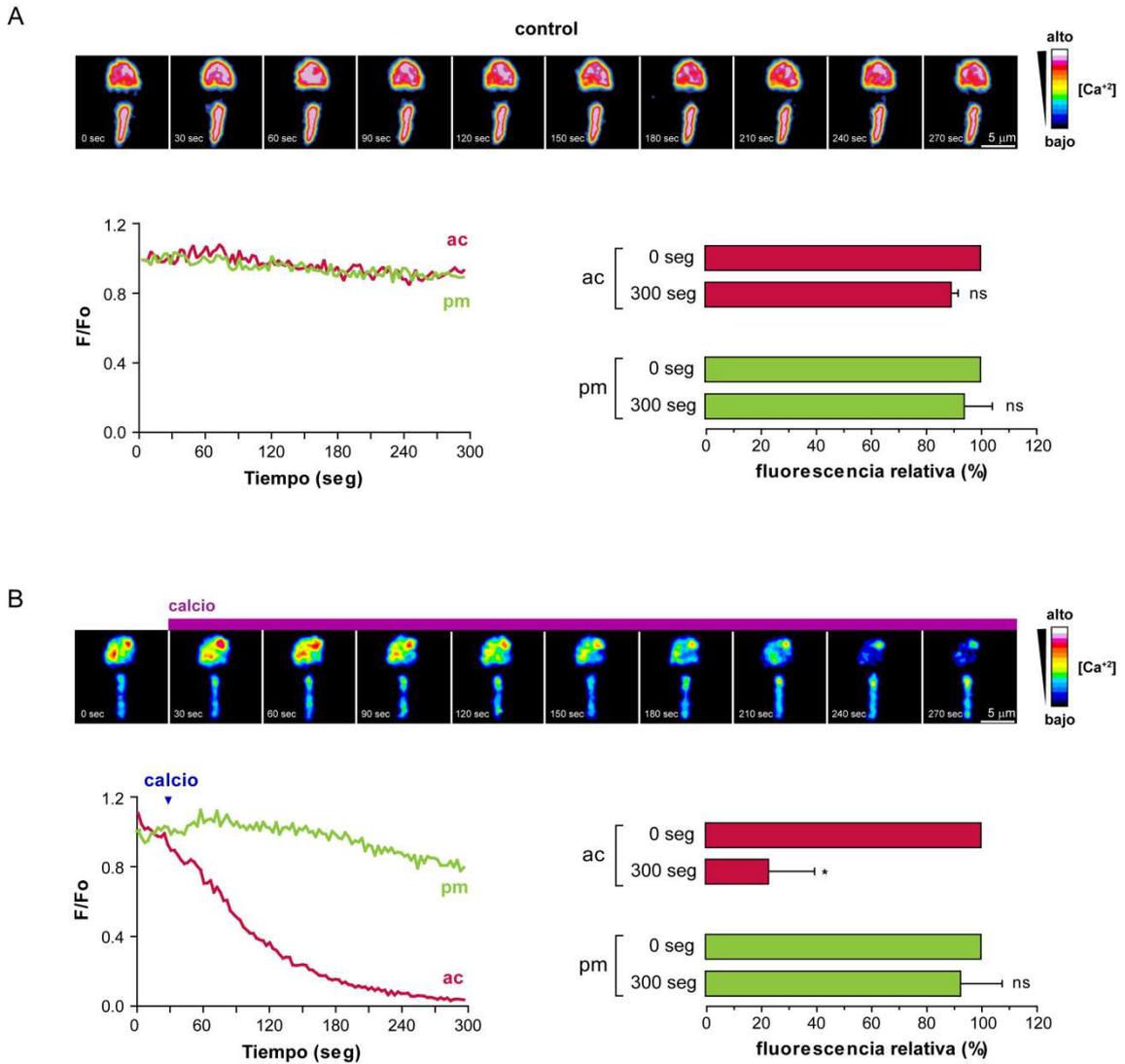


Figura 29. El estímulo con calcio extracelular induce la salida de calcio a partir del reservorio acrosomal. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con la toxina BoNT/B durante 15 minutos para prevenir la exocitosis acrosomal y luego cargados con Fluo3-AM/ácido plurónico durante 30 min a 37°C. Las células fueron lavadas, pegadas a cubreobjetos pretratados con polilisina y colocadas en una cámara termostatzada. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de espermatozoides cargados con Fluo3-AM sin ningún tratamiento (A) y antes y después del tratamiento con CaCl_2 0,5 mM (Ca, barra violeta B). Las imágenes se muestran en pseudocolor (azul y blanco representan baja o alta concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, respectivamente; barras = 5 μm). Los números debajo de cada imagen indican el tiempo en segundos relativo al inicio de la filmación. Los gráficos de barras representan la respuesta poblacional a cada tratamiento. La cuantificación muestra la fluorescencia relativa inicial (100%) comparada con la fluorescencia 300 segundos sin tratamiento (A) o después del tratamiento con CaCl_2 0,5 mM (B) en la pieza media (pm, verde) y en la región acrosomal (ac, rojo). Las barras representan el promedio \pm EEM (N=3). (A y B) Cada gráfico de líneas representa el registro de los cambios en la concentración de calcio intracelular de la célula mostrada en el montaje. Los gráficos muestran los trazos de la fluorescencia de la pieza media (pm, verde) y la región acrosomal (ac, rojo) en células sin tratamiento (A) o en respuesta a la adición de CaCl_2 0,5 mM (B, flecha vertical). Las escalas muestran la fluorescencia normalizada (F/F₀) vs. el tiempo en segundos (s), donde F es intensidad de

fluorescencia al tiempo t y F_0 es el promedio de F registrado durante el periodo control antes de la adición del estímulo.

Una vez comprobado que el estímulo con calcio exógeno induce la salida de calcio del reservorio acrosomal, nos preguntamos si esta movilización requiere AMPc. Con este propósito, incubamos células con KH7 o la esponja de AMPc y luego analizamos si se producía una disminución de la fluorescencia acrosomal al estimular las células con calcio extracelular. La preincubación de los espermatozoides con ambos inhibidores, abolió el vaciamiento del reservorio provocado por el agregado de calcio extracelular, confirmando de forma directa, que el AMPc es fundamental para que se ponga en marcha la vía de señalización que conduce a la salida de calcio acrosomal (Figura 30).

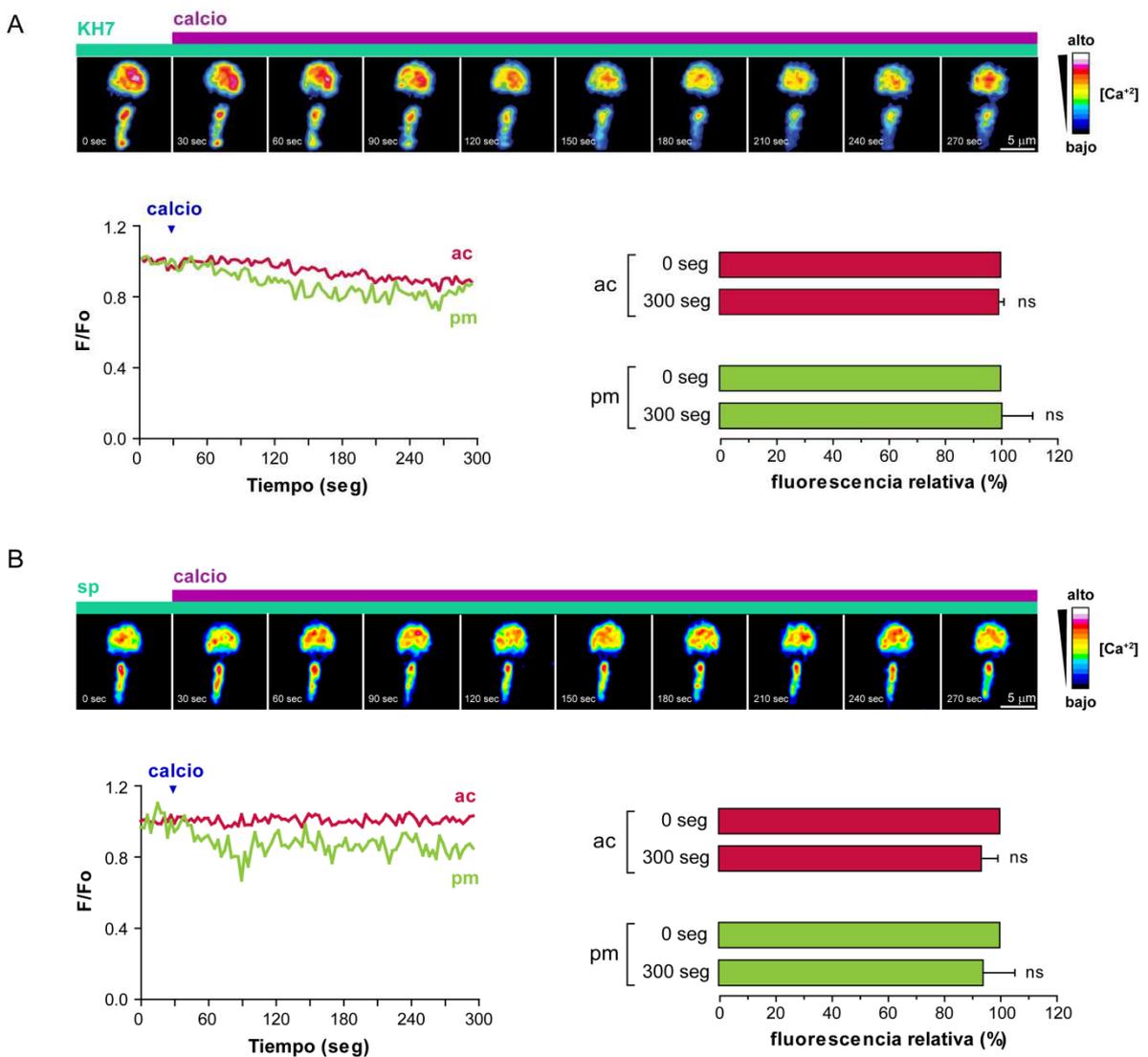


Figura 30. La salida de calcio acrosomal requiere AMPc. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con la toxina BoNT/B durante 15 minutos para prevenir la exocitosis acrosomal y luego cargados con Fluo3-AM/ácido plurónico durante 30 min a 37 °C. Las células fueron lavadas y una alícuota de las mismas fue incubada con el inhibidor KH7 10 μ M (A) o la esponja de AMPc 100 nM (B)

durante 15 min a 37°C. Luego fueron pegadas a cubreobjetos pretratados con polilisina y colocadas en una cámara termostatzada. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de espermatozoides cargados con Fluo3-AM antes y después del tratamiento con CaCl₂ 0,5 mM (calcio, barra violeta A y B). Las imágenes se muestran en pseudocolor (azul y blanco representan baja o alta concentración de calcio intracelular [Ca⁺²]_i, respectivamente; barras = 5 μm). Los números debajo de cada imagen indican el tiempo en segundos relativo al inicio de la filmación. Los gráficos de barras representan la respuesta poblacional a cada tratamiento. La cuantificación muestra la fluorescencia relativa inicial (100%) comparada con la fluorescencia 300 segundos después del tratamiento con CaCl₂ 0,5 mM en la pieza media (pm, verde) y en la región acrosomal (ac, rojo). Las barras representan el promedio ± EEM (N=3). (A y B) Cada gráfico de líneas representa el registro de los cambios en la concentración de calcio intracelular de la célula mostrada en el montaje. Los gráficos muestran los trazos de la fluorescencia de la pieza media (pm, verde) y la región acrosomal (ac, rojo) en respuesta a la adición de CaCl₂ 0,5 mM (flechas verticales). Las escalas muestran la fluorescencia normalizada (F/F₀) vs. el tiempo en segundos (s), donde F es intensidad de fluorescencia al tiempo t y F₀ es el promedio de F registrado durante el periodo control antes de la adición del estímulo.

Posteriormente, analizamos si la movilización de calcio dependiente de AMPc es señalizada a través de Epac, PKA o ambas. N6-benzoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico (6-Bnz-AMPc) es un análogo de AMPc selectivo para PKA y H89 un inhibidor selectivo de PKA. Evaluamos el efecto de 6-Bnz-AMPc y H89 con el fin de determinar si la movilización de calcio depende de la activación de PKA. Por otro lado, estimulamos espermatozoides con 8-pCPT-2-O-Me-AMPc y verificamos si se producía el vaciamiento del reservorio en células precargadas con la esponja de AMPc o con el anticuerpo anti-Epac para analizar si la salida del calcio interno depende de Epac.

Cuando las células fueron preincubadas con H89 y luego estimuladas con calcio, un alto porcentaje perdió la marca fluorescente en su acrosoma (Figura 31A). El efecto contrario fue observado en espermatozoides estimulados con 6-Bnz-AMPc, en los cuales no se registraron cambios en la fluorescencia durante todo el periodo de incubación (Figura 31B). Estos datos estarían indicando que no es a través de la activación de PKA que el AMPc induce la salida de calcio desde el reservorio interno.

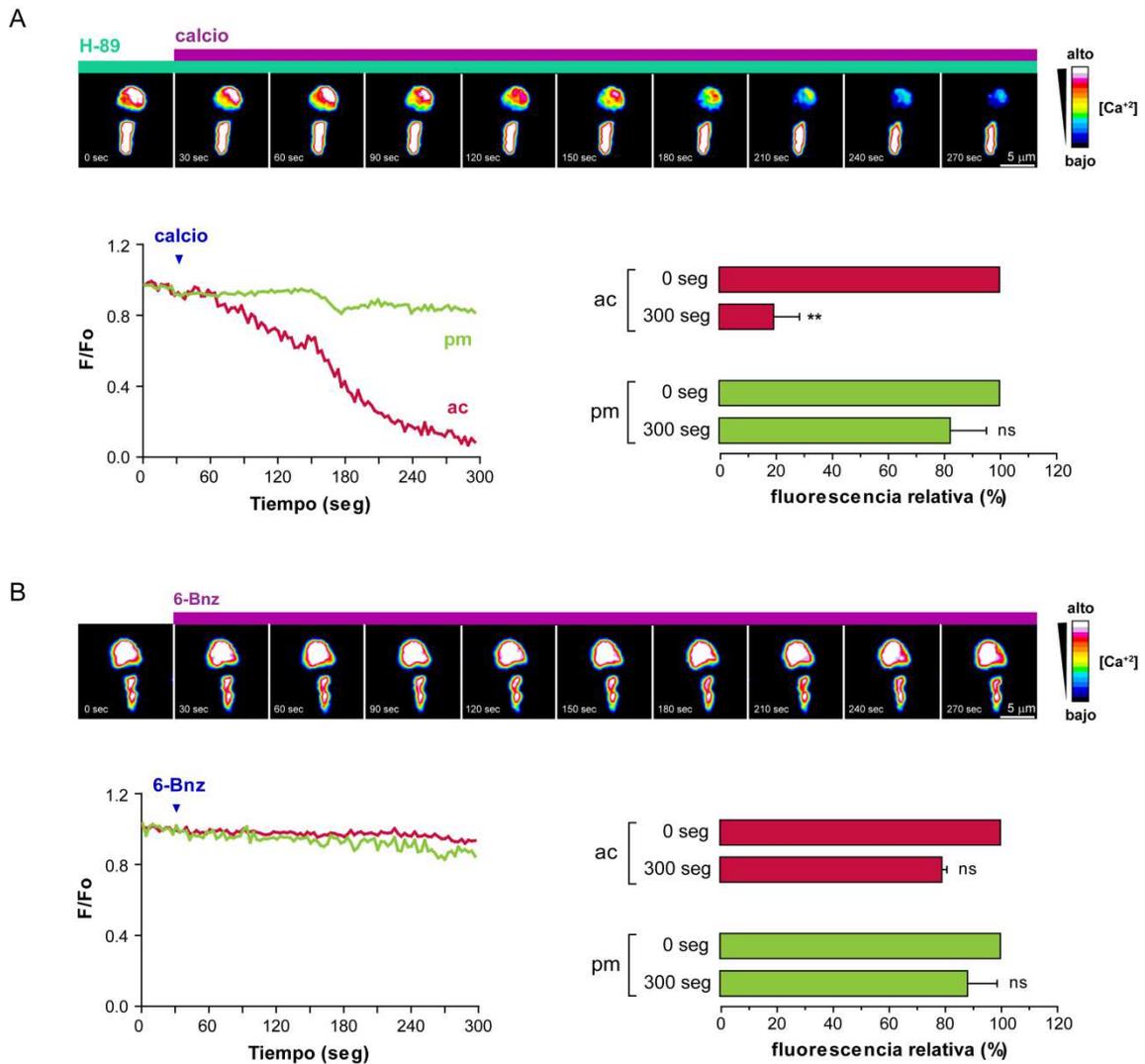


Figura 31. La movilización de calcio acrosomal es independiente de la activación de PKA. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con la toxina BoNT/B (100 nM) durante 15 minutos para prevenir la exocitosis acrosomal y luego cargados con Fluo3-AM (2 μ M)/ácido plurónico (1 μ M) durante 30 min a 37°C. Las células fueron lavadas y una alícuota de las mismas fue incubada con H89 10 μ M (A) durante 15 min a 37 °C. Luego fueron pegadas a cubreobjetos con polilisina y colocadas en una cámara termostatzada. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de espermatozoides cargados con Fluo3-AM antes y después del tratamiento con CaCl_2 0,5 mM (calcio, A) o 6-Bnz-AMPC 200 μ M (6-Bnz, B). Las imágenes se muestran en pseudocolor (azul y blanco representan baja o alta concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{+2}]_i$, respectivamente; barras = 5 μ m). Los números debajo de cada imagen indican el tiempo en segundos relativo al inicio de la grabación. Los gráficos de barras representan la respuesta poblacional a cada tratamiento. La cuantificación muestra la fluorescencia relativa inicial (100%) comparada con la fluorescencia 300 segundos después del tratamiento con CaCl_2 0,5 mM (A) o 6-Bnz 200 μ M (B) en la pieza media (pm, verde) y en la región acrosomal (ac, rojo). Las barras representan el promedio \pm EEM (N=3). Cada gráfico de líneas representa el registro de los cambios en la concentración de calcio intracelular de la célula mostrada en el montaje. Los gráficos muestran los trazos de la fluorescencia de la pieza media (pm, verde) y la región acrosomal (ac, rojo) en respuesta a la adición de CaCl_2 0,5 mM (A) o 6-Bnz 200 μ M (B) (flechas verticales). Las escalas muestran la fluorescencia normalizada (F/F₀) vs. el tiempo en segundos (s), donde F es intensidad de fluorescencia al tiempo t y F₀ es el promedio de F registrado durante el periodo control antes de la adición del estímulo.

En el caso contrario, cuando los espermatozoides cargados con la sonda fueron incubados con el análogo selectivo para Epac, 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, la fluorescencia disminuyó rápidamente a valores indetectables en un alto porcentaje de la población celular (Figura 32A). La misma respuesta fue observada en células precargadas con la esponja de AMPC y estimuladas con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Figura 32B), ya que la adición de este análogo de AMPC suplanta al AMPC capturado por la esponja. Estos resultados demuestran que la activación de Epac es suficiente para disparar la vía que lleva a la salida de calcio interno. La respuesta opuesta fue observada cuando las células se preincubaron con el anticuerpo anti-Epac y luego estimularon con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Figura 32C). Todos estos datos en conjunto indican, que es a través de la vía de señalización AMPC/Epac que inductores de la RA aseguran la salida de calcio desde el reservorio acrosomal, evento fundamental para poder llevar a cabo la exocitosis del gránulo.

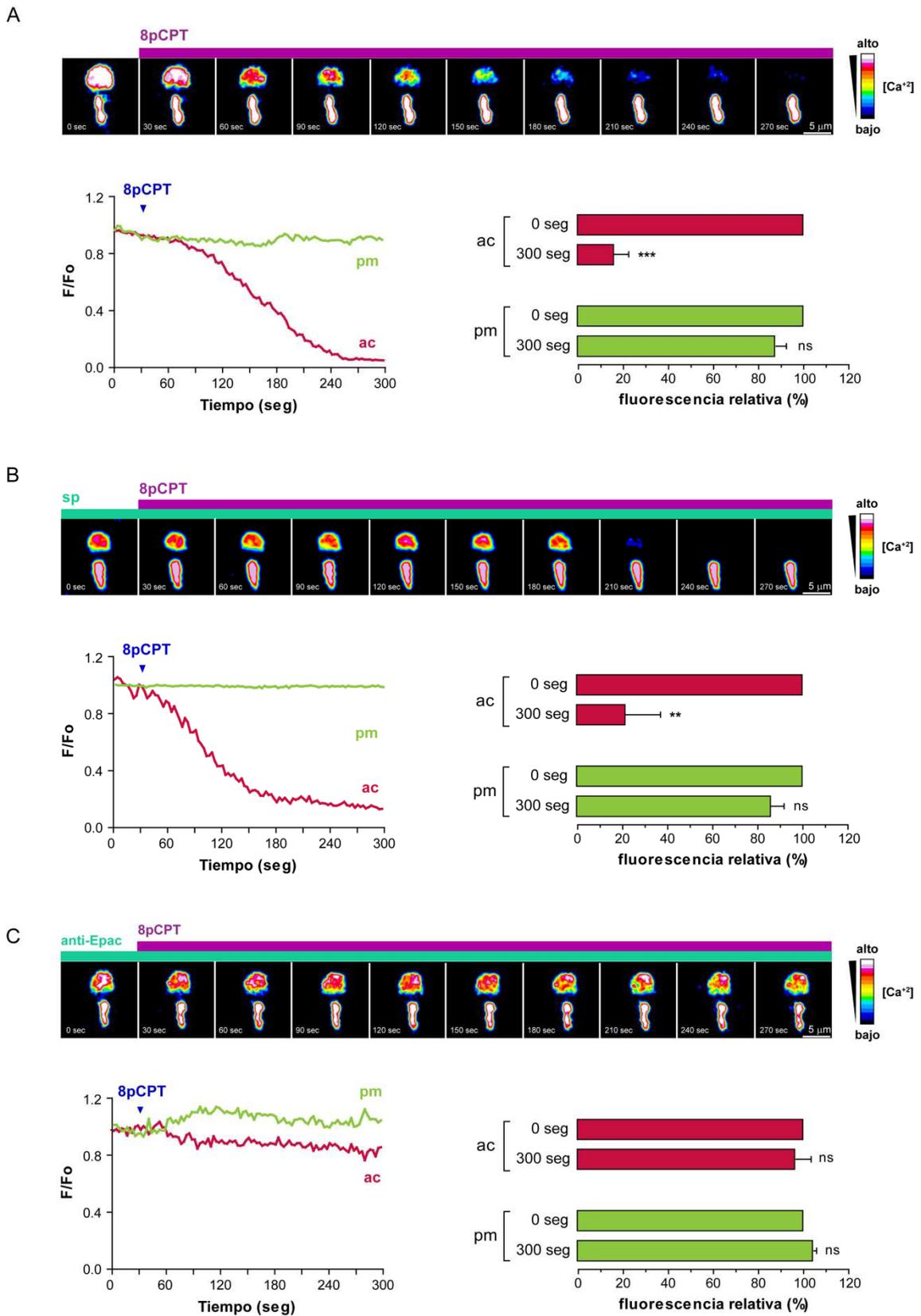
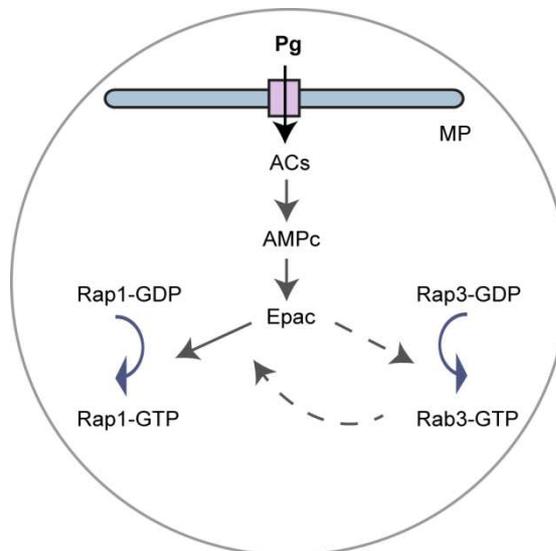


Figura 32. El vaciamiento del reservorio acrosomal es dependiente de la activación de Epac. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con la toxina BoNT/B (100 nM) durante 15 minutos para prevenir la exocitosis acrosomal y luego cargados con Fluo3-AM (2 μ M)/ácido plurónico (1 μ M) durante 30 min a 37°C. Las células fueron lavadas y una alícuota de las mismas fue incubada con la

esponja de AMPc 100 nM (B) o el anticuerpo anti-Epac 6,7 nM (C) durante 15 min a 37 °C. Luego fueron pegadas a cubreobjetos con polilisina y colocadas en una cámara termostatzada. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de espermatozoides cargados con Fluo3-AM antes y después del tratamiento con 8-pCPT-2-O-Me-AMPc 50 µM (8pCPT, A, B y C). Las imágenes se muestran en pseudocolor (azul y blanco representan baja o alta concentración de calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$, respectivamente; barras = 5 µm). Los números debajo de cada imagen indican el tiempo en segundos relativo al inicio de la grabación. Los gráficos de barras representan la respuesta poblacional a cada tratamiento. La cuantificación muestra la fluorescencia relativa inicial (100%) comparada con la fluorescencia 300 segundos después del tratamiento con 8-pCPT-2-O-Me-AMPc 50 µM en la pieza media (pm, verde) y en la región acrosomal (ac, rojo). Las barras representan el promedio ± EEM (N=3). Cada gráfico de líneas representa el registro de los cambios en la concentración de calcio intracelular de la célula mostrada en el montaje. Los gráficos muestran los trazos de la fluorescencia de la pieza media (pm, verde) y la región acrosomal (ac, rojo) en respuesta a la adición de 8-pCPT-2-O-Me-AMPc 50 µM (flechas verticales). Las escalas muestran la fluorescencia normalizada (F/Fo) vs. el tiempo en segundos (s), donde F es intensidad de fluorescencia al tiempo t y Fo es el promedio de F registrado durante el periodo control antes de la adición del estímulo.

Parte de los resultados de estos experimentos se encuentran incluidos en un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio en el que soy autora (Ruete et al., 2014).

OBJETIVO ESPECÍFICO 4. Desentrañar la vía de señalización en la cual se encuentra implicada la proteína Rap1.



Esquema representativo de la vía de señalización que se describe a continuación.

1. Diseño de un método que permite la detección simultánea de la localización y el estado de activación de Rap1 endógena por microscopía de fluorescencia

1. 1. Desarrollo del método

Con el fin de analizar el estado de activación de diferentes GTPasas monoméricas involucradas en las vías de señalización que conducen a la RA, hasta el momento se han llevado a cabo ensayos de pull down con proteínas recombinantes que unen y permiten recuperar estas GTPasas en su estado activo a partir de extractos de espermatozoides tratados con diferentes estímulos (Branham et al., 2009; Bustos et al., 2012). Si bien este método permite detectar un incremento en los niveles de estas proteínas en su estado activo (unido a GTP) en células tratadas con diferentes inductores de la RA, no brinda información detallada sobre el porcentaje de células que presenta GTPasas activas ni tampoco acerca de la localización subcelular de estas proteínas. Para abordar estos aspectos, en nuestro laboratorio desarrollamos un nuevo método que combina el uso de dominios proteicos que reconocen Rab3 y Rab27 en su estado GTP con la técnica de inmunofluorescencia indirecta y pudimos determinar simultáneamente el porcentaje de células con Rabs activas y la ubicación subcelular de estas proteínas en respuesta a diversos inductores de la excitosis acrosomal (Bustos et al., 2012).

Basada en esta estrategia, realicé una adaptación de la técnica para la detección de la proteína Rap en su estado GTP utilizando el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST. Esta proteína recombinante está formada por el sitio de unión (del inglés *Ras Binding Domain*, RBD) del efector Ral-GDS el cual posee la capacidad de unirse a la proteína Rap en su estado activo (van Triest et al., 2001), asociado al *tag* de GST que permite su purificación con columnas de afinidad de glutatión sefarosa y su detección con anticuerpos anti-GST. El protocolo se esquematiza a continuación en la figura 33.

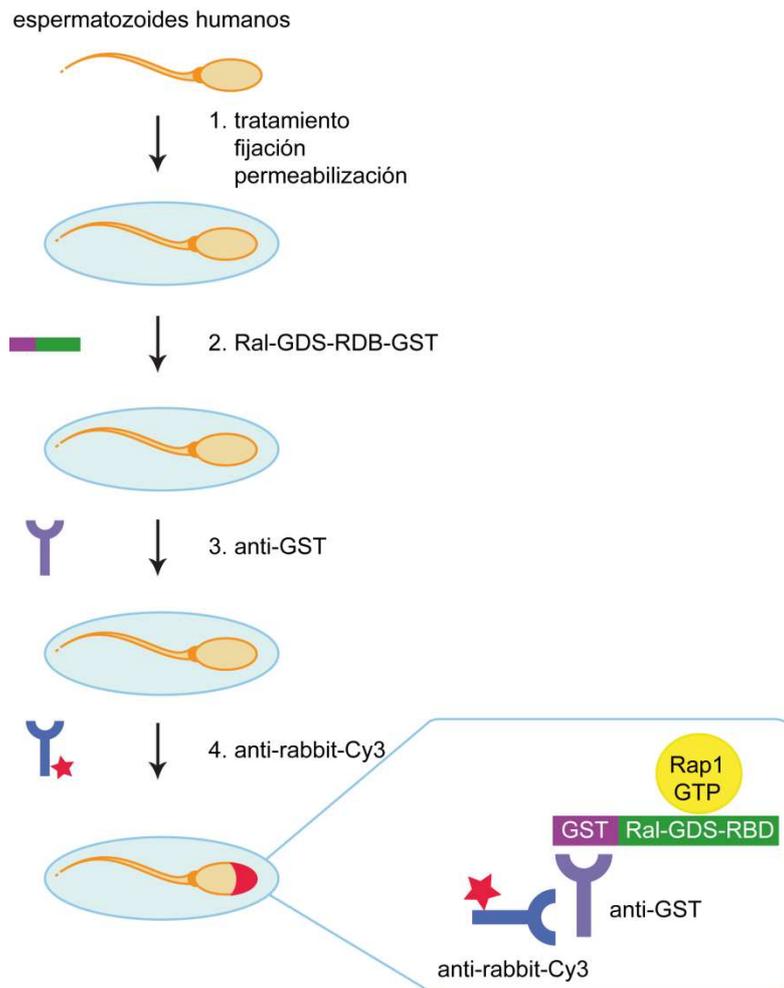


Figura 33. Representación esquemática del protocolo de Far-inmunofluorescencia (Far-IFI) para la detección de Rap1 en su estado GTP. Luego de los respectivos tratamientos, las células fueron fijadas, inmovilizadas en cubreobjetos con poli-L-lisina y permeabilizadas con tritón X-100 (1). Los espermatozoides pegados fueron recubiertos con el *cassette* de proteína recombinante Ral-GDS-RBD-GST, el cual une Rap1 en su estado activo (2). Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados con el anticuerpo primario anti-GST para la detección del dominio proteico unido a la proteína Rap1-GTP endógena (3). A continuación, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (4) con el fin de detectar el complejo anti-GST/Ral-GDS-RBD-GST/Rap1-GTP (recuadro). Finalmente, los cubreobjetos fueron montados y se cuantificó el porcentaje de células con marca acrosomal por microscopía de fluorescencia. Recuadro: el dominio Ral-GDS-RBD (verde-morado) unido a Rap1-GTP (amarillo) es reconocido por el anticuerpo primario anti-GST (violeta), el cual es detectado por el anticuerpo secundario (azul) acoplado a Cy3 (estrella roja).

1. 2. Validación del método

En una primera instancia, fue necesario diseñar un protocolo que permitiera validar el método y comprobar que el *cassette* de proteína recombinante era capaz de discriminar entre la proteína Rap1 en su estado unido a GDP y el unido a GTP. Con este fin, espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con 2-APB para impedir la pérdida de la región acrosomal y luego fueron incubados con EDTA para quelar los iones Mg^{2+} . Posteriormente, las

células fueron cargadas con GDP- β -S o GTP- γ -S con el propósito de determinar los niveles mínimo y máximo respectivamente de Rap1 activa detectables con el dominio Ral-GDS-RBD-GST. Se continuó con el protocolo diseñado de Far-IFI y se observó al microscopio. Como control negativo, se utilizaron células cargadas con nucleótidos, con la diferencia de que durante el desarrollo de la Far-IFI, el dominio Ral-GDS-RBD-GST fue reemplazado por la proteína GST recombinante.

Al observar las células presenciamos un inmunomarcado definido en la región acrosomal de los espermatozoides, comprobando asimismo, que el patrón de tinción desaparecía en aquellas células que habían perdido su acrosoma (Figura 34B). Al cuantificar el porcentaje de células con marca roja en la región acrosomal (indicando la presencia de Rap1 activa), pudimos comprobar que un 35% de las células tratadas con GDP- β -S presentaba marca. Al cuantificar los porcentajes de tinción de espermatozoides tratados con GTP- γ -S, este valor aumentó a un 55% (Figura 34C). En el caso de los controles incubados con la proteína GST, ninguna célula presentó marca acrosomal con el anticuerpo anti-GST, independientemente del nucleótido agregado (Figura 34A). Estos datos indican que la técnica diseñada permite identificar la subpoblación de espermatozoides con Rap1 en su estado activo. Otra ventaja a destacar, es que el método posibilitó la detección de la proteína activa en la región acrosomal, localización que hasta el momento no había podido comprobarse y que es consecuente con el rol que cumple Rap1 en la exocitosis acrosomal.

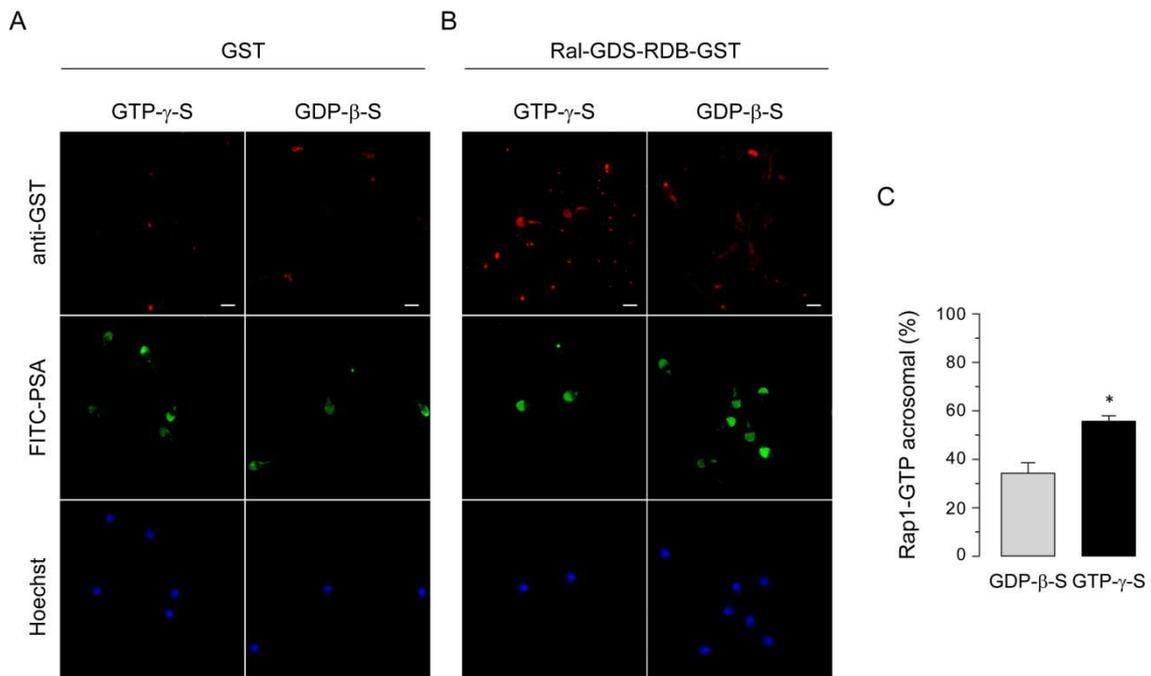


Figura 34. Detección del estado de activación de Rap1 endógena. Espermatozoides capacitados, permeabilizados con SLO fueron incubados con 2-APB y EDTA (como se describe en Materiales y

Métodos). Las células fueron cargadas con GDP- β -S (paneles derechos) o GTP- γ -S (paneles izquierdos) y los nucleótidos unidos, fueron estabilizados con MgCl₂. Las suspensiones celulares fueron fijadas con PAF, pegadas a cubreobjetos con poli-L-lisina y recubiertas con el dominio GST (A) o Ral-GDS-RBD-GST (B). Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-GST y teñidas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Cy3 (paneles superiores rojos). Se realizaron tinciones con la lectina PSA-FITC para evaluar el estado acrosomal (paneles centrales verdes) y con el colorante Hoechst 33342 para marcar los núcleos de las células (paneles inferiores azules), (barras = 5 μ m). (C) las células incubadas con el dominio Ral-GDS- RBD-GST fueron cuantificadas y se graficó el porcentaje de células con marca del anticuerpo anti-GST en la región acrosomal. Se contaron alrededor de 200 células por condición, la barra gris representa las células tratadas con GDP- β -S y la negra células tratadas con GTP- γ -S. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (* p < 0.05).

2. Rap1 es activada en respuesta a inductores de la exocitosis acrosomal

Como se mencionó anteriormente, Epac es un GEF para Rap. En espermatozoides permeabilizados, fue descrita la activación de la proteína Rap en respuesta al estímulo con el análogo de AMPc selectivo para Epac 8-pCPT-2-O-Me-AMPc mediante ensayos de pull down a partir de extractos totales (Branham et al., 2009). Con el fin de evaluar en qué porcentaje de la población se activa Rap en respuesta a inductores de la RA y al mismo tiempo determinar la localización subcelular de la proteína en su estado activo, llevamos a cabo los siguientes experimentos utilizando la técnica de Far-IFI.

En primer lugar, nos propusimos evaluar si la proteína Rap era activada en respuesta al estímulo con el ionóforo de calcio A23187 o el inductor fisiológico progesterona. Para ello, espermatozoides capacitados fueron incubados con 2-APB 100 μ M y luego estimulados con A23187 10 μ M o progesterona 15 μ M. Una vez finalizadas las incubaciones, se prosiguió con el protocolo de Far-IFI para espermatozoides no permeabilizados descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los cubreobjetos con los diferentes tratamientos fueron montados y observados en microscopio de fluorescencia. Para la cuantificación del porcentaje de espermatozoides con Rap1 activa fueron contadas alrededor de 200 células por condición, tomándose como patrón de tinción positivo aquellas células con marca acrosomal del anticuerpo acoplado a Cy3. Las células marcadas con el anticuerpo en la región acrosomal fueron comparadas con las teñidas con la lectina PSA-FITC, comprobándose que los espermatozoides espontáneamente reaccionados no presentaban tinción acrosomal con el anticuerpo. En cambio, sí encontramos células con los acrosomas intactos pero sin Rap activa (Figura 35A). Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5 (Figura 35B).

El dominio Ral-GDS-RDB detectó Rap activa en la región acrosomal de una subpoblación de células en reposo. El porcentaje incrementó significativamente (una diferencia de alrededor del 40%) luego de la incubación con A23187 (Figura 35B). Asimismo, el estímulo con progesterona provocó un aumento de la misma magnitud en la población de células con Rap-GTP acrosomal (40% sobre valores basales, Figura XB). Estos resultados sugieren que la activación de Rap es un paso crucial en la cascada exocítica activada por el agonista fisiológico progesterona y por el ionóforo de calcio.

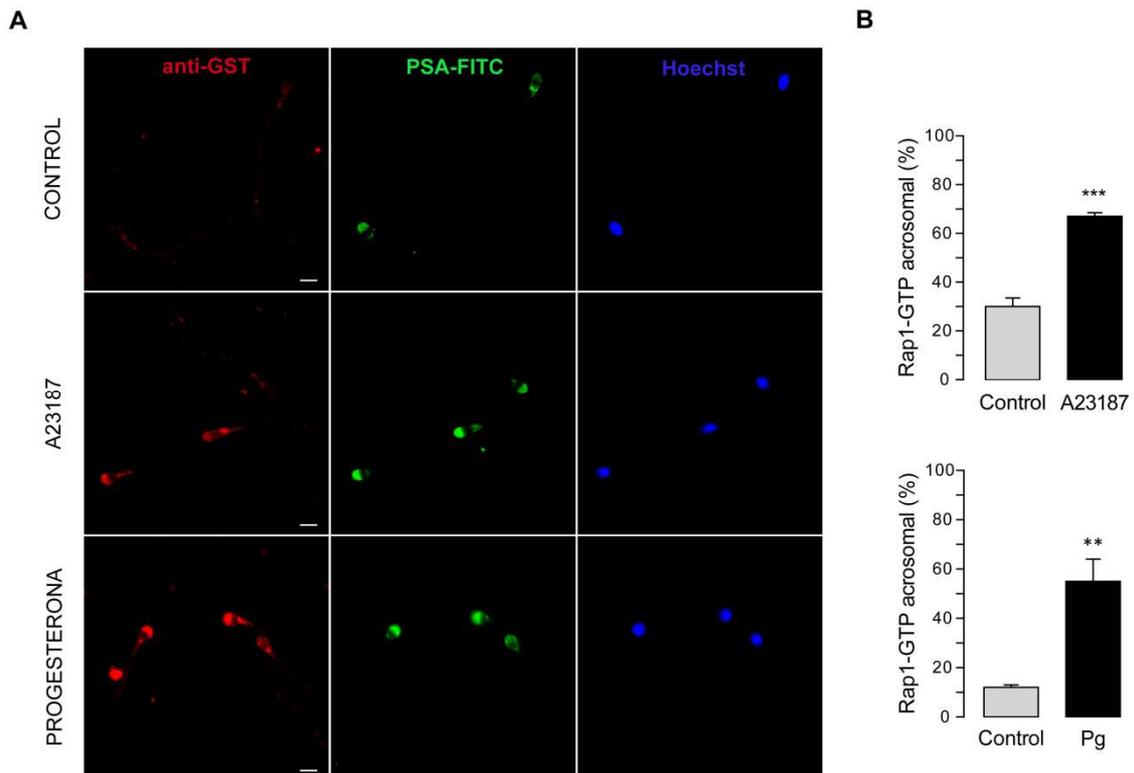


Figura 35. Rap1 es activada en respuesta al estímulo con progesterona y A23187. (A) Far-IFI de espermatozoides estimulados con A23187 y progesterona. Espermatozoides capacitados fueron incubados con 2-APB para evitar la pérdida acrosomal, luego estimulados con A23187 (paneles medios) y progesterona (paneles inferiores) durante 15 minutos y fijados con PAF 2%. Luego de neutralizar con glicina, las células se pegaron a cubreobjetos, bloquearon con BSA 5% e incubaron con el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST. Rap-GTP fue detectada en la región acrosomal mediante el inmunomarcado con el anticuerpo primario anti-GST (que se une al *cassette* de proteína recombinante), seguido de la marcación con el anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (paneles rojos). También se realizaron tinciones con la lectina PSA acoplada a FITC para evaluar el estado acrosomal (paneles verdes) y con el colorante Hoechst 33342 para la visualización de los núcleos celulares (paneles azules). Se utilizaron como control células sin tratar con inductores (paneles superiores), (barra = 5 μ m). (B) Cuantificación del porcentaje de células con Rap1 activa. Se contaron alrededor de 200 células por condición, las barras negras representan las células tratadas con los inductores y las grises células sin tratamiento. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (***) $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$).

3. Progesterona activa a la pequeña GTPasa Rap1 a través de una vía que utiliza AMPc endógeno

En el modelo planteado por nuestro laboratorio de la vía de señalización que lleva a la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos, AMPc/Epac están situados en un punto central de la cascada a partir del cual la vía exocítica se divide en dos ramas que actúan en conjunto para que la exocitosis se lleve a cabo exitosamente. La activación de la proteína Rap1 encabeza la rama que lleva a la liberación de calcio a partir del reservorio acrosomal (Branham et al., 2009; Ruete et al., 2014). Sabemos que Rap1 es activada directamente por la acción de Epac, sin embargo no ha sido demostrado directamente que el AMPc endógeno es requerido para esta activación. Con el fin de evaluar si progesterona requiere AMPc para activar esta GTPasa, llevamos a cabo una Far-IFI en espermatozoides preincubados con la esponja de AMPc y luego estimulados con progesterona.

Espermatozoides capacitados fueron tratados con 2-APB 100 μ M durante 10 minutos, luego incubados con la esponja de AMPc 100 nM 15 minutos y finalmente estimulados con progesterona 15 μ M durante 15 minutos (todas las incubaciones se realizaron a 37°C). Una vez finalizadas las incubaciones, las células fueron fijadas en suspensión con PAF 2% y se continuó con el protocolo de Far-IFI (ver sección de Materiales y Métodos). Finalmente, las células fueron montadas y observadas en microscopio de fluorescencia (Figura 36A). Para la cuantificación del porcentaje de espermatozoides con Rap1 activa fueron contadas alrededor de 200 células por condición, tomándose como patrón de tinción positivo aquellas células con marca acrosomal del anticuerpo acoplado a Cy3. Los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5 (Figura 36B).

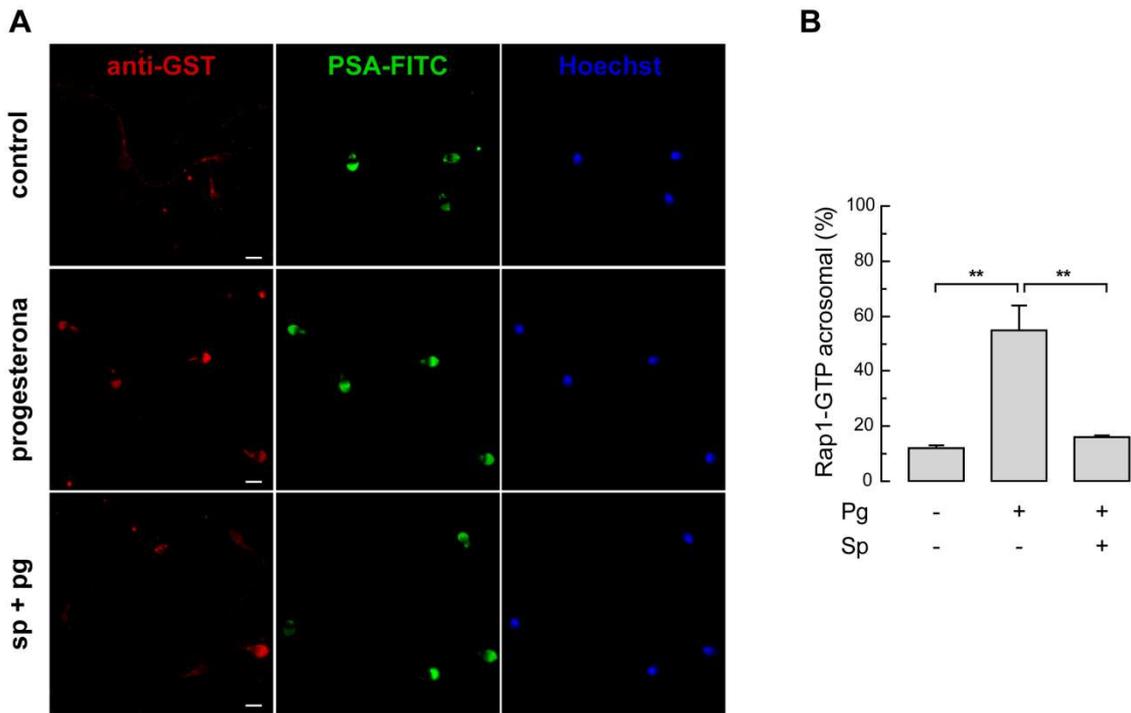


Figura 36. Rap1 es activada por progesterona por una vía que requiere AMPc endógeno. (A) Far-IFI de espermatozoides incubados con la esponja de AMPc y posteriormente estimulados con progesterona (Sp + Pg, panel inferior). Se utilizaron como control células sin tratamiento (control, panel superior) y tratadas con progesterona (panel medio). Luego de las incubaciones, las células fueron fijadas con PAF 2%, neutralizadas con glicina, pegadas a cubreobjetos y bloqueadas con BSA 5%. Posteriormente, fueron incubadas con el *cassette* Ral-GDS-RBD fusionado a GST. Todas las condiciones se trataron con el anticuerpo anti-GST y luego, se realizó una triple tinción con el anticuerpo anti-rabbit acoplado a Cy3 (paneles rojos), con la lectina PSA-FITC (paneles verdes) y con Hoechst 33342 (paneles azules). (B) El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de células con Rap1 activa. Se contaron alrededor de 200 células por condición, tomándose como patrón de tinción positivo aquellas células con marca acrosomal del anticuerpo acoplado a Cy3. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$).

Al cuantificar las células pudimos observar que los valores basales de Rap1-GTP fueron del 12% y que luego del estímulo con progesterona, aumentaron a un 55%. Al preincubar las células con la esponja de AMPc y luego estimular la RA con progesterona, pudimos comprobar que los valores de activación para Rap1 disminuyeron a 16% (Figura 36B). Estos resultados indican que la cascada de señalización iniciada por progesterona activa Rap1 mediante una vía que utiliza AMPc endógeno.

4. Rap1 es activada a través de una vía dependiente de Epac e independiente de PKA

Como hemos mencionado anteriormente, las respuestas celulares en las que se encuentra involucrado el AMPc pueden estar señalizadas a través de dos blancos principales: PKA y Epac. En múltiples tipos celulares la activación de Rap1 se encuentra asociada a un

incremento en la actividad de PKA. Evidencias recientes muestran que Rap1 es fosforilada en su extremo C-terminal por PKA y como consecuencia, es removida de la membrana plasmática, incrementando la hidrólisis de GTP y consiguiendo su inactivación (Takahashi et al., 2013). Asimismo, PKA ha sido involucrada en la fosforilación de diversos factores que regulan la actividad de Rap1, como por ejemplo, la fosforilación e inactivación del Rap1GAP en neuronas del cuerpo estriado (McAvoy et al., 2009) o la fosforilación e inactivación del CalDAG-GEFI en plaquetas (Guidetti et al., 2013). Por otra parte, existen un gran número de evidencias que muestran que AMPc/Epac/Rap gobiernan múltiples respuestas biológicas en una amplia variedad de células. La señalización Epac/Rap ha sido descrita en numerosos eventos exocíticos tales como: la secreción de gránulos de insulina en células β -pancreáticas (Shibasaki et al., 2007), la liberación de amilasa pancreática (Sabbatini et al., 2008), la liberación de los cuerpos de Weibel-Palade en células endoteliales (van Hooren et al., 2012b), la regulación de la liberación de neurotransmisores en neuronas corticales (Subramanian et al., 2013), la secreción de cloro por células del epitelio intestinal (Hoque et al., 2010), etc.

Antecedentes previos en ensayos con espermatozoides permeabilizados demostraron que la RA inducida por AMPc es regulada por Epac e independiente de PKA (Branham et al., 2006). En base a estos resultados, nos preguntamos si la activación de Rap1 dependiente de AMPc estaría regulada a través de la vía de señalización activada por PKA, Epac o ambas. Para ello, un grupo de células se incubaron con el inhibidor selectivo de PKA H89 y luego se estimularon con progesterona. Paralelamente, se estimularon células con 6-Bnz-AMPc (análogo de AMPc selectivo para PKA), 8-pCPT-2-O-Me-AMPc (análogo de AMPc selectivo para Epac) o progesterona y se evaluó qué ocurría con el estado de activación de la proteína Rap mediante Far- IFI. Las células fueron cuantificadas, a cada porcentaje obtenido se le restó el valor del control y se graficó la diferencia del porcentaje de fluorescencia acrosomal (Δ % de fluorescencia acrosomal) (Figura 37).

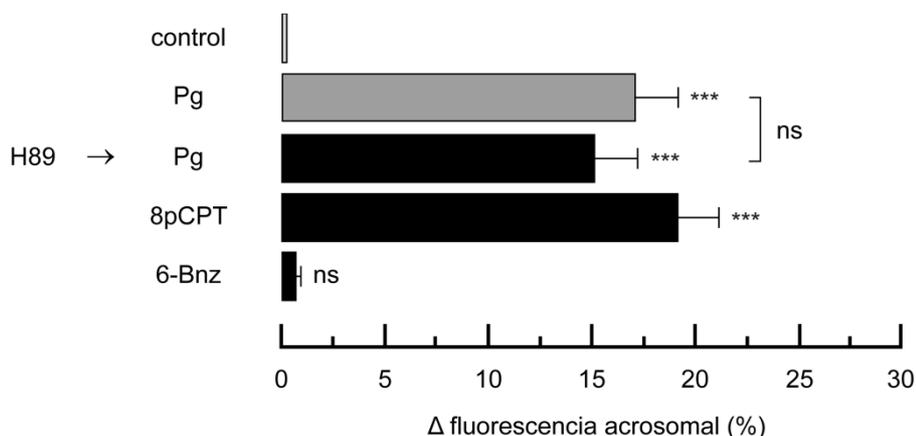


Figura 37. La activación de Rap1 sucede vía Epac y es independiente de PKA. Espermatozoides capacitados fueron tratados con 2-APB 100 μ M y a una de las condiciones se le agregó H89 10 μ M e incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron estimulados con progesterona 15 μ M (Pg), 8-pCPT-2-O-Me-AMPC 50 μ M (8pCPT) o 6-Bnz-AMPC 200 μ M (6-Bnz) durante 15 minutos y fijados en solución con PAF 2%. Las células se pegaron a cubreobjetos y se prosiguió con el protocolo de Far-IFI con el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST y el anticuerpo primario anti-GST para la detección de la proteína Rap1-GTP. Finalmente, se cuantificaron alrededor de 200 células y a los porcentajes obtenidos se le restó el valor del porcentaje del control. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (***) $p < 0.001$ comparados con el control sin tratar, ns: no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos).

El tratamiento de espermatozoides humanos con el análogo de AMPc selectivo para PKA, 6-Bnz-AMPC, no produjo cambios en la activación de Rap1 endógena (Figura 37). Asimismo, progesterona continuó aumentando el porcentaje de células con Rap-GTP en la región acrosomal incluso después del pretratamiento con H89. Estos resultados sugieren que el incremento de Rap-GTP dependiente de AMPc provocado por progesterona no fue debido a la activación de PKA. En cambio, se observó una importante activación de Rap a los 15 minutos de estimulación con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Figura 37). Estos datos confirman que la activación de Epac lleva al intercambio de GDP por GTP en la proteína Rap endógena. Además, indican que la vía de señalización involucrada en la activación de la proteína Rap1 estaría mediada por Epac y sería independiente de PKA.

5. Cinética de activación de Rap1 en respuesta a progesterona y 8-pCPT-2-O-Me-AMPC

Como mencionamos anteriormente, la proteína Rap es una pequeña GTPasa que cicla entre un estado activo promovido por proteínas GEF y un estado inactivo, controlado por factores GAP. En la cascada de señalización que lleva a la exocitosis acrosomal, estímulos que provocan un incremento en los niveles de AMPc intracelular activan al GEF Epac induciendo el intercambio de nucleótidos y la consiguiente activación de Rap. Con el objeto de analizar si mediante el uso del método descrito más arriba es posible detectar el ciclo de activación-inactivación de la proteína Rap, nos propusimos medir la cinética de activación de Rap1 en respuesta a inductores de la RA. Para ello, las células fueron incubadas con 2-APB 100 μ M y luego estimuladas durante distintos tiempos con progesterona 15 μ M u 8-pCPT-2-O-Me-AMPC 50 μ M. Luego se fijaron con PAF 2% y se prosiguió con la técnica de Far-IFI habitual. Se cuantificó el porcentaje de células con marca acrosomal.

En respuesta al estímulo con progesterona se observó un pico máximo en los niveles de activación de Rap1 a los 15 minutos de incubación, volviendo a los niveles basales a los 30

minutos. Al estimular las células con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, los niveles de Rap1 activa aumentan a los 15 minutos de estimulación, pero se mantienen constantes a tiempos mayores de incubación con el inductor (Figura 38). Estos resultados indican que, en respuesta al estímulo con progesterona se produce la activación de Epac, que a su vez favorece el intercambio de nucleótidos de guanina, activando a Rap1. Transcurridos los 15 minutos del estímulo, la acción de algún GAP estimularía la hidrólisis de GTP, llevando a la proteína Rap1 a su estado inicial, unido a GDP. La permanencia de Rap1 en su estado GTP durante el estímulo con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, está indicando que la proteína Epac se encuentra constantemente estimulada y por lo tanto, también lo está Rap.

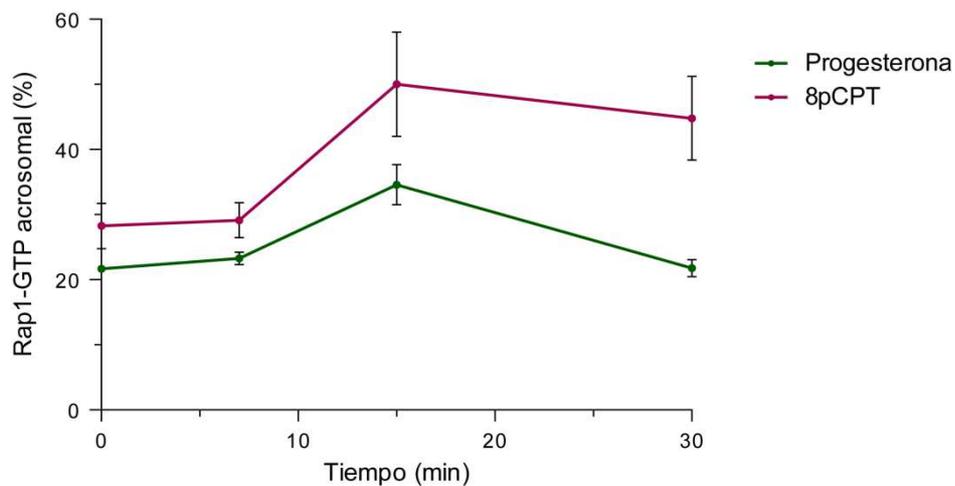


Figura 38. Activación diferencial de Rap1 en el tiempo en respuesta al estímulo con progesterona y 8-pCPT-2-O-Me-AMPC. Espermatozoides capacitados fueron incubados a distintos tiempos con progesterona u 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (8pCPT), luego fijados y pegados a cubreobjetos. La proteína Rap1 en su estado activo fue detectada mediante Far-IFI con el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST y el anticuerpo anti-GST. Posteriormente, se cuantificaron las células con marca acrosomal y se graficaron los porcentajes obtenidos a cada tiempo de incubación con cada inductor. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

6. Diacilglicerol activa a Rap1 a través de una vía independiente de Epac

En muchas vías de señalización, la activación de algunos de sus componentes no es mediada a través de un único regulador, sino que existen múltiples factores que intervienen en el proceso. Este es el caso de las proteínas Rap. La activación e inactivación de Rap son reguladas por una plétora de GEFs y GAPs, los cuales se encuentran sometidos a un intrincado control celular y son los encargados de acoplar diferentes factores intra y extra celulares a la señalización mediada por Rap (Gloerich and Bos, 2011). Uno de los mensajeros implicados en la regulación de la proteína Rap es el DAG (M'Rabet et al., 1998; McLeod et al., 1998). Se sabe

que calcio y DAG estimulan RapGEFs de la familia RasGRP (Bos et al., 2007). Asimismo, evidencias previas reportan que DAG induce RA en espermatozoides humanos por un mecanismo que es bloqueado por anticuerpos anti-Rap1 (Lopez et al., 2012). Por lo tanto, nos propusimos analizar si DAG era capaz de activar a Rap en espermatozoides. Para ello medimos la activación de Rap mediante Far-IFI en células estimuladas con DAG. Con el fin de evaluar si el AMPc se encontraba implicado en este proceso, preincubamos células con la esponja de AMPc, posteriormente las estimulamos con DAG y medimos el porcentaje de Rap1 activa en la región acrosomal.

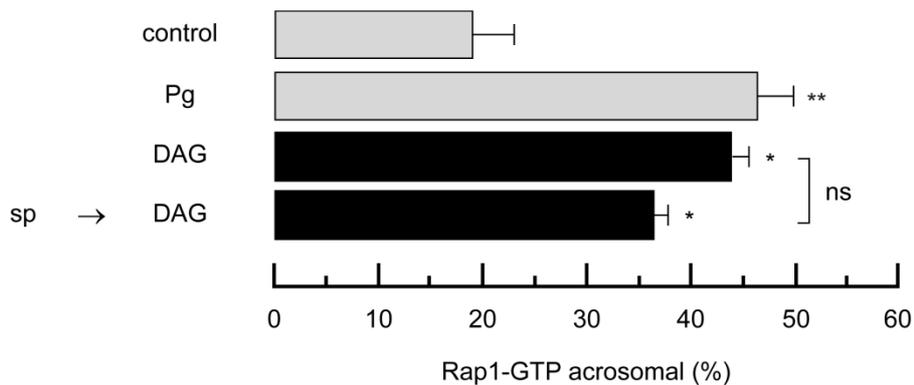


Figura 39. Rap1 es activada por DAG a través de una vía independiente de AMPc. Espermatozoides capacitados fueron tratados con 2-APB 100 μ M y e incubados o no con la esponja de AMPc 100 nM durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron estimulados con DAG 10 μ M durante 15 minutos y fijados en solución con PAF 2%. Se utilizaron como control positivo células estimuladas con progesterona 15 μ M. Las células se pegaron a cubreobjetos y se prosiguió con el protocolo de Far-IFI con el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST y el anticuerpo primario anti-GST para la detección de la proteína Rap1-GTP. Finalmente, se cuantificaron alrededor de 200 células y los porcentajes obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ comparados con el control sin tratar, ns: no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos).

Al cuantificar las células, comprobamos que DAG incrementó significativamente el porcentaje de espermatozoides con Rap-GTP acrosomal, alcanzando los mismos valores que progesterona (Figura 39). Es importante señalar que al tratar las células con la esponja de AMPc, la activación de Rap1 mediada por DAG no se vio modificada. Esto demuestra que DAG no requiere AMPc para estimular a Rap, sugiriendo que el mecanismo no está mediado por Epac. Estos resultados son consistentes con la noción de que, además de Epac, un RapGEF de la familia RasGRP estaría presente en espermatozoides.

7. Rab3A activa a Rap1 mediante una vía dependiente de AMPc

Como ya hemos mencionado, la proteína Rap se encuentra involucrada en numerosas vías de señalización interconectadas entre sí (Raaijmakers and Bos, 2009). Previamente reportamos que la RA está organizada en una vía de señalización donde Rab27 y Rab3 constituyen una cascada GEF (Bustos et al., 2012). La interconexión entre estas dos GTPasas y Rap no ha sido establecida, excepto para el módulo AMPc/Epac2/RIM (Kashima et al., 2001; Neumüller et al., 2009; Ozaki et al., 2000; Park et al., 2012). En espermatozoides humanos permeabilizados con SLO, la activación de Rab3 endógena por 8-pCPT-2-O-Me-AMPc (Branham et al., 2009) es insensible a anticuerpos anti-Rap, indicando que Rap no es requerida para el intercambio de GDP por GTP en Rab3. Nos propusimos testear en células vivas la situación contraria, es decir, si Rab3 influye en el estado de activación de Rap. Para ello, se incubaron células con Rab3A permeable geranilgeranilada y cargada con GTP- γ -S y se midió la activación de Rap1 endógena mediante Far-IFI. En el mismo experimento, los espermatozoides se preincubaron con la esponja de AMPc y posteriormente se estimularon con Rab3A permeable geranilgeranilada y cargada con GTP- γ -S. Como control positivo de activación de Rap, se utilizó el inductor progesterona. Las células fueron cuantificadas, a cada porcentaje obtenido se le restó el valor del control y se graficó la diferencia del porcentaje de fluorescencia acrosomal (Δ % de fluorescencia acrosomal) (Figura 40).

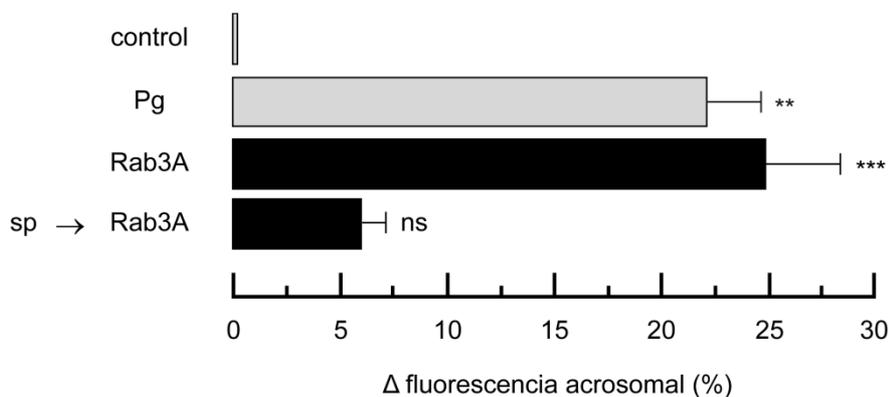


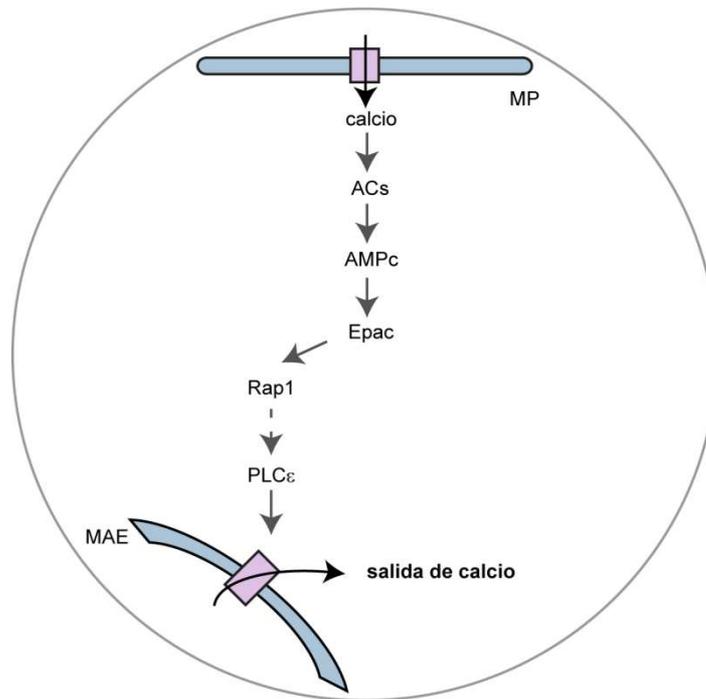
Figura 40. Rap1 es activada por Rab3A mediante una vía que requiere AMPc. Espermatozoides capacitados fueron tratados con 2-APB 100 μ M y e incubados o no con la esponja de AMPc 100 nM durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron estimulados con 300 nM de Rab3A geranilgeranilada y cargada con GTP- γ -S (Rab3A) durante 15 minutos y fijados en solución con PAF 2%. Se utilizaron como control positivo células estimuladas con progesterona 15 μ M. Las células se pegaron a cubreobjetos y se prosiguió con el protocolo de Far-IFI con el *cassette* Ral-GDS-RDB-GST y el anticuerpo primario anti-GST para la detección de la proteína Rap1-GTP. Finalmente, se cuantificaron alrededor de 200 células y a los porcentajes obtenidos se le restó el valor del porcentaje del control. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos

independientes (** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ comparados con el control sin tratar, ns: no existe diferencia significativa con el control).

Rab3A permeable, geranylgeranilada y activa causó la activación de Rap en la región acrosomal de un 25% más de la población de espermatozoides que en los controles sin tratar, un porcentaje comparable al alcanzado con progesterona (Figura 40). La incubación con la esponja, impidió que Rab3A activara a Rap endógena (Figura 40). Estos resultados concuerdan con el hallazgo de que la RA estimulada por Rab3A es inhibida por la esponja de AMPc (Figura 26) e indican que la cascada de señalización iniciada por Rab3A exógena incluye la activación de Rap de una manera AMPc-dependiente.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5: *Identificar la PLC involucrada en la vía de señalización que lleva a la salida de calcio acrosomal durante la RA.*

En múltiples eventos de señalización involucrados en diferentes procesos fisiológicos, la enzima PLC cataliza la hidrólisis de PIP_2 para generar IP_3 y DAG lo cual conduce a una liberación de calcio intracelular y la activación de PKC, respectivamente (Rhee, 2001). La actividad de PLC ϵ ha sido descrita en diferentes procesos secretorios y su activación se encuentra asociada a estímulos que llevan al incremento en los niveles de AMPc, con la consiguiente activación de Epac-Rap y que culminan con la movilización de calcio a partir de reservorios intracelulares como consecuencia de un incremento en los niveles de IP_3 (Dzhura et al., 2011; Oestreich et al., 2007; Schmidt et al., 2001). Basados en estos antecedentes y en estudios previos de nuestro laboratorio que indican el rol de una PLC en la cascada de señalización activada por Epac que conduce a la RA (Branham et al., 2009), nos proponemos analizar si PLC ϵ puede ser la isoforma involucrada.



Esquema representativo de la vía de señalización que se describe a continuación.

1. Presencia de PLCε en espermatozoides humanos.

Antecedentes previos de nuestro grupo sugieren la participación de una PLC en la vía de señalización encabezada por Epac que conduce a la movilización de calcio desde un reservorio intracelular a través de receptores sensibles a IP₃ (Branham et al., 2009). Sin embargo, la isoforma implicada no ha sido caracterizada hasta el momento. Basados en datos previos que reportan la participación de la isoforma épsilon en la vía de señalización encabezada por Epac/Rap (Dzhura et al., 2011; Oestreich et al., 2007; Schmidt et al., 2001), nos propusimos evaluar si esta isoforma está presente en espermatozoides humanos. Utilizamos un anticuerpo policlonal generado a partir del péptido sintético (KFILKLKEQVQASREDKKGISFASELKKLTKSTKQPRGLTSPSQQLLTSE) correspondiente a una región de la secuencia aminoacídica presente en el dominio RA2 del extremo C-terminal de la PLCε (Kelley et al., 2004).

En primer lugar, el anticuerpo fue probado en una inmunofluorescencia indirecta para analizar la presencia y localización de PLCε en espermatozoides humanos. Para ello, espermatozoides capacitados fueron inmovilizados en cubreobjetos y fijados con PAF al 2%. Luego se continuó con la técnica como se describe en Materiales y Métodos. El anticuerpo anti-PLCε detectó a la proteína en la región acrosomal y pieza media de los espermatozoides humanos (Figura 41, panel superior). En las células incubadas sólo con el anticuerpo

secundario no se observó marca, comprobando que la tinción con el anticuerpo primario fue específica (Figura 41, panel inferior).

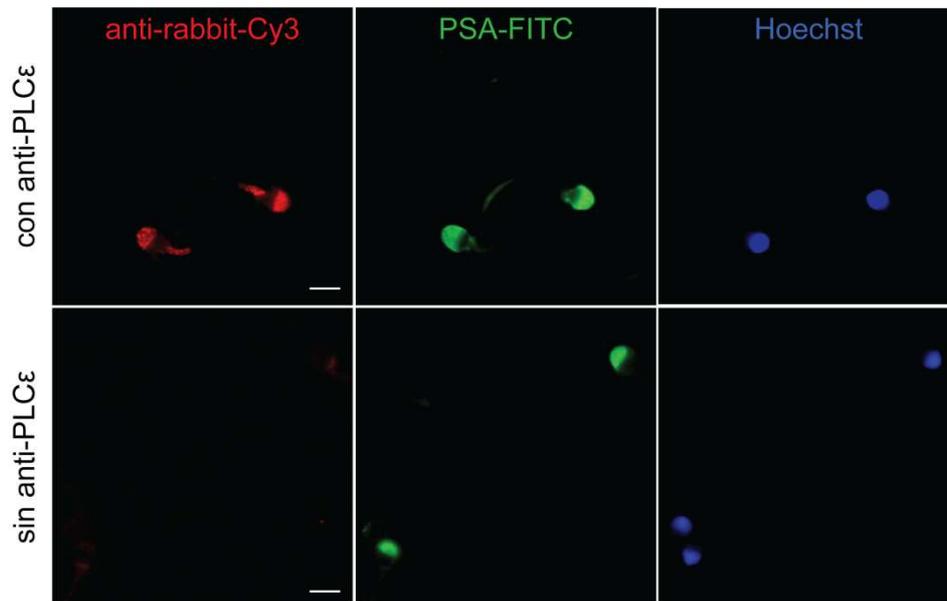


Figura 41. PLCε se localiza en región acrosomal y pieza media de espermatozoides humanos. (A) Espermatozoides capacitados fueron pegados a cubreobjetos con polilisina, fijados con PAF 2% y luego neutralizados con glicina 100 mM pH 7.4. Luego de la permeabilización con tritón X-100 0,1%, los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 5% y luego las células fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-PLCε. Se realizó una triple tinción con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Cy3 (paneles rojos), la lectina PSA-FITC (paneles verdes) y el colorante Hoechst 33342 (paneles azules). El panel rojo inferior (control) muestra células que sólo fueron incubadas con el anticuerpo anti-conejo-Cy3. (Barras = 5 μ m). Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones.

2. PLCε participa en la exocitosis acrosomal

Ensayos previos con U73122, un inhibidor de múltiples isoformas de la PLC, demostraron la participación de una PLC en la RA inducida por calcio u 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Branham et al., 2009). Con el fin de determinar la isoforma de PLC involucrada en la vía de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal, decidimos testear si la proteína PLCε es requerida durante la RA inducida por calcio. Con este fin, espermatozoides permeabilizados fueron incubados con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-PLCε. Luego, la RA fue estimulada con CaCl_2 y se midió el porcentaje de espermatozoides reaccionados para las distintas concentraciones de anticuerpo (Figura 42). El anticuerpo anti-PLCε inhibió la exocitosis disparada por calcio de una manera dosis dependiente, consiguiéndose una inhibición completa de la RA con concentraciones del anticuerpo de 6.7 nM (esta concentración fue seleccionada para posteriores experimentos). Estos resultados demuestran

que PLC ϵ se encuentra involucrada en la cascada de señalización que conduce a la exocitosis del acrosoma.

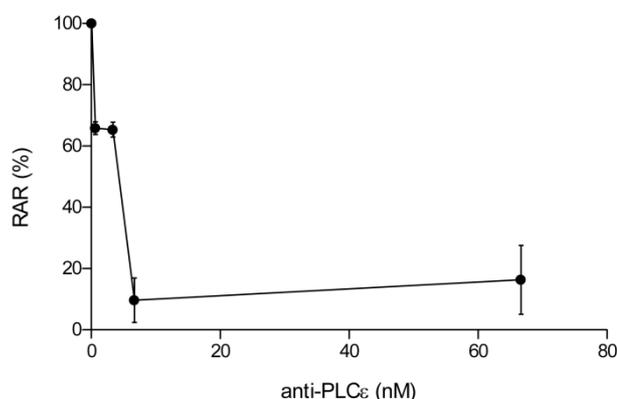


Figura 42. PLC ϵ es requerida durante la RA de espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos permeabilizados con SLO se trataron con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-PLC ϵ durante 15 min a 37°C. Luego se estimuló la RA con CaCl₂ 0,5 mM durante 15 min a 37°C. El porcentaje de exocitosis acrosomal (RAR) se evaluó por microscopía de fluorescencia con la lectina PSA-FITC y los datos se normalizaron respecto al control con CaCl₂. Los resultados graficados representan el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes.

3. Mapeo del sitio de acción de PLC ϵ en la cascada de señalización que lleva a la exocitosis acrosomal

A partir de las evidencias obtenidas hasta el momento, una PLC había sido situada en la vía de señalización regulada por Epac en un paso posterior a la activación de Rap y previo a la salida de calcio acrosomal a través de receptores sensibles a IP₃ (Branham et al., 2009). Nos propusimos evaluar si PLC ϵ es la isoforma involucrada en la vía de señalización dependiente de Epac que lleva a la salida de calcio acrosomal.

3.1. PLC ϵ actúa posterior a la activación de Rap1

Para identificar el lugar de la cascada que conduce a la exocitosis del acrosoma en el que se ubica PLC ϵ , nos valimos de una estrategia diseñada en nuestro laboratorio que consiste en el uso de “pares reversibles” (Bustos et al., 2012; Ruete et al., 2014). Esta metodología se basa en la ventaja que confiere el uso del modelo de espermatozoides permeabilizados el cual permite detener la exocitosis disparada por calcio en etapas específicas (con reactivos que denominamos como “inhibidor 1”). Luego, es posible probar el sistema con un segundo inhibidor (“inhibidor X”) y finalmente rescatar el bloqueo inicial de la exocitosis con reactivos que revierten el efecto del inhibidor 1 (“rescate del inhibidor 1”). Los reactivos son agregados

de acuerdo a la siguiente secuencia: inhibidor 1 → calcio → inhibidor X → rescate del inhibidor 1. Esta estrategia nos permite mapear el punto en el que el inhibidor X actúa en relación al inhibidor 1. La idea de esta secuencia es que si el blanco del inhibidor X es requerido en un paso temprano, la reacción no será inhibida por la adición tardía (luego del inhibidor 1 y calcio) del inhibidor X. En el caso contrario, si el blanco es requerido durante una fase tardía, el inhibidor X arrestará la reacción de manera que el rescate del inhibidor 1 no será suficiente para lograr la exocitosis. La forma en que estos pares reversibles funcionan es por competición, no por restitución. En este sentido, si el inhibidor 1 es un anticuerpo que se une a su blanco intracelular, la reacción alcanza un equilibrio entre el componente libre y el dímero “proteína X de espermatozoide/anticuerpo anti-proteína X”, con prevalencia del complejo proteína-anticuerpo debido a la concentración de anticuerpo utilizada. Bajo estas condiciones, el calcio falla en inducir la RA debido a que la proteína X endógena no se encuentra disponible. La adición subsecuente de la proteína recombinante X o el péptido con el que fue generado el anticuerpo (en este caso utilizaremos un péptido), desplaza el anticuerpo de la proteína endógena. Esto se debe a que la masa de péptido es mucho mayor que la de proteína endógena. Por lo tanto, se alcanza un nuevo equilibrio entre el anticuerpo y el péptido, liberando a la proteína endógena que queda libre para actuar.

Basados en esta estrategia, realizamos tres experimentos con pares reversibles, con el fin de situar a PLC ϵ en la cascada de señalización activada por calcio y que conduce a la exocitosis acrosomal. En primer lugar, probamos el sistema con el par reversible anti-Rap/Rap para situar a Epac en la cascada respecto a Rap y comprobar que el par reversible funciona como se espera. Con este fin, realizamos un ensayo de RA, donde primero probamos el rescate de la inhibición del anticuerpo anti-Rap con el péptido de Rap. Una vez comprobado que el péptido es capaz de rescatar la inhibición, analizamos qué pasaba con la RA al ensayar la siguiente secuencia: anti-Rap → calcio → anti-Epac → péptido Rap. Pudimos comprobar que hubo RA (Figura 43A, barra negra), demostrando que Epac se encuentra previo a Rap en la cascada de señalización. Una vez establecida la confiabilidad del par reversible, nos propusimos evaluar la ubicación en la vía de PLC ϵ respecto a la proteína Rap, con este fin realizamos dos experimentos de pares reversibles donde primero utilizamos el inhibidor genérico de PLC, U73122 y luego probamos el anticuerpo anti-PLC ϵ . En el primer caso la secuencia de adición fue la siguiente: anti-Rap → calcio → U73122 → péptido Rap. Al analizar los valores de RA, comprobamos que la RA no pudo ser rescatada con el agregado del péptido Rap (Figura 43B, barra negra), esto demostró que el U73122 actúa posterior al bloqueo de Rap con anti-Rap, confirmando la participación de una PLC posterior al sitio donde se requiere esta

GTPasa. Con el fin de determinar si es específicamente PLC ϵ quien actúa posterior a Rap, probamos la siguiente secuencia: anti-Rap \rightarrow calcio \rightarrow anti-PLC ϵ \rightarrow péptido Rap. La RA no pudo ser rescatada por la adición del péptido (Figura 43C, barra negra), demostrando que PLC ϵ se encuentra situada posterior a Rap en la cascada. El efecto inhibitorio observado en el experimento con el inhibidor U73122 (Figura 43B, barra negra) o el anticuerpo anti-PLC ϵ (Figura 43C, barra negra) lo atribuimos a la inhibición específica de PLC ϵ y no a un efecto inespecífico que podría provocar la secuencia de reactivos adicionados, ya que en el primer experimento realizado con el anticuerpo anti-Epac se utilizó la misma secuencia de reactivos y fue posible rescatar la RA cuando se adicionó el péptido Rap (Figura 43A, barra negra). Estos experimentos nos permitieron identificar a la PLC ϵ como la fosfolipasa que actúa en la vía de señalización disparada por calcio que conduce a la exocitosis acrosomal y situarla en un punto posterior a la activación de Rap catalizada por Epac.

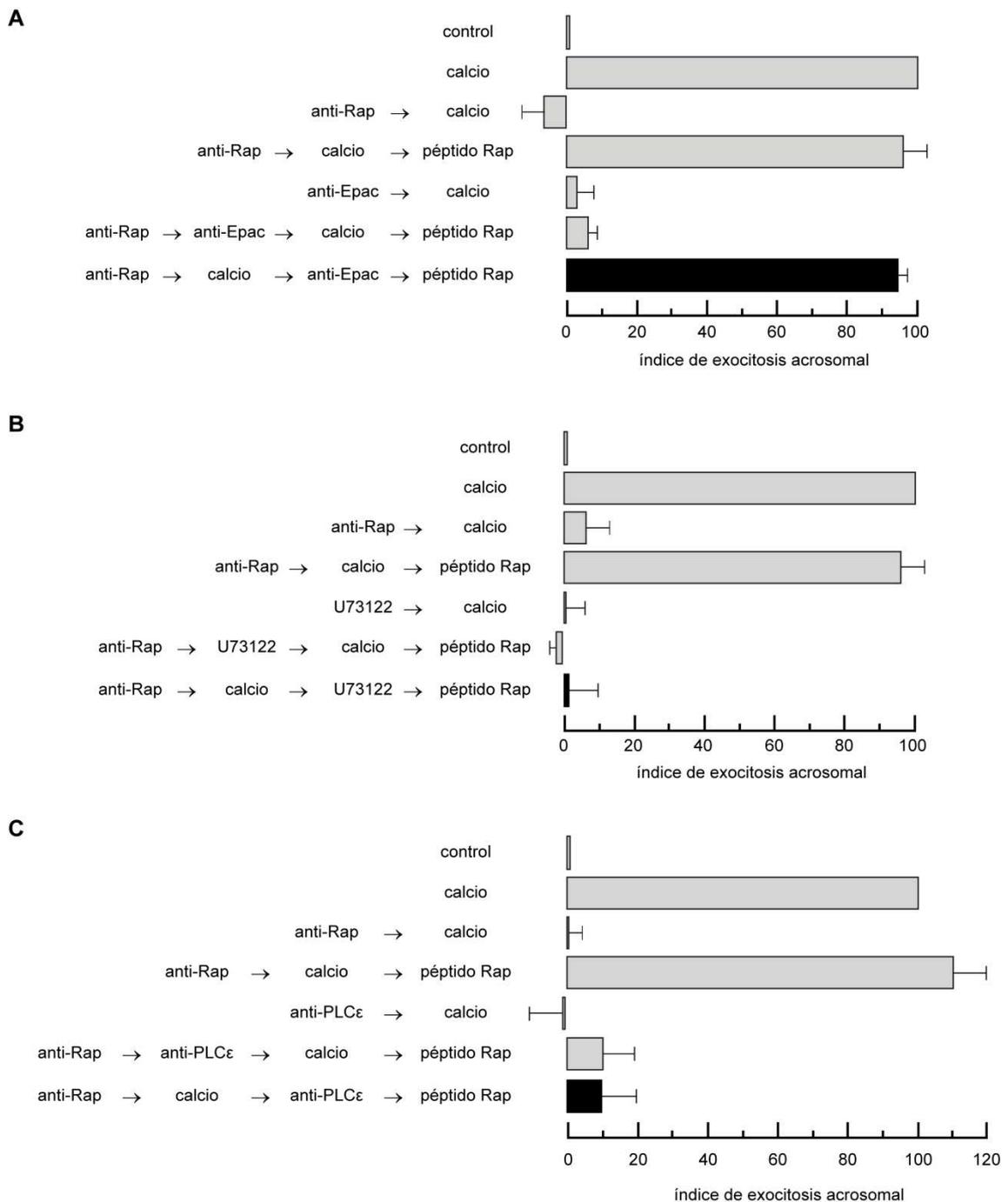


Figura 43. PLCε se localiza río abajo de Epac/Rap en la vía de señalización estimulada por calcio que conduce a la RA. Espermatozoides permeabilizados fueron incubados con 134 nM del anticuerpo anti-Rap1 por 8 minutos a 37°C para bloquear la vía de señalización donde Rap es requerida. Luego, la RA fue iniciada por el agregado de 0,5 mM de CaCl₂ y se incubó durante 8 minutos a 37°C para permitir que la exocitosis procediera hasta el punto sensible a Rap. Posteriormente, los espermatozoides fueron tratados con 6,7 nM del anticuerpo anti-Epac (A), 15 μM de U73122 (B) o 6,7 nM del anticuerpo anti-PLCε (C) e incubados durante 8 minutos a 37°C. Finalmente, se agregó 453 μg/ml del péptido Rap y se incubó durante 8 minutos a 37°C para rescatar el bloqueo impuesto por el anticuerpo anti-Rap (barras negras). Se incluyeron los siguientes controles (barras grises): nivel basal de RA en ausencia de cualquier estímulo (control), RA estimulada por 0,5 mM de CaCl₂ (calcio), inhibición con 134 nM del anticuerpo anti-Rap1 (anti-Rap → calcio), 6,7 nM del anticuerpo anti-Epac (anti-Epac → calcio), 15 μM

de U73122 (U73122 → calcio) o 6,7 nM del anticuerpo anti-PLCε (anti-PLCε → calcio); rescate del anticuerpo anti-Rap por el péptido Rap (anti-Rap → calcio → péptido Rap) y el efecto inhibitorio de los bloqueantes cuando están presentes a lo largo del todo el experimento (anti-Rap → anti-Epac/U73122/anti-PLCε → calcio → péptido Rap). El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes.

3.2 PLCε es requerida previo a la salida de calcio acrosomal

En experimentos anteriores con NP-EGTA-AM fue demostrado que el anticuerpo anti-Rap no afecta la RA cuando es agregado posterior al estímulo con calcio, demostrando que Rap1 es requerida en un paso anterior a la movilización de calcio acrosomal (Branham et al., 2009). Debido a que anteriormente demostramos que PLCε se encuentra río abajo de Rap en la cascada de señalización que conduce a la movilización de calcio acrosomal (Figura 43C), nos preguntamos si el anticuerpo anti-PLCε es capaz de frenar la exocitosis previo a la salida de calcio acrosomal. Para testear esta hipótesis desarrollamos un experimento de RA con el quelante fotosensible NP-EGTA-AM, en el cual agregamos el anticuerpo anti-PLCε antes y después de estimular con calcio. Encontramos que en espermatozoides permeabilizados cargados con NP-EGTA-AM, el anticuerpo anti-PLCε bloqueó la exocitosis cuando fue agregado antes, pero no después de la iniciación de la RA por calcio (Figura 44, barra negra). Estos datos indican que la PLCε se encuentra situada en la vía de señalización activada por calcio previa a la salida de calcio intra-acrosomal, donde probablemente actúa produciendo un incremento local de IP₃ lo cual induce la salida de calcio desde el acrosoma a través de canales sensibles a IP₃ presentes en la membrana acrosomal externa.

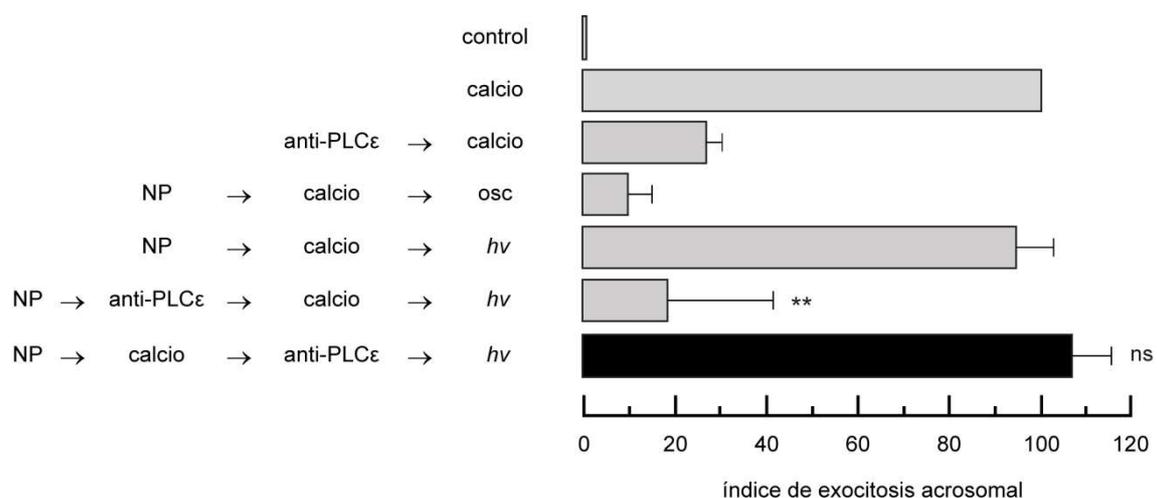


Figura 44. PLCε es requerida previo a la salida de calcio acrosomal. Espermatozoides permeabilizados se cargaron con NP-EGTA-AM 10 μM (NP) durante 10 min a 37°C para quelar el calcio intra-acrosomal.

Luego, las células fueron estimuladas con CaCl_2 0,5 mM durante 15 minutos a 37°C para permitir que la RA proceda hasta el punto en que se requiere la salida del calcio acrosomal. Las células se preincubaron con el anticuerpo anti-PLC ϵ 6.7 nM durante 15 min a 37°C . Todas las incubaciones se realizaron en la oscuridad. Al finalizar las incubaciones, se indujo la fotólisis del quelante con luz UV (hv) y las muestras se incubaron 5 minutos adicionales a 37°C (NP \rightarrow calcio \rightarrow anti-PLC ϵ \rightarrow hv, barra negra). Se realizaron los siguientes controles (barras grises): RA espontánea en ausencia de estímulo (control), RA estimulada con CaCl_2 0,5 mM (calcio), efecto inhibitorio del NP-EGTA-AM en oscuridad (NP \rightarrow calcio \rightarrow osc), recuperación de la RA luego de iluminar con luz UV (NP \rightarrow calcio \rightarrow hv) y el anticuerpo anti-PLC ϵ agregado antes de estimular la RA (NP \rightarrow anti-PLC ϵ \rightarrow calcio \rightarrow hv). El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes (** p < 0.01 comparado con el control sin tratar, ns: no existe diferencia significativa con el control).

3.3. PLC ϵ forma parte de la vía de señalización activada por Epac que conduce a la movilización de calcio acrosomal

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran la participación de PLC ϵ en la cascada de eventos que se ponen en marcha al estimular las células con calcio y que conducen a la salida de calcio acrosomal. Nos propusimos evaluar si PLC ϵ efectivamente está involucrada en la vía de señalización Epac dependiente que lleva a la salida de calcio acrosomal. Con este fin, analizamos si al preincubar células con el anticuerpo anti-PLC ϵ y luego estimularlas con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, se producía una inhibición de la exocitosis acrosomal. Esto fue lo que efectivamente ocurrió (Figura 45), demostrando que PLC ϵ forma parte de la cascada activada por Epac.

Previamente fue demostrado que adenosfostina rescató el bloqueo de la RA impuesto por U73122, localizando a PLC previo a la salida de calcio acrosomal (Branham et al., 2009). Basados en estos antecedentes, evaluamos si el efecto inhibitorio del anticuerpo anti-PLC ϵ sobre la RA inducida por calcio podría ser rescatado al adicionar adenosfostina A. Este compuesto es un agonista de receptores sensibles a IP_3 , que al ser agregado a espermatozoides permeabilizados, provoca la salida de calcio acrosomal (Ruete et al., 2014) y permite rescatar todo efecto inhibitorio impuesto previo a la apertura de los canales. Basados en esta estrategia, preincubamos espermatozoides permeabilizados con el anticuerpo anti-PLC ϵ , luego estimulamos la RA con CaCl_2 , finalmente agregamos adenosfostina y medimos el porcentaje de RA. Comprobamos que adenosfostina revirtió la inhibición impuesta por anti-PLC ϵ (Figura 45), demostrando nuevamente que PLC ϵ se encuentra ubicada en la cascada previa a la movilización de calcio desde el reservorio acrosomal. Estos datos también sugieren

que el efecto del anticuerpo anti-PLC ϵ es específico y que inhibe la RA porque impide la producción de IP $_3$.

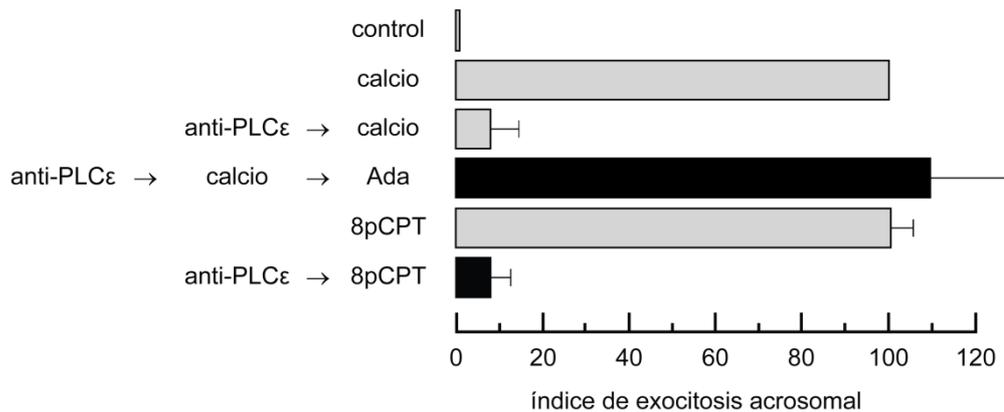


Figura 45. PLC ϵ actúa previo a la apertura de canales de calcio sensibles a IP $_3$. Espermatozoides permeabilizados fueron incubados durante 10 min con 6.7 nM de anti-PLC ϵ , luego se estimuló la RA con 0,5 mM de CaCl $_2$ durante 10 minutos y finalmente se adicionó adenofostina A (Ada) 5 μ M durante 10 minutos más (todas las incubaciones se realizaron a 37°C). Las células fueron también incubadas con 6.7 nM de anti-PLC ϵ durante 15 min a 37°C y luego la RA fue inducida con 50 μ M de 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (8pCPT) durante 15 minutos a 37°C. Se utilizaron como control células estimuladas con 0,5 mM de CaCl $_2$ o 50 μ M de 8-pCPT-2-O-Me-AMPC y células preincubadas con 6.7 nM de anti-PLC ϵ y luego estimuladas con 0,5 mM de CaCl $_2$. El porcentaje de RA fue evaluado mediante el recuento de alrededor de 200 células marcadas con PSA-FITC y los valores fueron normalizados respecto al tubo control. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

3.4. Epac moviliza calcio del acrosoma a través de una vía que utiliza Rap y PLC ϵ

Anteriormente fue reportado que, en ensayos de medición de calcio en poblaciones, la incubación con U73122 impidió la movilización de calcio inducida por 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Branham et al., 2009). Basados en estos antecedentes, nos propusimos evaluar directamente qué sucede con la movilización de calcio intra-acrosomal cuando espermatozoides permeabilizados son incubados con el anticuerpo anti-PLC ϵ y posteriormente estimulados con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC. Para ello realizamos ensayos de movilización de calcio en célula única probando el efecto de diferentes anticuerpos o inhibidores en espermatozoides permeabilizados y cargados con la sonda fluo3-AM como se describe en Materiales y Métodos. Como describimos en la Figura 32, el análogo de Epac, 8-pCPT-2-O-Me-AMPC, es capaz de movilizar el calcio acrosomal cuando es agregado a espermatozoides y esta movilización puede ser inhibida por el anticuerpo anti-Epac, confirmando que la vía que conduce a la salida de calcio acrosomal se encuentra regulada por Epac. Con el propósito de analizar si los demás componentes de la vía se encuentran involucrados en la salida de calcio desde el acrosoma y comprobar si PLC ϵ es un componente necesario de la vía para que este evento se lleve a cabo,

analizamos el efecto de la preincubación de las células con los anticuerpos anti-Rap y anti-PLC ϵ , como así también el de U73122 en la movilización de calcio estimulada por 8-pCPT-2-O-Me-AMPC. Como se puede ver en la Figura 46, la incubación con los anticuerpos anti-Rap y anti-PLC ϵ y con el inhibidor U73122 inhibió la movilización de calcio inducida por 8-pCPT-2-O-Me-AMPC. Estos resultados indican que es, en efecto, la vía de señalización Epac-Rap-PLC ϵ la responsable de asegurar la salida de calcio desde el acrosoma necesaria para que se produzca la exocitosis acrosomal.

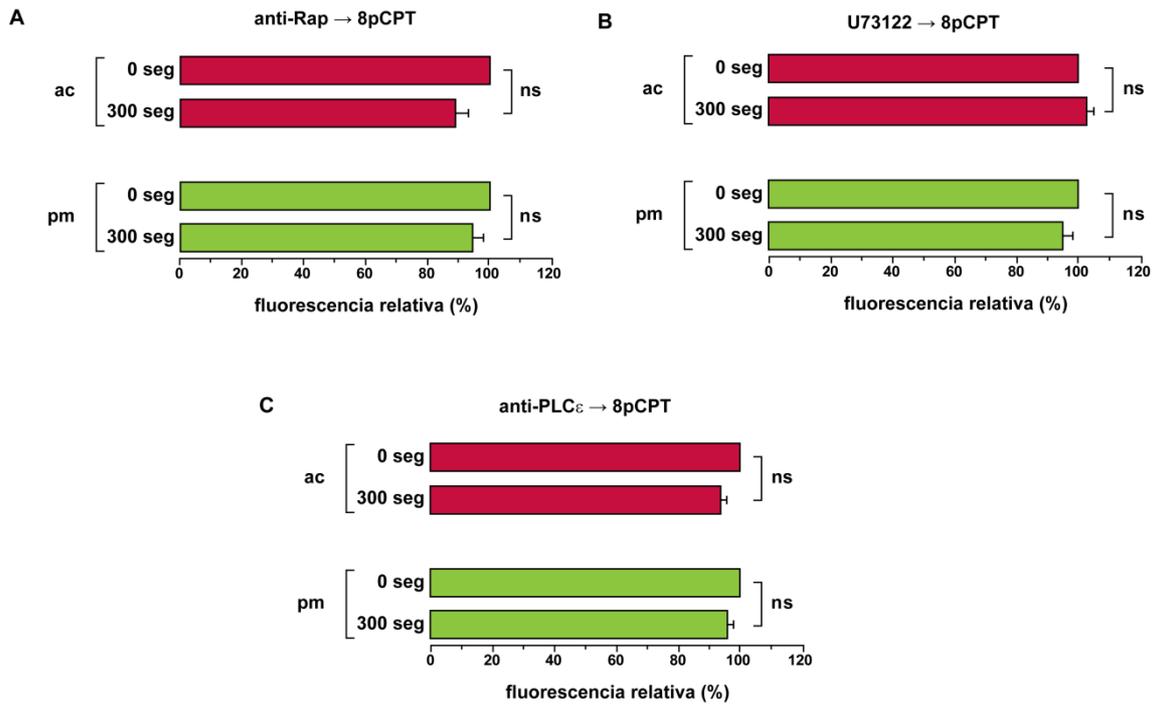


Figura 46. La vía Epac-Rap-PLC ϵ moviliza calcio del acrosoma. Espermatozoides permeabilizados con SLO fueron incubados con la toxina BoNT/B (100 nM) durante 15 minutos para prevenir la exocitosis acrosomal y luego cargados con Fluo3-AM (2 μ M)/ácido plurónico (1 μ M) durante 30 min a 37°C. Las células fueron lavadas y un volumen de las mismas fue incubado con 134 nM del anticuerpo anti-Rap (A), 15 μ M del inhibidor U73122 (B) o 6,7 nM del anticuerpo anti-PLC ϵ (C) durante 15 min a 37°C. Luego fueron pegadas a cubreobjetos con polilisina y colocadas en una cámara termostatzada. Las imágenes de fluorescencia fueron grabadas en microscopio confocal. Las células fueron estimuladas con 50 μ M de 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (8pCPT) a los 30 segundos de iniciado el registro de la fluorescencia. Los gráficos de barras representan la respuesta poblacional a cada tratamiento. La cuantificación muestra la fluorescencia relativa inicial (100%) comparada con la fluorescencia 300 segundos después del tratamiento con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC 50 μ M en la pieza media (pm, verde) y en la región acrosomal (ac, rojo). Las barras representan el promedio \pm EEM (N=3) (ns: no existe diferencia significativa entre los tratamientos).

V. DISCUSIÓN

El aumento en la concentración de AMPc sirve como un interruptor para activar muchas de las vías de señalización durante la maduración del espermatozoide, volviendo a las células aptas para desencadenar la exocitosis del acrosoma y, por ende, para la fertilización. Reactivos que aumentan los niveles de AMPc tales como los análogos permeables dbAMPc y 8-Br-AMPc, inhibidores de PDEs y estimuladores de las AC inducen la exocitosis acrosomal en espermatozoides de mamífero (Branham et al., 2006; De Jonge et al., 1991). Uno de los mecanismos propuestos para explicar cómo el AMPc induce RA tiene que ver con la fosforilación de canales de calcio en la membrana acrosomal externa por PKA (Breitbart, 2002). En los últimos años los mecanismos de señalización mediados por AMPc han mostrado ser más complejos de lo que se pensaba y muchos de los efectos atribuidos a PKA ahora sabemos que son debidos a Epac. En espermatozoides humanos permeabilizados se ha demostrado que la entrada de calcio a través de los poros generados por el tratamiento de permeabilización lleva a la activación de la RA a través de una vía dependiente de Epac e independiente de PKA (Branham et al., 2009). La mayor parte de la vía de señalización que conduce a la RA en la que ha sido caracterizado el rol del AMPc ha sido descrita en estudios realizados en células permeabilizadas, ya que a través de los poros generados por la SLO, es posible introducir múltiples agentes que permiten el estudio de la dinámica en que se desenvuelven los componentes endógenos del espermatozoide. Este sistema permite el análisis de los eventos tardíos de la célula, que ocurren posteriores a la apertura de los SOCCs. En esta tesis nos propusimos desarrollar una estrategia que nos permitiera estudiar el rol de este segundo mensajero en células vivas, sin permeabilizar y en condiciones más cercanas a las fisiológicas. Hasta el momento, el rol del AMPc en la RA de espermatozoides humanos ha sido caracterizado mediante el empleo de diferentes agentes farmacológicos que incrementan los niveles de AMPc endógeno, ya sean análogos de AMPc o inhibidores de PDEs y AC (Branham et al., 2006, 2009). Si bien estos agentes nos han permitido demostrar que es necesario el AMPc citosólico para que ocurra la RA, una prueba irrefutable de que éste y otros eventos son mediados por AMPc sólo puede conseguirse si la respuesta celular es abolida cuando el AMPc endógeno no se encuentra disponible.

Durante muchos años, en nuestro laboratorio hemos utilizado exitosamente el sistema de permeabilización con SLO (Yunes et al., 2000) para generar poros en la membrana plasmática de la célula y, de esta forma, introducir proteínas, anticuerpos y otras moléculas no permeables. Si bien este sistema ha permitido estudiar la función de múltiples proteínas relevantes en las vías de señalización involucradas en la RA, tiene algunas limitaciones. Trabajar con espermatozoides intactos permite evaluar la función de una proteína o una droga

permeable en condiciones más próximas a las fisiológicas, es decir, en células vivas y móviles. Además, permite el estudio de procesos que ocurren antes de la apertura de los canales SOC. Esto llevó a la búsqueda de una estrategia que permitiera estudiar el rol de diferentes componentes de la vía de señalización en células sin permeabilizar. Un sistema utilizado para la incorporación de diferentes moléculas a compartimentos intracelulares son los péptidos permeables que ingresan a las células a través de diversos mecanismos (Bechara and Sagan, 2013; Madani et al., 2011). La incorporación de dominios proteicos de transducción típicos, tales como el péptido TAT del HIV (Joliot and Prochiantz, 2004) ha sido monitoreada en espermatozoides (Jones et al., 2013). Las proteínas recombinantes acopladas a estos péptidos R-Rab3A (Lopez et al., 2007) y TAT-Rab27A (datos no publicados) ingresan eficientemente a los espermatozoides y, cuando se encuentran isopreniladas y cargadas con GTP- γ -S, inducen RA (Figura 26). Estos resultados demuestran que el péptido TAT permite la transducción eficiente de proteínas recombinantes a los espermatozoides. Cuando incubamos espermatozoides con la proteína recombinante que contiene la subunidad regulatoria RI β de PKA acoplada al péptido TAT (esponja de AMPc), la proteína se incorporó eficientemente (Figura 19) y suprimió las funciones mediadas por AMPc (Figura 21). Además, la esponja de AMPc inhibió la RA estimulada por progesterona de una manera dosis-dependiente (Figura 22A). La respuesta fue abolida completamente por 100 nM de la esponja, la misma concentración que previno la exocitosis acrosomal estimulada por calcio en espermatozoides permeabilizados (Figura 24). Estas observaciones sugieren que la transducción de la esponja a través de la membrana plasmática en espermatozoides no permeabilizados es al menos tan eficiente y cuantitativa como su difusión en células permeabilizadas. Por otra parte, teníamos la inquietud de que si la esponja permeable ejercía este efecto inhibitorio sobre la RA efectivamente mediante la captura del AMPc endógeno o si podría llegar a hacerlo a través de algún mecanismo inespecífico. Por lo que decidimos saturar la proteína con AMPc exógeno previo a su incubación con los espermatozoides y luego evaluar si continuaba inhibiendo la RA. Comprobamos que la inhibición de la RA causada por la esponja fue abolida al preincubar con dbAMPc (Figura 23), por lo que concluimos que su efecto era debido a su capacidad de secuestrar el AMPc endógeno.

El hinchamiento osmótico de vesículas y gránulos secretorios se ha propuesto como un paso intermedio en la fusión exocítica de ciertos gránulos con la membrana plasmática (Finkelstein et al., 1986). Asimismo, el hinchamiento del acrosoma durante la reacción acrosomal es un evento esencial en la exocitosis del gránulo que ha sido descrito en espermatozoides de múltiples especies. A diferencia de las células excitables, los

espermatozoides en reposo no tienen sus gránulos secretorios ubicados en la proximidad de su membrana plasmática, preparados para conseguir una exocitosis inmediata; por lo que el inicio de la RA debe llevar a la activación de la maquinaria de fusión y a la concomitante aproximación del acrosoma a la membrana plasmática. Este acercamiento es logrado mediante el hinchamiento del contenido acrosomal que empuja la membrana acrosomal hacia la plasmática seguido del anclaje de una membrana a la otra. Mediante el estudio del efecto de múltiples inhibidores que actúan en diferentes etapas de la cascada que conduce a la RA, se ha podido establecer que el hinchamiento del acrosoma es una etapa transitoria requerida para la RA que no es afectada por inhibidores tardíos y resulta independiente del ensamblaje de la maquinaria de fusión (Zanetti and Mayorga, 2009). Estos resultados sugieren que el hinchamiento del acrosoma que se produce en respuesta a la inducción de la RA es un evento relativamente temprano en el proceso exocítico y ocurre previo a la liberación altamente localizada de calcio intravesicular que cataliza las etapas finales de la exocitosis. Sin embargo, hasta el momento nada se conocía del rol del AMPc en este evento. En el presente trabajo demostramos que el hinchamiento es dependiente de AMPc (Figura 25).

Tanto progesterona como el inóforo de calcio A23187 dependen de la síntesis de AMPc por la ACs para lograr la exocitosis en espermatozoides humanos (Branham et al., 2009; Teves et al., 2009). Previamente reportamos que la digestión temprana del AMPc endógeno con la PDE 4D recombinante (Branham et al., 2006) o la inhibición de su síntesis con el bloqueante de la ACs KH7 (Branham et al., 2009) impide que calcio induzca RA en espermatozoides permeabilizados. Recientemente fue propuesto que la ACs sintetiza AMPc en la cola y que este AMPc se une a PKA para activar eventos de fosforilación que se correlacionan con la capacitación en espermatozoides de ratón (Wertheimer et al., 2013) y humanos (Battistone et al., 2013). Por otra parte, una AC transmembrana sería la responsable de la síntesis de AMPc en la cabeza de espermatozoides de ratón. Sin embargo, el bloqueo de esta actividad con el inhibidor de la ACtm SQ22536 no previene la RA inducida por A23187 (Wertheimer et al., 2013). Desafortunadamente, KH7 no fue testeado en los estudios de ratón y por lo tanto si las discrepancias aparentes con el humano son debidas a diferencias entre los modelos o a alguna otra razón, no puede ser confirmado con la información disponible actualmente. En cualquier caso, lo que sabemos sin ninguna duda es que la exocitosis de espermatozoides requiere AMPc.

Tanto las proteínas recombinantes GST-Rab3A (Branham et al., 2009; Yunes et al., 2000), GST-Rab27A (datos no publicados) como sus versiones permeables His₆-R-Rab3A (Figura 26 y López et al., 2007) y His₆-TAT-Rab27A (Figura 26), cuando se encuentran

geranilgeraniladas y en su estado persistentemente activo, inducen RA en espermatozoides humanos. Se postula que estas proteínas provocan la activación de la exocitosis acrosomal porque al ser agregadas en exceso compiten con las proteínas endógenas y actúan reclutando y activando a proteínas efectoras involucradas en la cascada de señalización que conduce a la RA. Además, recientemente fue reportado que el estímulo de espermatozoides permeabilizados con calcio provoca la activación de Rab27 y Rab3A endógenas en la región acrosomal de las células (Bustos et al., 2012) y que KH7 inhibe la activación de Rab3A inducida por calcio (Ruede et al., 2014). Nosotros aquí demostramos que la esponja de AMPc inhibe la exocitosis acrosomal inducida por ambas proteínas permeables (Figura 26) y que el tratamiento con progesterona estimula la activación de ambas Rabs endógenas en la región acrosomal de las células a través de un mecanismo que requiere AMPc (Figura 27). Estos resultados indican que el AMPc tiene un rol fundamental en la cascada de señalización en que se encuentran implicadas ambas Rabs, demostrando su influencia sobre la rama de señalización que conduce al ensamblaje de la maquinaria proteica de fusión (Figura 47).

Un asunto de vital importancia para entender la liberación de los gránulos secretorios implica cómo interactúa el AMPc con los reservorios internos para promover la liberación de calcio. En muchos modelos, el AMPc induce *per se* o potencia la movilización de calcio desde reservorios intracelulares. PKA y Epac regulan la liberación de calcio intracelular independientemente, cooperativamente o incluso se antagonizan una a la otra. Otras diferencias a tener en cuenta es que existe heterogeneidad en la expresión de receptores asociados a la movilización de calcio intracelular, diferentes organelas sirven como reservorios de calcio movilizable y, a veces, hay hallazgos distintos e incluso contradictorios en estudios realizados en el mismo tipo celular. Por ejemplo, en la línea celular INS-1 de células β -pancreáticas de rata, Epac facilita la exocitosis independientemente de PKA, además de cooperar con ella (Chepurny et al., 2009); mientras que en islotes humanos, la secreción de insulina potenciada por glucosa mediante un activador selectivo de Epac depende de la actividad permisiva de PKA (Chepurny et al., 2010). Para complicar aún más las cosas, existen mecanismos no convencionales que conectan AMPc a la movilización de calcio, como por ejemplo, la sensibilización directa por AMPc de los receptores de IP_3 estimulada por el acoplamiento selectivo de la AC tipo 6 con receptores de IP_3 tipo 2 (Tovey et al., 2008) y el reclutamiento de AC operado por reservorio (Lefkimmatis et al., 2009). El modelo de espermatozoides es ideal para responder la pregunta de cómo el AMPc se conecta con la movilización de calcio debido a que: i) los efectos de AMPc son únicamente transducidos por Epac, ii) la exocitosis puede proceder en ausencia de calcio externo (lo cual elimina mediciones

confusas) y iii) el acrosoma por sí mismo es el reservorio de calcio movilizable. Otra característica que simplifica el análisis es que el espermatozoide no experimenta ningún otro proceso de tráfico más que la exocitosis. Resultados previos indican que el calcio externo es prescindible para la RA estimulada por AMPc (Branham et al., 2006), Rab3A recombinante (De Blas et al., 2002; Lopez et al., 2007) y DAG (Lopez et al., 2012); pero el calcio interno no lo es. Sin embargo, la movilización de calcio intracelular por sí sola no estimula la secreción. En espermatozoides con la membrana plasmática permeabilizada con SLO y con el acrosoma cargado con el sensor de calcio fluorescente Fluo3-AM, el AMPc es requerido para la movilización de calcio desde el gránulo (Figura 30). Por otro lado, comprobamos que esta movilización no requiere la actividad de PKA (Figura 31). Si bien el uso de inhibidores de PKA permite establecer una independencia de esta enzima, no pueden definitivamente establecer un rol para Epac. Recientemente han sido reportados en la literatura los primeros inhibidores farmacológicos de la actividad de Epac (Courilleau et al., 2012; Tsalkova et al., 2012), pero su selectividad ha sido puesta en duda (Rehmann, 2013). Aquí nosotros presentamos evidencia directa de que AMPc/Epac/Rap1 movilizan calcio desde el acrosoma debido a que el estímulo de Epac con 8-pCPT-2-O'-Me-AMPc es suficiente para disparar la salida de calcio intra-acrosomal 30-60 segundos después de la aplicación (Figura 32A). Asimismo comprobamos que los anticuerpos anti-Epac (Figura 32C) y anti-Rap1 (Figura 46A) antagonizan este efecto. Estos hallazgos nos permitieron demostrar que el AMPc resulta ser un modulador primordial de la rama de señalización que conduce a la movilización de calcio desde el reservorio acrosomal (Figura 47).

Como mencionamos anteriormente, el AMPc regula la exocitosis de células secretorias mediante la coordinación de mecanismos dependientes y/o independientes de PKA, donde estos últimos son mediados por Epac. Epac es un GEF para las proteínas Rap (Bos, 2006; Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 1998). Un gran número de evidencias muestran que el módulo de señalización AMPc/Epac/Rap gobierna muchas respuestas biológicas en una variedad de células. Sin embargo, su importancia en la exocitosis regulada ha sido investigada en pocos estudios: Epac2A/Rap1 son requeridas para la potenciación de la secreción de insulina dependiente de AMPc/Epac (Dzhura et al., 2011; Shibasaki et al., 2007) y la movilización de calcio intracelular (Dzhura et al., 2010). Epac1/Rap1 son requeridas para la liberación de amilasa pancreática (Sabbatini et al., 2008) y de la forma soluble del precursor de la proteína α (Maillet et al., 2003). Epac1/Rap2 contribuyen a la secreción de cloro en células del epitelio intestinal humano (Hoque et al., 2010). Epac/Rap1 controlan la exocitosis mediada por AMPc de los cuerpos de Weible-Palade en células endoteliales (van Hooren et al., 2012) y

la secreción de FGF21 hepático estimulada por glucagón (Cyphert et al., 2014). Las isoformas 1 y 2 de Epac han sido detectadas por Western blot en espermatozoides humanos, de cerdo y caballo (Miro-Moran et al., 2012), Epac2 de hámster (Kinukawa et al., 2006) y Epac1 de ratón (Amano et al., 2007). Además, los ARNm correspondientes a Epac1 y Epac2 han sido detectados por RT-PCR en células espermatogénicas de ratón (Vadnais et al., 2013). En resultados previos de nuestro grupo, Epac fue identificada en la región acrosomal de espermatozoides humanos y descrita formando parte de la cascada de señalización que conduce a la RA (Branham et al., 2006, 2009). Las proteínas Raps son GTPasas de bajo peso molecular de la familia Ras, que sirven como sustrato para la actividad enzimática de Epac y son también activadas por otros GEFs que conectan diferentes señales a sus múltiples funciones (Bos, 2006; Bos et al., 2007; Gloerich and Bos, 2010, 2011; Raaijmakers and Bos, 2009). Rap1 ha sido detectada en espermatozoides humanos (Branham et al., 2009; Miro-Moran et al., 2012), de cerdo (Miro-Moran et al., 2012) y ratón (Kinukawa et al., 2006) y Rap2 en hámster (Amano et al., 2007). Ensayos de pull down han demostrado que la cantidad de Rap1-GTP en células estimuladas con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC es sustancialmente mayor que aquella en controles sin tratamiento tanto en humanos (Branham et al., 2009), en ratón (Amano et al., 2007), como en cerdo (Miro-Moran et al., 2012). Asimismo, recientemente reportamos que luego del estímulo de espermatozoides permeabilizados con calcio, se produce un incremento de Rap activa en la región acrosomal de las células (Ruete et al., 2014). Durante el desarrollo de esta tesis, diseñamos un método que permite la detección de la activación de Rap1 en respuesta al tratamiento de los espermatozoides con distintos inductores con el fin de caracterizar la vía en la que se encuentra implicada esta interacción. Pudimos detectar que Rap1 se activa en la región acrosomal de las células en respuesta al tratamiento con progesterona y A23187 (Figura 35) a través de mecanismos dependientes de AMPc (Figura 36). Además, cuando ahondamos más en la cascada de señalización que lleva a la activación de esta pequeña GTPasa, comprobamos que esta activación es dependiente de Epac e independiente de PKA (Figura 37).

Hemos demostrado que Epac es esencial para la activación de Rab3 (Bustos et al., 2012; Ruete et al., 2014). Asimismo, en espermatozoides permeabilizados, la activación de Rab3 endógena por 8-pCPT-2-O-Me-AMPC resultó ser insensible a anticuerpos anti-Rap1, indicando que Rap1 no es requerida para el intercambio de GDP por GTP en Rab3 (Branham et al., 2009). Sin embargo, el caso contrario fue observado cuando medimos la activación de Rap1 en células estimuladas con Rab3A-GTP- γ -S, donde comprobamos que se produjo un incremento en los niveles de Rap-GTP (Figura 40). Además, el anticuerpo anti-Rap1 inhibe la

exocitosis inducida por Rab3A-GTP- γ -S (Branham et al., 2009), demostrando que Rap1 es requerido en un paso posterior a la activación de Rab3A. Estos resultados sugieren la existencia de una conexión entre la movilización de calcio y la rama de la maquinaria proteica de fusión (Figura 47). Recientemente reportamos la existencia de un ciclo que vincula las dos cascadas de señalización activadas por Epac en un punto que se encuentra situado río abajo de Rab3 y río arriba de PTP1B (Ruete et al., 2014). Si bien, los componentes del ciclo no han sido descritos, especulamos que el efector de Rab3 Rim podría estar conectando la activación de Rab3 con AMPc/Epac ya que existen trabajos que reportan la interacción entre Epac y Rim en eventos secretorios dependientes de AMPc. Por ejemplo, la interacción Epac2-Rim2 ha sido descrita en la secreción de insulina potenciada por incretina en células β -pancreáticas (Kashima et al., 2001). Ozaki y colaboradores demostraron la interacción entre Epac2, Rim2 y Rab3A (Ozaki et al., 2000) y esta misma interacción fue luego descrita en la secreción de GLP-1 en células β -pancreáticas (Park et al., 2012). También ha sido reportado que Epac2, Rim2 y Piccolo forman un complejo macromolecular que participa en la secreción de insulina dependiente de AMPc (Fujimoto et al., 2002). Recientemente, Rim fue descrita en espermatozoides humanos e involucrada en la exocitosis acrosomal mediante la interacción con las proteínas Munc-13 y Rab3A (Bello et al., 2012). Si bien no conocemos el mecanismo implicado, hipotetizamos que el propósito de la interacción Rim-Rab3 es dirigir a Epac y, por lo tanto, a Rap-GTP a los sitios de *tethering* creados por Rab3 activa. De esta forma, el calcio intra-acrosomal sería liberado cercano a los puntos de contacto entre la membrana acrosomal y la plasmática.

Existen evidencias que postulan que el nexo entre la señalización de AMPc/Epac y la movilización de calcio intracelular podría estar dado por una actividad PLC ϵ . Varios años atrás fue reportado que AMPc/Epac/Rap2B estimulan una actividad PLC ϵ y la movilización de calcio desde reservorios intracelulares en células HEK-293 y de neuroblastoma (Schmidt et al., 2001). Más recientemente, fue demostrado que la vía de señalización Epac-Rap1-PLC ϵ incrementa la liberación de calcio inducida por calcio a partir del retículo sarcoplásmico de miocitos cardíacos (Oestreich et al., 2007). Las isoformas de PLC β , γ , δ y ζ han sido descritas en espermatozoides de mamíferos (Fukami et al., 2001; Nomikos et al., 2005; Tomes et al., 1996; Walensky and Snyder, 1995); sin embargo PLC ϵ no ha sido identificada hasta el momento. En espermatozoides permeabilizados la RA estimulada por calcio, Rab3A persistentemente activa, 8-pCPT-2-O-Me-AMPc (Branham et al., 2009), DAG y un análogo no hidrolizable (Lopez et al., 2012) es sensible al bloqueante de PLC U73122. Además, 8-pCPT-2-O-Me-AMPc genera una

señal de calcio en estudios de poblaciones de espermatozoides no permeabilizados que se suprime por U73122 (Branham et al., 2009). Durante el transcurso de esta tesis describimos la presencia y localización de la isoforma épsilon de PLC en espermatozoides humanos (Figura 41). Además comprobamos que PLC ϵ es requerida para la RA estimulada por calcio y 8-pCPT-2-O-Me-AMPC (Figura 42 y 45). Cuando espermatozoides tratados con U73122 y con anticuerpos anti-PLC ϵ fueron estimulados con 8-pCPT-2-O-Me-AMPC no se produjo movilización de calcio intra-acrosomal (Figura 46 B y C), indicando que la actividad PLC ϵ es requerida para este evento. Además, realizamos un monitoreo del sitio en que actúa PLC ϵ en la cascada que conduce a la movilización de calcio acrosomal y comprobamos que esta enzima es requerida posterior a Rap1 y previo a la salida de calcio acrosomal (Figura 43 y 44). Asimismo, el agonista de receptores sensibles a IP₃ adenosfostina A rescató el efecto inhibitorio sobre la RA impuesto por el anticuerpo anti-PLC ϵ , demostrando que la actividad fosfolipasa es requerida para la movilización de calcio intra-acrosomal a través de canales sensibles a IP₃ (Figura 45). Esto es consecuente con resultados previos que indican que adenosfostina rescata el bloqueo de la RA impuesto por U73122 (Branham et al., 2009). Todas estas evidencias confirman que es a través de la vía AMPc/Epac/Rap1/PLC ϵ que los inductores movilizan el calcio intra-acrosomal e inducen RA. Estos resultados concuerdan con experimentos conducidos en islotes pancreáticos de ratones PLC ϵ ^{-/-} donde fue demostrado el requerimiento de esta enzima puesta abajo de Epac2/Rap1 para la potenciación de la liberación de insulina inducida por glucosa y la movilización de calcio intracelular (Dzhura et al., 2010, 2011). Existe también evidencia farmacológica del requerimiento de una PLC para la secreción de cloro regulada por Epac1/Rap2 en células del epitelio intestinal humano (Hoque et al., 2010). Es tentador hipotetizar la relación entre Epac y PLC ϵ como un nexo molecular entre los dos segundos mensajeros universales calcio y AMPc.

En resumen, nuestros hallazgos indican que durante la cascada de la RA iniciada por progesterona, la activación de Epac por AMPc lleva al intercambio de GDP por GTP en Rap1 en la región acrosomal de los espermatozoides, con el subsecuente reclutamiento y/o activación de una PLC ϵ quien sintetiza IP₃; este segundo mensajero se une a canales sensibles a IP₃ y promueve la liberación de calcio almacenado en el gránulo. AMPc también media la activación de Rab3 y Rab27 endógenas, un evento obligatorio en la cascada exocítica. La salida de calcio desde el acrosoma y el ensamblaje de la maquinaria de fusión convergen para conseguir la fusión del acrosoma con la membrana plasmática. Nuestra contribución al campo de la

exocitosis fue presentar evidencia directa sobre el rol de cada uno de los pasos del módulo de señalización AMPc/Epac/Rap1/PLCε en la secreción de espermatozoides. En la Figura 47 se muestra la vía de señalización caracterizada y las herramientas utilizadas para el estudio de varios de sus componentes.

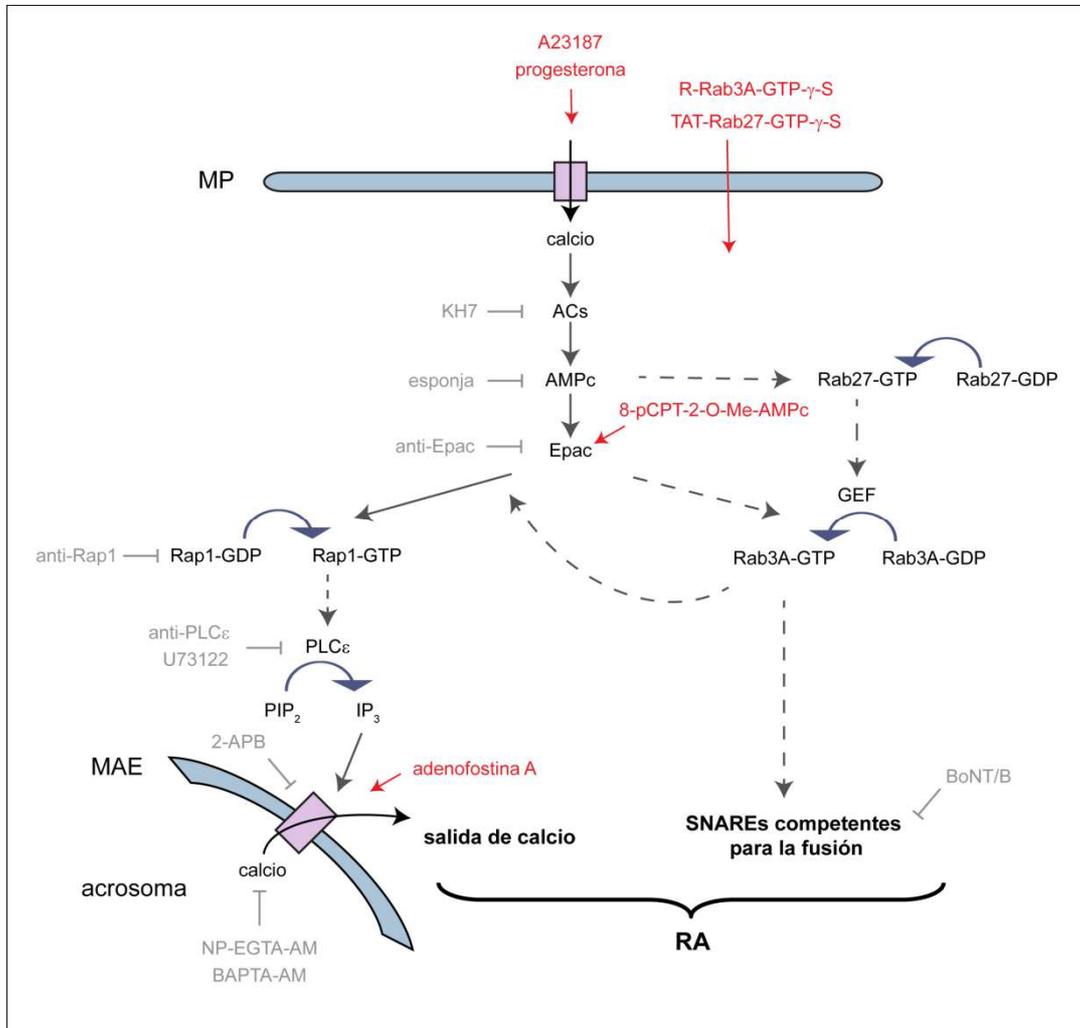


Figura 47. Modelo de la cascada de señalización que conduce a la RA. El calcio entra a la célula a través de los poros generados por la SLO, mediante el tratamiento con el ionóforo A23187 o como consecuencia de la unión de progesterona a su receptor en la membrana plasmática. La entrada de calcio al citoplasma conduce a la activación de la ACs y se produce un incremento en los niveles de AMPc endógenos. Esto estimula, directa o indirectamente, el intercambio de GDP por GTP en Rab27. El AMPc sintetizado también estimula a Epac y, a partir de este punto, la cascada de señalización se divide en dos ramas. En una de ellas Epac cataliza el intercambio de GDP por GTP en Rap y en la otra, AMPc/Epac activan indirectamente a Rab3A. Rap1-GTP encabeza una vía que lleva a la movilización de calcio acrosomal ("salida de calcio" en la figura). Rab3A-GTP encabeza un camino que lleva al ensamblaje adecuado de la maquinaria de fusión ("SNAREs competentes para la fusión" en la figura). En algún sitio río abajo de Rab3A-GTP, hay una conexión unidireccional (rama Rab3A --> rama Rap1) entre ambas ramas de la vía. El paso catalizado por las SNAREs activas converge con el incremento local de calcio que proviene del acrosoma para lograr los pasos finales de la fusión de membranas ("RA" en la figura). Los bloqueantes reversibles o irreversibles que fueron utilizados se muestran en gris y los inductores o agonistas en rojo. PM, membrana plasmática; MAE, membrana acrosomal externa.

VI. CONCLUSIONES

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: *Generar una herramienta que permita capturar el AMPc de espermatozoides.*

Diseñamos una proteína permeable capaz de ingresar a espermatozoides humanos por difusión a través de la MP y capturar el AMPc intracelular, suprimiendo los procesos celulares dependientes de este nucleótido cíclico. La proteína se incorporó efectivamente a los espermatozoides humanos.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: *Establecer la influencia de la esponja de AMPc en los fenómenos de la fisiología espermática en los que está involucrado el AMPc.*

Comprobamos que la incorporación de la esponja de AMPc a espermatozoides humanos afectó procesos fundamentales de la fisiología espermática en los que se encuentra involucrado este segundo mensajero, como la fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación, el hinchamiento del acrosoma que producen distintos inductores de la RA y la RA estimulada por calcio y progesterona. Asimismo, demostramos que la esponja de AMPc ejerce su efecto inhibitorio sobre la RA mediante el secuestro del AMPc endógeno, ya que este efecto puede ser revertido mediante la incubación previa de la proteína con dibutiril AMPc.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3: *Identificar el lugar específico de la cascada donde se requiere el AMPc y establecer una conexión con la movilización de calcio y la maquinaria proteica que interviene en la exocitosis regulada.*

El AMPc tiene un rol fundamental en ambas ramas de la vía de señalización que conduce a la RA. Por un lado, las proteínas Rab3A y Rab27A, implicadas en la rama que conduce al ensamblaje de proteínas SNAREs, requieren AMPc endógeno para conseguir que la exocitosis se lleve a cabo. Además, progesterona activa estas dos GTPasas mediante una vía que utiliza AMPc endógeno. Por otra parte, es a través de la vía de señalización activada por AMPc/Epac que inductores de la RA aseguran la salida de calcio desde el reservorio acrosomal.

OBJETIVO ESPECÍFICO 4. *Desentrañar la vía de señalización en la cual se encuentra implicada la proteína Rap1.*

Rap1 se activa en la región acrosomal de espermatozoides humanos en respuesta a diversos inductores de la RA a través de una vía mediada por AMPc/Epac e independiente de PKA. El estado de activación de Rap1 en respuesta al estímulo con progesterona se modifica en

el tiempo, sugiriendo que existe un ciclo de activación-inactivación de la proteína Rap1, que involucra la acción de factores GEFs y GAPs que actúan como elementos regulatorios de su actividad. Asimismo, comprobamos que DAG no requiere AMPc para estimular a Rap, lo que sugiere que el mecanismo no está mediado por Epac y que podría estar regulado por un GEF de la familia RasGRP.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5: *Identificar la PLC involucrada en la vía de señalización que lleva a la salida de calcio acrosomal durante la RA.*

La proteína PLC ϵ está presente en espermatozoides humanos y forma parte de la vía de señalización encabezada por Epac que lleva la movilización de calcio acrosomal. En base a los resultados obtenidos pudimos actualizar la vía de señalización propuesta en nuestro modelo de estudio, situando a PLC ϵ en la siguiente rama: AMPc \rightarrow Epac \rightarrow Rap \rightarrow PLC ϵ \rightarrow movilización de calcio.

VII. REFERENCIAS

Abou-Haila, A., and Tulsiani, D.R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.* *379*, 173–182.

Ackermann, F., Zitanski, N., Heydecke, D., Wilhelm, B., Gudermann, T., and Boekhoff, I. (2007). The Multi-PDZ Domain Protein MUPP1 as a Lipid Raft-Associated Scaffolding Protein Controlling the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa. 757–768.

Aivatiadou, E., Ripolone, M., Brunetti, F., and Berruti, G. (2009). cAMP-Epac2-mediated activation of Rap1 in developing male germ cells: RA-RhoGAP as a possible direct down-stream effector. *Mol. Reprod. Dev.* *76*, 407–416.

Amano, R., Lee, J., Goto, N., and Harayama, H. (2007). Evidence for existence of cAMP-Epac signaling in the heads of mouse epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* *53*, 127–133.

Angers, C.G., and Merz, A.J. (2011). New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 18–26.

Arnoult, C., Zeng, Y., and Florman, H.M. (1996a). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* *134*, 637–645.

Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R., and Florman, H.M. (1996b). Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13004–13009.

Avella, M. a, and Dean, J. (2011). Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19843–19844.

Barclay, J.W., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* *38*, 343–353.

Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., and Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* *34*, C1–C5.

Battistone, M.A., Da Ros, V.G., Salicioni, A.M., Navarrete, F.A., Krapf, D., Visconti, P.E., and Cuasnicú, P.S. (2013). Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 570–580.

Baxendale, R.W., and Fraser, L.R. (2003a). Immunolocalization of multiple Galpha subunits in mammalian spermatozoa and additional evidence for Galphas. *Mol. Reprod. Dev.* *65*, 104–113.

Baxendale, R.W., and Fraser, L.R. (2003b). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* *66*, 181–189.

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

Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* *587*, 1693–1702.

Bello, O.D., Zanetti, M.N., Mayorga, L.S., and Michaut, M.A. (2012). RIM, Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis. *Exp. Cell Res.* *318*, 478–488.

Beltrán, C., Vacquier, V.D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L.R., and Darszon, A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *358*, 1128–1135.

Béranger, F., Tavitian, A., and de Gunzburg, J. (1991). Post-translational processing and subcellular localization of the Ras-related Rap2 protein. *Oncogene* *6*, 1835–1842.

Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E., and Hofmann, F. (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7553–7557.

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

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

Bleil, J.D., and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* *95*, 317–324.

Bos, J.L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 680–686.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). Review GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins. 865–877.

Bramson, H.N., Kaiser, E.T., and Mildvan, A.S. (1984). Mechanistic studies of cAMP-dependent protein kinase action. *CRC Crit. Rev. Biochem.* *15*, 93–124.

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

Branham, M.T., Bustos, M. a, De Blas, G. a, Rehmann, H., Zarelli, V.E.P., Treviño, C.L., Darszon, A., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. (2009). Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J. Biol. Chem.* *284*, 24825–24839.

Braun, T., and Dods, R.F. (1975). Development of a Mn²⁺-sensitive, “soluble” adenylate cyclase in rat testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 1097–1101.

Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* *187*, 139–144.

Breitbart, H., and Spungin, B. (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* *3*, 195–202.

- Bryn, T., Mahic, M., Enserink, J.M., Schwede, F., Aandahl, E.M., and Taskén, K. (2006). The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. *J. Immunol.* *176*, 7361–7370.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 79–84.
- Buffone, M.G., Wertheimer, E. V, Visconti, P.E., and Krapf, D. (2014). Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Bunney, T.D., and Katan, M. (2006). Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol.* *16*, 640–648.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* *83*, 581–632.
- Busso, D., Cohen, D.J., Maldera, J.A., Dematteis, A., and Cuasnicu, P.S. (2007). A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol. Reprod.* *77*, 848–854.
- Bustos, A., Roggero, C.M., Iglesia, P.X. De, and Mayorga, L.S. (2014). GTP-bound Rab 3 A exhibits consecutive positive and negative roles during human sperm dense-core granule exocytosis. *6*, 286–298.
- Bustos, M.A., Lucchesi, O., Ruete, M.C., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. (2012). Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 2057–2066.
- Carlson, A.E., Westenbroek, R.E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D.E., Hille, B., Garbers, D.L., and Babcock, D.F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 14864–14868.
- Carlson, A.E., Hille, B., and Babcock, D.F. (2007). External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev. Biol.* *312*, 183–192.
- Cass, L.A., Summers, S.A., Prendergast, G. V, Backer, J.M., Birnbaum, M.J., and Meinkoth, J.L. (1999). Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5882–5891.
- Chen, C.-C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., et al. (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* *302*, 1416–1418.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* *289*, 625–628.
- Cheng, C.Y., and Boettcher, B. (1981). Effect of cAMP, Mn²⁺, and phosphodiesterase inhibitors on human sperm motility. *Arch. Androl.* *7*, 313–317.

Chepurny, O.G., Leech, C.A., Kelley, G.G., Dzhura, I., Dzhura, E., Li, X., Rindler, M.J., Schwede, F., Genieser, H.G., and Holz, G.G. (2009). Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *J. Biol. Chem.* *284*, 10728–10736.

Chepurny, O.G., Kelley, G.G., Dzhura, I., Leech, C.A., Roe, M.W., Dzhura, E., Li, X., Schwede, F., Genieser, H.-G., and Holz, G.G. (2010). PKA-dependent potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM in human islets of Langerhans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E622–E633.

Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.-G., et al. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J. Biol. Chem.* *278*, 35394–35402.

Citro, S., Malik, S., Oestreich, E.A., Radeff-Huang, J., Kelley, G.G., Smrcka, A. V., and Brown, J.H. (2007). Phospholipase Cepsilon is a nexus for Rho and Rap-mediated G protein-coupled receptor-induced astrocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15543–15548.

Clift, D., and Schuh, M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 549–562.

Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., and Eisenbach, M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 11039–11043.

Colledge, M., and Scott, J.D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* *9*, 216–221.

Consonni, S. V, Gloerich, M., Spanjaard, E., and Bos, J.L. (2012). cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3814–3819.

Correia, J., Conner, S., and Kirkman-Brown, J. (2007). Non-Genomic Steroid Actions in Human Spermatozoa. *Semin. Reprod. Med.* *25*, 208–220.

Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J., and Publicover, S. (2009). Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* *138*, 425–437.

Courilleau, D., Bissierier, M., Jullian, J.-C., Lucas, A., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Blondeau, J.-P., and Lezoualc'h, F. (2012). Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J. Biol. Chem.* *287*, 44192–44202.

Cukkemane, A., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (2011). Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 55–64.

Cullere, X., Shaw, S.K., Andersson, L., Hirahashi, J., Lusinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* *105*, 1950–1955.

Cyphert, H.A., Alonge, K.M., Ippagunta, S.M., and Hillgartner, F.B. (2014). Glucagon stimulates hepatic FGF21 secretion through a PKA- and EPAC-dependent posttranscriptional mechanism. *PLoS One* *9*, e94996.

Dao, K.K., Teigen, K., Kopperud, R., Hodneland, E., Schwede, F., Christensen, A.E., Martinez, A., and Døskeland, S.O. (2006). Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J. Biol. Chem.* *281*, 21500–21511.

Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernández-González, E.O., Nishigaki, T., Treviño, C.L., Wood, C., and Beltrán, C. (2006a). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* *131*, 977–988.

Darszon, A., López-Martínez, P., Acevedo, J.J., Hernández-Cruz, A., and Treviño, C.L. (2006b). T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* *40*, 241–252.

DiPilato, L.M., Cheng, X., and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16513–16518.

Dostmann, W.R., and Taylor, S.S. (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* *30*, 8710–8716.

Ducibella, H., and Florman, T. (2005). Fertilization in Mammals. In *Physiology of Reproduction*, E. Knobil, and J.D. Neill, eds. (San Diego, CA.: Elsevier A), pp. 55–112.

Dzhura, I., Chepurny, O.G., Kelley, G.G., Leech, C.A., Roe, M.W., Dzhura, E., Afshari, P., Malik, S., Rindler, M.J., Xu, X., et al. (2010). Epac2-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ by glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 is disrupted in β -cells of phospholipase C- ϵ knockout mice. *J. Physiol.* *588*, 4871–4889.

Dzhura, I., Chepurny, O.G., Leech, C. a., Roe, M.W., Dzhura, E., Xu, X., Lu, Y., Schwede, F., Genieser, H.-G., Smrcka, A. V., et al. (2011). Phospholipase C- ϵ links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. *Islets* *3*, 121–128.

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

Edreira, M.M., Li, S., Hochbaum, D., Wong, S., Gorfe, A.A., Ribeiro-Neto, F., Woods, V.L., and Altschuler, D.L. (2009). Phosphorylation-induced conformational changes in Rap1b: allosteric effects on switch domains and effector loop. *J. Biol. Chem.* *284*, 27480–27486.

Eisenbach, M. (1999a). Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev. Genet.* *25*, 87–94.

Eisenbach, M. (1999b). Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* *4*, 56–66.

Eisenbach, M., and Giojalas, L.C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 276–285.

Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L., and Bos, J.L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* *4*, 901–906.

Essen, L.O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R.L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* *380*, 595–602.

Evellin, S., Nolte, J., Tysack, K., vom Dorp, F., Thiel, M., Weernink, P.A.O., Jakobs, K.H., Webb, E.J., Lomasney, J.W., and Schmidt, M. (2002). Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* *277*, 16805–16813.

Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15781–15786.

Finkelstein, A., Zimmerberg, J., and Cohen, F.S. (1986). Osmotic swelling of vesicles: its role in the fusion of vesicles with planar phospholipid bilayer membranes and its possible role in exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* *48*, 163–174.

Finkelstein, M., Etkovitz, N., and Breitbart, H. (2010). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J. Biol. Chem.* *285*, 39702–39709.

Fisch, J.D., Behr, B., and Conti, M. (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum. Reprod.* *13*, 1248–1254.

Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L., and Babcock, D.F. (1989). An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* *135*, 133–146.

Flynn, G.E., Johnson, J.P., and Zagotta, W.N. (2001). Cyclic nucleotide-gated channels: shedding light on the opening of a channel pore. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 643–651.

Francis, S.H., and Corbin, J.D. (1994). Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* *56*, 237–272.

Fraser, L.R., and Adeoya-Osiguwa, S. (1999). Modulation of adenylyl cyclase by FPP and adenosine involves stimulatory and inhibitory adenosine receptors and g proteins. *Mol. Reprod. Dev.* *53*, 459–471.

Frenette, G., Girouard, J., D'Amours, O., Allard, N., Tessier, L., and Sullivan, R. (2010). Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biol. Reprod.* *83*, 473–480.

Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., and Seino, S. (2002). Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 50497–50502.

Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N., et al. (2001). Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* 292, 920–923.

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

Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2801–2813.

Gadella, B.M. (2013). Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 26–37.

Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E., and Kopf, G.S. (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56, 707–719.

Gamboa, S., and Ramalho-Santos, J. (2005). SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology* 64, 275–291.

Garde, J., and Roldan, E.R. (1996). rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites. *FEBS Lett.* 391, 263–268.

Gatica, L. V., Guidobaldi, H.A., Montesinos, M.M., Teves, M.E., Moreno, A.I., Unates, D.R., Molina, R.I., and Giojalas, L.C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 559–569.

Giancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E., and Carabelli, V. (2006). Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited Ca_v3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys. J.* 90, 1830–1841.

Gloerich, M., and Bos, J.L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 355–375.

Gloerich, M., and Bos, J.L. (2011). Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol.* 21, 615–623.

Gondré-Lewis, M.C., Park, J.J., and Loh, Y.P. (2012). Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 299, 27–115.

González-Martínez, M.T., Galindo, B.E., de De La Torre, L., Zapata, O., Rodríguez, E., Florman, H.M., and Darszon, A. (2001). A sustained increase in intracellular Ca(2+) is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 236, 220–229.

Gupta, M., and Yarwood, S.J. (2005). MAP1A light chain 2 interacts with exchange protein activated by cyclic AMP 1 (EPAC1) to enhance Rap1 GTPase activity and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 280, 8109–8116.

- Gupta, S.K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B.K., Palaniappan, C., Malhotra, S.S., and Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res.* *349*, 665–678.
- Hammer, J.A., and Wu, X.S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 69–75.
- Hanoune, J., and Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 145–174.
- Harden, T.K., and Sondek, J. (2006). Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *46*, 355–379.
- Harden, T.K., Waldo, G.L., Hicks, S.N., and Sondek, J. (2011). Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C- β signaling nodes. *Chem. Rev.* *111*, 6120–6129.
- Herrick, S.B., Schweissinger, D.L., Kim, S.-W., Bayan, K.R., Mann, S., and Cardullo, R.A. (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* *202*, 663–671.
- 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., et al. (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell* *9*, 249–259.
- Holz, G.G., Chepurny, O.G., and Schwede, F. (2008). Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors. *Cell. Signal.* *20*, 10–20.
- Van Hooren, K.W.E.M., van Agtmaal, E.L., Fernandez-Borja, M., van Mourik, J. a, Voorberg, J., and Bierings, R. (2012). The Epac-Rap1 signaling pathway controls cAMP-mediated exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 24713–24720.
- Hoque, K.M., Woodward, O.M., van Rossum, D.B., Zachos, N.C., Chen, L., Leung, G.P.H., Guggino, W.B., Guggino, S.E., and Tse, C.-M. (2010). Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion. *J. Gen. Physiol.* *135*, 43–58.
- Hu, X.-Q., Ji, S.-Y., Li, Y.-C., Fan, C.-H., Cai, H., Yang, J.-L., Zhang, C.-P., Chen, M., Pan, Z.-F., Hu, Z.-Y., et al. (2010). Acrosome formation-associated factor is involved in fertilization. *Fertil. Steril.* *93*, 1482–1492.
- Hutt, D.M., Baltz, J.M., and Ngsee, J.K. (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* *280*, 20197–20203.
- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S., Toshimori, K., and Mori, T. (1999). Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. *Dev. Biol.* *211*, 144–155.
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M., Okabe, M., Chang, M.C., and Austin, C.R. (2010). Review series Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte. *120*.

- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20008–20011.
- Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* *490*, 201–207.
- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 631–643.
- Jaiswal, B.S., and Conti, M. (2001). Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* *276*, 31698–31708.
- Jaiswal, B.S., and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10676–10681.
- Jeon, Y.H., Heo, Y.-S., Kim, C.M., Hyun, Y.-L., Lee, T.G., Ro, S., and Cho, J.M. (2005). Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 1198–1220.
- Jimenez-Gonzalez, C., Michelangeli, F., Harper, C. V, Barratt, C.L.R., and Publicover, S.J. (2006). Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized “toolkit” of channels, transporters and stores. *Hum. Reprod. Update* *12*, 253–267.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4892–4896.
- Jin, T.G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C.D., and Kataoka, T. (2001). Role of the CDC25 homology domain of phospholipase Cepsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* *276*, 30301–30307.
- Johnson, D.A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M., and Taylor, S.S. (2001). Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* *101*, 2243–2270.
- Johnson, L.R., Moss, S.B., and Gerton, G.L. (1999). Maintenance of motility in mouse sperm permeabilized with streptolysin O. *Biol. Reprod.* *60*, 683–690.
- Joliot, A., and Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell Biol.* *6*, 189–196.
- Jones, R. (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development* *111*, 1155–1163.
- Jones, S., Lukanowska, M., Suhorutsenko, J., Oxenham, S., Barratt, C., Publicover, S., Copolovici, D.M., Langel, Ü., and Howl, J. (2013). Intracellular translocation and differential accumulation of cell-penetrating peptides in bovine spermatozoa: evaluation of efficient delivery vectors that do not compromise human sperm motility. *Hum. Reprod.* *28*, 1874–1889.

De Jonge C (1996). The cAMP-dependent kinase pathway and human sperm acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.* *1*, d234–d240.

De Jonge, C.J., Han, H.L., Lawrie, H., Mack, S.R., and Zaneveld, L.J. (1991). Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J. Exp. Zool.* *258*, 113–125.

Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* *11*, 1680–1685.

Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.-G., and Holz, G.G. (2003). Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 8279–8285.

Kasai, H., Takahashi, N., and Tokumaru, H. (2012). Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol. Rev.* *92*, 1915–1964.

Kasai, K., Ohara-Imaizumi, M., Takahashi, N., Mizutani, S., Zhao, S., Kikuta, T., Kasai, H., Nagamatsu, S., Gomi, H., and Izumi, T. (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J. Clin. Invest.* *115*, 388–396.

Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., and Seino, S. (2001). Critical role of cAMP-GEFII–Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* *276*, 46046–46053.

Katafuchi, K., Mori, T., Toshimori, K., and Iida, H. (2000). Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal region of rodent spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* *57*, 375–383.

Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* *82*, 769–824.

Kaupp, U.B., Kashikar, N.D., and Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.* *70*, 93–117.

Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* *282*, 2275–2279.

Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., and Smrcka, A. V (2001). Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J.* *20*, 743–754.

Kinukawa, M., Oda, S., Shirakura, Y., Okabe, M., Ohmuro, J., Baba, S. a, Nagata, M., and Aoki, F. (2006). Roles of cAMP in regulating microtubule sliding and flagellar bending in demembrated hamster spermatozoa. *FEBS Lett.* *580*, 1515–1520.

Kirkman-Brown, J.C., Punt, E.L., Barratt, C.L.R., and Publicover, S.J. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Androl.* *23*, 306–315.

- Klinovska, K., Sebkova, N., and Dvorakova-Hortova, K. (2014). Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 10652–10668.
- Kobori, H., Miyazaki, S., and Kuwabara, Y. (2000). Characterization of intracellular Ca²⁺ increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* *63*, 113–120.
- Kooistra, M.R.H., Corada, M., Dejana, E., and Bos, J.L. (2005). Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett.* *579*, 4966–4972.
- Koren, E., and Torchilin, V.P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* *18*, 385–393.
- Kornblihtt, A.R., Flawia, M.M., and Torres, H.N. (1981). Manganese ion dependent adenylate cyclase activity in rat testes: purification and properties. *Biochemistry* *20*, 1262–1267.
- Krugmann, S., Williams, R., Stephens, L., and Hawkins, P.T. (2004). ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr. Biol.* *14*, 1380–1384.
- Kukimoto-Niino, M., Takagi, T., Akasaka, R., Murayama, K., Uchikubo-Kamo, T., Terada, T., Inoue, M., Watanabe, S., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., et al. (2006). Crystal structure of the RUN domain of the RAP2-interacting protein x. *J. Biol. Chem.* *281*, 31843–31853.
- Kuroda, T.S., and Fukuda, M. (2005). Functional analysis of Slac2-c/MyRIP as a linker protein between melanosomes and myosin VIIa. *J. Biol. Chem.* *280*, 28015–28022.
- Kwan, E.P., Gao, X., Leung, Y.M., and Gaisano, H.Y. (2007a). Activation of exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A regulate common and distinct steps in promoting plasma membrane exocytic and granule-to-granule fusions in rat islet beta cells. *Pancreas* *35*, e45–e54.
- Kwan, E.P., Xie, L., Sheu, L., Ohtsuka, T., and Gaisano, H.Y. (2007b). Interaction between Munc13-1 and RIM is critical for glucagon-like peptide-1 mediated rescue of exocytotic defects in Munc13-1 deficient pancreatic beta-cells. *Diabetes* *56*, 2579–2588.
- Lacabartz-Porret, C., Corvazier, E., Kovács, T., Bobe, R., Bredoux, R., Launay, S., Papp, B., and Enouf, J. (1998). Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology. *Biochem. J.* *332* (Pt 1), 173–181.
- Leclerc, P., and Kopf, G.S. (1995). Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol. Reprod.* *52*, 1227–1233.
- Leclerc, P., and Kopf, G.S. (1999). Evidence for the role of heterotrimeric guanine nucleotide-binding regulatory proteins in the regulation of the mouse sperm adenylyl cyclase by the egg's zona pellucida. *J. Androl.* *20*, 126–134.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.* *55*, 684–692.

- Lefkimiatis, K., Srikanthan, M., Maiellaro, I., Moyer, M.P., Curci, S., and Hofer, A.M. (2009). Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. *Nat. Cell Biol.* *11*, 433–442.
- Li, Y., Asuri, S., Rebhun, J.F., Castro, A.F., Parnavitana, N.C., and Quilliam, L.A. (2006). The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *281*, 2506–2514.
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., and Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* *125*, 1157–1163.
- Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., and Levin, L.R. (2003). Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J. Biol. Chem.* *278*, 15922–15926.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M.A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D.R., and Conti, M. (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol. Endocrinol.* *19*, 1277–1290.
- Lopez, C.I., Belmonte, S. a, De Blas, G. a, and Mayorga, L.S. (2007). Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. *FASEB J.* *21*, 4121–4130.
- Lopez, C.I., Pelletán, L.E., Suhaiman, L., Blas, G.A. De, Vitale, N., Mayorga, L.S., and Belmonte, S.A. (2012). Biochimica et Biophysica Acta Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1821*, 1186–1199.
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E., and Lomasney, J.W. (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 2758–2765.
- Lotfi, S., Li, Z., Sun, J., Zuo, Y., Lam, P.P.L., Kang, Y., Rahimi, M., Islam, D., Wang, P., Gaisano, H.Y., et al. (2006). Role of the exchange protein directly activated by cyclic adenosine 5'-monophosphate (Epac) pathway in regulating proglucagon gene expression in intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* *147*, 3727–3736.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Gräslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* *2011*, 414729.
- Maillet, M., Robert, S.J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J.L., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. (2003). Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nat. Cell Biol.* *5*, 633–639.
- Mazzolini, M., Marchesi, A., Giorgetti, A., and Torre, V. (2010). Gating in CNGA1 channels. *Pflugers Arch.* *459*, 547–555.
- McKnight, G.S. (1991). Cyclic AMP second messenger systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* *3*, 213–217.
- McPartlin, L. a, Visconti, P.E., and Bedford-Guaus, S.J. (2011). Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biol. Reprod.* *85*, 179–188.

Mehats, C., Andersen, C.B., Filopanti, M., Jin, S.-L.C., and Conti, M. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *13*, 29–35.

Mei, F.C., and Cheng, X. (2005). Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton. *Mol. Biosyst.* *1*, 325–331.

Meizel, S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *59*, 125–157.

Meizel, S., and Lui, C.W. (1976). Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* *195*, 137–144.

Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., and Tesarik, J. (1992). Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* *95*, 755–763.

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

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

Miro-Moran, A., Jardin, I., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G.M., Peña, F.J., Tapia, J. a, and Aparicio, I.M. (2012). Identification and function of exchange proteins activated directly by cyclic AMP (Epac) in mammalian spermatozoa. *PLoS One* *7*, e37713.

Misra, U.K., and Pizzo, S. V (2005). Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling: effects of silencing CREB gene expression on Akt activation. *J. Biol. Chem.* *280*, 38276–38289.

Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* *15*, R563–R574.

Monks, N.J., Stein, D.M., and Fraser, L.R. (1986). Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue. *Int. J. Androl.* *9*, 67–76.

Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., Lompré, A.-M., Vandecasteele, G., and Lezoualc'h, F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* *97*, 1296–1304.

Moreno, R.D., and Alvarado, C.P. (2006). The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol. Reprod. Dev.* *73*, 1430–1434.

Murphy, G.A., Graham, S.M., Morita, S., Reks, S.E., Rogers-Graham, K., Vojtek, A., Kelley, G.G., and Der, C.J. (2002). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J. Biol. Chem.* *277*, 9966–9975.

Nassar, A., Mahony, M., Morshedi, M., Lin, M.H., Srisombut, C., and Oehninger, S. (1999). Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil. Steril.* *71*, 919–923.

Neer, E.J., and Murad, F. (1979). Separation of soluble adenylate and guanylate cyclases from the mature rat testis. *Biochim. Biophys. Acta* *583*, 531–534.

Neumüller, O., Hoffmeister, M., Babica, J., Prella, C., Gegenbauer, K., and Smolenski, A.P. (2009). Synaptotagmin-like protein 1 interacts with the GTPase-activating protein Rap1GAP2 and regulates dense granule secretion in platelets. *Blood* *114*, 1396–1404.

Niimura, M., Miki, T., Shibasaki, T., Fujimoto, W., Iwanaga, T., and Seino, S. (2009). Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J. Cell. Physiol.* *219*, 652–658.

Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M.J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* *279*, 37215–37218.

Nolan, M.A., Babcock, D.F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K.A., and 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*, 13483–13488.

Nomikos, M., Blayney, L.M., Larman, M.G., Campbell, K., Rossbach, A., Saunders, C.M., Swann, K., and Lai, F.A. (2005). Role of phospholipase C-zeta domains in Ca²⁺-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *J. Biol. Chem.* *280*, 31011–31018.

Nomikos, M., Kashir, J., Swann, K., and Lai, F.A. (2013). Sperm PLC ζ : from structure to Ca²⁺ oscillations, egg activation and therapeutic potential. *FEBS Lett.* *587*, 3609–3616.

O'Toole, C.M., Roldan, E.R., and Fraser, L.R. (1996). Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* *45*, 204–211.

O'Toole, C.M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A., and Florman, H.M. (2000). Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1571–1584.

Oestreich, E. a, Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K. a, Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T., and Smrcka, A. V (2007). Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 5488–5495.

Oestreich, E.A., Malik, S., Goonasekera, S.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T., and Smrcka, A. V (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* *284*, 1514–1522.

Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development* *140*, 4471–4479.

- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., et al. (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* *275*, 805–812.
- Park, J.-H., Kim, S.-J., Park, S.-H., Son, D.-G., Bae, J.-H., Kim, H.K., Han, J., and Song, D.-K. (2012). Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic β -cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A. *Endocrinology* *153*, 574–582.
- Pavlos, N.J., Grønborg, M., Riedel, D., Chua, J.J.E., Boyken, J., Kloepper, T.H., Urlaub, H., Rizzoli, S.O., and Jahn, R. (2010). Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca²⁺-triggered exocytosis. *J. Neurosci.* *30*, 13441–13453.
- Pereira-Leal, J.B., and Seabra, M.C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* *313*, 889–901.
- Pfeffer, S. (2005). A model for Rab GTPase localization. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 627–630.
- Pfeffer, S., and Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 886–896.
- Pifferi, S., Boccaccio, A., and Menini, A. (2006). Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett.* *580*, 2853–2859.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zacco, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* *5*, 1176–1180.
- Ponsioen, B., Gloerich, M., Ritsma, L., Bos, J.L., Jalink, K., and Rehmann, H. (2009). Direct Spatial Control of Epac1 by Cyclic AMP Direct Spatial Control of Epac1 by Cyclic AMP. *Mol. Cell Biol.* *29*, 2521–2531.
- Primakoff, P., and Myles, D.G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* *296*, 2183–2185.
- Publicover, S.J., Giojalas, L.C., Teves, M.E., de Oliveira, G.S.M.M., Garcia, A.A.M., Barratt, C.L.R., and Harper, C.V. (2008). Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front. Biosci.* *13*, 5623–5637.
- Raaijmakers, J.H., and Bos, J.L. (2009). Specificity in Ras and Rap signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 10995–10999.
- Rall, T.W., and Sutherland, E.W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* *232*, 1065–1076.
- Ramalho-Santos, J., and Schatten, G. (2004). Presence of N-ethyl maleimide sensitive factor (NSF) on the acrosome of mammalian sperm. *Arch. Androl.* *50*, 163–168.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Wessel, G.M., Chan, E.K., and Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp. Cell Res.* *267*, 45–60.

- Rangarajan, S., Enserink, J.M., Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Price, L.S., Schwede, F., and Bos, J.L. (2003). Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Cell Biol.* *160*, 487–493.
- Rehmann, H. (2006). Characterization of the activation of the Rap-specific exchange factor Epac by cyclic nucleotides. *Methods Enzymol.* *407*, 159–173.
- Rehmann, H. (2013). Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci. Rep.* *3*, 3032.
- Rehmann, H., Schwede, F., Døskeland, S.O., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* *278*, 38548–38556.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (2007). Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 63–73.
- Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O., and Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* *455*, 124–127.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., and Clapham, D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* *413*, 603–609.
- Robert, S., Maillet, M., Morel, E., Launay, J.-M., Fischmeister, R., Mercken, L., and Lezoualc'h, F. (2005). Regulation of the amyloid precursor protein ectodomain shedding by the 5-HT4 receptor and Epac. *FEBS Lett.* *579*, 1136–1142.
- Rodríguez, F., Bustos, M. a, Zanetti, M.N., Ruete, M.C., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. (2011). α -SNAP prevents docking of the acrosome during sperm exocytosis because it sequesters monomeric syntaxin. *PLoS One* *6*, e21925.
- Roggero, C.M., De Blas, G. a, Dai, H., Tomes, C.N., Rizo, J., and Mayorga, L.S. (2007). Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 26335–26343.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474–477.
- De Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* *275*, 20829–20836.
- Roscioni, S.S., Elzinga, C.R.S., and Schmidt, M. (2008). Epac: effectors and biological functions. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* *377*, 345–357.
- Ruete, M.C., Lucchesi, O., Bustos, M. a, and 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.

- Sabbatini, M.E., Chen, X., Ernst, S. a, and Williams, J. a (2008). Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion. *J. Biol. Chem.* *283*, 23884–23894.
- Saling, P.M., Sowinski, J., and 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*, 229–238.
- Sands, W.A., Woolson, H.D., Milne, G.R., Rutherford, C., and Palmer, T.M. (2006). Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6333–6346.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P. a, von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W., and Jakobs, K.H. (2001). A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1020–1024.
- Schmidt, M., Sand, C., Jakobs, K.H., Michel, M.C., and Weernink, P.A.O. (2007). Epac and the cardiovascular system. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 193–200.
- Schulz, J.R., Wessel, G.M., and Vacquier, V.D. (1997). The exocytosis regulatory proteins syntaxin and VAMP are shed from sea urchin sperm during the acrosome reaction. *Dev. Biol.* *191*, 80–87.
- Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., and Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* *120*, 3905–3910.
- Scott, J.D., and McCartney, S. (1994). Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol. Endocrinol.* *8*, 5–11.
- Seabra, M.C., and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 451–457.
- Sedej, S., Rose, T., and Rupnik, M. (2005). cAMP increases Ca²⁺-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. *J. Physiol.* *567*, 799–813.
- Seino, S., Takahashi, H., Fujimoto, W., and Shibasaki, T. (2009). Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes. Obes. Metab.* *11 Suppl 4*, 180–188.
- Shi, G.-X., Rehmann, H., and Andres, D.A. (2006). A novel cyclic AMP-dependent Epac-Rit signaling pathway contributes to PACAP38-mediated neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9136–9147.
- Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J.-I., et al. (2007). Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19333–19338.
- Sinclair, M.L., Wang, X.Y., Mattia, M., Conti, M., Buck, J., Wolgemuth, D.J., and Levin, L.R. (2000). Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* *56*, 6–11.

- Skålhegg, B.S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R.L., McKnight, G.S., and Burton, K.A. (2002). Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.* *16*, 630–639.
- Smrcka, A. V, Brown, J.H., and Holz, G.G. (2012). Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell. Signal.* *24*, 1333–1343.
- Soderling, S.H., and Beavo, J.A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 174–179.
- Söllner, T.H. (2003). Regulated exocytosis and SNARE function. *Mol. Membr. Biol.* *20*, 209–220.
- Song, C., Satoh, T., Edamatsu, H., Wu, D., Tadano, M., Gao, X., and Kataoka, T. (2002). Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C epsilon. *Oncogene* *21*, 8105–8113.
- Sorli, S.C., Bunney, T.D., Sugden, P.H., Paterson, H.F., and Katan, M. (2005). Signaling properties and expression in normal and tumor tissues of two phospholipase C epsilon splice variants. *Oncogene* *24*, 90–100.
- Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H.-S., Ronjat, M., De Waard, M., and Arnoult, C. (2004). Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J. Cell. Physiol.* *200*, 116–124.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.
- Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update* *14*, 647–657.
- Suarez, S.S., and Ho, H.-C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reprod. Domest. Anim.* *38*, 119–124.
- Subramanian, J., Dye, L., and Morozov, A. (2013). Rap1 signaling prevents L-type calcium channel-dependent neurotransmitter release. *J. Neurosci.* *33*, 7245–7252.
- Südhof, T.C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* *80*, 675–690.
- Südhof, T.C., and Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Suhaiman, L., De Blas, G. a, Obeid, L.M., Darszon, A., Mayorga, L.S., and Belmonte, S. a (2010). Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase are involved in a novel signaling pathway leading to acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* *285*, 16302–16314.
- Taira, K., Umikawa, M., Takei, K., Myagmar, B.-E., Shinzato, M., Machida, N., Uezato, H., Nonaka, S., and Kariya, K. (2004). The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *279*, 49488–49496.

- Takano, H., Yanagimachi, R., and Urch, U.A. (1993). Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* *1*, 79–91.
- Talbot, P., Shur, B.D., and Myles, D.G. (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* *68*, 1–9.
- Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* *84*, 137–167.
- Taylor, S.S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N.M., Yang, J., Wu, J., and Anand, G.S. (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta* *1754*, 25–37.
- Taylor, S.S., Zhang, P., Steichen, J.M., Keshwani, M.M., and Kornev, A.P. (2013). PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 1271–1278.
- Teves, M.E., Barbano, F., Guidobaldi, H.A., Sanchez, R., Miska, W., and Giojalas, L.C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* *86*, 745–749.
- Teves, M.E., Guidobaldi, H.A., Uñates, D.R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S.J., Morales Garcia, A.A., and Giojalas, L.C. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One* *4*, e8211.
- Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., and Seabra, M.C. (2004). A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol. Biol. Cell* *15*, 332–344.
- Tomes, C.N. (2007a). Acrosomal Exocytosis. In *Molecular Mechanisms of Exocytosis*, R. Regazzi, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 117–147.
- Tomes, C.N. (2007b). Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* *65*, 275–291.
- Tomes, C.N., McMaster, C.R., and Saling, P.M. (1996). Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol. Reprod. Dev.* *43*, 196–204.
- Tomes, C.N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., and Mayorga, L.S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* *243*, 326–338.
- Tomes, C.N., De Blas, G. a, Michaut, M. a, Farré, E. V, Cherhitin, O., Visconti, P.E., and Mayorga, L.S. (2005). alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 43–51.
- Töpfer-Petersen, E., and Henschen, A. (1988). Zona pellucida-binding and fucose-binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* *369*, 69–76.
- Tovey, S.C., Dedos, S.G., Taylor, E.J.A., Church, J.E., and Taylor, C.W. (2008). Selective coupling of type 6 adenylyl cyclase with type 2 IP3 receptors mediates direct sensitization of IP3 receptors by cAMP. *J. Cell Biol.* *183*, 297–311.

- 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., et al. (2004). Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* *563*, 87–92.
- Tsai, P.-S.J., Brewis, I.A., van Maaren, J., and Gadella, B.M. (2012). Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis. *PLoS One* *7*, e32603.
- Tsalkova, T., Mei, F.C., Li, S., Chepurny, O.G., Leech, C.A., Liu, T., Holz, G.G., Woods, V.L., and Cheng, X. (2012). Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18613–18618.
- Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 39253–39259.
- Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2006). Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* *119*, 2196–2203.
- Ueno, H., Shibasaki, T., Iwanaga, T., Takahashi, K., Yokoyama, Y., Liu, L.M., Yokoi, N., Ozaki, N., Matsukura, S., Yano, H., et al. (2001). Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. *Genomics* *78*, 91–98.
- Ulucan, C., Wang, X., Baljinnyam, E., Bai, Y., Okumura, S., Sato, M., Minamisawa, S., Hirotsu, S., and Ishikawa, Y. (2007). Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *293*, H1662–H1672.
- Vadnais, M.L., Aghajanian, H.K., Lin, A., and Gerton, G.L. (2013). Signaling in sperm: toward a molecular understanding of the acquisition of sperm motility in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* *89*, 127.
- Visconti, P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 667–668.
- Visconti, P., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornés, M., and Kopf, G.S. (1998). The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *J. Androl.* *19*, 242–248.
- Visconti, P.E., Muschietti, J.P., Flawia, M.M., and Tezon, J.G. (1990). Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* *1054*, 231–236.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* *121*, 1139–1150.
- Visconti, P.E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J.J., and Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* *13*, 395–405.

- Walensky, L.D., and Snyder, S.H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* *130*, 857–869.
- Ward, C.R., Faundes, D., and Foster, J.A. (1999). The monomeric GTP binding protein, rab3a, is associated with the acrosome in mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* *53*, 413–421.
- Wassarman, P.M., Gustave, O., and Place, L.L. (1999). Mammalian Fertilization : Molecular Aspects of Gamete Adhesion , Exocytosis , and Fusion. *96*, 175–183.
- Weitz, D., Ficek, N., Kremmer, E., Bauer, P.J., and Kaupp, U.B. (2002). Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* *36*, 881–889.
- Wertheimer, E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J.L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A.M., Levin, L.R., Buck, J., et al. (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* *288*, 35307–35320.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2008). Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 658–664.
- Wiederhold, K., and Fasshauer, D. (2009). Is assembly of the SNARE complex enough to fuel membrane fusion? *J. Biol. Chem.* *284*, 13143–13152.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U.B., and Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J. Cell Biol.* *142*, 473–484.
- Wing, M.R., Houston, D., Kelley, G.G., Der, C.J., Siderovski, D.P., and Harden, T.K. (2001). Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits. *J. Biol. Chem.* *276*, 48257–48261.
- Witte, T.S., and Schäfer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* *102*, 181–193.
- Xie, F., and Conti, M. (2004). Expression of the soluble adenylyl cyclase during rat spermatogenesis: evidence for cytoplasmic sites of cAMP production in germ cells. *Dev. Biol.* *265*, 196–206.
- Xie, F., Garcia, M.A., Carlson, A.E., Schuh, S.M., Babcock, D.F., Jaiswal, B.S., Gossen, J.A., Esposito, G., van Duin, M., and Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev. Biol.* *296*, 353–362.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, and J.D. Neill, eds. (Raven Press, New York: University of Sheffield Library), pp. 189–317.
- Yip, K.-P. (2006). Epac-mediated Ca²⁺ mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *291*, F882–F890.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., and Mayorga, L.S. (2000). Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol. Reprod.* *62*, 1084–1089.

Zanetti, N., and Mayorga, L.S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* *81*, 396–405.

Zarelli, V.E.P., Ruete, M.C., Roggero, C.M., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. (2009). PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis. *J. Biol. Chem.* *284*, 10491–10503.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107–117.



Universidad Nacional de Cuyo



"2005 - Año de homenaje a Antonio Berni"

MENDOZA, 31 de agosto de 2005

Señora
Dra. Claudia Nora TOMES
PRESENTE

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo ha analizado la documentación que presentada en relación al proyecto: **"TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA REACCIÓN ACROSÓMICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS"**.

Este Comité no encuentra objeción bioética para la realización del mismo.

Se sugiere que a los pacientes con muestras que presenten patología de número motilidad y/o morfología espermática se les recomiende la consulta médica especializada.

Saludo a usted atentamente.

Meg.

Prof. Dr. Ramón PIEZZI
Presidente Comité Bioética