Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudios sobre la presencia y expresión de cadherina epitelial en gametas humanas y murinas. Evidencias sobre su participación en el proceso de la fecundación

Veiga, María Florencia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Veiga, María Florencia. (2011). Estudios sobre la presencia y expresión de cadherina epitelial en gametas humanas y murinas. Evidencias sobre su participación en el proceso de la fecundación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Veiga, María Florencia. "Estudios sobre la presencia y expresión de cadherina epitelial en gametas humanas y murinas. Evidencias sobre su participación en el proceso de la fecundación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIOS SOBRE LA PRESENCIA Y EXPRESIÓN DE CADHERINA EPITELIAL EN GAMETAS HUMANAS Y MURINAS. EVIDENCIAS SOBRE SU PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO DE LA FECUNDACIÓN

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Veiga, María Florencia

Director de Tesis
Dra. Mónica Vazquez-Levin

Consejero de Estudios
Dr. Dante A Paz

Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET-UBA)

Buenos Aires, Febrero 2011

ESTUDIOS SOBRE LA PRESENCIA Y EXPRESIÓN DE CADHERINA EPITELIAL EN GAMETAS HUMANAS Y MURINAS. EVIDENCIAS SOBRE SU PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO DE LA FECUNDACIÓN

La **fecundación** involucra eventos de adhesión celular ovocito-espermatozoide dependientes de Ca^{2+}. **Cadherina epitelial** (cadE) es una glicoproteína de membrana de 120 KDa, con 5 dominios extracelulares, 1 transmembrana y 1 citoplasmático. CadE se asocia al citoesqueleto de actina a través de moléculas adaptadoras como β-catenina y está involucrada en la adhesión celular dependiente de Ca^{2+}. CadE participa en el desarrollo embrionario, la organogénesis y mantenimiento de tejidos y la tumorigénesis.

El objetivo de este proyecto fue evaluar la expresión de cadE en tejidos reproductivos, su presencia y localización en ovocitos y espermatozoides y su participación en la fecundación. Se emplearon 2 modelos: humano y murino.

Los estudios describen 1) la expresión del ARNm de cadE en testículo y epidídimo y 2) la presencia de la proteína en extractos de epidídimo y su localización en las células epiteliales 3) la presencia de cadE en estructuras membranosas del plasma seminal humano y del fluido epididimario murino 4) la presencia, formas proteicas y localización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides murinos epididimarios y humanos eyaculados 5) la localización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados 6) la localización de cadE en ovocitos y formas proteicas en ovocitos murinos 7) la capacidad de anticuerpos bloqueantes de la función adhesiva de cadE de inhibir la interacción espermatozoide-ovocito 8) la evaluación de la presencia de cadE en pacientes en tratamiento por infertilidad e identificación de alteraciones en algunos casos.

Este es el primer estudio que aborda de manera exhaustiva la detección de cadE en las gametas humanas y murinas y muestra evidencias de su rol en la fecundación.

***Palabras claves**: moléculas de adhesión, cadherina epitelial, humano, murino, testículo, epidídimo, ovocito, espermatozoide, capacitación, exocitosis acrosomal, fecundación.*

STUDIES ON THE PRESENCE AND EXPRESSION OF EPITHELIAL CADHERIN IN HUMAN AND MURINE GAMETES. EVIDENCE OF ITS PARTICIPATION IN FERTILIZATION

Fertilization involves Ca^{2+} dependent adhesion events between the oocyte and the spermatozoon. Epithelial cadherin (Ecad) is a 120 KDa glycoprotein organized in five extracellular domains, one transmembrane and one cytoplasmic domain. Ecad is linked to the actin cytoskeleton by adaptor molecules, such as β-catenin, and is involved in Ca^{2+}-dependent cell-cell adhesion. Among several functions, Ecad has been shown to participate in embryonic development, organogenesis and maintenance of tissues as well as in tumor progression and metastasis.

The aims of this project were to evaluate Ecad expression in reproductive tissues, its presence and localization in oocytes and spermatozoa and its participation in fertilization. Human and murine tissues and gametes were used throughout the study.

The studies have shown: 1) expression of Ecad mRNA in the testis and the epididymis 2) presence of the 120 KDa Ecad form in the epididymis mainly localized in the epithelial cells borders 3) immunodetection of Ecad in membranous vesicles isolated from human seminal plasma and murine epididymal fluid 4) presence and localization of Ecad, β-catenin and actin in murine epididymal spermatozoa and in ejaculated human sperm cells 5) a distinctive localization of Ecad in capacitated and acrosome-reacted spermatozoa 6) immunoreactivity towards Ecad in human oocytes and its protein forms in murine oocytes 7) the ability of specific antibodies towards Ecad to inhibit sperm-oocyte interaction 8) the assessment of Ecad in patients under infertility treatment and the identification of changes in some of them.

This is the first report that thoroughly characterizes the expression of Ecad in tissues of the male reproductive tract, as well as in gametes from mice and humans, and shows evidence of its participation in fertilization.

***Keywords**: adhesion molecules, epithelial cadherin, human, murine, testis, epididymis, oocyte, spermatozoon, capacitation, acrosomal exocytosis, fertilization.*

Dedicado a mis padres, Hilda y Rubén,
mis hermanos, Valeria y Sebastián
y a Santino.

Quisiera agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de estos años, que me aconsejaron, guiaron y acompañaron, entre ellas:

Al los directores del Instituto de Biología y Medicina Experimental, Dr. Eduardo Charreau, Dr. Alejandro De Nicola y Dra. Damasia Becu-Villallobos por brindarme el espacio para realizar el trabajo de tesis doctoral.

A mi directora, Dra. Mónica Vazquez-Levin por escuchar mis inquietudes, por la confianza que deposita en mí, por su ayuda e interés en la realización del trabajo de doctorado y por guiarme en mis inicios en la investigación.

A mi tutor Dr. Dante Paz por su atención, orientación y seguimiento en la realización del trabajo de Tesis Doctoral.

Al Dr. Alberto Valcarcel y su grupo de trabajo, por su ayuda en el seguimiento y búsqueda de material para realizar y completar parte del trabajo presentado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 248/271 (ex 226) los que pasaron: Cristian, Eze, Flor, Juli, Nico, Nieves, Mati y Marcela; y a los presentes: Laris, Sil, Mari, Clarisa y Mariano, por todo lo que me enseñaron en estos años, tanto a nivel laboral como personal.

A Paty y a los chicos del 217/215, los que están Agus, Débora, Gus, Juli, Juan y Marian; y los que ya emprendieron otro camino: Loli, Vanina y Petu.

A mis amigos del instituto: Adrián (Dr. Chucky), Cele, Ceci, Carli, Martín, Lucas, Lara, Sebas, Naty, Juan, Marta, Lilit, Marina, Vani, Mariel, Ani, Vale, Wendy, Mer, CeciFer, Chechu, Lucho, Inti, por los momentos compartidos y por ocuparse de Santi cuando lo necesité.

A mis padres por dejarme elegir, por ayudarme y acompañarme, porque solo yo conozco, valoro y estimo el esfuerzo que realizaron para darnos todo.

A mis hermanos y a toda mi familia, tíos y primos, a Sofía y Luis, por apoyarme cuando lo necesité; en especial a Sebastián y a Santino, por estos últimos años que compartieron conmigo.

Sin olvidarme de mis compañeros de estudio y amigos, entre ellos Andro, Celi, Mati, Sil, Goyo y Mica.

A todos ustedes, y a los que me olvido, una vez más, muchas gracias.

Abreviaturas

A: Acrosomal

A+PA: Acrosomal + Post-acrosomal

ADAM: del las siglas en inglés A Desintegrin And Metalloproteinase

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

ARN: Ácido ácido

ATP: Adenosín Trifosfato

BHT: Barrera Hemato-Testicular

BSA: Albúmina Sérica Bovina (del inglés Bovine Serum Albumin)

C: Capacitados

$[Ca^{2+}]_i$: Concentración de iones calcio intracelular

CD: Dominio citoplasmático (de sus siglas en inglés "cytoplasmic domain")

CEGyR: Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción

CIL: Compartimiento Intraluminal.

COCs: Complejos Ovocito *Cumulus*

CP: Cuerpo Polar

CS: Conductos Seminíferos

CY3: Cianina 3

D: Conducto Deferente

DAG: DiAcilGlicerol

DAB: Diaminobencidina

DE: Conductos Eferentes

DMSO: DiMetilSulfOxido

E: Tejido Epididimario Adulto

EA: Exocitosis Acrosomal

ECD: Dominio extracelular (de sus siglas en inglés "extracellular domain")

EE: Especializaciones Ectoplásmica

EEE: Endodermo Extra-embrionario

EEP: Error Estándar Promedio

EDTA: Acido Etilen-Diamino TetraAcético

EGTA: Acido Etilen-Glicol TetraAcético

EP: Epididimosomas

ESCA: Esterilidad Sin Causa Aparente

FCE: Fluidos del Cauda Epididimario

FIV: Fecundación *In Vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante (de sus siglas en inglés Follicle Stimulating Hormone)

GC: Gránulo cortical

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas (de sus siglas em inglés Gonadotropin Releasing Hormone)

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

H: Homogéneo

hCG: Gonadotrofina Coriónica humana (de sus siglas en inglés Human Chorionic Gonadotropin)

hFF: Fluido folicular humano (del inglés human Folicular Fluid)

HTF: de sus siglas en inglés Human Tubal Fluid

HSA: Albúmina Sérica Humana (de sus siglas en inglés Human Serum Albumin)

HSM: de sus siglas en ingles Human Sperm Medium

HZA: Ensayo de Hemizona (de sus siglas en inglés Hemi Zona Assay)

ICQ: Inmunocitoquímica

ICSI: Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide

IHQ: InmunoHistoQuímica

IFI: InmunoFluorescencia Indirecta

IgG: Inmunoglobulina G

IMET: Inmuno Microscopía Electrónica de Transmisión

IP: Intra Peritoneal

IP3: Inositol-3,4,5-trifosfato

IO: Ionóforo de Calcio

KDa: Kilo Dalton

mA: Miliamperios

MAE: Membrana Acrosomal Externa

MAI: Membrana Acrosomal Interna

MCI: Macizo Celular Interno

MDC: de sus siglas en inglés Metaloproteinase-like domain Desintegrin-like domain Cystein-rich domain

MP: Membrana Plasmática

MV: Microvellocidades

N: Negativo

NC: No Capacitados

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NSF: de sus siglas en inglés Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor

Nu: Núcleo

O: Orina

PA: Post-acrosomal

pb: Pares de Bases nucleotídicas

PBS: “Buffer” Salino Fosfato (del inglés Phosphate Buffer Saline)

PBS-D: “Buffer” salino fosfato Dulbecco

PBS-T: PBS Tween 20

PCE: Plasma de *Cauda* Epididimario

PCR: Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa

PI-PLC: Enzima Fosfolipasa C específica para inositol fosfato

PLC: Enzima Fosfolipasa C

PM: Peso Molecular

PMSG: de sus siglas en inglés Pregnant Mare Serum Gonadotropin

PN: Pronúcleos

PSA-FITC: *Pisum Sativum* “Agglutinin” marcada con isotiocianato de fluoresceína

PS: Plasma Seminal

PST: Plasma Seminal Total

PSU: Plasma Seminal Ultracentrifugado

R: Reaccionados

RT: *rete testis*

RT-PCR: ensayo de Retro-Transcripción de ARNm seguido de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

S: Suero

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio (del inglés Sodium Dodecyl Sulfate)

SE: Segmento Ecuatorial

SN: sobrenadante

SNAP: de sus siglas en inglés soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein

SNARE: de sus siglas en inglés soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors

SPA: Ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin Zona Pellucida (del inglés Sperm Penetration Assay)

TBS-T: TBS Tween20

TED: Trofoectodermo

TMD: Dominio transmembrana (de sus siglas en inglés "transmembrane domain")

UE: Unión Estrecha

V: Voltios

VG: Vesícula Germinal

vs: versus

WIB: Western ImmunoBlotting

ZP: *Zona Pellucida*

Índice

I. Resumen I

II. Dedicatoria III

III. Agradecimientos IV

IV. Abreviaturas VI

IV. Índice XI

1. Introducción 01

1.1 El aparato reproductor masculino 04
1.2 La espermatogénesis 10
1.3 El espermatozoide 13
1.4 Maduración espermática 20
1.5 Capacitación espermática 23
1.6 El acrosoma y la exocitosis acrosomal 27
1.7 Transporte espermático a través del tracto reproductor femenino 29
1.8 El tracto reproductor femenino 31
1.9 El complejo ovocito y células del *cumulus oophorus* (COC) 34
1.10 El proceso de la fecundación 41
1.11 Desarrollo embrionario temprano 50
1.12 Interacciones celulares 51
1.13 Moléculas de adhesión celular 53
1.14 Las cadherinas 55
1.15 Cadherina epitelial 58
1.16 Cadherina epitelial y neural y tejidos reproductivos 70

2. Objetivos 75

2.1 Objetivos generales 76
2.2 Objetivos particulares 77

3. Materiales y métodos 81

Parte I: Evaluación de la expresión y localización de cadE en espermatozoides y ovocitos humanos. Evaluación de su participación en la interacción de gametas. Análisis de su expresión en testículo y epidídimo humano 82

3.I.1 Reactivos generales 82
3.I.2 Anticuerpos 82
3.I.3 Medios de cultivo 84
3.I.4 Procedimientos de laboratorio 84
3.I.5 Muestras biológicas 85
3.I.6 Obtención de tejidos y gametas 85
3.I.7 Criopreservación de las muestras de semen 88
3.I.8 Caracterización de la secuencia codificante del transcripto de cadE epididimario empleando una biblioteca de expresión 89
3.I.9 Evaluación de los niveles de expresión del transcripto de cadE en testículo y epidídimo humano 91
3.I.10 Obtención de extractos proteicos 96
3.I.11 Extracción de proteínas de la membrana del espermatozoide 99
3.I.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes 100
3.I.13 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y "Western Immunoblotting" con anticuerpos específicos 101
3.I.14 Evaluación de la expresión y localización de cadE en cortes histológicos de epidídimo humano por inmunohistoquímica 102
3.I.15 Evaluación básica de las muestras de semen y obtención de la fracción enriquecida en espermatozoides mótiles 102
3.I.16 Capacitación espermática e inducción de la exocitosis acrosomal 106
3.I.17 Inmunolocalización de cadE y proteínas relacionadas en espermatozoides y ovocitos 107
3.I.18 Ensayos de interacción del espermatozoide con el ovocito 109
3.I.19 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas 114

3.I.20 Análisis estadístico 114

PartеII: Empleo del modelo murino para la evaluación de la expresión, localización y participación de cadE en la fecundación. Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios y evaluación de su expresión en el epidídimo 116

3.II.1 Reactivos generales 116
3.II.2 Anticuerpos 116
3.II.3 Medios de cultivo 117
3.II.4 Cepas de ratones y manejo de animales 117
3.II.5 Obtención de tejidos, fluidos y gametas 118
3.II.6 Obtención de ARN total de tejido testicular y epididimario 120
3.II.7 Obtención de extractos proteicos 122
3.II.8 Capacitación e inducción de la exocitosis acrosomal 123
3.II.9 Evaluación de la exocitosis acrosomal 124
3.II.10 Ensayos de inmunohistoquímica para localización de cadE en cortes histológicos de epidídimo 126
3.II.11 Ensayos de inmunolocalización de cadE en espermatozoides 126
3.II.12 Inmunolocalización de β-catenina y actina en espermatozoides 127
3.II.13 Localización ultraestructural de cadE en espermatozoides y vesículas del fluido del *cauda* epididimario 128
3.II.14 Inmunolocalización en ovocitos de ratón con y sin ZP 129
3.II.15 Ensayos de interacción ovocito-espermatozoide, fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario temprano 130
3.II.16 Análisis estadístico 135

4. Resultados 137

Parte I: Evaluación de la expresión, localización y función de cadE en espermatozoides y ovocitos humanos. Análisis de su expresión en testículo y epidídimo humano y presencia en

fluidos del tracto reproductor masculino. Estudios preliminares sobre muestras de semen de pacientes en consulta por infertilidad 138

4.I.1 Identificación de las formas de cadE, β-catenina y actina en extractos proteicos de espermatozoides mótiles del eyaculado 140
4.I.2 Ensayos de inmunolocalización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides mótiles del eyaculado 146
4.I.3 Inmunolocalización de cadE en espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación y en espermatozoides reaccionados 151
4.I.4 Expresión de cadE en tejidos del tracto reproductor masculino y detección de su presencia en tejidos y fluidos 155
4.I.5 Evaluación de la participación de cadE en el proceso de interacción de gametas 162
4.I.6 Evaluación de la presencia y localización de cadE en espermatozoides recuperados del semen de un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad 170
Parte A: Evaluación de muestras obtenidas a partir de semen fresco de pacientes con parámetros seminales normales o con alguna anormalidad 172

Parte B: Evaluación de un conjunto de muestras a partir de semen previamente congelado de pacientes diagnosticados con Esterilidad sin Causa Aparente (ESCA) 175

Parte II: Empleo del modelo murino para la evaluación de la expresión y localización de cadE en la gametas y su participación en la fecundación. Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios y evaluación de su expresión en el epidídimo 182

4.II.1 Identificación de formas proteicas e inmunolocalización de cadE y otros miembros del complejo adherente en espermatozoides del *cauda* epididimario murino no capacitados 183

4.II.2 Estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides del *cauda* epididimario capacitados y reaccionados 187
4.II.3 Estudios de inmunolocalización de β-catenina y actina en espermatozoides capacitados y reaccionados 191
4.II.4 Estudios de detección de actina filamentosa en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados 193
4.II.5 Estudios de localización de cadE en espermatozoides del *cauda* epididimario por inmunomicroscopía electrónica de transmisión 195
4.II.6 Evaluación de la expresión y localización de cadE en tejidos del tracto reproductor masculino 197
4.II.7 Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios de ratones adultos 200
4.II.8 Identificación de formas proteicas e inmunolocalización de cadE y otros miembros del complejo adherente en células del *cumulus oophorus* y en ovocitos maduros de ratón 205
4.II.9 Evaluación de la participación de cadE en eventos de interacción entre las gametas durante la fecundación 209
4.II.9.1 Evaluación de la capacidad del anticuerpo anti cadE H-108 de bloquear la adhesión célula-célula en modelos de embriones murinos en desarrollo 211
4.II.9.2 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de fecundación *in vitro* 212
4.II.9.3 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de interacción espermatozoide-ZP 214
4.II.9.4 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de interacción espermatozoide-ovocito sin ZP 218

5. Discusión 227

6. Apéndices 260

7. Bibliografía 282

Introducción

El éxito de la continuidad de las especies reside en su capacidad de reproducirse y de desarrollarse; de ahí que una de las principales características de los organismos vivos es su habilidad para reproducirse. Existen diversos mecanismos por los cuales una especie puede asegurar su descendencia, una de ellas es la reproducción sexual.

De las aproximadamente 14 millones de especies que habitan en la tierra, alrededor del 99% de ellas se reproduce sexualmente (Litscher *et al*, 2009). La reproducción sexual ocurre a través de la fecundación, proceso durante el cual dos células haploides se unen para formar un individuo genéticamente distinto; por lo tanto muchos aspectos del proceso de la fecundación en mamíferos se encuentran en constante revisión.

Por más de tres décadas, numerosos estudios han abordado la identificación de las moléculas que participan en los eventos del proceso de interacción de gametas. Los estudios se han realizado en diversos modelos con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares, biológicos y funcionales por los cuales dos células diferentes llevan a la formación de un individuo capaz de crecer y desarrollarse, de manera tal de reproducirse y perpetuar la especie.

Los avances en el conocimiento del proceso de fecundación han sido importantes desde diversas perspectivas. Cada una de las etapas que conducen a la fecundación ha sido estudiada exhaustivamente en el modelo de ratón y, en menor grado, en otros mamíferos incluyendo al hombre. La posibilidad de introducir genes en el genoma del ratón (transgenesis) o de anular la expresión de determinados genes ("knock-out") hace que el modelo de ratón sea de gran utilidad en el estudio de proteínas y mecanismos involucrados en el proceso de fecundación.

Por su parte, el uso de gametas humanas para estudiar los eventos de este proceso anticipa el acceso de información altamente relevante en la comprensión de los mecanismos. La identificación y caracterización de las moléculas que participan en el proceso de fecundación así como la comprensión de los mecanismos que regulan su expresión y funciones pueden contribuir no solo a comprender los mecanismos involucrados en la interacción

espermatozoide-ovocito sino también al desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos, así como también métodos de diagnóstico y tratamiento para la infertilidad humana.

El conocimiento exhaustivo de los mecanismos asociados a la funcionalidad del espermatozoide y el ovocito y a los eventos relacionados al proceso de interacción de las gametas ha permitido el desarrollo de las técnicas de fecundación asistida para el tratamiento de la infertilidad. La implementación de estas metodologías ha permitido, a su vez, estudiar algunos aspectos del proceso de interacción ovocito-espermatozoide al acceder, aunque en forma limitada, a las gametas humanas femenina y masculina. Conjuntamente, estas metodologías han permitido evaluar etapas tempranas del desarrollo embrionario; teniendo en cuenta que las células del zigoto tienen la propiedad de ser totipotentes con la posibilidad de dar origen a todos los tipos celulares, el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales se inicia el desarrollo embrionario, podría ser esencial para aplicar estos procesos en un contexto terapéutico, como por ejemplo la utilización de "stem cells" o células madre.

De todas maneras, los avances alcanzados todavía dejan numerosos desafíos en la comprensión de los procesos y han impuesto la necesidad de seguir investigando para lograr un mayor conocimiento de los procesos moleculares involucrados.

1.1 El aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino se compone de los testículos que producen las gametas, los ductos eferentes, los epididimarios, los deferentes y los eyaculatorios por los cuales los espermatozoides transitan y se modifican estructural y funcionalmente. Conjuntamente, se identifican las glándulas anexas como la vesícula seminal, la próstata y las glándulas bulbouretrales que asisten a la formación del líquido seminal y proveen componentes que contribuyen a la funcionalidad de la gameta masculina (**Figura 1**).

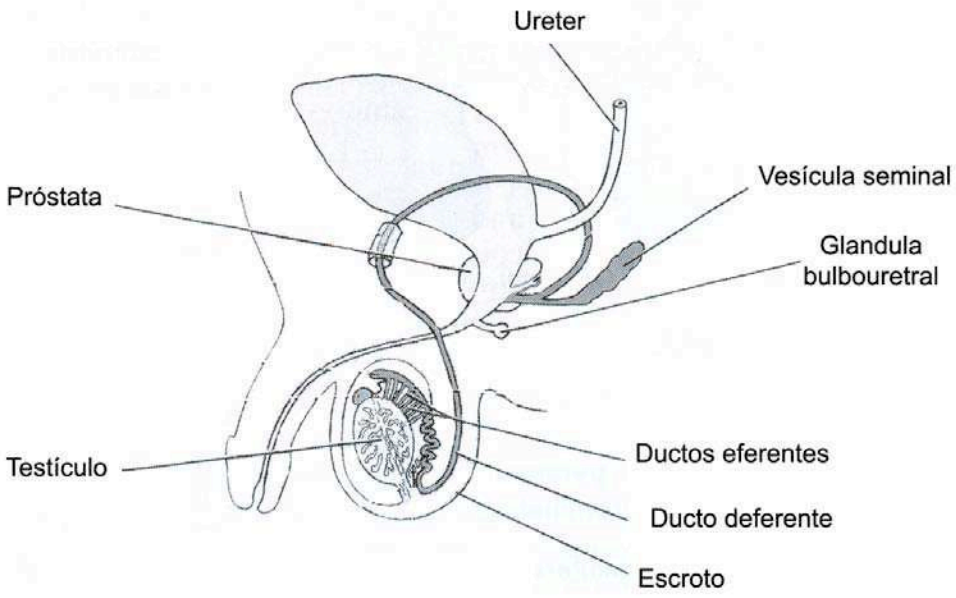


Figura 1: Representación esquemática del tracto reproductor masculino. La imagen muestra el escroto conteniendo al testículo. La gonada vuelca su contenido al epidídimo a través de los ductos eferentes. Los espermatozoides salen de éste por el ducto deferente. Las glándulas anexas como la vesícula seminal, la próstata y la glándula bulbouretral, contribuyen en la formación del fluido seminal (modificado de Lewis & Kaplan, 2009).

La gonada masculina, el testículo, en mamíferos es del tipo tubular y está recubierta por la túnica albugínea que envuelve la red tubular (**Figura 2**).

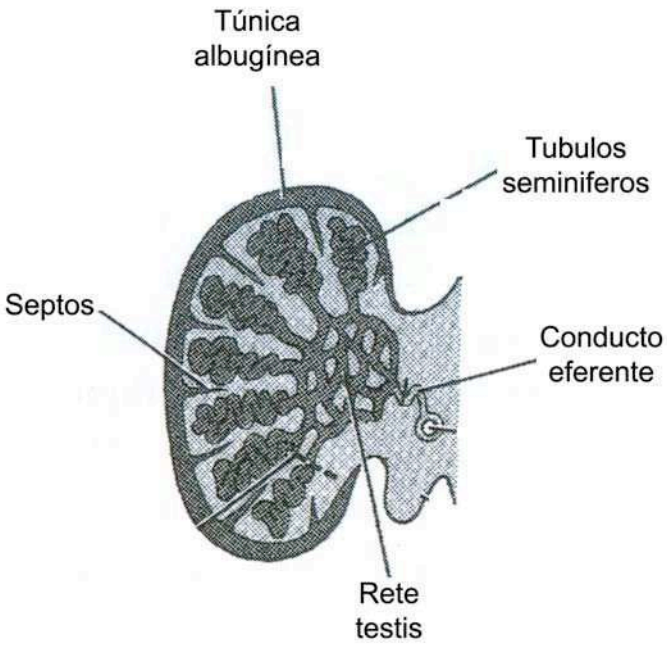


Figura 2: Representación esquemática del testículo humano, mostrando la túnica albugínea y los túbulos seminíferos separados por los septos (modificado de Lewis & Kaplan, 2009).

En los túbulos seminíferos ocurre la espermatogénesis o formación de las gametas masculinas, los espermatozoides. En el compartimiento intersticial del testículo mamífero, entre los túbulos, se encuentran las células de Leydig, productoras de testosterona. Las células de Leydig son importantes para la diferenciación del sexo gonadal y fenotípico y para mantener los caracteres sexuales secundarios (**Figura 3**).

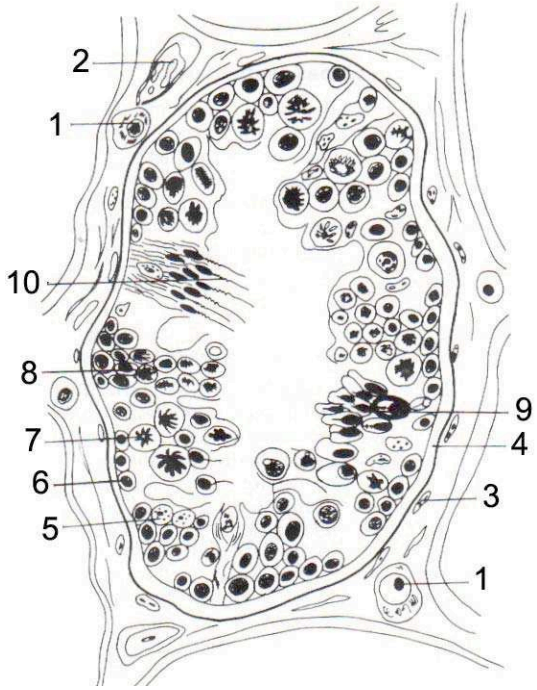


Figura 3: Representación esquemática del túbulo seminífero: 1-célula de Leydig; 2-capilar; 3-célula parenquimatosa de la túnica propia; 4-membrana basal; 5-célula de Sertoli; 6-espermatogonias; 7-espermatogonia en mitosis; 8-espermatocitos; 9-espermátides en diferentes grados de evolución (diferenciación progresiva del flagelo); 10-grupos de espermatozoides que son liberados hacia la luz tubular (modificado de Monsey & Arrondo, 1994).

La estructura tubular establece un compartimiento en donde la espermatogénesis es regulada por las células de Sertoli. El soporte físico, nutricional y hormonal de los espermatozoides durante su formación está dado por estas células, que se encuentran rodeando las paredes internas de todo el túbulo. Las células se mantienen unidas por uniones estrechas conformando la barrera hemato-testicular (Fawcett & Dym, 1974) que le confiere a la luz del túbulo características únicas, dado que sólo permite el pasaje de las células germinales y los productos de secreción de las células de Sertoli (**Figura 4**).

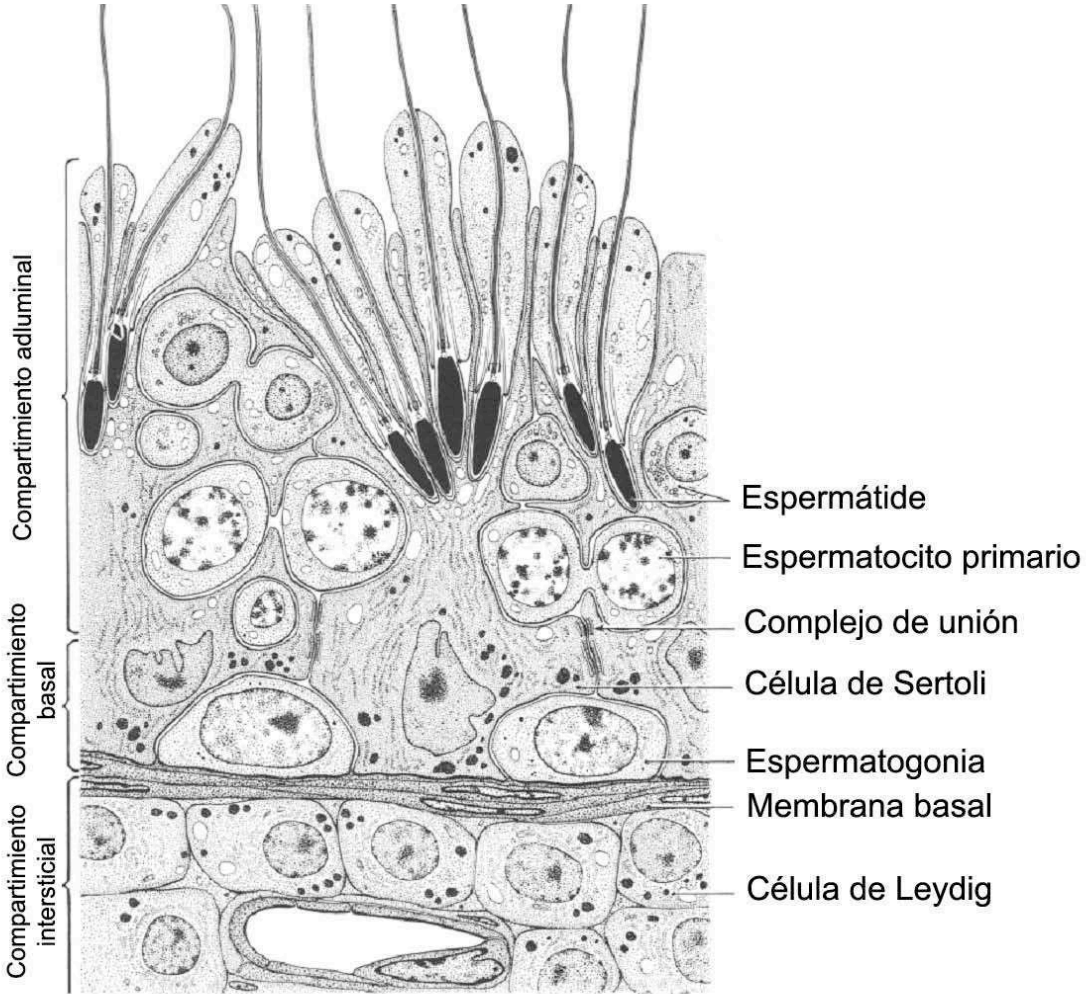


Figura 4: Sección de un túbulo seminífero que ilustra los compartimientos presentes en el testículo (intersticial, basal y adluminal) y las células que los componen. La formación de espermatozoides comienza cerca de la membrana basal cuando una espermatogonia sufre una serie de divisiones mitóticas y finalmente da un espermatocito primario. El espermatocito primario se mueve desde el compartimiento basal hacia el adluminal, donde eventualmente sufre una primera división meiótica y da un espermatocito secundario, que sufre una segunda división meiótica para dar una espermátide. Toda la línea germinal se encuentra en contacto con las células de Sertoli (modificado de Amann & Schanbacher, 1983).

El testículo vuelca su contenido al epidídimo a través de una red de vasos conectores, llamada *rete testi*. Esta confluye en un conducto único que es el conducto eferente, sale del testículo y se pone en contacto con una estructura tubular altamente plegada, el epidídimo, donde los espermatozoides maduran y son almacenados. El epidídimo confluye en el conducto deferente por el cual salen los espermatozoides maduros hacia la uretra (**Figura 2**, **Figura 5**).

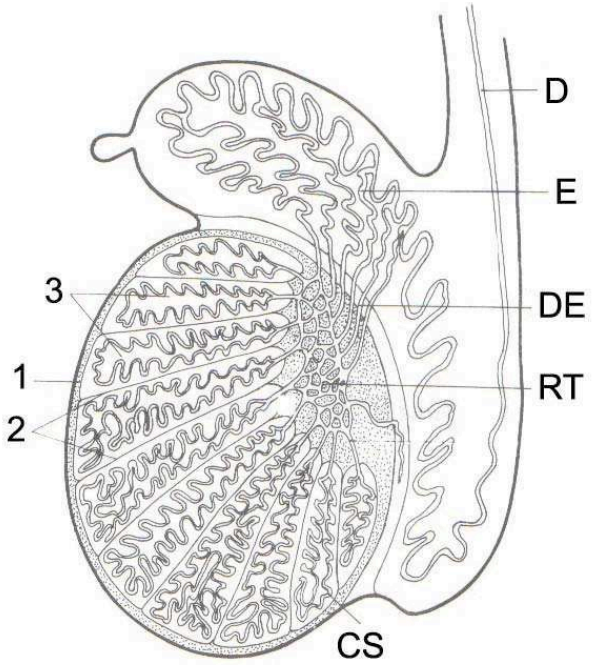


Figura 5: Esquema del testículo y de los ductos. 1-túnica albugínea; 2-tabiques de la albugínea; 3-lobulillo testicular. Donde: **CS**: conductos seminíferos; **RT**: *rete testis*; **DE**: conductos eferentes; **E**: epidídimo; **D**: conducto deferente (tomado de Monsey & Arrondo, 1994).

El epidídimo se divide en tres regiones que difieren en su estructura y funciones, en las que los espermatozoides maduran fisiológica y funcionalmente. La región más cercana al testículo o *caput*, la región media o cuerpo o *corpus*, y la porción caudal o *cauda* epididimario (**Figura 6**):

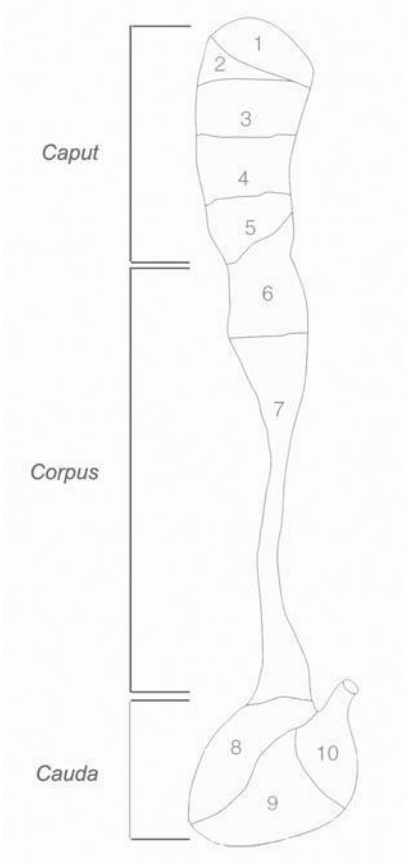


Figura 6: Dibujo que ilustra las regiones del epidídimo en el modelo murino. El epidídimo puede dividirse en 3 regiones: *caput*, *corpus* y *cauda* (modificado de Turner, 2009).

Una de las funciones del epidídimo es transportar los espermatozoides desde el testículo al vaso deferente. El fluido conteniendo los espermatozoides se desplaza rápidamente en la región proximal del epidídimo en donde el líquido es menos viscoso y lentamente en la región distal en donde aumenta su viscosidad. La velocidad de flujo es importante debido a que ello influencia la concentración final de las moléculas absorbidas o secretadas por el epitelio epididimario (Turner *et al*, 1990). La presión hidrostática del fluido proveniente del testículo y las contracciones peristálticas del epidídimo proveen la fuerza necesaria para el transporte del fluido (Robaire & Fan, 1998). Las células del epitelio epididimario producen un aumento en la concentración espermática y en la viscosidad del fluido hacia el final del epidídimo mediante la reabsorción de agua (Wong *et al*, 1978). El epidídimo también almacena a los espermatozoides durante un tiempo. El 55-65% de los espermatozoides epididimarios son

retenidos en la región distal del *cauda* en la mayoría de las especies (Amann, 1981).

El epitelio epididimario, entre otras proteínas, expresa defensinas (Yamaguchi *et al*, 2002), mas de 40 tipos de β-defensinas se identificaron en el epidídimo de la rata (Patil *et al*, 2005; Hall *et al*, 2007) y algunas de ellas mostraron expresión específica de segmento epididimario (*caput*, *corpus* o *cauda*) (Jelinsky *et al*, 2007; Johnston *et al*, 2007). Las defensinas producidas por las células del epitelio epididimario participan en la protección frente a infecciones de patógenos mediando la respuesta inmune innata (revisado en Hall *et al*, 2007; Lin *et al*, 2008), también participan en procesos no inmunológicos como la maduración espermática en el epidídimo (Zhou *et al*, 2004) y la capacitación (Yudin *et al*, 2003). Por último, el epidídimo provee a los espermatozoides el ambiente adecuado para la maduración (ver más adelante).

1.2 La espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular por el cual una célula madre espermatogénica o espermatogonia es capaz de generar espermatozoides, a través de una serie de divisiones mitóticas (fase proliferativa), una división meiótica (fase meiótica) y numerosas transformaciones citológicas (fase acrosomal, fase de elongación y condensación nuclear y fase de eliminación citoplasmática y liberación de los túbulos).

Las espermatogonias están situadas en la base de los túbulos seminíferos y progresan hacia la luz a medida que sufren una serie de divisiones mitóticas sucesivas denominándose espermatogonias A_0, A_1, A_2, A_3, Intermedias, B_1 y B_2. Una vez alcanzada la etapa de espermatogonia B_2, comienzan a experimentar las primeras fases de la división meiótica de la profase: etapas de preleptotene hasta paquitene. En estos estadios se denomina espermatocito primario. Los siguientes pasos de la primera división meiótica se completan más rápidamente y el espermatocito primario se convierte en espermatocito secundario, pasando a ocupar un lugar intermedio entre las células de Sertoli hacia la luz del túbulo. Como producto de la segunda división meiótica se

identifican las espermátides, que inicialmente son redondas, pero luego de sufrir una serie de transformaciones citológicas se convierten en espermátides elongadas (con estructura de cabeza y cola pero unidas entre sí por restos citoplasmáticos), ocupando la última capa celular hacia la luz del túbulo (**Figura 7**). Una vez completa la meiosis, el espermatozoide condensa su cromatina y conjuntamente con este evento cesan los procesos de transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN).

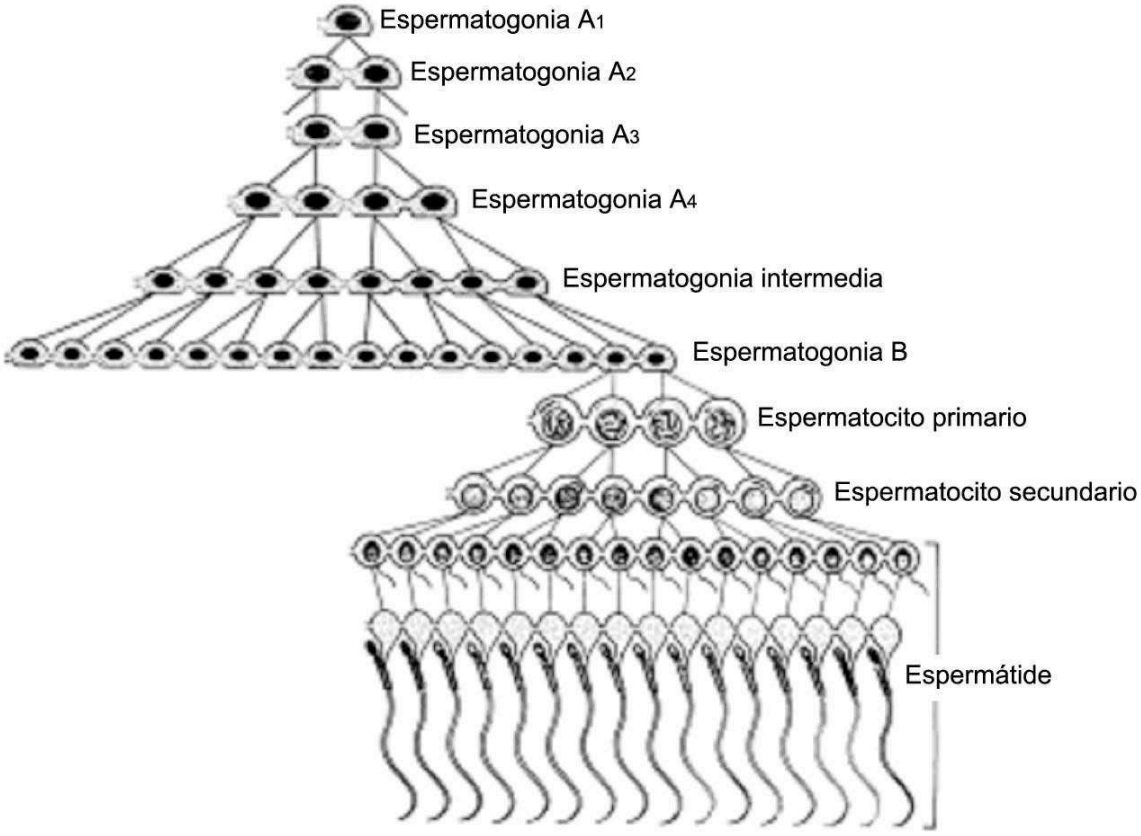


Figura 7: Representación esquemática de la espermatogénesis. La imagen muestra los distintos tipos celulares conectados por puentes citoplasmáticos (modificado de Dym & Fawcett, 1971).

El proceso siguiente se denomina espermiogénesis y consiste en la conversión de una espermátide elongada a partir de una espermátide redonda, luego de sufrir una serie de transformaciones celulares. Estos cambios madurativos se encuentran bajo el control de eventos no genómicos. Las transformaciones ocurren en cuatro fases (Galli & Lazzari, 2008): 1) la de Golgi, donde se forma un gránulo acrosomal asociado a la membrana nuclear; 2) la de

capuchón, donde se forma el capuchón acrosomal sobre la cabeza; 3) la de acrosoma, donde ocurre la condensación, elongación y formación del acrosoma y, finalmente, 4) la fase de maduración, donde se culmina la formación del flagelo, el cuello y la condensación nuclear. Completados estos procesos, el espermatozoide ha adquirido casi por completo su estructura final y es liberado por el epitelio seminífero (**Figura 8**).

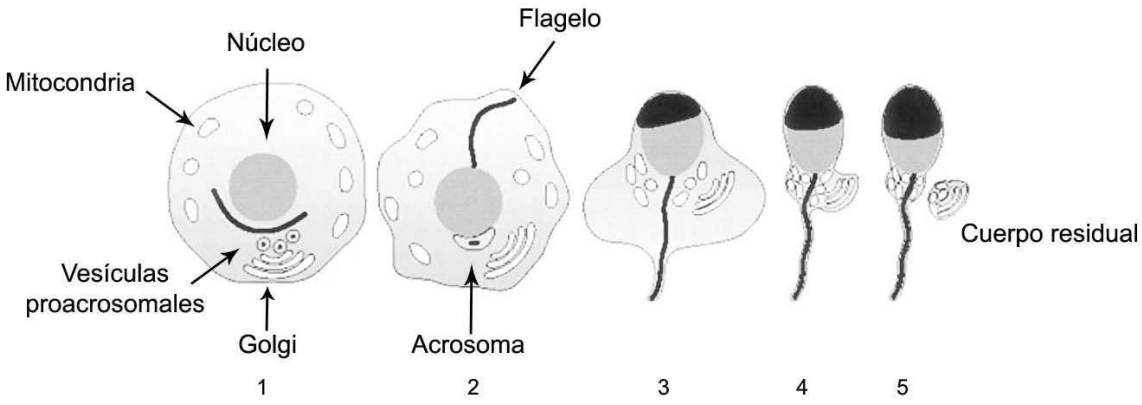


Figura 8: Diagrama que ilustra la espermiogénesis. Las espermátides redondas poseen el núcleo redondo, un gran complejo de Golgi y muchas vesículas proacrosomales. El flagelo ha comenzado a diferenciarse y se localiza cerca del complejo de Golgi (1). Las vesículas proacrosomales se fusionan unas con otras formando la vesícula acrosomal que se localiza sobre el núcleo y comienza a crecer debido a la fusión de vesículas provenientes del aparato de Golgi. El flagelo se mueve al sitio opuesto al acrosoma, cerca del núcleo (2). Luego el complejo acrosoma-núcleo invierte su posición y se acerca a la membrana plasmática (3). El aparato de Golgi y otras organelas son descartadas en un cuerpo residual (4 y 5). Algunas mitocondrias se mueven hacia el flagelo y otras son descartadas en el cuerpo residual (4 y 5). El espermatozoide alcanza su forma final (5) y es liberado al lumen del túbulo seminífero (Modificado de Ramalho-Santos *et al* 2002).

Durante la espermatogénesis, tanto las uniones adherentes como las estrechas sufren cambios importantes de re-estructuración que permiten a las células germinales moverse desde la membrana basal hacia la luz del epitelio seminífero, hasta la liberación de los espermatozoides sin perder la impermeabilidad de la barrera hemato-testicular. Estas uniones célula-célula son además importantes para la nutrición y el desarrollo de las células germinales. Las uniones adherentes están representadas por las “especializaciones ectoplásmicas”, específicas de testículo, que se encuentran entre células de Sertoli en la región basal y entre células de Sertoli y germinales en la región apical (**Figura 9**).

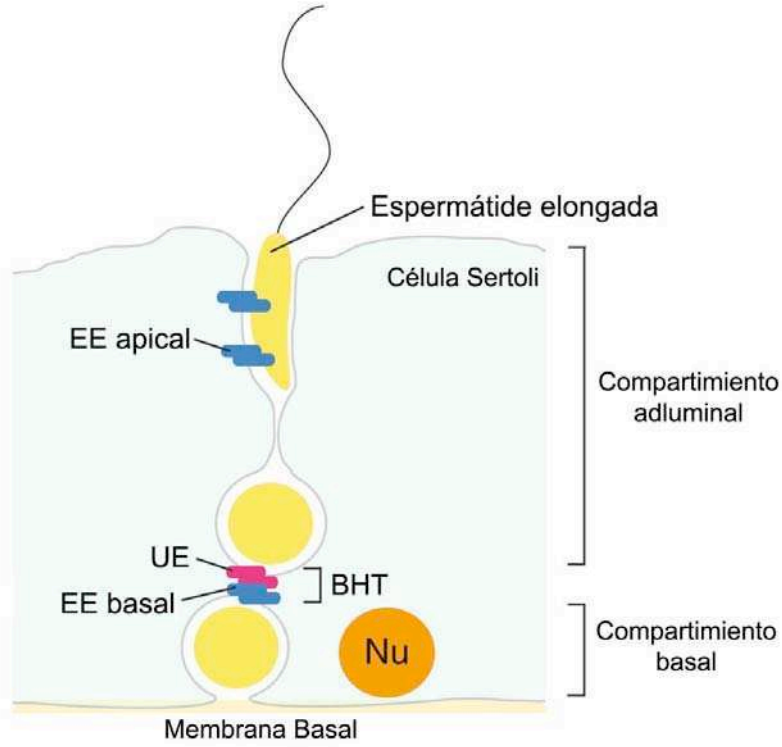


Figura 9: Representación esquemática de las Especializaciones Ectoplásmicas (EE) en el testículo mamífero. Se las puede observar en la región apical, entre la célula de Sertoli y la célula germinal así como en la región basal, entre células de Sertoli, que junto con las uniones estrechas conforman la barrera hemato testicular. **EE**: Especializaciones Ectoplásmica Apical/Basal; **UE**: Unión Estrecha; **BHT**: Barrera Hemato-Testicular; **Nu**: Núcleo (modificado de Wong & Cheng, 2009).

Aparentemente existe un mecanismo por el cual actúan diversas proteínas de cada tipo de unión (*uniones adherentes*: cadherina neural, β-catenina, integrina β_1, nectina; *uniones estrechas*: ocludina y zona "occludens"-1) para permitir el movimiento celular sin perder la adhesión completamente, (Xia *et al*, 2005), que le otorgan polaridad al movimiento de las células germinales y que estaría regulada por andrógenos (Zhang *et al*, 2005).

1.3 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada y polarizada, que se forma de manera continua en el epitelio seminífero del testículo durante la espermatogénesis. En el espermatozoide de mamíferos se pueden distinguir la cabeza, involucrada en la interacción con el ovocito, la pieza media, que

participa en la producción de energía, ya que aquí se localizan las mitocondrias y el flagelo, responsable de la motilidad (**Figura 10**).

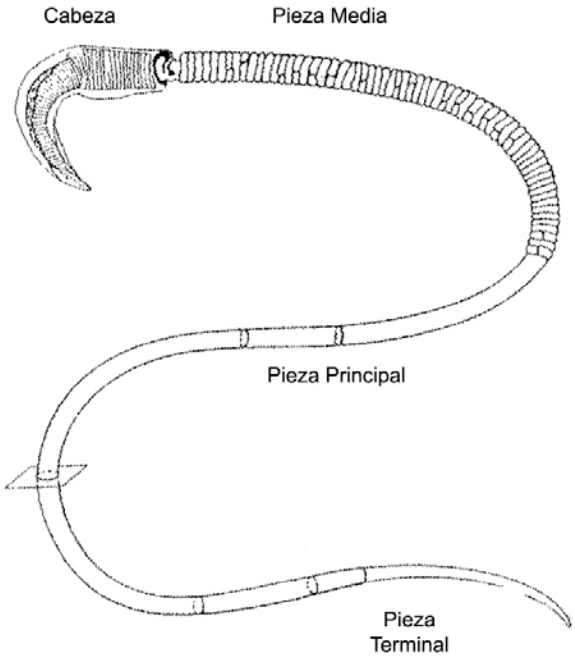


Figura 10: Características generales del espermatozoide de mamíferos. La cabeza del espermatozoide se encuentra unida a la pieza conectora del flagelo. Las otras regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Extraído de Eddy & O`Brien, 1994).

La **cabeza** del espermatozoide mamífero contiene el *núcleo* y el *acrosoma*, rodeado por componentes del *citoesqueleto*. Si bien la organización básica de la cabeza es similar en diferentes especies de mamíferos, existe una gran variedad de formas y tamaños entre las mismas. Existe dos grandes grupos de formas espermáticas, con forma de paleta (humano, bovino, equino, cobayo) o falciformes, como es en el caso de la mayoría de los roedores (rata, ratón, hámster) (**Figura 11**).

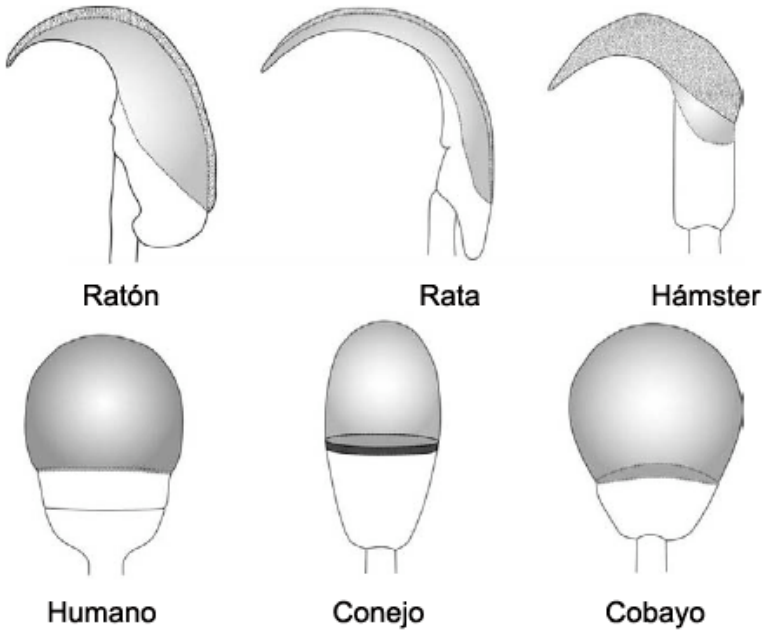


Figura 11: Variantes morfológicas de espermatozoides en mamíferos: formas falciformes (ratón, rata y hámster), formas de paleta (humano, conejo y cobayo) (Tomado de Eddy & O`Brien, 1994).

En las variantes morfológicas identificadas, la membrana plasmática se divide en regiones o dominios. La cabeza se divide en dos regiones principales, la región acrosomal y la región post-acrosomal. La región acrosomal está localizada en la región más anterior y tiene dos dominios, el acrosoma (dominio anterior) y el dominio posterior al acrosoma (segmento ecuatorial) (**Figura 12**).

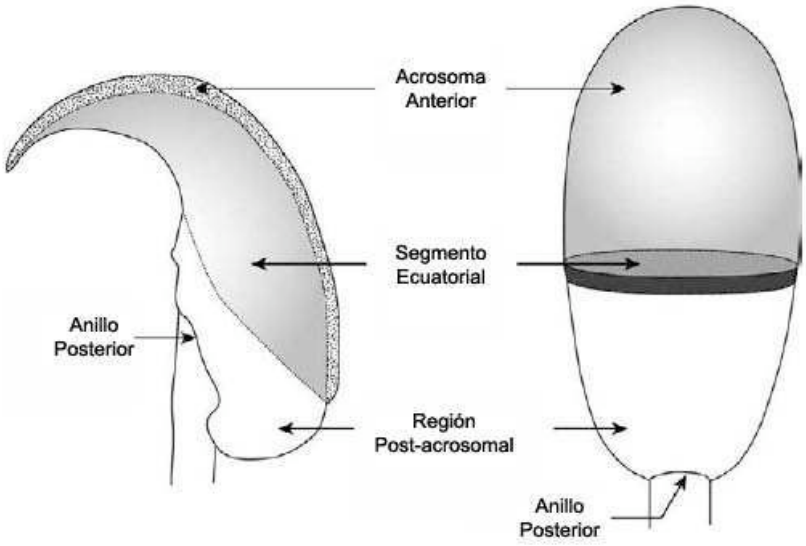


Figura 12: Representación esquemática de las variantes morfológicas y sus regiones y dominio de membrana. La imagen muestra las dos regiones principales (región acrosomal y región post-acrosomal) y los dominios de membrana en la región acrosomal (acrosoma y segmento ecuatorial) en espermatozoides que difieren en su morfología (modificado de Eddy & O`Brien, 1994).

El **acrosoma** es un gránulo secretorio especializado que ocupa la parte anterior de la cabeza rodeando al núcleo. Esta organela se encuentra presente en los espermatozoides de todos los mamíferos y presenta variaciones importantes en la forma y tamaño, de manera similar a lo expresado previamente para la morfología espermática entre las distintas especies (**Figura 12**). La membrana que envuelve al acrosoma se diferencia en: membrana acrosomal externa (MAE), que se encuentra debajo de la membrana plasmática (MP), y la membrana acrosomal interna (MAI), sobre la membrana nuclear. Ambas membranas, a pesar de ser continuas, poseen diferentes características debido a un proceso de diferenciación posterior a la formación del acrosoma (**Figura 13**).

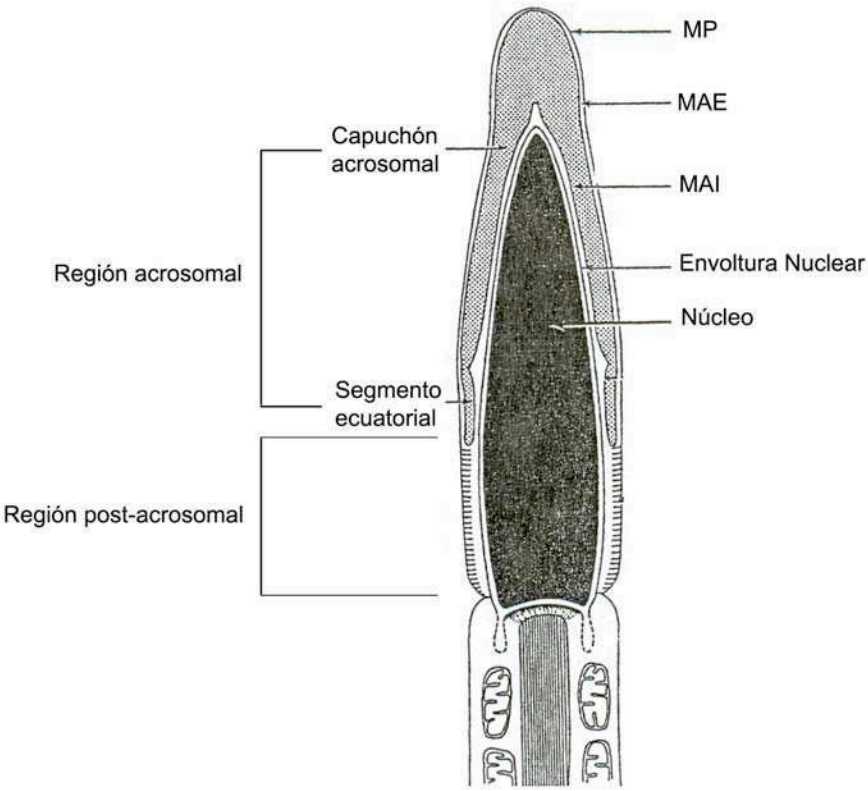


Figura 13: Corte sagital de la cabeza espermática donde se visualizan la región del acrosoma y la región post-acrosomal; donde **MP**: membrana plasmática, **MAE**: membrana acrosomal externa, **MAI**: membrana acrosomal interna (modificado de Yanagimachi, 1994).

Debajo del acrosoma se encuentra el **núcleo**, que es haploide y posee una cromatina altamente condensada. Las principales proteínas asociadas al ADN espermático son las protaminas, son proteínas pequeñas ricas en arginina y cisteína. Los ARNm que codifican para las protaminas en ratón son sintetizados en el estadío de espermátide. El complejo protamina-ADN se estabiliza por la formación de puentes disulfuro entre las protaminas (Eddy & O´Brien, 1994).

El **citoesqueleto** se localiza en tres regiones de la cabeza del espermatozoide: el citoesqueleto subacrosomal, localizado entre el acrosoma y el núcleo; el citoesqueleto post-acrosomal ubicado entre la envoltura nuclear y la MP de la región post-acrosomal; y el citoesqueleto para-acrosomal, entre el acrosoma y la membrana plasmática (**Figura 14**). La función del citoesqueleto es estabilizar la forma falciforme de espermatozoides en roedores, así como también proveer fortaleza y apoyo a la parte posterior de la cabeza para prevenir

que se flexione cuando se mueve y mantener estable la asociación entre el acrosoma, el núcleo y la membrana plasmática de la región post-acrosomal (Eddy & O´Brien, 1994).

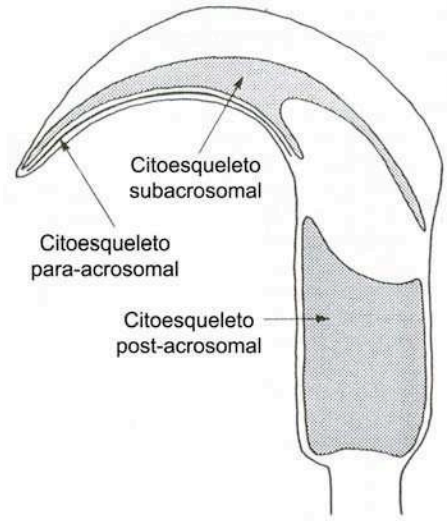


Figura 14: El citoesqueleto en el espermatozoide. En la imagen se muestran las tres regiones de localización del citoesqueleto en la cabeza del espermatozoide (modificado de Eddy & O´Brien, 1994).

El **flagelo** o **cola** del espermatozoide provee la motilidad necesaria para que la gameta masculina llegue hasta el ovocito y penetre sus envolturas. En esta estructura se pueden distinguir cuatro segmentos: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal o final. La pieza conectora une el aparato motriz del flagelo con el núcleo. En el centro del flagelo, desde la pieza conectora a la final, se encuentra el axonema, que consiste en un complejo de microtúbulos altamente ordenado y rodeado por fibras densas. En la pieza media, por fuera de las fibras densas, se dispone la vaina mitocondrial, responsable de la generación de energía (Eddy & O`Brien, 1994). La región de la pieza media se compone de un axonema rodeado por nueve fibras densas y un anillo mitocondrial. La pieza principal consiste en el axonema rodeado de siete fibras densas y una vaina fibrosa que reemplaza el anillo mitocondrial, mientras que el segmento terminal solo consiste de un residuo del axonema (Toshimori, 2003) (**Figura 15**):

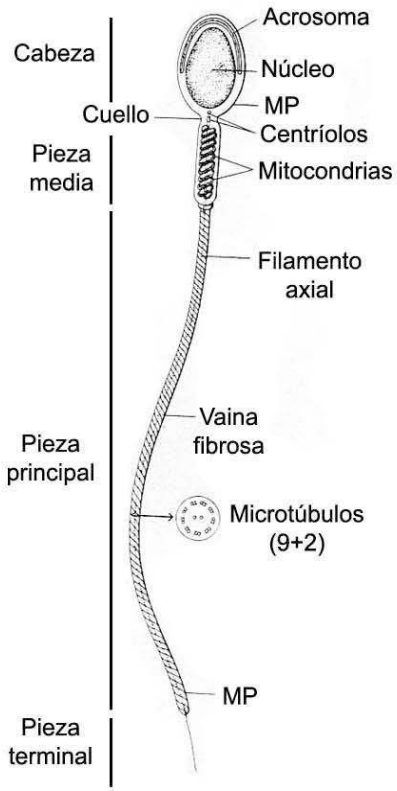


Figura 15: Regiones del flagelo espermático. En la imagen se muestra la pieza conectora o cuello, pieza media, la pieza principal y pieza terminal del flagelo del espermatozoide (modificado de http://rdh2010.blogspot.com/).

Los espermatozoides mamíferos se diferencian de otras células haploides por su incapacidad de sintetizar proteínas *de novo* posttesticularmente, ya que la cromatina nuclear de la espermátide es gradualmente condensada a medida que progresa la espermatogénesis. Los espermatozoides se liberan de las células del epitelio germinal solo con un citoplasma residual. Los espermatozoides presentes en el testículo y la región proximal del epidídimo son inmótiles o presentan motilidad no progresiva y no pueden fecundar al ovocito; en contraste, solo aquellos que se encuentran en la región del *cauda* epididimario presentan motilidad progresiva y con capacidad de interactuar con el ovocito (Toshimori, 2003). Dichas características se adquieren durante la **maduración espermática** que ocurre durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo.

1.4 Maduración espermática

El proceso de maduración espermática es un conjunto de cambios morfológicos, bioquímicos y metabólicos que sufre el espermatozoide a través de su paso por el epidídimo; en este proceso, se identifican numerosos cambios en la gameta, entre los que se destacan la adquisición de la motilidad progresiva y la capacidad fecundante (Cooper *et al*, 1986). Si bien algunos estudios sugieren que el *caput* epididimario secreta los componentes necesarios para la maduración espermática, los cambios asociados a este proceso se hacen evidentes en los espermatozoides que han alcanzado la región del *corpus* y *cauda* proximal (Yanagimachi, 1994).

Entre las modificaciones que tienen lugar durante la maduración se encuentran los cambios en la composición fosfolipídica de la membrana plasmática y en la proporción colesterol/fosfolípidos, el aumento de puentes disulfuro y de carga negativa neta en la superficie espermática, la relocalización de antígenos de superficie, y la modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie (Yanagimachi, 1994; Jones *et al*, 2007; Cornwall, 2009).

Los cambios que ocurren durante la maduración resultan, en parte, de la modificación de ciertas proteínas espermáticas por diversos mecanismos (Blobel, 2000; Yoshinaga & Toshimori, 2003) así como por la asociación al espermatozoide de proteínas secretadas por el epitelio del epidídimo bajo estimulación androgénica (Kirchhoff *et al*, 1998). Numerosas evidencias sugieren que la composición del compartimiento intraluminal varía de una región a otra del epidídimo, como lo reflejan los cambios en el patrón de expresión génica de las células del epitelio epididimario. En consecuencia, durante el tránsito epididimario, el espermatozoide va sufriendo una serie de cambios bioquímicos que conducen a la maduración del mismo (Cornwall & Hann, 1995; Aitken *et al*, 2007; Takano & Abe, 2004; Jones *et al*, 2007).

Las proteínas que se unen al espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo pueden ser proteínas secretorias solubles, liberadas al espacio intraluminal por el epitelio epididimario. Dichas proteínas, denominadas proteínas periféricas, se unen a la membrana del espermatozoide mediante interacciones

hidroestáticas (Rifkin & Olson, 1985). Algunas de estas proteínas podrían asociarse a la superficie espermática y prevenir su activación prematura mientras otras podrían actuar en eventos posteriores de reconocimiento e interacción con el ovocito.

También se ha detectado otro tipo de proteínas presentes en el lumen epididimario e incorporadas por el espermatozoide. Dichas proteínas presentan un comportamiento de proteína integral de membrana cuando son sometidas a diferentes tratamientos bioquímicos y no poseen péptido señal característico de las proteínas de secreción (Saez *et al*, 2003). Los mecanismos por los cuales las proteínas se integrarían a la membrana están aun en evaluación.

Uno de los mecanismos propuestos para su incorporación involucra vesículas llamadas epididimosomas. Los epididimosomas fueron descritos en la rata (Fornés & De Rosas, 1991), en el hámster (Yanagimachi *et al*, 1985) y en de toro (Frenette & Sullivan, 2001). Los epididimosomas son partículas de membrana proteica multilaminar con composición lipídica inusual, que tienen un diámetro de 50 a 500 nm (Saez *et al*, 2003, Sullivan *et al*, 2007) (**Figura 16**):

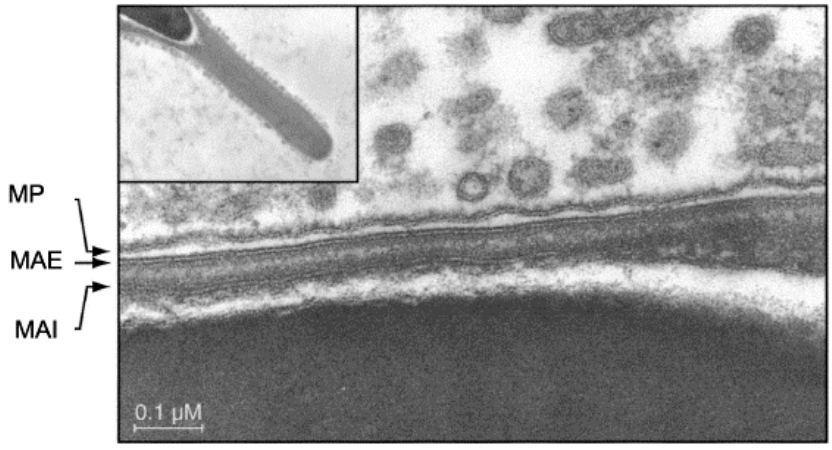


Figura 16: Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se observan epididimosomas de hámster rodeando la membrana plasmática del espermatozoide (tomado de Yanagimachi *et al*, 1985) donde **MP**: membrana plasmática, **MAE**: membrana acrosomal externa y **MAI**: membrana acrosomal interna.

El mecanismo de secreción de estas vesículas al lumen epididimario sería de tipo apócrino; como parte de este proceso, se forman protrusiones en la

membrana apical de las células principales del epidídimo, estas protrusiones contienen en su interior vesículas del citoplasma de estas células, de diversos tamaños. Una vez liberadas las protrusiones, se fragmentan y se liberan las vesículas al lumen del epidídimo (Aumuller *et al*, 1999; Cornwall, 2009). Se ha observado que las mismas contienen algunas organelas del citoplasma y vesículas membranosas (Hermo & Jacks, 2002) (**Figura 17**).

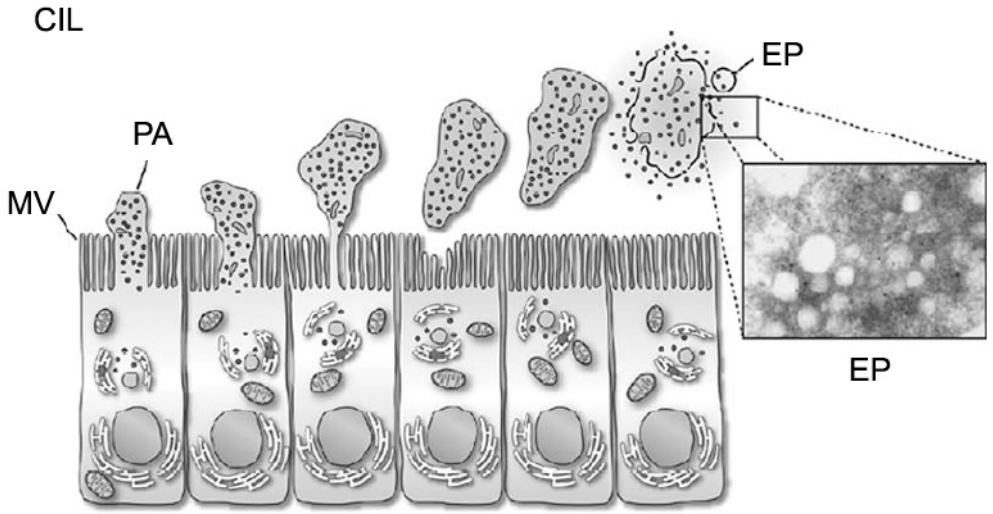


Figura 17: Representación esquemática de la secreción apócrina en las células principales del epidídimo. En el "inset" se muestra una imagen de microscopía electrónica de epididimosomas (tomado de Sullivan *et al*, 2007). Donde: **PA**: protrusión apical, **MV**: microvellosidades, **EP**: epididimosomas, **CIL**: compartimiento intraluminal.

Se ha descrito que las vesículas epididimarias varían su composición proteica en los distintos segmentos del epidídimo (Frenette *et al*, 2006) y participarían en la transferencia de determinadas proteínas a distintas subregiones de los espermatozoides en tránsito (Sullivan *et al*, 2003). Las regiones subcelulares del espermatozoide donde se incorporan más frecuentemente dichas proteínas son las membranas que cubren la región acrosomal y la pieza media espermática (Sullivan *et al*, 2007).

Las bases moleculares de la transferencia proteica desde los epididimosomas al espermatozoide madurante no se conocen completamente; utilizando ensayos *in vitro* se ha determinado que la interacción entre estas vesículas y los espermatozoides es dependiente del pH y la temperatura, además se sabe que la interacción se ve favorecida por la presencia de iones

Zn^{2+} (Sullivan *et al*, 2005). Las membranas de las vesículas contienen dominios denominados “lipid rafts” (balsas lipídicas), compuestos de proteínas y lípidos, que serían transferidos a la membrana de los espermatozoides epididimarios (Sullivan *et al*, 2007).

Una de las proteínas involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito que está presente en epididimosomas es P34H, específica de espermatozoides, sintetizada en el epidídimo en respuesta a andrógenos y transferida al espermatozoide vía epididimosomas (Légaré *et al*, 1999). Dos ortólogos de esta proteína, P26h y P25b, en hámster y toro, respectivamente, se encuentran en los epididimosomas y son adquiridos por los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo (Sullivan & Bleau, 1985; Frenette & Sullivan, 2001). Otra proteína, PH-20 (o SPAM-1) es sintetizada por las células principales del epidídimo (Zhang *et al*, 2004), utiliza a los epididimosomas para incorporarse a la superficie de los espermatozoides (Zhang *et al*, 2003) y juega un rol en la interacción del espermatozoide con el complejo ovocito *cumulus* (Martin-DeLeon, 2006).

Los espermatozoides que han completado la espermatogénesis en el epitelio seminífero y son transportados a través del epidídimo sufren modificaciones bioquímicas y funcionales durante el proceso de maduración. Sin embargo, aún son funcionalmente inactivos e incapaces de fecundar al ovocito. Esta facultad es adquirida durante la migración a través del tracto genital femenino en un proceso complejo que se conoce como **capacitación** (Yanagimachi, 1994).

1.5 Capacitación espermática

La capacitación de los espermatozoides se inicia con la remoción de factores inhibitorios, provenientes del plasma seminal, cuando las gametas masculinas atraviesan el moco cervical. Varios eventos relacionados con la capacitación tienen lugar durante el pasaje de los espermatozoides por el útero, por el oviducto, o mientras éstos penetran las células del *cumulus oophorus*. La capacitación se completa con la exocitosis acrosomal (EA) en la superficie de la *zona pellucida* (ZP) (De Jonge, 2005).

El proceso de capacitación consiste en una serie de alteraciones en el metabolismo, modificaciones de la composición de proteínas y lípidos y consecuentemente de las características estructurales de la membrana plasmática, cambios en los patrones de fosforilación de proteínas y aumento del pH y de los niveles de iones calcio (Ca^{2+}) intracelulares (Visconti *et al*, 2002; Darszon *et al*, 2006), así como también generación de niveles bajos y controlados de especies reactivas del oxígeno (Lamirande *et al*, 1997; Cross, 1998; De Jonge, 2005). Se ha propuesto que los cambios en la membrana plasmática y en los patrones de fosforilación de proteínas, serían necesarios tanto para la unión del espermatozoide a la ZP como para la inducción de la EA (Visconti & Kopf, 1998; Flesch *et al*, 2001; Kerr *et al*, 2002).

Numerosas evidencias sugieren que la pérdida de colesterol de la membrana plasmática es un elemento crucial en la respuesta a los estímulos que desencadenan la EA (Abou-Haila & Tulsiani, 2000). La ocurrencia de la capacitación se ha correlacionado con un aumento en la fosforilación proteica en residuos tirosina (Visconti *et al*, 2002; Liu *et al*, 2006; Buffone *et al*, 2006); la mayoría de las proteínas fosforiladas en residuos tirosina, han sido localizadas en el flagelo espermático y se ha visto que están involucradas en el mantenimiento de la motilidad espermática y, probablemente, en el desarrollo de la hiperactivación. La capacitación de espermatozoides humanos también está relacionada con la fosforilación de proteínas en residuos serina y treonina (Naz, 1999; Jha *et al*, 2006).

Durante la capacitación los espermatozoides desarrollan un proceso denominado **hiperactivación** de la motilidad espermática, que se evidencia por la presencia de un patrón distintivo de motilidad y que se produce como consecuencia de modificaciones en la membrana plasmática de la región de la cola (Yanagimachi, 1994). Los espermatozoides con motilidad hiperactivada se caracterizan por tener movimientos no progresivos interrumpidos por cortos episodios de movimientos lineares. Los estudios cinemáticos revelan que este movimiento está asociado a un aumento en la velocidad, una disminución en la linealidad, un aumento en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y movimientos tipo látigo del flagelo espermático (**Figura 18**) (Mortimer & Mortimer, 1990). Se cree que el(los) componente(s) no direccional(es) de la

motilidad hiperactivada puede(n) contribuir a que los espermatozoides se liberen del epitelio del *Isthmus* oviductal. Además, se ha propuesto que este tipo de motilidad permite al espermatozoide penetrar la ZP del ovocito.

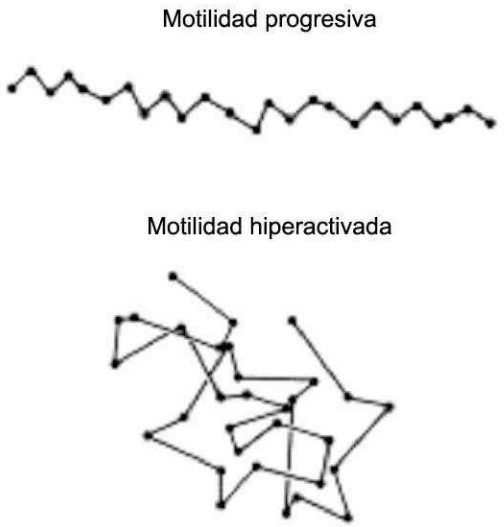


Figura 18: Esquema que ilustra la trayectoria de la motilidad de espermatozoides activados e hiperactivados (modificado de Mortimer & Mortimer, 1990).

La hiperactivación ha sido asociada con la capacitación espermática; sin embargo, el desarrollo de motilidad hiperactivada estaría regulado por vías diferentes de aquellas que modulan la adquisición de la capacidad para responder a estímulos que inducen la EA (Marquez & Suarez, 2004). El adenosín trifosfato (ATP) y el AMPc son necesarios para la hiperactivación espermática. Además, un incremento en las concentraciones intracelulares de iones Ca^{2+} es esencial para el desarrollo de este tipo de motilidad, el cual estaría relacionado con la fosforilación de proteínas flagelares específicas (Luconi & Baldi, 2003).

Además de los cambios mencionados se ha descrito que el espermatozoide sufre reorganización del citoesqueleto de actina durante la capacitación (Breitbart *et al*, 2005; Etkovitz *et al*, 2007). Varios autores han evaluado los niveles de actina polimerizada en espermatozoides luego de incubarlos en condiciones que promueven la capacitación y han observado que dichas condiciones producen un aumento de la polimerización de actina

principalmente en la cabeza del espermatozoide de varias especies (Brener *et al*, 2003). La polimerización de actina en espermatozoides humanos estaría relacionada con la morfología espermática y la capacidad de unirse a la estructura glicoproteica que rodea al ovocito, la ZP (Liu *et al*, 2005), así como también sería necesaria para la incorporación del espermatozoide al citoplasma ovocitario, pero no sería esencial para la fusión de las membranas, ni en los pasos iniciales de activación ovocitaria (Sánchez-Gutiérrez *et al*, 2002). Además se ha visto que la reorganización del citoesqueleto de actina es necesaria para la descondensación del núcleo espermático una vez que el espermatozoide ha ingresado al oolema (Kumakiri *et al*, 2003). Además de su rol en estos procesos, la polimerización de actina sería relevante en la hiperactivación y en la exocitosis acrosomal inducida por ZP, dado que el bloqueo de la proteína con anticuerpos monoclonales anti actina o la inhibición de la polimerización inhibe ambos eventos (Liu *et al*, 2002; Liu *et al*, 1999).

Los eventos relacionados con la capacitación de espermatozoides humanos pueden completarse en condiciones definidas *in vitro* mediante la incubación de las gametas masculinas por un período de tiempo determinado, bajo condiciones ambientales específicas (37º C en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire) y utilizando medios de cultivo de composición conocida. Estos últimos consisten en soluciones salinas balanceadas, suplementadas con las concentraciones apropiadas de electrolitos, fuentes de energía (glucosa, lactato y piruvato) y fuentes de proteína (albúmina sérica). La composición iónica del medio de cultivo es fundamental para mantener la funcionalidad espermática (Marín-Briggiler *et al*, 2003). Considerando que el plasma seminal contiene factores decapacitantes, su remoción es esencial para lograr la capacitación (Tomes *et al*, 1998). Para ello, el plasma seminal de las muestras de semen es diluido por agregado de medio o, alternativamente, el semen es sometido a técnicas de selección espermática de forma tal que los espermatozoides inmótiles y las células redondas son removidos obteniéndose una población de espermatozoides enriquecida en células mótiles y de alta calidad funcional (Buffone *et al*, 2004).

1.6 El acrosoma y la exocitosis acrosomal

Como se mencionara previamente, el acrosoma es una organela que deriva del aparato de Golgi, se encuentra rodeado por la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana acrosomal interna (MAI), se localiza en la parte anterior de la cabeza espermática apoyado sobre el núcleo, y comprende el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial. Desde el punto de vista bioquímico y morfológico, el acrosoma se encuentra compartimentalizado en proteínas solubles y una matriz acrosomal particulada. Se ha propuesto que esta matriz juega un rol importante en la regulación de la liberación de enzimas líticas durante la EA (Kim *et al*, 2001; Kim & Gerton, 2003; Buffone *et al*, 2008).

Los componentes acrosomales pueden ser solubles o estar asociados a la matriz acrosomal. Algunos de estos componentes son liberados al medio y otros solo se exponen luego de la EA. Se ha descrito la presencia de proteínas específicas del acrosoma como proacrosina/acrosina (Urch & Patel, 1991; Zahn *et al*, 2002), acrogranina (Anakwe & Gerton, 1990), SP-10 (Herr *et al*, 1990) y la proteína de la matriz acrosomal AM67/SP56 (Foster *et al*, 1997), entre otras.

Numerosas enzimas con diferentes actividades han sido identificadas en el contenido acrosomal. Las enzimas con actividad de proteasa participarían en la EA y en el proceso de penetración espermática a través de la matriz extracelular que rodea al ovocito, la ZP, mediante la unión y la lisis de sus componentes (Tulsiani *et al*, 1998; Vazquez-Levin *et al*, 2005).

La EA es un evento esencial para que el espermatozoide penetre la ZP y para que se fusione con el oolema. La importancia funcional de la EA es la liberación de enzimas acrosomales que ayudarían al pasaje del espermatozoide a través de la ZP, la redistribución de proteínas en diferentes subregiones de la gameta y el desarrollo de capacidad fusogénica del segmento ecuatorial, que participaría en la fusión con el oolema (Flesh & Gadella, 2000).

Luego de la unión a la ZP, los espermatozoides capacitados pueden sufrir la EA. La EA es un proceso irreversible que involucra una serie compleja de eventos intracelulares, que resulta en la fusión de la membrana acrosomal

externa y la membrana plasmática que la recubre, con la consiguiente liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna (**Figura 19**).

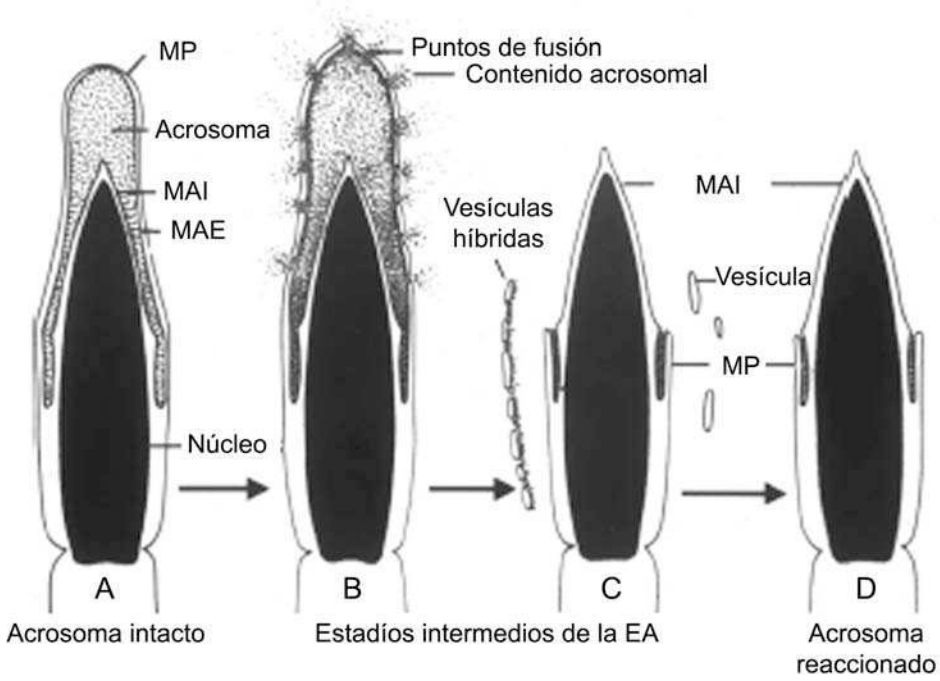


Figura 19: Representación esquemática de la fusión de membranas durante la exocitosis acrosomal. (A) Espermatozoide con acrosoma intacto: donde se observan la membrana plasmática (MP), membrana acrosomal interna (MAI) y membrana acrosomal externa (MAE) y el contenido acrosomal. (B - C) Espermatozoides en estadios intermedios de la EA donde la MP comienza a fusionarse con la MAE, se libera el contenido acrosomal y se forman vesículas híbridas constituidas por MP y MAE. (D) Espermatozoides completamente reaccionados donde el contenido acrosomal fue liberado y se expone la MAI (modificado de Wasarman *et al*, 2005).

En el modelo murino, el mecanismo clásico propone que la unión de la proteína de la ZP, llamada ZP3, a receptores espermáticos específicos causaría su agregación y activación (Bleil & Wassarman, 1983); los receptores activados desencadenarían una cascada de eventos que culminarían con la fusión de las membranas y la liberación de los componentes acrosomales. La EA inducida por ZP3 involucraría la activación de proteínas G, alcalinización intracelular, despolarización de la membrana plasmática, aumento transiente de las concentraciones de iones Ca^{2+} intracelular por activación de canales dependientes de voltaje del tipo T, generación de inositol-3,4,5-trifosfato (IP3), incremento sostenido de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} por

vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP3 y apertura de canales de iones Ca^{2+} en la membrana plasmática, y producción de compuestos fusogénicos (Gong *et al*, 1995).

Se ha descrito que la ZP humana nativa o solubilizada induce la pérdida de los componentes del acrosoma en espermatozoides humanos capacitados (Cross *et al*, 1988). Sin embargo, debido a las restricciones en la disponibilidad del material biológico, la identidad de los componentes de la ZP responsables de desencadenar la EA no ha sido dilucidada totalmente.

Los mecanismos moleculares que controlan la fusión de membranas celulares han sido extensamente estudiados en los últimos años. Se ha caracterizado la participación de las proteínas NSF (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor), SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein) y SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) en la regulación de la fusión de membranas durante la exocitosis de células somáticas (Zhao *et al*, 2007). Recientemente, se han identificado algunas de esas proteínas en la cabeza espermática y se ha estudiado el mecanismo que regularía la fusión de membranas durante la EA, el que presenta similitudes con el mecanismo de la fusión de membranas de células somáticas (Tomes *et al*, 2002; Tomes *et al*, 2005; De Blass, 2005; Mayorga *et al*, 2007; Tomes, 2007). Como parte de estos hallazgos, también se ha descrito que la EA de espermatozoides humanos requiere la actividad de tirosina kinasas y fosfatasas, indicando que la fosforilación proteica en tirosina está involucrada en este proceso (Tomes *et al*, 2004).

Finalmente, sólo los espermatozoides capacitados pueden sufrir la EA en respuesta a estímulos fisiológicos por lo que la ocurrencia de EA indica que se ha completado el proceso de capacitación.

1.7 Transporte espermático a través del tracto reproductor femenino

En la mayoría de los mamíferos, el semen es depositado en la región anterior de la vagina durante el coito y, en minutos, los espermatozoides entran en el cérvix uterino atravesando el moco cervical. Los espermatozoides eyaculados

muestran una motilidad activada y progresiva que les permite su avance a través del tracto genital femenino. El moco cervical actúa como un filtro espermático, de manera que sólo células de buena motilidad y morfología pueden entrar al útero y continuar su tránsito por el tracto femenino. En el útero, los espermatozoides son sometidos a contracciones musculares y unos pocos miles alcanzan el oviducto.

Como se mencionó anteriormente, durante su transporte y estadía en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides sufren una serie de cambios metabólicos y estructurales, conocidos en conjunto con el nombre de **capacitación**; asimismo, los espermatozoides desarrollan un patrón distintivo de motilidad, denominado **hiperactivación**. Estos cambios fisiológicos preparan a los espermatozoides para ser guiados hacia la gameta femenina por gradientes de temperatura y estímulos químicos, fenómenos llamados termotaxis y quimiotaxis, respectivamente. A su vez, estos cambios son requeridos para que ocurra la EA en respuesta a los estímulos del ovocito y para la posterior penetración de sus envolturas. La interacción estrecha y dinámica entre el espermatozoide y las secreciones de las células del tracto genital femenino es esencial para la regulación y el desarrollo *in vivo* de la capacidad fecundante del espermatozoide (De Jonge, 2005; Suarez & Pacey, 2006).

En la **Figura 20** se representan esquemáticamente los principales eventos moleculares relacionados con el transporte espermático en el tracto femenino hacia el sitio de la fecundación.

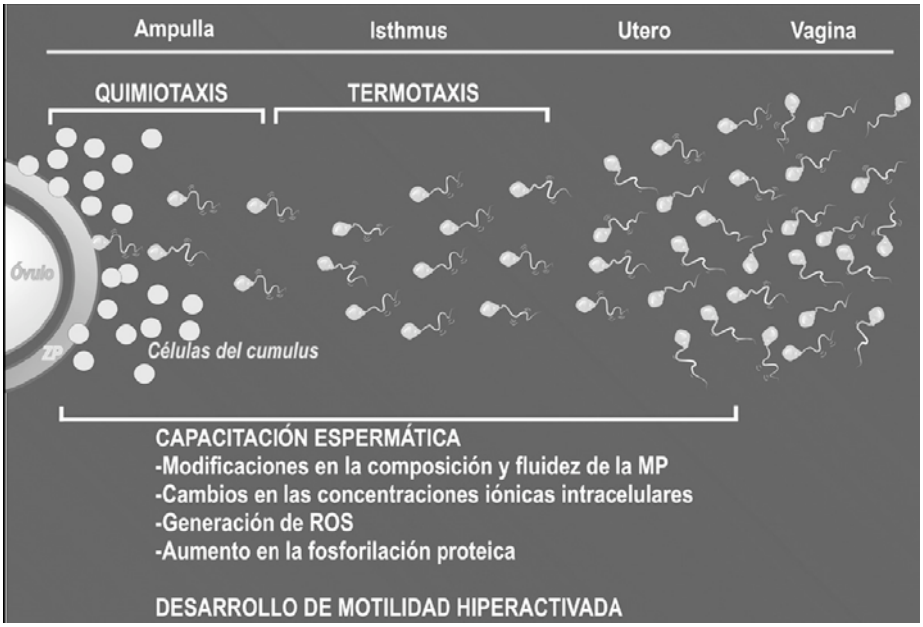


Figura 20. Representación esquemática de los principales eventos que tienen lugar durante el transporte de los espermatozoides en el tracto femenino. Los espermatozoides podrían ser guiados al sitio de fecundación por mecanismos activos tales como termotaxis y quimiotaxis, que asegurarían el encuentro de las gametas. MP: membrana plasmática, ROS: especies reactivas del oxígeno (Extraído de Vazquez-Levin & Marín-Briggiler, 2009).

1.8 El tracto reproductor femenino

El órgano productor de la gameta femenina es el ovario, que en mamíferos se compone de una región cortical y otra medular. La ovogénesis o formación de la gameta femenina ocurre en el ovario, comienza en la corteza del ovario durante la vida fetal y se detiene en la profase de la primera división meiótica hasta la pubertad. Durante la vida fetal, las ovogonias proliferan a través de sucesivas mitosis hasta poblar la corteza ovárica (**Figura 21**). Posteriormente entran en la Meiosis I y estos ovocitos quedan arrestados en Diplotene de la Profase I; el núcleo de estos ovocitos es denominado vesícula germinal (VG). En este estadio, el ovocito se encuentra dentro de un folículo primordial caracterizado por estar rodeado por una membrana basal y una capa única de células de la granulosa plana (Picton, 2001). Poco después del nacimiento y a lo largo de toda la vida se produce la foliculogénesis. Este proceso involucra la formación y crecimiento de folículos primordiales hasta el estadio pre-ovulatorio. En la pubertad se reanuda la meiosis durante cada ciclo reproductivo en la vida adulta. Esta reanudación culmina con la ovulación de un

ovocito nuevamente arrestado en metafase II, que al llegar a la *Ampulla* oviductal sólo completará su división meiótica una vez penetrado por un espermatozoide fecundante. En la hembra estos procesos están regulados hormonalmente pero, a diferencia del macho, de manera cíclica (Niswender & Nett, 1994).

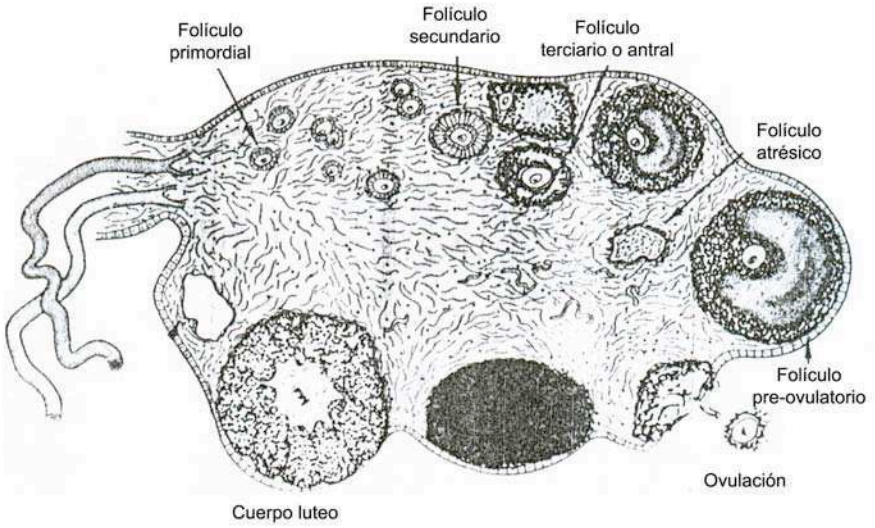


Figura 21: Ovario mamífero. La imagen muestra los estadios del desarrollo y crecimiento folicular. Los folículos primarios tienen una simple capa de células de la granulosa que rodean al ovocito. Los folículos secundarios presentan múltiples capas de células de la granulosa y una capa de células tecales en diferenciación. El folículo terciario ha desarrollado por completo la capa de células de la granulosa, la teca interna y externa, y se ha formado un antro con fluido folicular. El folículo pre-ovulatorio continúa creciendo hasta que ocurre la ovulación (modificado de Niswender & Nett, 1994).

Los folículos primordiales, independientemente de la acción de las gonadotrofinas, sufren una serie de cambios, que involucran la transformación de las células que rodean al ovocito de planas a cuboidales y el inicio de la secreción de la ZP por parte del ovocito, transformándose así en folículos primarios (**Figura 21**). Las células de la granulosa no pierden el contacto con el ovocito, sus proyecciones celulares permanecen atravesando la estructura de la ZP. Posteriormente, la proliferación y diferenciación de las células de la teca que rodean al folículo, hacen que el ovocito se rodee de una serie de capas de células de la granulosa aumentando significativamente el tamaño del folículo, denominado ahora folículo secundario (**Figura 21**). A partir de este momento el folículo es capaz de responder a las gonadotrofinas y el ovocito aumenta

considerablemente de tamaño, completando su fase de crecimiento (Fair *et al*, 1996).

Las células de la granulosa responden a las hormonas hipofisarias y a estrógenos con la formación de líquido folicular, que comienza a formar el antro folicular. En forma conjunta, se diferencian las células que rodean al ovocito en células del *cumulus* y las que rodean a la pared folicular en células de la granulosa murales. Por acción hormonal se estimula el crecimiento de las células de la granulosa y la producción de líquido folicular por acción autocrina. Cuando los niveles sanguíneos de estrógenos son elevados, la hipófisis es capaz de responder con un pico de hormona luteinizante (LH) induciéndose la ovulación. Durante este proceso se produce la expansión del *cumulus* por producción de una matriz de ácido hialurónico con la consecuente pérdida parcial de la adhesividad entre las células y adelgazamiento de las proyecciones citoplasmáticas que conectan a las mismas con el ovocito, la reanudación de la meiosis con extrusión del primer corpúsculo polar y arresto en Metafase II (**Figura 22**), la maduración citoplasmática del ovocito y adelgazamiento y rotura de la pared folicular. Estos eventos permiten la expulsión y salida del ovocito del ovario para ser captado por el *Infundibullum* oviductal. La meiosis culminará solo si el ovocito es penetrado por un espermatozoide fecundante (Chamberlin *et al*, 1989) (**Figura 22**).

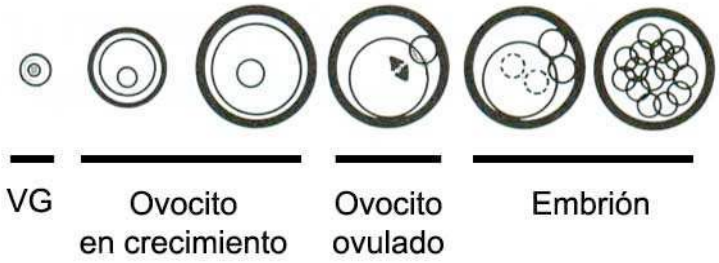


Figura 22: Crecimiento ovocitario. El ovocito en vesícula germinal (VG) es el que se encuentra en folículos primordiales, estos se desarrollan para dar los folículos primarios que, hasta el estadio de folículo pre-ovulatorios muestran un ovocito arrestado en Profase de la primer división meiótica, rodeado de las estructuras de la ZP y células del *cumulus oophorus*. Al momento de la ovulación los ovocitos reasumen la meiosis con la consecuente extrusión del primer cuerpo polar, para quedar nuevamente arrestados en la metafase de la segunda división meiótica. La meiosis se reasume una vez que el ovocito es fecundado, liberándose así el segundo cuerpo polar para

comenzar las sucesivas divisiones mitóticas del embrión en crecimiento (modificado de Wassarman *et al*, 1989).

Una vez ocurrida la ovulación, el Complejo Ovocito y Células del *Cumulus oophorus* (COC) es depositado en el oviducto. El oviducto se compone de tres regiones principales: el *Isthmus*, la *Ampulla* y el *Infundibullum* (**Figura 23**).

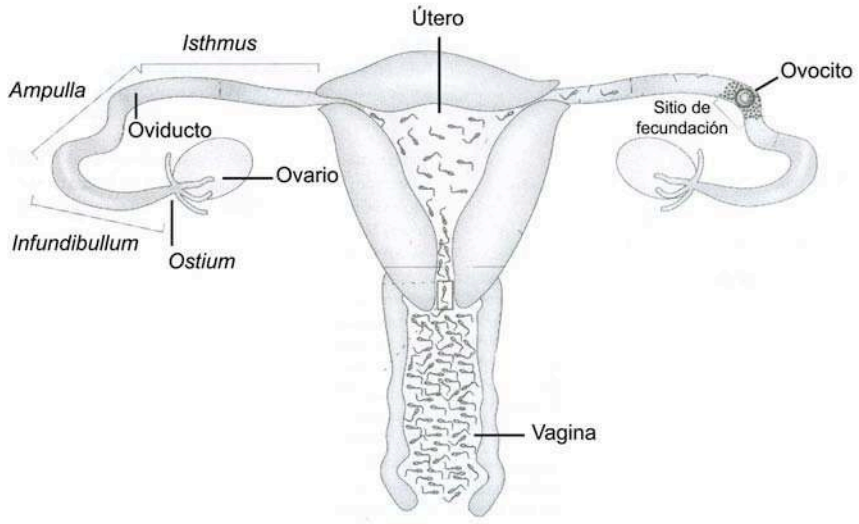


Figura 23: Tracto genital femenino en mamíferos. En la imagen se muestra la vagina por donde ingresan los espematozoides, el útero y el oviducto de la hembra en mamíferos; el oviducto se divide en tres porciones: e*l Isthmus*, porción más cercana al útero, el *Infundibullum* y la *Ampulla*, donde ocurre la fecundación (modificado de Eisenbach & Giogalas, 2006).

Los COCs ingresan al oviducto por el *Ostium*, en la porción anterior del *Infundibullum*, y permanecen en la *Ampulla* donde va a ocurrir la fecundación. En el *Isthmus*, la primera cohorte espermática que arriba, permanece quiescente hasta la llegada de los COCs. Una vez ocurrida la fecundación, el/los embriones ingresan al útero donde completarán su desarrollo hasta el momento del parto.

1.9 El complejo ovocito y células del *cumulus oophorus* (COC)

Luego de la ovulación, el ovocito, que se encuentra arrestado en la metafase de la segunda división meiótica (Metafase II), entra en el oviducto acompañado de dos estructuras adicionales: el *cumulus oophorus* y la *zona pellucida* (**Figura 24**).

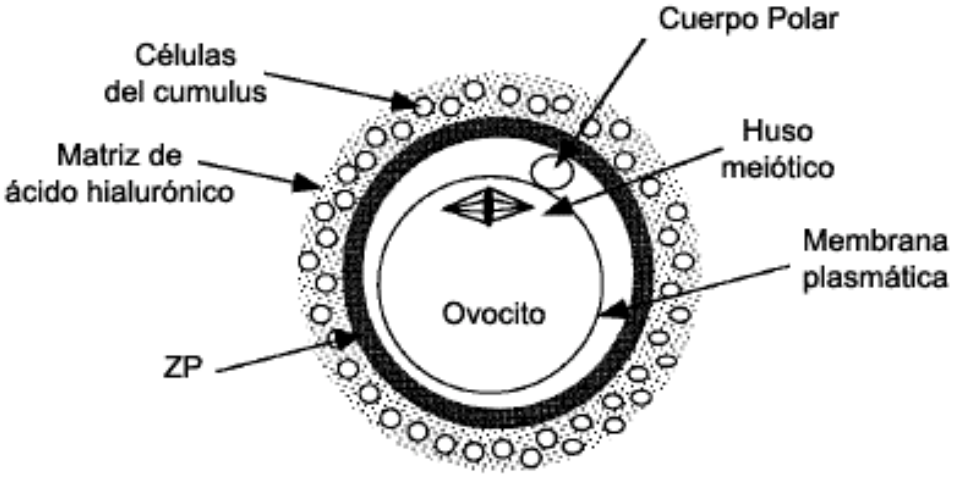


Figura 24: Representación esquemática de los componentes del complejo ovocito-*cumulus* (COC). Las células del *cumulus oophorus*, contenidas en una matriz de ácido hialurónico, envuelven al ovocito que se encuentra arrestado en Metafase II y rodeado por una matriz glicoproteica denominada *zona pellucida* (modificado de Evans, 2000).

Como se menciona anteriormente el *cumulus oophorus* está formado por varias capas de células de la granulosa (de origen folicular) insertas en una matriz extracelular de ácido hialurónico polimerizado y conjugado a proteínas. La matriz es secretada por las células de *cumulus oophorus* cuando el ovocito reinicia la meiosis, la secreción de la matriz de ácido hialurónico, causa expansión del *cumulus oophorus* previo a la ovulación. Se ha propuesto que el *cumulus oophorus* no sería esencial para el proceso de fecundación, pero sería beneficioso. Cumpliría diversas funciones entre las que se pueden mencionar 1) su participación en la remoción de componentes del espermatozoide, 2) un rol en la presentación de una mayor superficie de encuentro con el espermatozoide, 3) una contribución en el sostén de la gameta femenina, 4) una contribución en la disminución de la polispermia, 5) un rol en favor de la capacitación y de la penetración del espermatozoide a través de la ZP y 6) una contribución en el desarrollo del embrión hasta estadios más avanzados. Estas propiedades surgen de estudios realizados con ovocitos con y sin células del *cumulus oophorus* inseminados (Yanagimachi, 1994; Bagis *et al*, 2001). En algunas especies, entre ellas el ratón, la presencia del *cumulus* o de células del *cumulus* es beneficiosa para la fecundación *in vitro* (FIV) (Siddiquey & Cohen, 1982; Fraser, 1985). La presencia del *cumulus* reduce variaciones en la fertilidad masculina (Itagaki *et al*, 1992), sensibiliza al espermatozoides para que reaccione al entrar en contracto

con la ZP (Cherr *et al*, 1986), prolonga la vida del ovocito fértil (Piko *et al*, 1979) retrasando el endurecimiento de la ZP luego de la ovulación (Gianfortoni & Gulyas, 1985), filtrando y admitiendo solo una subpoblación de espermatozoides capaces de interactuar con el ovocito (Florman & Babcock, 1991).

La *zona pellucida* (ZP) es una matriz extracelular que en la mayoría de las especies se compone de entre tres y cinco glicoproteínas llamadas ZPs, sintetizadas y secretadas por el ovocito (Wassarman, 1988). En especies no mamíferas como *Xenopus leavis*, la ZP o envoltura vitelina que rodea al ovocito se compone de hasta cinco glicoproteinas (Vo *et al*, 2003). En primates no humanos (*Macaca radiata*) (Ganguly *et al*, 2008), en humanos (Lefievre *et al*, 2004) y en el hámster (Izquierdo-Rico *et al*, 2009) la ZP se compone de cuatro glicoproteinas; mientras que en murinos solo se han descrito tres glicoproteinas, ZP1 (200 KDa), ZP2 (120 KDa) y ZP3 (83 KDa) (Bleil & Wassarman, 1980).

La ZP constituye la última barrera que el espermatozoide debe atravesar para lograr la fecundación. En términos generales, la ZP actuaría como receptor espermático e inductor o acelerador de la exocitosis acrosomal, cumpliendo un rol como regulador espacio-temporal del proceso de la fecundación. Asimismo, protege al ovocito del daño físico al que pueda estar expuesto y provee especificidad de especie en el reconocimiento entre las dos gametas, impidiendo la penetración heteróloga. Por otro lado, participa en el mecanismo de bloqueo de la polispermia, evento que se gatilla como consecuencia del ingreso del espermatozoide en el citoplasma ovocitario (ooplasma). Finalmente, la ZP tendría una función durante el desarrollo preimplantatorio del embrión, actuando como barrera de protección mecánica frente a daños físicos y a otros tipos de injurias (Yanagimachi, 1994; Wassarman et al, 1999; Wassarman *et al*, 2001).

Estudios de microscopía electrónica de barrido han confirmado que la ZP es una estructura porosa, con forma de red y aspecto compacto (Vanroose *et al*, 2000), encontrándose diferencias morfológicas y cierta asimetría entre la superficie externa e interna de la misma. Cuando se utilizan técnicas de alta resolución, se observa una estructura de filamentos interconectados con un patrón regular de alternancia de “mallas amplias y estrechas” (Familiari *et al*, 2006) (**Figura 25**).

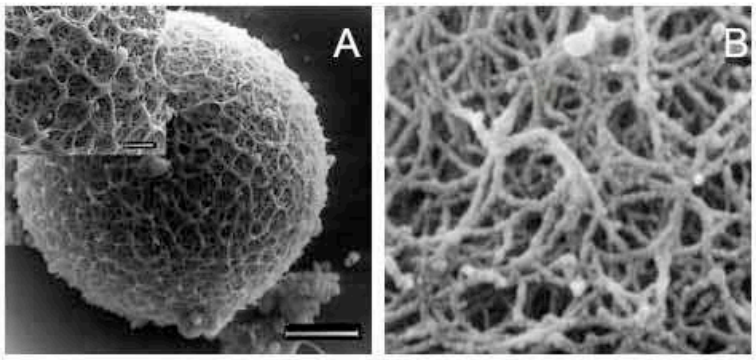


Figura 25: La *zona pellucida* o matriz extracelular del ovocito. **A.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la ZP de un ovocito humano (barra: 20 µm). En el ángulo superior izquierdo se muestra un detalle (barra: 5 µm) (extraído de Magerkurth *et al*, 1999). **B.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la ZP de un ovocito de ratón. Notar la extensa red de filamentos de la ZP (extraído de Familiari *et al*, 2006).

Estudios estructurales realizados en la ZP murina han permitido ahondar en la organización de las tres proteínas en la matriz de la ZP (**Figura 26**):

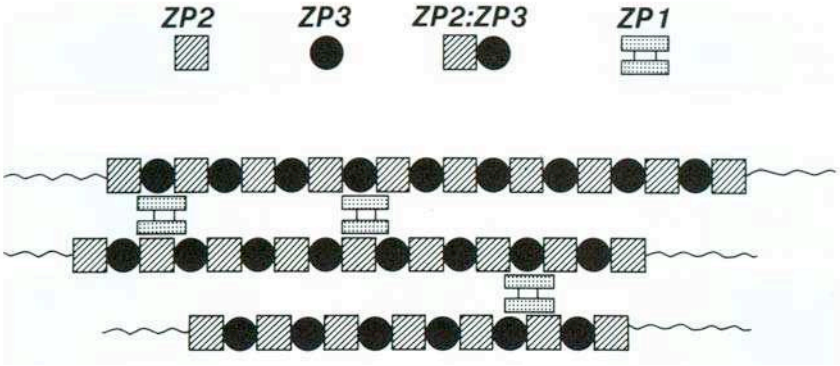


Figura 26: Representación esquemática del arreglo de las glicoproteínas de la ZP de ratón. En este modelo, heterodímeros de ZP2-ZP3 forman largos filamentos interconectados por homodímeros de ZP1 (modificado de Wassarman, 1989).

Numerosos trabajos han permitido proponer roles a cada una de las glicoproteinas que componen la ZP; mientras se ha propuesto que ZP1 tiene un rol exclusivamente estructural (Wassarman, 1989), manteniendo unida la malla formada entre ZP2 y ZP3, ZP3 sería la responsable de inducir la EA de los espermatozoides (Bleil & Wassarman, 1983; Vazquez-Levin & Marín-Briggiler, 2009). Se ha reportado además que ZP3 se une de manera especie específica a

la cabeza de espermatozoides con acrosoma intacto, pero no a espermatozoides que hayan sufrido la EA (Bleil & Wassarman, 1986; Yamashita *et al*, 2007). Respecto de ZP2, las evidencias revelan que se une débilmente a los espermatozoides con acrosoma intacto y se le ha adjudicado la función de unión al espermatozoide reaccionado mientras atraviesa la estructura de la ZP (unión secundaria) (Bleil & Wassarman, 1988).

De manera similar al modelo murino, tres glicoproteínas fueron identificadas en la ZP humana (Hunter *et al*, 1991), hZPA, hZPB y hZPC; posteriormente se describió la presencia de una cuarta proteína en la ZP humana (hZP1) (Wilmut & Hunter, 1984; Smith & Yanagimachi, 1990). Se observó que la ZP humana une selectivamente espermatozoides morfológica y funcionalmente normales. Los espermatozoides que se unen a la ZP muestran morfología normal (Menkveld *et al*, 1991), y normal cromatina nuclear (Liu & Baker, 2007), adicionalmente se observó una correlación entre el número de espermatozoides unidos a la estructura de la ZP y el patrón de fosforilación de proteínas en residuo tirosina de los mismos (Liu *et al*, 2006). Empleando proteínas recombinantes de la ZP humana, nuestro grupo de investigación ha presentado evidencias sobre el rol de hZPC en la unión espermatozoide-ZP y la inducción de la EA (Marín-Briggiler *et al*, 2008) y de hZPA en la unión secundaria espermatozoide-ovocito (Furlong *et al*, 2005).

Estudios realizados en numerosas especies han demostrado que la mayoría de los espermatozoides que se encuentran en el oviducto presentan sus acrosomas intactos. Algunas células pueden iniciar la EA mientras atraviesan la masa de células del *cumulus oophorus*, pero el espermatozoide completa la EA cuando interactúa con las glicoproteínas de la ZP (Yanagimachi, 1994). Las evidencias en el modelo murino sugieren que un espermatozoide con su acrosoma intacto es capaz de unirse a ZP3, completar la EA, unirse a ZP2, penetrar la ZP y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. La fusión del espermatozoide con el ovocito conduce a la modificación de las glicoproteínas de la ZP, por lo tanto los espermatozoides libres en el medio son incapaces de unirse a la ZP y los espermatozoides previamente unidos a la ZP no pueden penetrarla (Wassarman, 2008). Estos conceptos han sido desafiados por trabajos recientes que proponen que la unión del espermatozoide a la ZP no

sería suficiente para inducir la EA, sugiriendo un mecanismo alternativo en el cual la penetración de la ZP gatilla una transducción de señales mecanosensoriales necesarias para desencadenar la EA (Baibakov *et al*, 2007).

Una vez penetrada la estructura de la ZP, el espermatozoide ingresa al espacio perivitelino y se pone en contacto con la membrana plasmática del ovocito. La superficie del ovocito está cubierta por microvellosidades, en roedores la región que recubre el uso meiótico, está libre de las microvellosidades, y la fusión raramente ocurre por esta región (Evans, 2002).

Cuando el espermatozoide se pone en contacto con la superficie ovocitaria, las microvellosidades rodean la cabeza del espermatozoide (McLeskey *et al*, 1998; Kaji & Kudo, 2004). La interacción entre el espermatozoide fecundante y el oolema involucraría la adhesión celular mediada por componentes en la membrana acrosomal interna de la región apical de la cabeza y las microvellosidades de la membrana plasmática del ovocito (**Figura 27**). Esta interacción es disociada por efecto de proteasas, luego de lo cual el espermatozoide se ubica paralelo, se une al oolema y finalmente se fusionaría por el segmento ecuatorial. Como se mencionara previamente, una de las consecuencias de la EA es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial de los espermatozoides, permitiéndole a los mismos unirse y fusionarse con la membrana plasmática (MP) del ovocito. La región anterior del espermatozoide es incorporada al ovocito por fagocitosis y la región post-acrosomal y el flagelo son incorporados vía fusión de membranas. Una indicación visible de la fusión es la reducción en el movimiento de la cola espermática, que ocurre pocos segundos después de haberse completado el evento de fusión (Yanagimachi, 1994; Primakoff & Myles, 2007; Sutovsky, 2009).

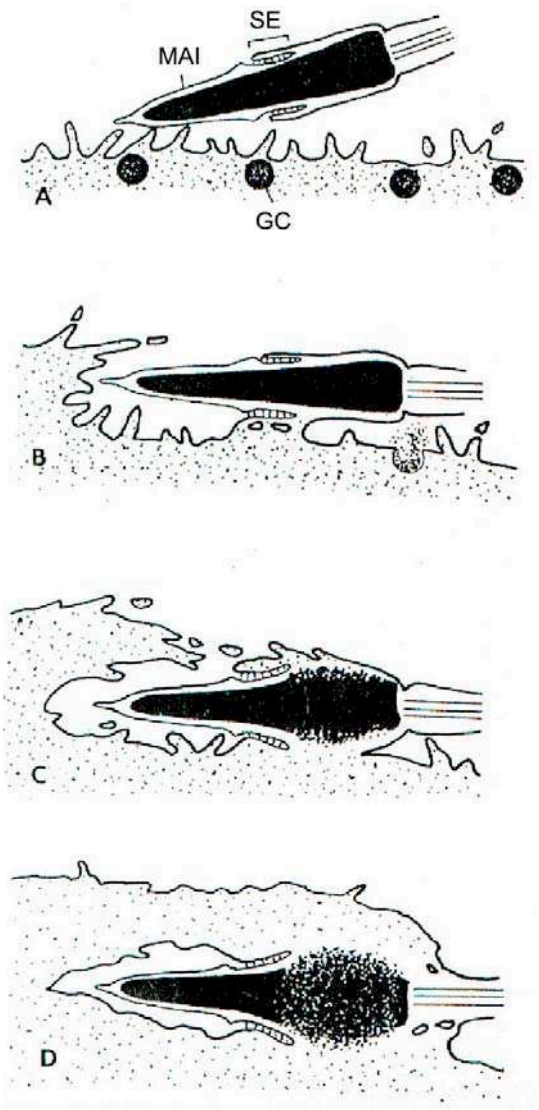


Figura 27: Interacción del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (oolema). La membrana acrosomal interna (MAI) del espermatozoide establece el contacto inicial con las microvellosidades del ovocito, y posiblemente participa en la adhesión, pero las gametas no se fusionan por esta región. El segmento ecuatorial (SE) de la cabeza del espermatozoide reaccionado participa en la fusión inicial con el oolema. Gránulo cortical (GC) (modificado de Bedford & Cooper, 1978).

Muchas son las proteínas descritas sobre la superficie espermática y ovocitaria que participarían en este proceso de interacción de gametas.

1.10 El proceso de la fecundación

La interacción entre el ovocito y el espermatozoide es un proceso especializado que lleva a la fecundación y a la activación del desarrollo embrionario. Durante el proceso de fecundación, los espermatozoides que llegan a la vecindad del ovocito comienzan una serie compleja de interacciones entre las dos células que le permitirán atravesar estructuras acelulares y celulares y alcanzar el citoplasma de la gameta femenina. La fecundación ocurre en la mayoría de las especies en la región de la *Ampulla* o porción media del oviducto.

Inicialmente, los espermatozoides se unen a la ZP y sufren la EA. Posteriormente, los espermatozoides reaccionados penetran la ZP y alcanzan el espacio perivitelino. Luego, se unen y fusionan a la membrana plasmática del ovocito (oolema) permitiendo el ingreso de la cabeza espermática al citoplasma ovocitario (ooplasma) y la decondensación del núcleo espermático (**Figura 28**). Finalmente, la entrada del espermatozoide gatilla mecanismos de bloqueo de la polispermia.

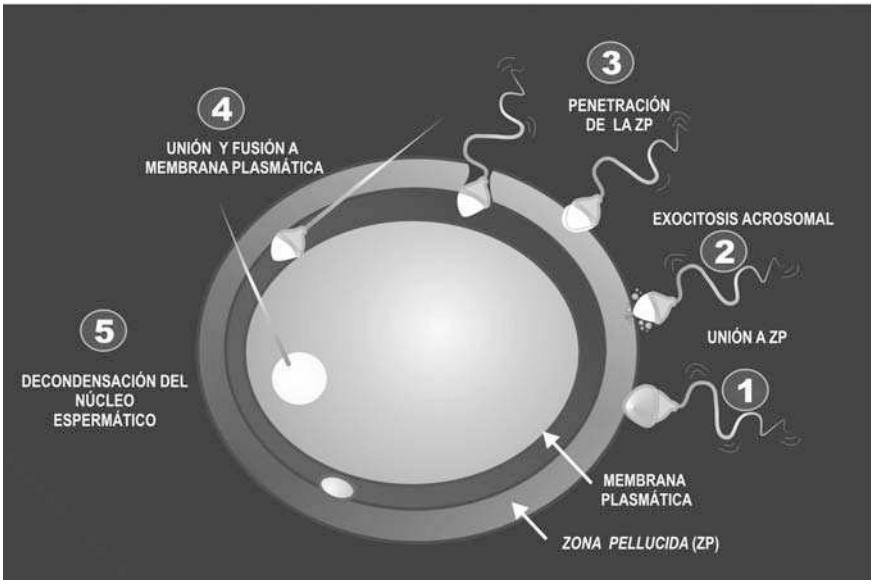


Figura 28. Representación esquemática de los principales eventos que tienen lugar durante la interacción de gametas. Los espermatozoides que han completado la capacitación inicialmente se unen a la *zona pellucida* (ZP) (1) y sufren la exocitosis acrosomal (2); los espermatozoides reaccionados penetran la ZP (3), alcanzan el espacio perivitelino, se unen y fusionan a la membrana plasmática del ovocito (oolema) (4), permitiendo el ingreso de la cabeza espermática al citoplasma

ovocitario (ooplasma) y la decondensación del núcleo espermático (5) (extraído de Vazquez-Levin & Marín-Briggiler, 2009).

Los principales eventos involucrados durante la interacción de las gametas en el proceso de la fecundación en mamíferos son:

a) penetración del *cumulus-oophorus*,
b) unión a la *zona pellucida* (ZP),
c) inducción de la EA y liberación de los contenidos acrosomales,
d) penetración de la ZP y
e) fusión a la membrana plasmática del ovocito (**Figura 29**).

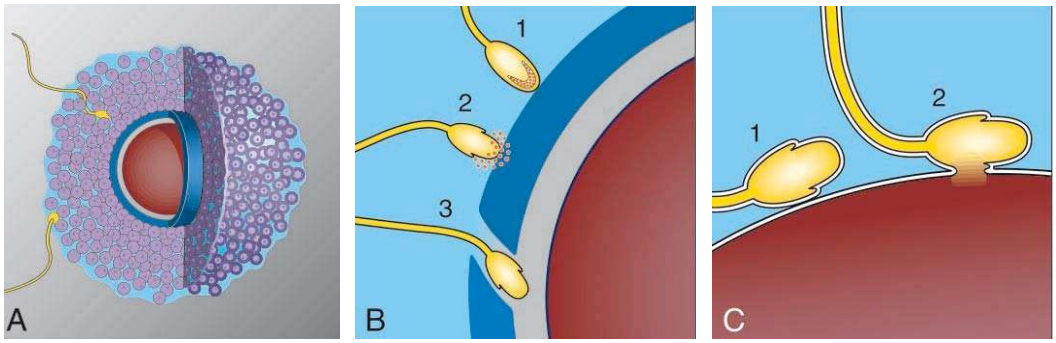


Figura 29: Representación esquemática de las etapas del proceso de fecundación en mamíferos. A) penetración del *cumulus oophorus*. B) 1- unión a la ZP; 2- inducción de la exocitosis acrosomal y liberación del contenido acrosomal; 3-penetración de la ZP. C) 1- unión a la membrana plasmática y 2- fusión de membranas plasmáticas espermática y ovocitaria (modificado de Primakoff & Myles, 2002)

a) Penetración del *cumulus oophorus*: una vez que llega a la vecindad del ovocito, el espermatozoide atraviesa la matriz del *cumulus oophorus*. Algunos autores proponen que la matriz de ácido hialurónico es degradada por la hialuronidasa espermática; sin embargo, hay estudios que indican que no sería esencial (Baba *et al*, 2002) y que la penetración se lograría solo por la tracción generada por la motilidad espermática. Mientras tanto, otros autores sugieren que la motilidad hiperactivada del espermatozoide, facilitada por la hialuronidasa espermática y otras proteínas en la superficie del espermatozoide, contribuyen a la penetración de la masa de células del *cumulus oophorus* (Bedford, 2004).

b y c) Unión a la ZP, inducción de la EA y liberación de los contenidos acrosomales: el mecanismo clásico de la fecundación propone que la unión del espermatozoide a la ZP es un paso relevante en la interacción de las gametas, dado que otorga especificidad de especie a la interacción y gatilla la EA; esta última permite la penetración espermática de la ZP y la subsiguiente unión y fusión con el oolema. Como resultado de numerosas investigaciones, existe un consenso que sugiere que la unión espermatozoide-ZP involucra la interacción de componentes de la ZP con proteínas de la superficie del espermatozoide, proceso conocido como **unión primaria**.

La unión primaria del espermatozoide a la ZP se da entre un espermatozoide capacitado que no ha sufrido la EA, ya que ésta es gatillada por la unión del receptor (en el espermatozoide) al ligando (ZP3, en el ovocito). Estos eventos permiten que se expongan proteínas de superficie espermática que le permitirán al espermatozoide, junto con la motilidad hiperactivada, atravesar la ZP y ponerse en contacto con la membrana plasmática del ovocito.

Como se mencionó anteriormente, estudios bioquímicos efectuados en el modelo murino revelaron que la ZP está compuesta principalmente por tres glicoproteínas: ZP1m, ZP2m y ZP3m. Estudios posteriores caracterizaron estos componentes a nivel molecular y se han desarrollado modelos experimentales combinando mutagénesis dirigida y transgénesis para estudiar sus funciones. Las investigaciones realizadas permitieron proponer que ZP3m es el ligando de la unión primaria y que gatilla/acelera la EA; ZP2m estaría involucrada en la unión secundaria a la ZP y ZP1m mantendría la integridad de la estructura de la ZP. Las glicoproteínas de la ZP humana participarían en la unión primaria y secundaria.

Se ha propuesto que la unión primaria involucra el reconocimiento entre azúcares de la ZP3 y receptores proteicos localizados en la cabeza del espermatozoide. La especificidad de la unión entre el espermatozoide y ZP3 depende, en gran parte, de oligosacáridos de esta última. Se ha descrito que cambios en el patrón de glicosilación de ZP3 pueden afectar la unión especie-específica entre las gametas (Wassarman *et al*, 2001). Sin embargo, estos conceptos se encuentran actualmente en revisión y se propone la participación

de toda la estructura de la ZP como el ligando del espermatozoide (Rankin *et al*, 2003; Dean *et al*, 2004). Asimismo, estudios de los últimos años en el modelo murino proponen la interacción de proteínas espermáticas con otros componentes recuperados de la ZP además de la ZP3 (Rodeheffer & Shur, 2004), extendiendo la participación de otras proteínas ovocitarias en la interacción con el espermatozoide en los primeros estadios de la interacción entre las gametas.

Desde el punto de vista de las proteínas espermáticas, se ha propuesto una gran cantidad de moléculas responsables de la interacción con componentes de la ZP, y hay una amplia literatura que las describe. Los estudios involucraron el uso de modelos experimentales en roedores así como otros mamíferos; numerosas metodologías fueron utilizadas, desde la biología celular clásica y la bioquímica hasta las tecnologías más sofisticadas de biología molecular y genética experimental, incluyendo modelos de genes "knock out". Las proteínas candidatas incluyen una variedad de enzimas (beta 1,4-galactosiltransferasa/GalTasa; alfa-fucosiltransferasas, alfa-manosidasas, N-acetilglucosaminidasas/Hex; fosforilasa A2), y proteínas de unión a carbohidratos (receptores de manosa, galactosa y mucosa; p47/SED1 y otras spermadhesinas; zonadhesina; moléculas tipo selectinas), así como también otras proteínas (FA-1; P34H/P26h/P25b; SLIP-1; P66; cadherina epitelial). En humanos, se ha descrito la presencia de algunas de estas proteínas: FA-1 y P34H, GalTasa (Miller *et al*, 1994), Hex (Miranda *et al*, 2000), selectinas (Dell *et al*, 1995), SLIP-1 (Rattanachaiyanont *et al*, 2001), p66 (Lasserre *et al*, 2003), cadherina epitelial (Marín-Briggiler/Veiga et al, 2008); mientras que en el modelo murino, se pueden mencionar: p95 (Saling, 1991), SP56 (Cheng *et al*, 1994; Cohen & Wassarman, 2001), β-1,4-galactosil transferasa (Miller *et al*, 1992), SED-1 (Ensslin & Shur, 2003), CRISP1 (Busso *et al*, 2007) y p26 (Gaudreault *et al*, 2002).

Adicionalmente, se encontró que componentes acrosomales muestran actividad de unión a la ZP, y podrían estar involucrados en la unión secundaria del espermatozoide reaccionado a la ZP. Entre ellas podemos mencionar al sistema proacrosina/acrosina, PH20, sp56, acrin2/MC41, sp38/IAM38 y Sp17, en ratón; asimismo se han presentado evidencias de la expresión del sistema

proacrosina/acrosina, PH20 (Lin *et al*, 1993), Sp17 (Lea *et al*, 1996) y SOB3 (Hammami-Hamza *et al*, 2001) en el humano.

En el presente hay consenso en considerar que más de una proteína espermática participaría en la unión primaria a los componentes de la ZP (Wassarman *et al*, 2001; Florman *et al*, 1999).

d) Penetración de la ZP: una vez completada la EA, se inicia el proceso de penetración de la ZP. Los espermatozoides que completaron la EA son capaces de penetrar la ZP y fusionarse con el oolema. Los mecanismos por los cuales los espermatozoides penetran la ZP todavía no han sido dilucidados totalmente. Se han propuesto varias hipótesis, entre ellas la "mecánica" y la "enzimática". En la primera, el espermatozoide penetraría la ZP usando la fuerza provista por la motilidad de manera independiente de la actividad enzimática; en la segunda, el espermatozoide necesitaría la actividad lítica de enzimas acrosomales para la penetración y la motilidad no sería relevante. Una tercera hipótesis, que en el presente es la más aceptada, combina la motilidad vigorosa flagelar y la actividad lítica espermática (Yanagimachi, 1994; Bedford, 2004).

Si bien ha sido discutido el rol de las enzimas acrosomales en la lisis de la ZP durante la penetración, existen evidencias experimentales que sugieren que el mecanismo de penetración dependería de la actividad lítica en conjunción con la motilidad y la fuerza mecánica que el espermatozoide ejerce sobre la matriz de la ZP (Tulsiani *et al*, 1998). Como resultado de la EA, otras moléculas espermáticas se exponen o relocalizan y comienzan a ponerse de manifiesto nuevas interacciones con componentes de la ZP, que en conjunto se conocen como **unión secundaria** del espermatozoide a la ZP. En ratón, ZP2 ha sido propuesta como la principal proteína participante en esta unión (Wassarman, 1999). Sin embargo, las interacciones que la mantienen no han sido totalmente dilucidadas, como tampoco el/los receptor(es) espermático(s) implicado(s) en esta unión.

La participación de hidrolasas de tipo tripsina del espermatozoide humano en la penetración de la ZP, ya ha sido sugerida mostrando el efecto de inhibidores de tripsina sobre este evento (Liu & Baker, 1993). Entre los

componentes acrosomales estudiados, el sistema proacrosina/acrosina ha sido el más ampliamente caracterizado (Urch, 1991; Klemm *et al*, 1991). Acrosina es una endopeptidasa de tipo tripsina sintetizada y almacenada en el acrosoma en su forma de zimógeno, proacrosina (Siegel *et al*, 1986; Zahn *et al*, 2002). La enzima madura activa, beta-acrosina, es liberada durante la EA (Tesarik *et al*, 1990), y las evidencias sugieren que su activación es acelerada por componentes de la ZP (Eberspaecher *et al*, 1991).

El concepto clásico por el cual el espermatozoide penetra la estructura de la ZP ayudado por proteólisis mediada por acrosina ha sido objeto de revisión desde que los animales “knock out” que carecen de esta proteasa fueron fértiles (Baba *et al*, 1994; Adham *et al*, 1997). Sin embargo, los espermatozoides de ratones deficientes en acrosina exhiben una fertilización tardía (Baba *et al*, 1994), y tienen un pobre rendimiento cuando se exponen a ovocitos con ZP endurecida (Nayernia *et al*, 2002). Las evidencias sugieren una desventaja en la capacidad de penetrar la ZP para los espermatozoides que pierden acrosina. Otras proteasas encontradas en el ratón, pueden sobrellevar la falta de acrosina, pero en el humano estos homólogos no fueron identificados (Honda *et al*, 2002). Otros estudios indican que la actividad enzimática de acrosina podría participar durante la EA en la disolución de la matriz acrosomal y en la liberación del contenido acrosomal (Yamagata *et al*, 1998).

En humanos, una actividad anormal de acrosina fue asociada con fallas de fertilización. En particular, un grupo de hombres diagnosticados con infertilidad idiopática, mostraron baja actividad de acrosina (Mari *et al*, 2003; Chaudhury *et al*, 2005); que se relacionó con una disminución en la tasa de fecundación *in vitro*, y con anormalidades en la activación de proacrosina, pero no se observaron cambios en la secuencia de ADN de proacrosina (Mari *et al*, 2003). Adicionalmente, en el modelo murino, utilizando estrategias de imunización génica, se observó que los machos inmunizados presentaron fertilidad disminuída (Veaute *et al*, 2009); los anticuerpos anti acrosina inhiben la EA en la superficie de la ZP (Veaute *et al*, 2010).

e) Fusión de las membranas: una vez que el espermatozoide alcanzó el espacio perivitelino se produce la unión y posterior fusión entre las membranas

de las gametas. La fusión espermatozoide-ovocito es un evento mediado por una unión ligando (en la superficie espermática) receptor (en la superficie ovocitaria). Sin embargo, las bases moleculares de este proceso no se conocen aún en su totalidad.

Muchas proteínas han sido propuestas como responsables del proceso de unión y fusión del espermatozoide al ovocito. Entre ellas podemos mencionar sobre la superficie espermática (ligando) a miembros de la familia de proteínas MDC (Metaloproteinase-like domain Desintegrin-like domain Cystein-rich domain) o ADAM (A Desintegrin And Metalloproteinase), entre ellas, fertilina beta (ADAM 2) y ciritestina (tMCD I o ADAM 3) (Primakoff & Myles, 2002; Rubinstein *et al*, 2006). Utilizando estrategias de supresión génica, estudios posteriores revelaron que el proceso de fusión ocurre en ausencia de estas proteínas (Kim *et al*, 2006). En el modelo humano, los genes que codifican para fertilina alfa (ADAM 1), tMCD II (ADAM 5) y ciritestina no son funcionales, aunque los espermatozoides expresan otros miembros de la familia (tMCD III o ADAM 18) que podrían participar en la unión al oolema (Frayne *et al*, 2002). Otras proteínas a las que se le ha atribuido un rol en la fusión son DE/CRISP1 (ratón) y TPX/CRISP2 (humano), ambas pertenecen a la familia de las proteínas secretorias ricas en cisteínas (CRISP, Cysteine-RIch Secretory Proteins). Anticuerpos específicos dirigidos contra estas proteínas producen una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados, indicando que estas proteínas tendrían un rol en la interacción espermatozoide-oolema (Cohen *et al*, 2000; Busso *et al*, 2005). Sin embargo los animales “knock out” para CRISP1 son fértiles, aunque en ensayos de fertilización *in vitro* los espermatozoides de ratones deficientes en CRISP1 muestran una reducida capacidad de penetrar ovocitos con y sin ZP (Da Ros *et al*, 2008).

Recientemente, se ha identificado una proteína transmembrana novel, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, llamada IZUMO. Esta proteína se expone en el segmento ecuatorial luego de la EA y sería esencial para la fusión de gametas en el ratón; en humanos, se demostró que anticuerpos específicos anti IZUMO inhibieron de manera significativa la penetración espermática de ovocitos de hámster sin ZP sin afectar otros eventos de la fecundación (Inoue *et al*, 2005).

La participación de otras proteínas espermáticas en la fusión de las gametas ha sido sugerida a través de estudios que muestran la capacidad de anticuerpos específicos de inhibir la penetración del espermatozoide humano de ovocitos de hámster en el ensayo heterólogo de fusión de gametas: FLB1 (Boué *et al*, 1995); SOB2 (Lefévre *et al*, 1997); gp20 (Focareli *et al*, 1998); SP-10 (Hamatani *et al*, 2000); ARP (Cohen *et al*, 2001); SAMP32 (Hao *et al*, 2002); SAMP14 (Shetty *et al*, 2003); TPX1 (Busso *et al*, 2005) y cadherina epitelial así como también cadherina neural (Marín-Briggiler/Veiga *et al*, 2008; Marín-Briggiler *et al*, 2009). Recientemente se ha reportado la presencia de integrinas y de proteínas miembro de las tetraspaninas, como CD9, en la superficie espermática y su rol durante la fusión de las gametas (Barraud-Lange *et al*, 2007; Boissonnas *et al*, 2010; Ito *et al*, 2010).

Dentro de las proteínas identificadas en el ovocito que tendrían un rol en la unión y fusión con el espermatozoide, inicialmente se describió a las integrinas. Si bien estudios empleando estrategias de “knock out” sugieren que no serían esenciales para la fecundación en animales y humanos (Miller *et al*, 2000), su participación no ha sido descartada totalmente; así, se ha observado la presencia de agrupamientos o "clusters" de la integrina $\alpha 6\beta 1$ en el sitio de contacto con el espermatozoide (Ziyyat *et al*, 2006) y estudios realizados en el modelo murino demostraron que CD9, uno de los miembros de la familia de las tetraspaninas, se encuentra asociado a la integrina $\alpha 6\beta 1$ y tiene un rol crítico en la adhesión/fusión de las gametas (Kaji *et al*, 2000; Le Naour *et al*, 2000; Miyado *et al*, 2000). En el modelo humano, anticuerpos específicos contra CD9 inhiben la agregación de otras proteínas que estarían directamente involucradas en la fusión (Ziyyat *et al*, 2006). La tetraspanina CD9 y otros miembros como CD81, están presentes en microdominios ricos en colesterol, donde interactúan con otras proteínas (integrinas, kinasas, receptores de factores de crecimiento, antígenos de leucocitos humanos) e incluso con otras tetraspaninas, formando una asociación compleja conocida como “red de tetraspaninas”. Estos complejos proteicos han sido implicados en la señalización, adhesión celular y en una gran variedad de funciones celulares especializadas, lo que permite relacionarlos con los eventos de adhesión durante la interacción de las gametas (Sutovsky, 2009).

En la **Figura 30** se representan algunas de las moléculas involucradas en la adhesión y/o fusión del espermatozoide con el oolema. Aunque existen ciertas evidencias de la participación de todas estas moléculas en la interacción entre el espermatozoide y el oolema, la relación entre las mismas en este proceso complejo aún es desconocida (Sutovsky, 2009).

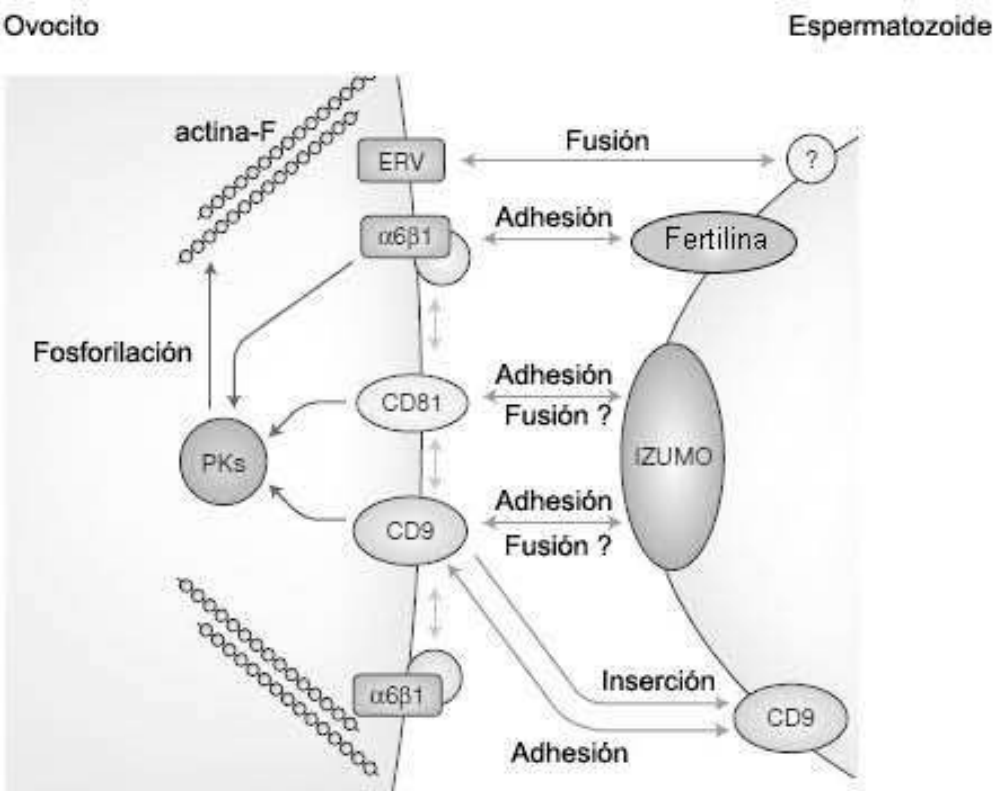


Figura 30: Elementos de la maquinaria de adhesión/fusión espermatozoide-oolema. La proteína IZUMO espermática podría unirse a las tetraspaninas CD9 y/o CD81 para mediar la adhesión y fusión. Dentro de la "red de tetraspaninas" sobre el oolema, CD9 y CD81 podrían interactuar entre sí y con integrinas (por ej. integrina $\alpha 6\beta 1$). La adhesión espermatozoide-oolema es facilitada por la interacción entre integrinas de la membrana plasmática del ovocito, tales como $\alpha 6\beta 1$, y desintegrinas espermáticas como fertilina β. Proteínas de la envoltura retroviral endógenas expresadas en el oolema (ERVs) podrían interactuar con un componente no identificado de la membrana plasmática del espermatozoide y participar de la fusión. Ambas, integrinas y tetraspaninas, podrían modular la polimerización de la actina (actina-F) en la corteza del ovocito mediante vías de señalización que involucran a proteínas kinasas (PKs) (modificado de Sutovsky, 2009).

Una vez que se produce la unión y posterior fusión entre el oolema y la región post-acrosomal, el espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito y

libera allí su material genético. En este momento ocurre la “activación ovocitaria” que le permite al ovocito reiniciar la división meiótica, llevando a la formación del pronúcleo femenino con la consecuente extrusión del segundo cuerpo polar. Se inician los procesos para prevenir la polispermia que involucran la reacción cortical, la reacción de zona (Yanagimachi, 1994; Florman & Ducibella, 2006) y la reacción vitelina, todos ellos con el objetivo de evitar que más de un espermatozoide penetre el ovocito. Se ha observado en el ratón, que luego de la fusión del espermatozoide con el ovocito se produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Este aumento está dado por liberación de iones Ca^{2+} de los reservorios intracelulares del ovocito inducido por IP3 y por la entrada masiva de Ca^{2+} desde el exterior (Yanagimachi, 1994).

1.11 Desarrollo embrionario temprano

Finalizando el proceso de fecundación, una vez que el espermatozoide ingresa al citoplasma ovocitario y el ovocito reinicia la meiosis; comienza la descondensación del núcleo espermático formándose el pronúcleo masculino. Posteriormente ocurre la fusión de ambos pronúcleos o singamia dando lugar al surgimiento del zigoto que va a sufrir una serie de divisiones celulares, dentro de la ZP que lo rodea. Durante estos clivajes, el zigoto se divide en varias células más pequeñas, llamadas blastómeras. Entre las fases de 8 y de 16 células (estadio de mórula), comienza el proceso de diferenciación que se inicia con la compactación. Las blastómeras incrementan los contactos intercelulares, y se desarrollan uniones herméticas entre las células externas que sellan el interior de la mórula con respecto al medio exterior (**Figura 31**). Durante este período, las blastómeras pierden su forma redondeada y se polarizan presentando dominios de membrana diferentes en la zona apical y basolateral, claramente visibles por microscopía de barrido.

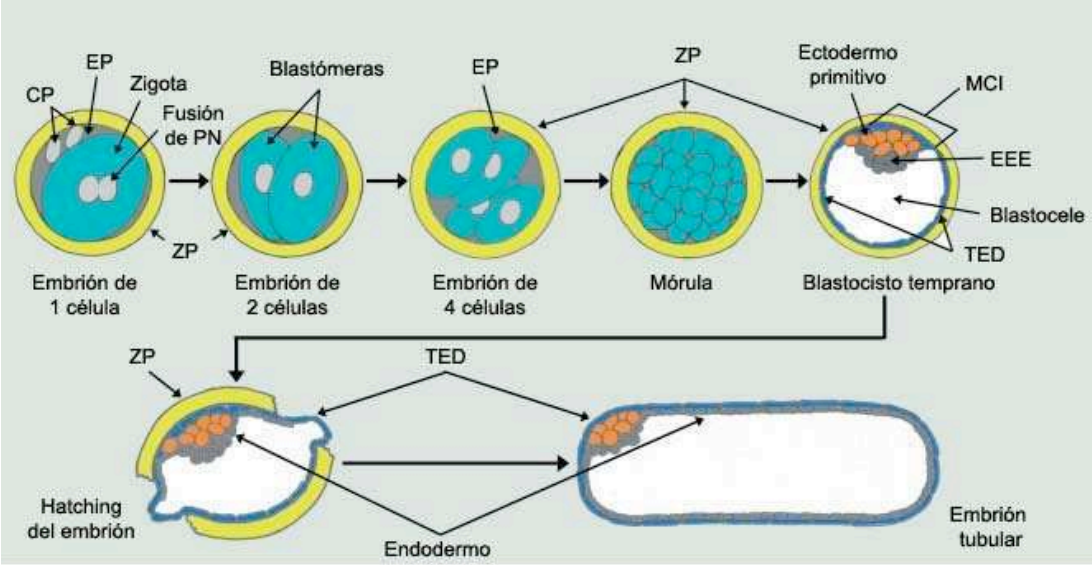


Figura 31: Desarrollo embrionario temprano. La fecundación ocurre en el oviducto y el embrión en estadio de mórula ingresa al útero donde posteriormente el blastocisto sufre el *hatching* de la ZP; el embrión migra y adquiere una forma tubular, la implantación involucra una fuerte adhesión del trofoectodermo a las paredes del útero. Donde: **CP**: cuerpo polar; **EP**: espacio perivitelino; **PN**: pronúcleos; **ZP**: zona pellucida; **MCI**: macizo celular interno; **EEE**: endodermo extra-embrionario; **TED**: trofoectodermo (modificado de Bazer *et al*, 2009).

Al finalizar la compactación, las organelas celulares también están polarizadas. Poco después, los espacios intercelulares aumentan de tamaño generando una única cavidad central llena de líquido, el blastocele. Este estadio se denomina blastocisto. En la etapa de blastocisto pueden distinguirse dos tejidos diferentes: el trofoblasto y el macizo celular interno (**Figura 31**). Las células del trofoblasto darán origen al tejido extraembrionario, mientras que las células del macizo celular interno formarán los tejidos embrionarios y fetales. Posteriormente, el blastocisto debe liberarse de la ZP para permitir que se lleve a cabo la implantación, este evento se conoce como *hatching* y consiste en la ruptura de la ZP y el "escape" del embrión al medio (**Figura 31**) (Alberts *et al*, 1990; Bazer *et al*, 2009; Menkhorst & Selwood, 2008; Hendrick, 2008).

1.12 Interacciones celulares

En numerosos procesos asociados a la fecundación están involucrados los contactos célula-célula y los procesos de adhesión celular. Entre ellos se encuentran el contacto entre las células de las gónadas y las interacciones entre las células germinales y somáticas en los órganos reproductores, como en el

epitelio seminífero y en el oviducto; asimismo, las interacciones que se dan entre los espermatozoides con el complejo ovocito *cumulus* y en las uniones que se dan entre las blastómeras del embrión en formación.

Las uniones celulares pueden dividirse en dos tipos: uniones intercelulares (uniones estrechas, comunicantes, adherentes y desmosomales), y aquellas que unen la célula con la matriz (contactos focales y hemidesmosomales). Todas estas uniones juegan un rol en el mantenimiento de la integridad de los tejidos en organismos multicelulares y en algunos casos están involucradas en la transducción de señales (**Figura 32**).

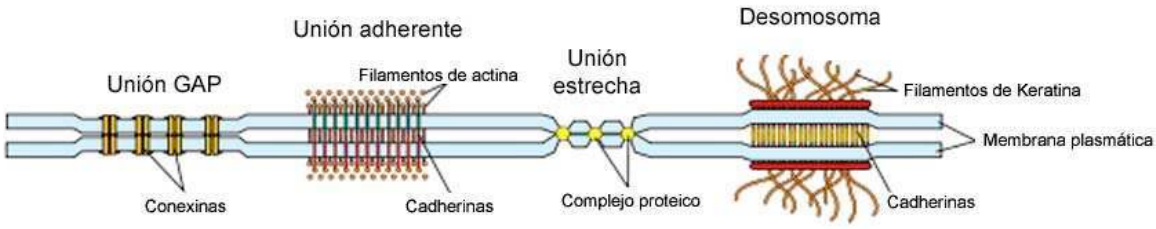


Figura 32: Representación esquemática presentando de manera sintética las principales uniones celulares (modificado de Alberts, 2000).

En las uniones intercelulares, las *uniones estrechas* actúan como barreras de permeabilidad a través de los epitelios, separando los líquidos extracelulares que bañan las regiones apicales y basales de las células. En este tipo de relación entre células, proteínas integrales de membrana como ocludina y claudina forman uniones extremadamente fuertes, en las que las membranas de las dos células en contacto parecen haberse fusionado (Alberts *et al*, 2006).

En contraste, en las *uniones comunicantes* o *uniones GAP*, se forma un canal entre las membranas de las células en contacto para permitir la comunicación directa entre los citoplasmas celulares sin pasar por el espacio extracelular. Así, los canales formados por hexámeros de conexina permiten el pasaje de moléculas pequeñas de alrededor de 1,500 Dalton o menos (Alberts *et al*, 2006).

Las *uniones adherentes y desmosomales* se encuentran en sitios de contacto célula-célula, mientras el *contacto focal* se da entre la célula y la matriz extracelular. Ambos tipos de uniones se asocian al citoesqueleto de actina y

ambos están involucrados en la adhesión y en la transducción de señales que van a influenciar una variedad de comportamientos celulares como proliferación, migración y diferenciación. En el contacto focal participan miembros de la familia de las integrinas, mientras que en las uniones adherentes y desmosomales participan miembros de la familia de las moléculas de adhesión dependientes de iones Ca^{2+}, las cadherinas (Alberts *et al*, 2006).

1.13 Moléculas de adhesión celular

Los fenómenos de adhesión celular antes mencionados involucran la participación de numerosas moléculas de adhesión celular. Estas son proteínas localizadas en la superficie de las células y están involucradas en la unión célula-célula y célula-matriz extracelular. Estas proteínas son generalmente receptores transmembrana compuestos por tres dominios principales: uno extracelular de interacción con moléculas del mismo tipo (unión homofílica) o de otro tipo (unión heterofílica), uno transmembrana y uno citoplasmático de interacción con el citoesqueleto. Las moléculas de adhesión se agrupan en cuatro superfamilias: inmunoglobulinas (IgGs), selectinas, integrinas y cadherinas (**Figura 33**):

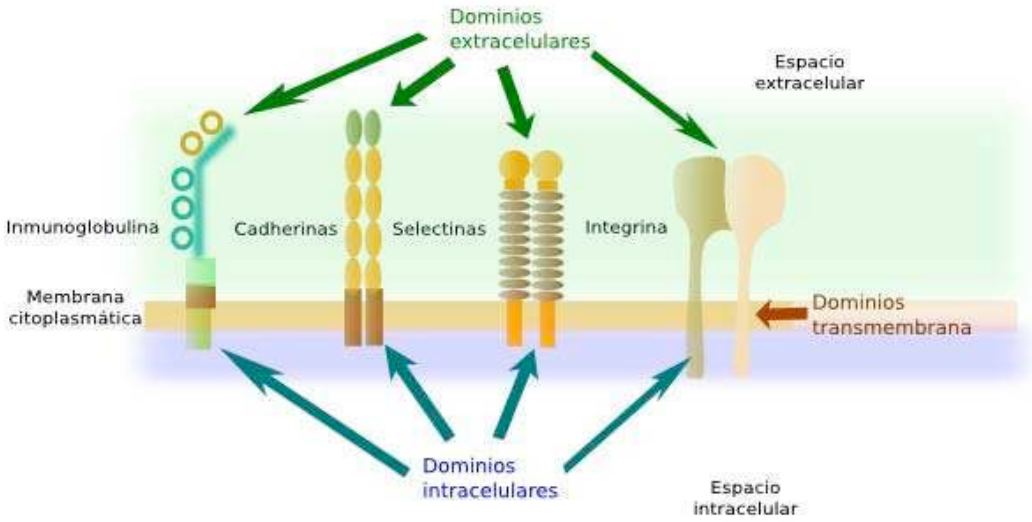


Figura 33: Representación esquemática de las moléculas de adhesión celular. La imagen muestra los dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares de las principales moléculas de adhesión (tomado de http://webs.uvigo.es).

Algunos de sus miembros han sido encontrados en las gametas y en algunos casos se han determinado sus funciones en las mismas:

1- IgGs: son receptores transmembrana y dentro de esta superfamilia se encuentran varias moléculas. Entre ellas se ha descrito a la Molécula de Adhesión Celular Neuronal (N-CAM), presente en ovocitos de ratón desde el estadio de metafase II hasta blastocisto (Kimber *et al*, 1994) y en ovocitos humanos, al igual que la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1), la Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 (VCAM-1) (Campbell *et al*, 1995) y la Molécula de Adhesión Célula-Célula (C-CAM), cuya expresión fue descripta en blastómeros de rata (Svalander *et al*, 1987).

Más recientemente, se ha descrito que un miembro de la superfamilia de las IgGs, llamado IZUMO, se detecta luego de que el espermatozoide sufre la EA y sería responsable de la fusión del espermatozoide al ovocito. Los espermatozoides de ratón que no expresan IZUMO son capaces de unirse y atravesar la estructura de la ZP, pero no tienen la habilidad de fusionarse con el ovocito. En el humano, la incubación de los espermatozoides en presencia de anticuerpos anti IZUMO inhibe la fusión de los mismo con ovocitos de hámster desprovistos de ZP (Inoue *et al*, 2005). En estudios realizados con pacientes con infertilidad masculina, la disminución en la fertilidad no pudo ser asociada a alteraciones en la proteína (Hayasaka *et al*, 2007) o en el gen codificante (Granados-Gonzales *et al*, 2008).

2- Selectinas: son glicoproteínas transmembrana dependientes de iones calcio. Se conocen 3 tipos de selectinas: selectina endotelial (selectina E), selectina leucocitaria (selectina L) y selectina plaquetaria (selectina P) también presente en células endoteliales. La presencia de selectina L ha sido reportada en el segmento ecuatorial de espermatozoides humanos y en ovocitos humanos y de hámster luego de la adhesión del espermatozoide (Campbell *et al*, 1995), así como también en ovocitos y espermatozoides porcinos (Geng *et al*, 1997).

3- Integrinas: son heterodímeros formados por dos subunidades de unión a otras moléculas de adhesión celular o matriz extracelular. Las integrinas se describieron como receptores de ligandos espermáticos como vitronectina y fibronectina (Vuento *et al*, 1984; Fusi & Bronson, 1992), antígeno CD9 que cumple un rol esencial en la fusión con el ovocito (Ziyyat *et al*, 2006) y ADAM2

de la familia de las proteínas ADAMs, cuya región de unión a integrinas interactúa con el heterodímero α6β1 (Chen & Sampson, 1999). Las integrinas están formadas por dos subunidades no covalentemente unidas: α y β, de las cuales se conocen 24 subunidades α y 9 β, que pueden unirse en diferentes combinaciones. En ovocitos han sido descritas las combinaciones: α3β1, α5β1 y α6β1 para el caso de ratón (Tarone *et al*, 1993), αvβ5 y α5β1 en hámster (Fusi *et al*, 1992) y las cadenas α2, α4, α5, α6, αV, αL, β1, β2, β7 y β3 en humanos (Campbell *et al*, 1995; Bronson *et al*, 1996). En espermatozoides humanos se han descrito α4, α5, α6 y β1 (Klentzeris *et al*, 1995) y además se encontraron evidencias de cambios en la localización de los heterodímeros: mientras que α5β1 se observó en espermatozoides capacitados, αVβ3 se detectó en espermatozoides capacitados expuestos a ionóforo de calcio (Fusi *et al*, 1996). En particular, en ovocitos bovinos fueron descriptas las subunidades α2, α4, α6, β1, β2 y β3 (Pate *et al*, 2007).

4- Cadherinas: las cadherinas conforman una superfamilia de moléculas de adhesión celular dependiente de iones Ca^{2+}, cuya estructura, regulación y función se describen a continuación.

1.14 Las cadherinas

Las cadherinas son glicoproteínas que participan en la unión célula-célula, en forma dependiente de iones Ca^{2+}, de numerosos tejidos (Takeichi, 1991; Angst *et al*, 2001). En su mayoría son transmembrana y presentan una estructura con tres dominios: el extracelular, el transmembrana y el intracelular.

El dominio extracelular está formado por dominios Extracelulares Cadherina (EC), los cuales presentan sitios que determinan la especificidad de la unión. El dominio transmembrana presenta una estructura secundaria α-hélice y está compuesto por aminoácidos hidrofóbicos que interactúan con la bicapa lipídica a través de fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals. En el citoplasma de la célula se ubica el dominio intracelular o Carboxi-terminal (C-terminal). Esta región conecta las cadherinas con los filamentos de actina del citoesqueleto, a través de una unión necesaria para estabilizar la adhesión intercelular dependiente de cadherinas.

Los segmentos extracelulares presentan de 5 a 34 dominios cadherina EC, cuya característica distintiva es la presencia de sitios de unión a iones calcio (Ca^{2+}). Las conexiones entre los dominios son dirigidas por la asociación específica de 3 iones Ca^{2+} entre cada par de dominios sucesivos. La presencia de los iones Ca^{2+} es condición indispensable para la función adherente de las cadherinas, por lo que el nombre de los miembros de esta familia deriva de la abreviatura del término en inglés "calcium-dependent adherent protein" (proteínas adherentes dependientes de calcio) (Patel *et al*, 2003).

Basadas en la composición de los dominios, la organización genómica y la estructura molecular, la superfamilia de las cadherinas es usualmente dividida en seis subgrupos: **1-** cadherinas clásicas o de tipo I, **2-** cadherinas de tipo II, **3-** cadherinas desmosomales (desmocolina y desmogleina), **4-** protocadherinas, **5-** cadherinas con siete pasos transmembrana (7TM-cadherina) y **6-** FAT-like cadherinas (**Figura 34**). Además de las cadherinas que pueden clasificarse dentro de familias definidas, existen cadherinas que ocupan una posición única y aislada dentro de la superfamilia, como es el caso de T-cadherina (Gooding *et al*, 2004).

Las subfamilias de cadherinas se diferencian principalmente en las características de los dominios extracelulares, mientras que la región intracelular es muy similar en todos los grupos. Sin embargo, algunas diferencias en esta región producen distintos tipos de interacción con los componentes citoplasmáticos. Las cadherinas de "Tipo I" (cadherinas clásicas) y las de "Tipo II", se encuentran íntimamente relacionadas con el citoesqueleto de actina por medio de su asociación con moléculas adaptadoras llamadas cateninas. Por su parte, las cadherinas desmosomales (desmocolinas y desmogleinas) son proteínas transmembrana que forman parte de los desmosomas, sitios de unión célula-célula presentes particularmente en tejidos sujetos a fuerzas de tracción mecánicas (ej. en la epidermis del tejido epitelial y en el miocardio); su dominio citoplasmático se une a filamentos intermedios. Las protocadherinas se expresan principalmente en el sistema nervioso, interactúan con diversas proteínas implicadas en la transducción de señales, entre ellas integrinas, fascina y Fyn; por lo general, poseen una débil actividad adhesiva que frecuentemente no es dependiente de iones Ca^{2+} (Sano *et al*, 1993). La cadherina Truncada, T-

cadherina, es una cadherina de tipo I inusual ya que no posee el segmento transmembrana. Las cadherinas atípicas (entre ellas “FAT-like” y 7-TM) poseen uno o más dominios cadherina, pero no comparten ninguna otra característica distintiva con las cadherinas (**Figura 34**).

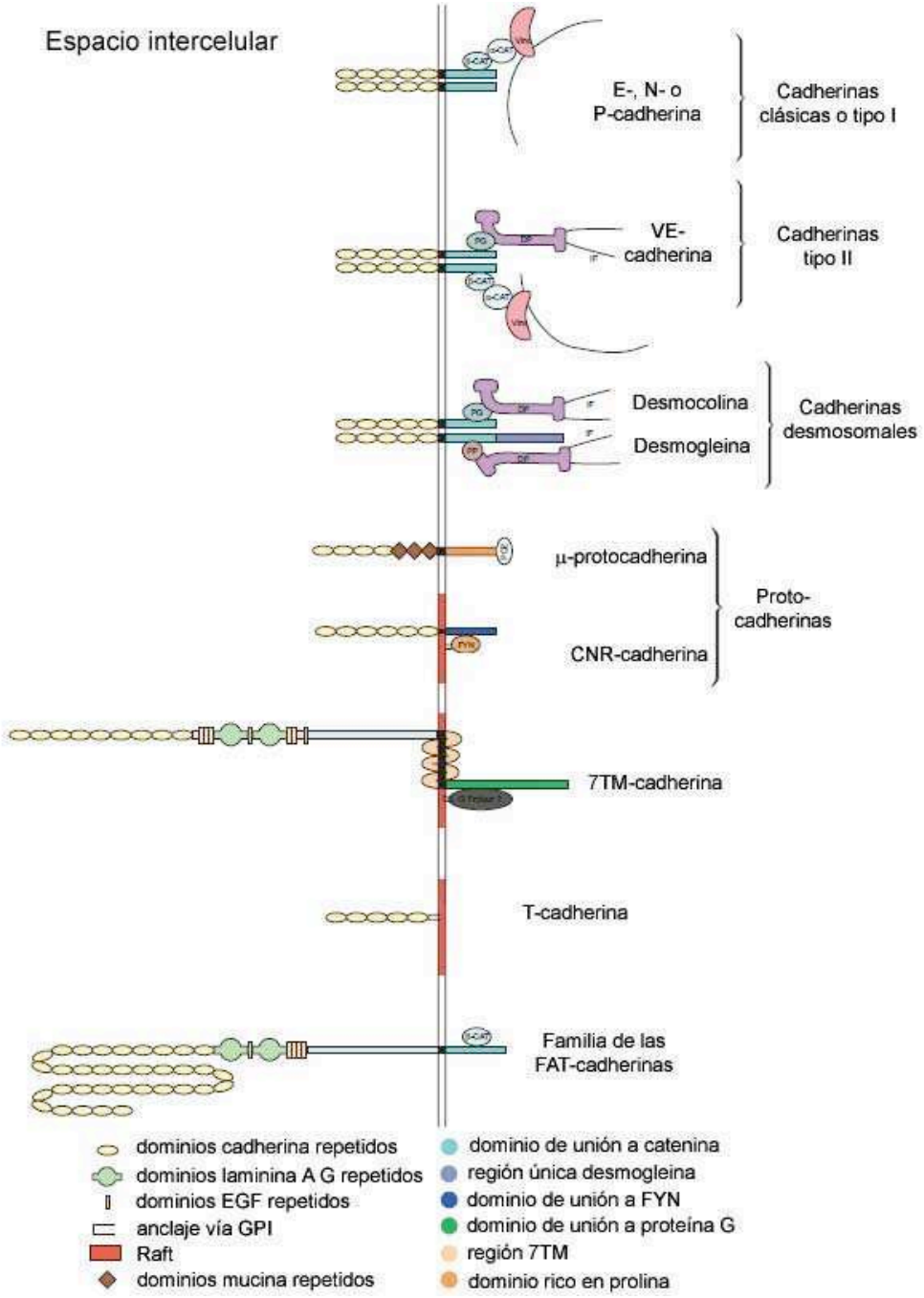


Figura 34: Representación esquemática de la superfamilia de las cadherinas (modificado de Angst *et al*, 2001).

Las primeras cadherinas en ser descriptas fueron las cadherinas clásicas o de tipo I; estas son proteínas con un simple paso transmembrana, que participan de uniones adherentes dependientes de iones Ca^{2+}. Estas cadherinas están involucradas en diversos procesos biológicos que incluyen: adhesión celular, morfogénesis, organización del citoesqueleto, migración celular así como también tienen un rol en patologías como el cáncer (Angst *et al*, 2001). Como reguladores de la morfogénesis, las cadherinas juegan un rol importante en la formación de sinapsis, integración de membranas, polarización y migración celular, interacciones con el citoesqueleto y modificaciones post-transcripcionales (Gooding *et al*, 2004). La adhesión celular mediada por cadherinas es fundamental para la diferenciación e integridad de la mayoría de los tejidos adultos (Gumbiner, 1996, 2005).

1.15 Cadherina Epitelial

Las cadherinas clásicas o tipo I comprenden un grupo de más de 30 miembros, entre los que se encuentran cadherina epitelial (cadE), cadherina neural (cadN), cadherina placentaria (cadP) y la cadherina endotelio vascular (cadVE). Las proteínas de este grupo se localizan principalmente entre las uniones adherentes mediando, a través de sus dominios extracelulares, la adhesión celular de manera dependiente de los iones Ca^{2+}; asimismo, se ha descrito que se comportan como receptores de la señalización y son activados por la adhesión (Yap & Kovacs, 2003), estimulando las vías de señalización intracelulares que afectan procesos tan diversos como ser cambios en el citoesqueleto (Mège *et a*l, 2006) y la proliferación celular (Perrais *et al*, 2007).

Cadherina epitelial, miembro fundador de la superfamilia de las cadherinas, fue descrita por primera vez por Takeichi en el año 1977 como una molécula de 150 KDa capaz de mantener las uniones célula-célula en una línea celular de manera dependiente de iones Ca^{2+} (Takeichi, 1977). Posteriormente fue encontrada como la molécula responsable de mantener las uniones entre las blastómeras en embriones murinos (Gumbiner & Simons, 1987), razón por la cual también fue denominada *uvomorulina*. Luego fue denominada cadherina epitelial por haber sido encontrada en numerosas células epiteliales pero no en fibroblastos (Yoshida-Noro *et al*, 1984).

La proteína está codificada por el gen *CDH1* ubicado en el brazo largo del cromosoma 16 en el humano y en el cromosoma 8 en el murino (Yagi & Takeichi, 2000). Hasta el presente se ha reportado que el gen *CDH1* se transcribe como un único ARN mensajero (ARNm) que luego es traducido a un precursor que se procesa para dar lugar a la proteína madura.

La pérdida de expresión y/o función de cadE ha sido asociada a distintos mecanismos regulatorios de la expresión, entre los que se encuentran la pérdida de heterocigocidad, las mutaciones específicas en la región codificante del gen *CDH1* que dan lugar a formas aberrantes truncadas no funcionales de la proteína, el silenciamiento epigenético asociado con la metilación de sitios CpG en la región promotora del gen y la represión transcripcional por factores de transcripción de la familia de “dedos de zinc” como Snail, E12/E47 y SIP1 y de la familia hélice-bucle-hélice, como Twist y Slug, se unen a las cajas “E” (“E-box”) del promotor de cadE, reprimiendo su expresión (Cleton-Jansen *et al*, 2001; Berx *et al*; 1996; Graff *et al*, 2000; Strathdee, 2002; Peinado *et al*, 2007; Vandewalle *et al*, 2005).

Como resultado de la transcripción del gen y traducción del ARNm se obtiene un precursor proteico de 882 aminoácidos con un Mr de 135 KDa (Shore & Nelson, 1991) (**Figura 35**). El clonado del ADNc de cadE murina predijo que este precursor es un polipéptido que posee una secuencia señal para su transporte desde el retículo endoplasmático a la membrana celular y que además contiene un pro-péptido (Nagafuchi *et al*, 1987). Ambos segmentos son removidos para dar lugar a la glicoproteína madura y funcional de 728 aminoácidos (residuos 155-882) y un tamaño aparente de 120 KDa. Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales, entre las que se destaca la fosforilación que regularía su asociación a las cateninas (Stappert & Kemler, 1994) y la glicosilación, en particular por N-glicanos, que también regula su función biológica y ha sido especialmente estudiada en modelos de carcinogénesis (Zhao *et al*, 2008).

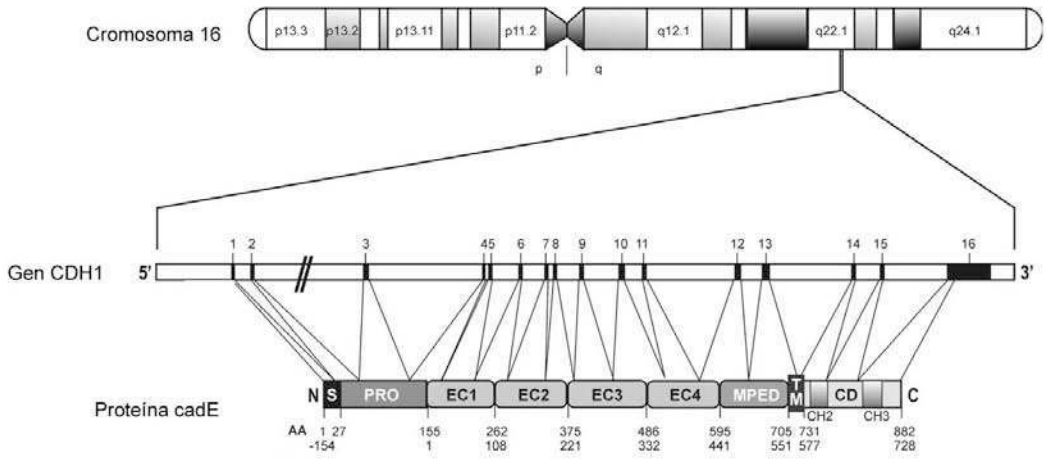


Figura 35: Estructura del gen de cadE *CDH1* y la proteína codificante, cadE, en el humano. El gen *CDH1*, se localiza en el cromosoma 16 en ubicación 16q22.1, consta de 16 exones que codifican una preproproteína de 135 KDa. AA, posición aminoacídica (la numeración comienza en la metionina del codón de iniciación o en el extremo amino terminal de la proteína procesada); C, carboxilo terminal; CD, dominio citoplasmático; CH, dominio de homología; EC, dominio extracelular cadherina repetido; MPED o EC5, dominio extracelular próximo a la membrana; N, amino terminal; PRO, propéptido; S, péptido señal; TM, región transmembrana (modificado de van Roy & Berx, 2008).

La forma madura de cadE de 120 KDa consta de un dominio extracelular (ECD, de sus siglas en inglés "extracellular domain") de 550 aminoácidos, un dominio transmembrana (TMD, de sus siglas en inglés "transmembrane domain") de 28 aminoácidos y un dominio citoplásmico (CD, de sus siglas en inglés "cytoplasmic domain") de 150 aminoácidos (**Figura 36**).

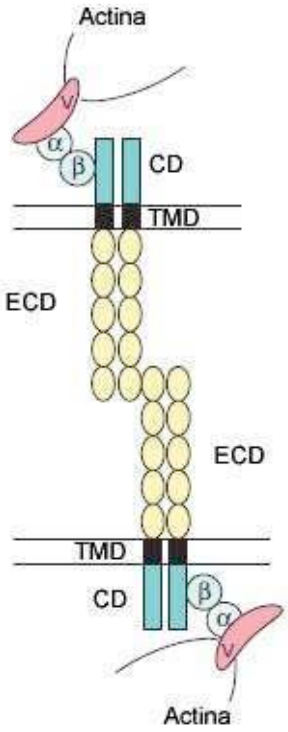


Figura 36: Representación esquemática de la interacción entre cadherinas clásicas en dos células. La imagen muestra una unión cadherina-cadherina, las moléculas constan de un dominio extracelular (ECD) que consiste en 5 EC repetidos, el dominio transmembrana (TMD) y el dominio citoplasmático (CD) por el cual la molécula de adhesión se une cateninas (β y α) y vinculina (v), las cuales anclan a la proteína de adhesión al citoesqueleto de actina (modificado de Angst *et al*, 2001).

El dominio extracelular se organiza en 5 subdominios cadherina repetidos en *tandem*, de aproximadamente 110 aminoácidos cada uno (EC1-EC5), de los cuales 10 de los residuos aminoacídicos están involucrados en la unión entre los dominios. En la unión interdominios se encuentran tres sitios responsables de la unión del ión Ca^{2+}. La unión del catión a la región extracelular de la cadherina tiene un efecto de protección contra la degradación por enzimas y estabiliza la unión entre los ectodominios. Cada dominio cadherina es codificado por dos o tres exones y sus límites no se corresponden con los límites de los exones (Berx *et al*, 1995).

El dominio citoplasmático es el más altamente conservado entre las cadherinas clásicas, se asocia a proteínas intracelulares como β-catenina, α-catenina y vinculina, que anclan la cadherina al citoesqueleto de actina (Angst *et al*, 2001; Gooding *et al*, 2004; Mohan *et al*, 2007; van Roy & Berx, 2008). Puede

ser subdividido en dos subdominios: el dominio próximo a la membrana, llamado dominio juxtamembrana (JMD) que contiene secuencias de unión a proteínas accesorias como p120-catenina (p120ctn) y el que contiene secuencias específicas a las cuales se une β-catenina y por ello es llamado dominio de unión a β-catenina (CBD; del inglés Catenin Binding Domain). La unión de estas moléculas forma el Complejo Asociado a Cadherina (CAC). El CAC es el encargado de otorgarle mayor estabilidad a la unión célula-célula, vinculando a las cadherinas con el citoesqueleto de actina a través de proteínas como α-actinina, vinculina y ZO-1 (Weis & Nelson, 2006). Además de las proteínas adaptadoras mencionadas se encuentra γ-catenina (también conocida como plakoglobina), que se asocia con otros miembros de la superfamilia de las cadherinas como la desmogleina y la desmocolina, pero que también es capaz de interactuar con las cadherinas clásicas en lugar de β-catenina (Rowlands *et al*, 2000).

La unión del dominio citoplasmático al citoesqueleto de actina a través de las cateninas permite el "clustering" o la agrupación de las cadherinas en la unión adherente, un proceso fundamental para su función adhesiva (Pertz *et al*, 1999). Como mencionamos anteriormente, otro miembro de la familia de las cateninas que puede interactuar directamente con el dominio citoplasmático de las cadherinas es p120ctn; si bien esta proteína no une a las cadherinas al citoesqueleto de actina, cambios en su fosforilación pueden influir de manera crítica en la adhesión (Rowlands *et al*, 2000; Daniel & Reynolds, 1997).

Cadherina epitelial media la adhesión celular a través de interacciones homofílicas de su dominio extracelular dependiente de iones Ca^{2+} y de la interacción de su dominio citoplásmico con las cateninas (Takeichi, 1993); sin embargo, como miembro de las cadherinas clásicas, cadE también puede establecer uniones de tipo heterofílicas (diferente tipo de cadherina) así como homotípicas o heterotípicas (mismo o diferente tipo celular). La unión de los iones calcio a los sitios conservados cambia la conformación de la proteína haciendo que el dominio EC adquiera rigidez, permitiendo la interacción entre cadherinas de células opuestas (Pertz *et al*, 1999), convirtiéndola en la forma activa (Yoshida-Noro *et al*, 1984).

En células somáticas, la regulación de cadE, su expresión y sus funciones han sido extensamente evaluada en la línea celular MCF7. Esta línea celular fue establecida a partir de un cáncer mamario humano, es una línea poco invasiva, pobremente metastásica y expresa altos niveles de cadE. En células MCF7, cadE muestra localización típica en membrana plasmática siendo más intensa en la región de contacto intercelular. Dicha localización es acompañada por la presencia de β-catenina y los filamentos de actina-F muestran la estructura característica de un cinturón continuo alrededor de la célula que co-localiza con cadE y β-catenina (Lapyckyj *et al*, 2010) (**Figura 37**):

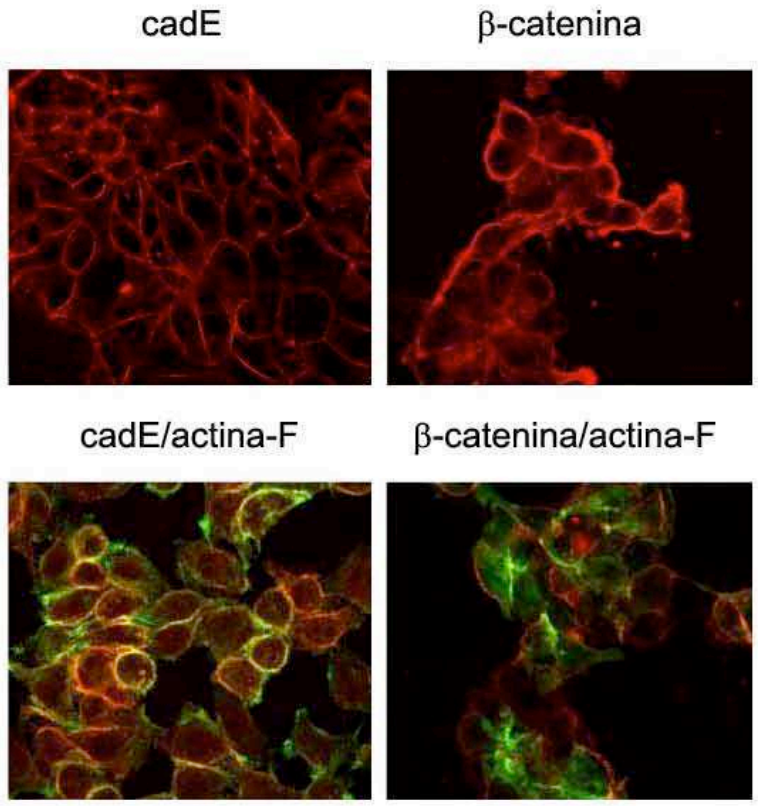


Figura 37: Localización típica de cadE en superficie celular y contacto célula-célula. La imagen muestra localización de cadE en superficie celular siendo mas intensa en la región de contacto de las células. La localización de cadE fue acompañada por la presencia de β-catenina. Ambas co-localizan con actina filamentosa (tomado de Lapyckyj *et al*, 2010).

La función adhesiva de la molécula de cadE ocurre por formación de dímeros en *cis* y la unión de éstos con dímeros previamente formados en *trans*. De los dominios cadherina extracelulares, el EC1 tiene la menor afinidad por el Ca^{2+}, lo cual asegura que se forme la dimerización *cis* una vez que toda la región

extracelular tenga la configuración adecuada. El EC1 posee una secuencia peptídica HAV (Histidina, Alanina, Valina) en la posición 79-81 implicada en la formación de las uniones homofílicas (Blaschuk *et al*, 1990; Zhu *et al*, 2003). La secuencia HAV reconoce y une el residuo triptofano (WV) del dímero en *trans*, se sabe que esta secuencia es esencial para el reconocimiento de la adhesión celular y que se encuentra conservada en todas las cadherinas clásicas (Nollet *et al*, 2000). Numerosos estudios han descrito que el EC1 de la cadherina da el carácter de especificidad de unión al proceso de adhesión homofílica en diferentes posiciones estructurales, sin embargo otros autores han demostrado que también podrían ser responsables los cinco dominios extracelulares (Sivazankar *et al*, 1999; Chappuis-Flament *et al*, 2001; Zhu *et al*, 2003). El EC5 posee cuatro cisteínas conservadas, la reducción de sus puentes disulfuro son los responsables de formar un fuerte contacto célula-célula. Por otra parte, en la unión heterofílica se destaca la unión cadherina-integrinas en la cual participa el EC5, en particular esto ha sido estudiado en la interacción entre $\alpha E\beta 7$ y cadE (Shiraishi *et al*, 2005).

Los dominios extracelulares poseen además sitios de reconocimiento por proteasas y metaloproteinasas que procesan la proteína resultando en formas de menor peso molecular observadas en ensayos de Western Immunoblotting. Entre las proteasas responsables de estos fenómenos se encuentran las metaloproteinasas 3, 7, 9, 14 y 15, plasmina y ADAM10 (De *et al*, 2007; Najy *et al*, 2008). Dicho procesamiento da lugar a una forma soluble de alrededor de 86 KDa conocida como ectodominio (McGuire *et al*, 2003) y un fragmento con el dominio transmembrana y la región citoplasmática. Otra forma de procesamiento de la proteína involucra a un motivo consenso único para el corte por caspasa-3 (DTRD-750) da un fragmento soluble citoplasmático de peso molecular aparente de 24 KDa y uno transmembrana truncado, cuando se desencadena la apoptosis en células epiteliales inducida por estaurosporina (Steinhusen *et al*, 2001) (**Figura 38**). También en el dominio citoplasmático se encuentra una región entre los aminoácidos 782-787 que sería el sitio de clivado por calpaína y daría lugar a una forma transmembrana de entre 97-100 KDa y una forma citoplasmática con unión a β-catenina de 35 KDa (Rios-Doria *et al*, 2003) (**Figura 38**).

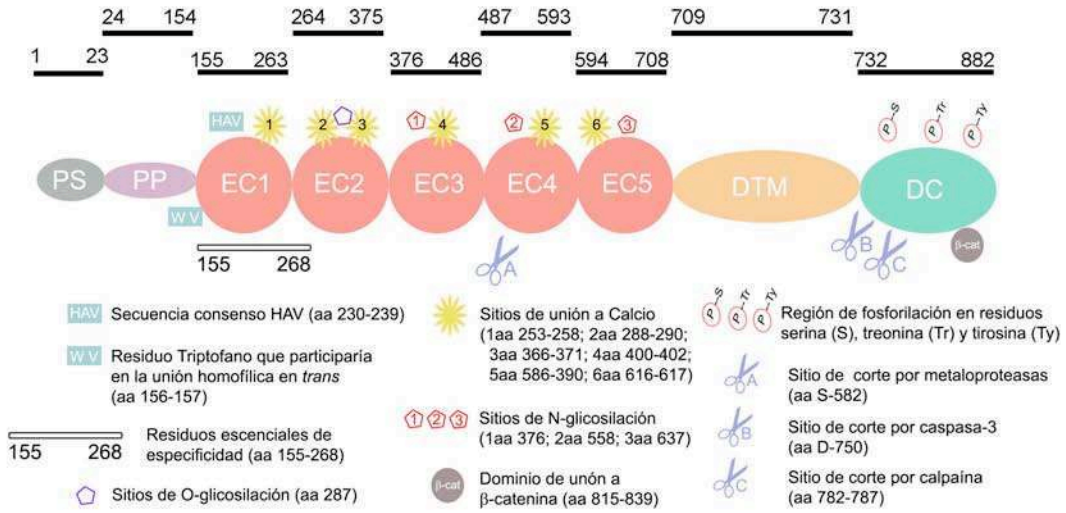


Figura 38: Representación esquemática de la molécula de cadherina epitelial. En el esquema se muestra la molécula de cadE con el péptido señal (PS) y el pro-péptido (PP) que luego se clivan para dar la proteína madura constituida por cinco dominios extracelulares cadherina (EC1-EC5), el dominio transmembrana (DTM) y el dominio citoplasmático (DC). Se puede observar además la secuencia HAV, el residuo triptofano (WV), los sitios de O-glicosilación, los sitios de N-glicosilación, los sitios de unión a calcio indicados en amarillo, las regiones de fosforilación en el dominio citoplasmático, el sitio de unión a β-catenina y los sitios de corte para las enzimas metaloproteasa, caspasa-3 y calpaína.

Extractos proteicos de células MCF7 muestran la forma completa para cadE que se corresponde con un PM de 120 KDa. Como se mencionó anteriormente, la actividad de metaloproteasas específicas da como resultado una forma proteica de 35 KDa asociada a la membrana plasmática de la célula, acompañada de la presencia del ectodominio de cadE de 86 KDa en el medio condicionado de incubación celular (**Figura 39**):

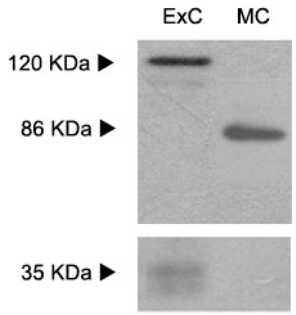


Figura 39: Formas proteicas esperadas para cadE en extractos proteicos de células MCF7. Se observan las formas correspondientes a la proteína completa de 120 KDa y al dominio citoplasmático de 35 KDa en extractos proteicos de células MCF7 (ExC), mientras que el ectodominio soluble de cadE de 86 KDa se observa en el medio condicionado de cultivo celular (MC).

El procesamiento de la molécula de cadE lleva a la disrupción de la adhesión celular o inhibición de la misma, originando un mecanismo alternativo al genómico de alteración de la función adhesiva normal.

Con respecto a los dominios de transmembrana y citoplasmático, se mencionó anteriormente que se conoce que interactúan con las proteínas p120ctn y β-catenina (o alternativamente plakoglobina) y α-catenina, asociando a cadE con el citoesqueleto de actina (**Figura 40**). El dominio citoplasmático tiene como función la regulación de la señalización. Este regula la polimerización de actina por activación del complejo de proteínas reguladoras de actina o Arp2/3 (de sus siglas en inglés, actin regulator protein). Proteínas G pequeñas de la familia de Rac1 se encuentran unidas a p120 y actúan sobre la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) unida a β-catenina. PI3K ejerce su acción sobre Arp2/3 induciendo la polimerización de actina (Noren *et al*, 2001; Goodwin *et al*, 2003). Las moléculas unidoras de actina también responden a las proteínas G pequeñas de la familia de Rho GTPasas (RhoA, Rac1 y Cdc42). La activación de proteínas G pequeñas de la familia de Rap1 también disminuye la formación del complejo y funciona a su vez como activador de la formación de adhesiones focales de integrinas (Balzac *et al*, 2005).

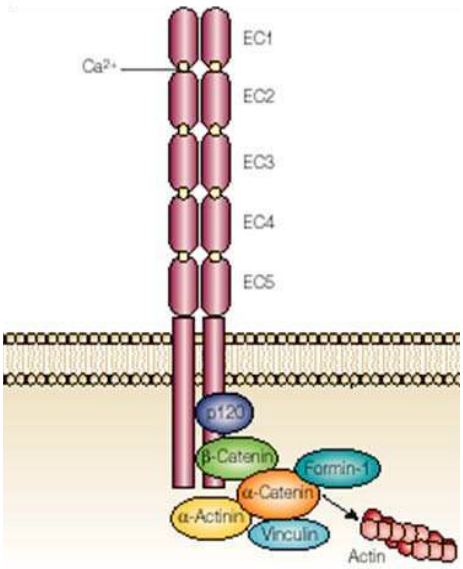


Figura 40: Uniones adherentes y el complejo clásico cadherina-catenina. CadE es un homodímero cis. La región extracelular consiste en cinco dominios tipo cadherina (EC1-5) dependiente de iones calcio (Ca^{2+}), un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático unido al citoesqueleto de actina a través del complejo catenina: p120 o β-catenina unida a α-catenina que se une directamente a actina o a través de moléculas de unión a actina (extraído de Gumbiner, 2005).

Luego de la formación del contacto intercelular por interacciones de los dominios extracelulares de cadE, la región citoplasmática une proteínas adaptadoras, β-catenina y actina, uniendo a la proteína de adhesión con el citoesqueleto de actina y fortaleciendo la interacción. Los cambios en las propiedades adhesivas de cadE son atribuidos a modificaciones post-transcripcionales, como se mencionó anteriormente la glicosilación es una de ellas; otras de las modificaciones pueden ocurrir a nivel de las proteínas del complejo adherente, dentro de estas modificaciones podemos nombrar la fosforilación en Ser/Thr y Tyr mediada por Src y caseina kinasas (Behrens *et al*, 1993; Dupre-Crochet *et al*, 2007; Lickert *et al*, 2000; Matsuyoshi *et al*, 1992). La fosforilación en tirosina de β-catenina o del dominio citoplasmático de cadE causa la disociación del complejo (Roura *et al*, 1999).

Además de proveer un enlace físico a las cadherinas con el citoesqueleto de actina, las cateninas están involucradas en vías de transducción de señales mediadas por receptores de membrana como Wnt, por lo que el estado de

adhesión celular puede influenciar o ser influenciado por la señalización intracelular (Daugherty & Gottardi, 2007). En ausencia de la señalización Wnt, β-catenina queda libre en el citoplasma y es degradada rápidamente; si la vía de señalización Wnt se encuentra activa, β-catenina se acumula en el citoplasma, entra al núcleo para actuar como co-factor de transcripción y modula la expresión de genes que estimulan la proliferación celular, entre ellos C-myc y ciclina D1. La pérdida o disminución de la expresión de cadE puede resultar en niveles aumentados de β-catenina citoplasmática, que interactúa con factores de transcripción de la familia de TCF (factores de las células T, "T-Cell Factor") y aumenta la transcripción de sus genes blanco (Willert & Jones, 2006; Daugherty & Gottardi, 2007).

Al ser una proteína integral de membrana, cadE es sintetizada en el retículo endoplasmático, donde se asocia a β-catenina y es transportada a la superficie celular de las células epiteliales. El tráfico de cadE en la célula se encuentra regulado por el contacto célula-célula. Eventos de fosforilación del dominio citoplasmático, ausencia de calcio y fallas en la glicosilación inducen la internalización de la molécula de adhesión. Esta internalización resulta en el reciclado de la proteína a la membrana plasmática o la marcación de la misma a través de la ubiquitinación y posterior degradación lisosomal (Palacios *et al*, 2005). Existen evidencias que sugieren que la unión de p120ctn al dominio juxtamembrana de cadE se encuentra involucrada en el tráfico celular de la proteína de adhesión (Bryant & Sotow, 2004).

La internalización de cadE es un proceso constitutivo que asegura su recambio metabólico y contribuye a la remodelación de contactos locales (**Figura 41**):

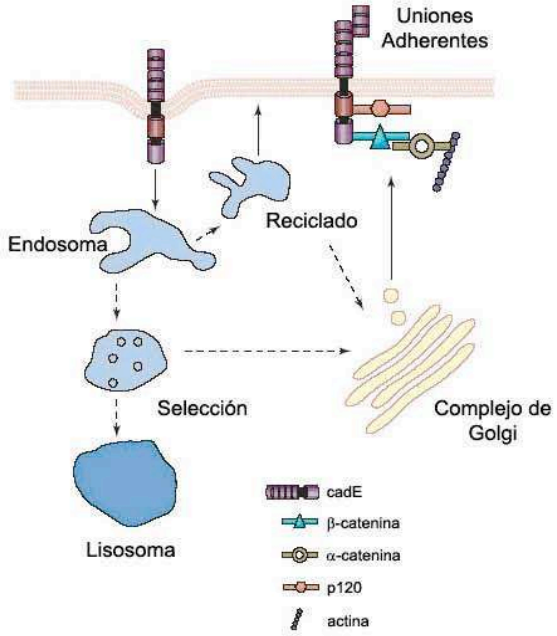


Figura 41: Vía endocitótica y exocitótica del tráfico de cadE en la célula. Las moléculas de cadE recién sintetizadas van por la vía del *trans* Golgi a la superficie celular donde se incorporan, junto con las cateninas conformando el complejo de unión adherente. Las moléculas de cadE de la superficie celular pueden ser endocitadas y tomar el camino de regreso a la superficie o bien seguir el destino de la degradación (modificado de Bryant & Stow, 2004).

La endocitosis puede alterarse debido a estímulos externos, por ejemplo, se ve aumentada cuando las células en cultivo se encuentran en estado de sub-confluencia. También se ha observado la disrupción de las uniones adherentes y la internalización de cadE en respuesta a la señalización de factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés, "Epidermal Growth Factor"). Se ha propuesto que, en el epitelio maduro polarizado, cadE forma y estabiliza las uniones adherentes que requieren pocos niveles de síntesis de cadE y sólo es necesario un pequeño "pool" de cadE para ser reciclado en la superficie celular (Bryant & Stow, 2004).

La endocitosis y la función de adhesión de cadE forman parte de un proceso dinámico que puede ser fisiológica y patológicamente alterado dependiendo del contexto celular. Son procesos opuestos ya que la endocitosis lleva al decaimiento de la función de cadE debido a que las moléculas de cadE libres en la membrana son removidas, impidiendo la interacción adhesiva. Por el contrario, la unión entre las moléculas de adhesión estabiliza a las mismas prolongando el tiempo de residencia en la superficie celular.

Además de la formación de uniones adherentes en todos los epitelios de los diferentes tejidos mamíferos se han identificado otras funciones de cadE entre las que pueden citarse: la separación de células durante la formación de los tejidos principalmente a través de la unión homofílica y en la fuerza de adhesión de las uniones (Nose *et al*, 1990; Duguay *et al*, 2003; Godt & Tepass, 1998), la morfogénesis tisular a través de la regulación fisiológica de la función adhesiva a la superficie celular y la interacción con otras moléculas de adhesión (Marsden & De Simone, 2003; Brieher *et al*, 1994), el movimiento celular particularmente durante la formación de tejidos (Marsden & De Simone, 2003; Geisbrecht & Montell, 2003) y la renovación tisular en tejidos adultos (Hermiston *et al*, 1996; Tinkle *et al*, 2004). En condiciones patológicas, se ha documentado que los tumores epiteliales pierden esta proteína parcial o totalmente a causa de mutaciones genéticas, silenciamiento epigenético, endocitosis o sobreexpresión de otras cadherinas no epiteliales (Frixen *et al*, 1991; Vleminckx *et al*, 1991; Perl *et al*, 1998).

1.16 Cadherina epitelial y neural y tejidos reproductivos

La presencia del ARN mensajero y formas proteicas de las cadherinas clásicas cadE y cadN ha sido descrita en el tracto reproductor femenino y masculino y gametas en humanos y diferentes modelos experimentales.

La literatura muestra resultados controversiales al respecto de la expresión de cadE en el tejido ovárico normal humano. Existen estudios que indican que la expresión de la molécula de adhesión por las células de la superficie del ovario varía de acuerdo a la localización dentro del ovario y a la forma celular. Independientemente de la localización se encuentra más prominentemente en células columnares, en forma variable en las cuboidales y ausentes en las “chatas” (Maines-Bandiera & Auersperg, 1997; Sundfeldt *et al*, 1997*;* Davies *et al*, 1998). En tejido endometrial normal, se observó expresión de cadE y de β-catenina en el citoplasma de células glandulares, predominantemente en la fase proliferativa, la expresión de ambas proteínas disminuye durante la fase secretoria (Shih *et al*, 2004). En tejido normal de ovario, trompas de falopio, endometrio uterino, cervix uterino y vagina, cadE se localiza en los límites de unión célula-célula del epitelio glandular y escamoso

(Inoue *et al*, 1992). En ovario fetal, cadE y cadN se expresan en todos los períodos gestacionales pero no muestran patrones idénticos de expresión. Las células epiteliales de los conductos de Müller expresan cadN, mientras que las células epiteliales del conducto de Wolff expresan solo cadE (Smith *et al*, 2010).

Estudios presentados en esta tesis, muestran la expresión específica de cadE en la estructura de la ZP y en el oolema y citoplasma de ovocitos humanos obtenidos de excedentes de procedimientos de reproducción asistida (Marín-Briggiler/Veiga *et al*, 2008). Asimismo, estudios recientes en células del *cumulus* humanas permitieron detectar cadE en la membrana plasmática y el citoplasma de las células (Wang *et al*, 2009).

En estudios realizados en el modelo de la rata, se ha demostrado la expresión de cadE y cadN en el ovario en período gestacional y prepuberal. En particular, se ha observado que cadE tendría un rol en la producción y mantenimiento de la arquitectura ovárica durante el desarrollo y la foliculogénesis; más aún, la expresión de cadE resultó ser dependiente del estadio folicular (Machell *et al*, 2000). Ambas cadherinas se encontrarían bajo regulación estrogénica en el ovario de la rata (MacCalman *et al*, 1994; MacCalman *et al*, 1995). La presencia de cadE ha sido reportada en los ovocitos de esta especie (Ziv *et al*, 2002).

En nuestro laboratorio la presencia de cadE y β-catenina fue inmunodetectada en cortes histológicos del oviducto en ambas fases del ciclo así como en cultivos de células oviductales bovinas; asimismo, ambas proteínas fueron localizadas en las células del *cumulus* y sus proyecciones así como en el oolema ovocitario, no observándose señal para la proteína en el primer corpúsculo polar (Caballero *et al*, resultados no publicados). Estudios preliminares sugieren además la expresión de cadN en el ovocito y células del *cumulus* de esta especie (Arzondo *et al*, resultados no publicados)

En cuanto a la expresión de cadE y cadN en el modelo murino, existen evidencias que sugieren que tanto el precursor como la forma madura de cadE son sintetizados en ovocitos murinos no fecundados y fecundados a partir del ARN mensajero materno hasta el estadio de dos células donde comienza a

sintetizarse a partir del genoma embrionario (Sefton *et al*, 1992). Respecto de cadN, Peluso & col. (2006), describieron su presencia en ovocitos de ratón y en la membrana plasmática de células de la granulosa, así como también en las proyecciones trans zonales de éstas células. Resultados recientes de nuestro laboratorio confirman la expresión de cadN en ovocitos murinos (Veiga *et al*, resultados no publicados).

Más recientemente, se describió la presencia y expresión del ARNm de cadE y cadN en ovarios de hámster (Wang & Roy, 2010). Estos autores observaron que el transcripto de cadN es el mensajero principal de cadherina en el ovario neonatal del hámster, y que en períodos postnatales cadN muestra expresión exclusiva en células de la granulosa de folículos primarios y secundarios, sin observarse localización en los ovocitos. Diferencialmente, cadE está presente en la membrana y el citoplasma del ovocito fetal de hámster y permanece hasta períodos postnatales (Wang & Roy, 2010).

En el tracto reproductor masculino, a partir de estudios de inmunohistoquímica en humanos, se describió la presencia de cadN en la superficie de espermatogonias y espermatocitos primarios, así como en las células endoteliales del testículo, mientras que en las células peritubulares y las células de Leydig no se detectó su expresión (Andersson *et al*, 1994). En el mismo estudio, los autores describen la detección de cadE en la superficie de las células principales del epitelio epididimario (Andersson *et al*, 1994). Respecto de la expresión de cadE y otros miembros de la familia de cadherinas clásicas en espermatozoides humanos, estudios preliminares han reportado la inmunodetección de cadE y cadN (Rufas *et al*, 2000; Purohit *et al*, 2004); sin embargo, los resultados son contradictorios. En base a estos antecedentes, nuestro grupo ha abordado la evaluación de cadE y cadN en órganos del tracto reproductor masculino y gametas; al respecto se ha realizado un análisis exhaustivo de la expresión de cadE en la gonada y epidídimo humano así como en espermatozoides en diferentes estadios funcionales, resultados que forman parte de esta tesis y que han sido publicados (Marín-Briggiler/Veiga *et al*, 2008). En relación a cadN, estudios de expresión del transcripto, así como inmunodetección de la proteína en extractos totales de la gonada y su presencia

en espermatozoides recuperados del testículo fueron recientemente reportados por nuestro grupo (Marín-Briggiler *et al*, 2010)

En el epidídimo de rata adulto, cadE ha sido localizada en células principales del epitelio epididimario y se ha descrito que los niveles del ARN mensajero son regulados durante el desarrollo epididimario postnatal y las concentraciones del ARNm de cadE son dependientes de andrógenos en este tejido. La regulación de la expresión del ARNm de cadE es dependiente del segmento epididimario; más aún, la proporción relativa del mensajero de cadE a lo largo del epidídimo y la localización así como la concentración relativa de cadE varían en función de la edad (Cyr *et al*, 1993). En el *caput* y *corpus* epididimario, las concentraciones del mensajero de cadE incrementan, presentando un máximo a los 42 días de edad. Esto se correlaciona con la conversión de testosterona a dihidrotestosterona en el epidídimo. En el segmento del *cauda* epididimario, sin embargo, la concentración del ARNm de cadE no se vio que aumente en función de la edad, indicando que esta proteína es regulada específicamente dependiendo del segmento (Cyr *et al*, 1995). Resultados similares fueron observados por otros autores que describen que tanto cadE como otras moléculas de adhesión, particularmente ocludina y ZO-1, mostraron patrones de localización segmento específico y dependiente de la edad. El cambio más dramático se observó a los 24 meses de edad de las ratas, en donde la intensa tinción para cadE en el citoplasma celular que se observó a los tres meses de edad, no se observó a los 24 meses, al igual que ocludina y ZO-1 en estos animales añosos (Levi & Robaire, 1999). Otros autores han descrito la presencia de proteínas de adhesión, incluyendo a cadE en espermatozoides de rata recuperados de testículo y epidídimo (Ziv *et al*, 2002).

Respecto de la expresión de cadherinas de tipo I y II en el ratón, Munro & Blaschuk (1996) describieron la presencia del ARNm de varios miembros de la familia en el testículo de ratones de varias edades; en particular los autores observaron que el trancripto de cadE se expresa en estadios tempranos del desarrollo, estando ausente en ratones de 21 días y adultos, mientras que cadN se encuentra presente en todos los estadios del desarrollo evaluados por estos autores, siendo su expresión mayoritaria a los 21 días y en ratones adultos. Asimismo, Mackay & col. (1999) localizaron cadE en la gonada indiferenciada,

específicamente en células de la línea germinal, en testículo de ratones en período gestacional. Se ha observado que los niveles de producción del ARNm murino de cadN son regulados hormonalmente en el testículo, determinándose que FSH estimula la producción del ARN mensajero y este estímulo puede ser aumentado por estrógenos (MacCalman *et al*, 1997). En otro trabajo se ha descrito la presencia de cadE y cadN en células germinales primordiales en el ratón (Bendel-Stenzel *et al*, 2000); además se ha demostrado un rol para cadE en la adhesión entre células germinales primordiales (Bendel-Stenzel *et al*, 2000; Okamura *et al*, 2003).

En estudios recientes utilizando estrategias de “microarrays”, Thimon & col. (2007) determinaron un incremento en el número de genes expresados en la región proximal del epidídimo correspondiente a transcriptos de las moléculas de adhesión célula-célula. Esta categoría de genes está compuesta por diferentes miembros de transcriptos de cadherinas, cateninas y claudinas (Thimon *et al*, 2007). En conjunto estas observaciones indican que las cadherinas juegan un importante rol en la organización del epitelio seminífero y epididimario.

En las secciones siguientes, se describen las metodologías y resultados obtenidos en el estudio de la expresión de cadE y otros miembros del complejo adherente en gametas y en tejidos reproductivos humano y murino, así como se muestran los resultados de los estudios realizados para evaluar la participación de cadE en eventos de adhesión del proceso de la fecundación en ambas especies.

Objetivos

El proceso de la **fecundación** involucra una serie compleja de interacciones moleculares entre componentes de las gametas femenina y masculina, a través de mecanismos que no han sido dilucidados en su totalidad. Durante este proceso, numerosos eventos dependen de la interacción y **adhesión** de diferentes tipos celulares por lo que proteínas miembro de familias de las moléculas de adhesión podrían jugar un rol importante. Asimismo, se sabe que el proceso de la fecundación depende de la presencia de **iones calcio**, los que están involucrados en el desarrollo de la funcionalidad del espermatozoide y de los eventos moleculares de la fecundación.

La molécula de adhesión **cadherina Epitelial** (cadE) es el miembro fundador de la superfamilia de moléculas de adhesión llamadas cadherinas. CadE es una glicoproteína transmembrana que participa en eventos de **adhesión célula-célula** en células epiteliales; como el resto de los miembros de esta superfamilia, su función es dependiente de la presencia de iones calcio. Se sabe que cadE está involucrada en procesos fisiológicos como la embriogénesis, organización y mantenimiento de los tejidos así como en procesos patológicos asociados a la progresión tumoral y la metástasis, en eventos moleculares relacionados a la adhesión celular y la transducción de señales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propone como **HIPOTESIS** que **cadE se expresa en los ovocitos y los espermatozoides, está presente en estructuras involucradas en el reconocimiento y adhesión entre las gametas y participa en eventos de la adhesión celular espermatozoide-ovocito que forman parte del proceso de la fecundación.**

Con el fin de responder la hipótesis, se proponen los siguientes **OBJETIVOS** generales y particulares.

2.1 Objetivos generales

- **PARTE I**: Evaluar la expresión y localización de la proteína de adhesión cadE en gametas humanas y evaluar la participación de la proteína en eventos de interacción de gametas. Evaluar la expresión de cadE en tejidos del aparato reproductor masculino. Evaluar la presencia de cadE

en espermatozoides de muestras de semen de individuos en tratamiento por infertilidad con técnicas de Reproducción Asistida de alta complejidad Fecundación *In vitro* (FIV) estándar y empleando Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

- **PARTE II**: Utilizar el modelo murino para estudiar la expresión de cadE y otras moléculas que conforman el complejo adherente (en particular β-catenina y actina) en tejidos reproductivos y en gametas y evaluar su participación en el proceso de la fecundación en el modelo murino.

2.2 Objetivos particulares

PARTE I: Estudios en el modelo humano

Para desarrollar los objetivos propuestos para la Parte I se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar la presencia, localización y formas proteicas de cadE y proteínas relacionadas (β-catenina y actina) en espermatozoides mótiles recuperados del eyaculado humano provenientes de donantes normozoospérmicos, utilizando ensayos de inmunocitoquímica y Western Immunoblotting con anticuerpos específicos.

- Analizar la localización de cadE en espermatozoides luego de la incubación en condiciones que promueven la capacitación y luego de la inducción de la exocitosis acrosomal utilizando ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos.

- Evaluar la presencia y expresión del ARN mensajero (ARNm) de cadE por medio de ensayos de retrotranscripción del ARN seguido de ensayo en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

- Caracterizar la secuencia codificante del ARNm de cadE del epidídimo humano a partir de una biblioteca de expresión y compararlo con el correspondiente al identificado en otras fuente de tejido ya caracterizadas.

- Evaluar las formas proteicas de cadE en extractos de proteínas totales de tejidos (testicular y epididimario) y fluidos (fluido del *cauda* epididimario y plasma seminal) del tracto reproductor masculino en ensayos de Western Immunoblotting con anticuerpos específicos y su localización en secciones histológicas del epidídimo humano por ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.

- Evaluar la presencia de cadE en ovocitos humanos en ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos.

- Desarrollar ensayos biológicos de interacción de gametas para evaluar la participación de cadE en eventos de adhesión celular ovocito-espermatozoide: 1) interacción con la estructura de la ZP (ensayo de hemizona; HZA) y 2) ensayo heterólogo de penetración de espermatozoides con ovocitos de hámster libres de ZP (SPA). Se emplearán estrategias de bloqueo con dos anticuerpos específicos para cadE dirigidos contra los dominios extracelulares de la proteína de adhesión.

- Evaluar la presencia de cadE en espermatozoides provenientes de pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de FIV e ICSI empleando ensayos de inmunocitoquímica y de Western Immunoblotting con anticuerpos específicos.

PARTE II: Estudios en el modelo murino

Para desarrollar los objetivos propuestos para la Parte II se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Realizar estudios de inmunodetección de las formas proteicas de las tres proteínas del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina, en extractos de proteínas de espermatozoides del *cauda* epididimario.

- Realizar estudios de inmunolocalización de las tres proteínas del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina, en espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario (espermatozoides no capacitados), incubados en condiciones

que promueven la capacitación (espermatozoides capacitados) y luego de ser expuestos a un inductor farmacológico que promueve la exocitosis acrosomal (espermatozoides reaccionados).

- Evaluar los patrones de actina filamentosa en espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario (espermatozoides no capacitados), incubados en condiciones que promueven la capacitación (espermatozoides capacitados) y luego de ser expuestos a un inductor farmacológico que promueve la exocitosis acrosomal (espermatozoides reaccionados).

- Evaluar la localización ultraestructural de cadE en espermatozoides de *cauda* epididimario por inmunomicroscopía electrónica de transmisión utilizando un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro coloidal.

- Evaluar la expresión de cadE en tejido testicular y epididimario de ratón, analizando la presencia de transcriptos codificantes de cadE en ensayos de RT-PCR y la presencia de la proteína utilizando técnicas de inmunohistoquímica y electroforesis en geles de poliacrilamida seguido de Western Immunoblotting con anticuerpos específicos.

- Evaluar la expresión de la proteína cadE en espermatozoides recuperados del testículo y de los diferentes segmentos del epidídimo.

- Evaluar la presencia de vesículas de tipo epididimosomas en el fluido de *cauda* epididimario de ratones adultos y analizar la presencia y expresión de cadE en dicha fracción vesicular empleando técnicas de inmunomicroscopía electrónica de transmisión y de Western Immunoblotting con anticuerpos específicos.

- Analizar la expresión de cadE y proteínas relacionadas (β-catenina y actina total y filamentosa) en células del *cumulus oophorus* y en ovocitos maduros de ratón empleando ensayos de inmunocitoquímica y Western Immunoblotting con anticuerpos específicos.

- Desarrollar ensayos de interacción de gametas para evaluar la participación de cadE en la interacción de gametas durante la fecundación. Para ello se llevaran

a cabo protocolos de 1) Fecundación *In Vitro* de Complejos Ovocitos *Cumulus* u Ovocitos denudados con espermatozoides previamente incubados con anticuerpos específicos para cadE, 2) Ensayos de interacción del espermatozoide con la estructura de la ZP y 3) Ensayos de unión y de fusión a la membrana plasmática del ovocito (oolema) con espermatozoides u ovocitos previamente incubados con anticuerpos específicos para cadE.

Materiales y Métodos

Parte I: Estudios de la expresión y localización de cadE en espermatozoides y ovocitos humanos. Evaluación de su participación en la interacción de gametas. Análisis de su expresión en testículo y epidídimo humano

3.I.1 Reactivos generales

Todos los reactivos empleados a lo largo del estudio fueron obtenidos de la firma Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU), excepto que se indique expresamente. Los insumos para electroforesis fueron obtenidos de la firma BioRad (Richmond, CA, EEUU) o indicados específicamente. Los reactivos para biología molecular utilizados fueron obtenidos de las empresas Qiagen (Hilden, Alemania) e Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU).

3.I.2 Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos dirigidos contra cadE humana (anti cadE) utilizados a lo largo del estudio fueron:

1) H-108 (anticuerpo policlonal) dirigido contra un segmento proteico comprendido entre los aminoácidos 600-707 (dominio cadherina 5) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, EEUU).

2) clon DECMA-1 (anticuerpo policlonal), que reconoce una secuencia localizada en la región comprendida por los dominios cadherina 4 y 5 de cadE murina (Ozawa *et al*, 1990) (Sigma).

3) clon 610181 (anticuerpo monoclonal) que reconoce una secuencia localizada en la región comprendida entre los aminoácidos 773 y 791 (dominio citoplasmático) (Chitaev & Troyanovsky, 1998) (BD Biosciences, San Diego, CA, EEUU).

4) clon HECD-1 (anticuerpo monoclonal) que reconoce una secuencia localizada en la región comprendida entre los aminoácidos 333-379 (dominios cadherina 2) (Becker *et al*, 2002) (Zymed; South San Francisco, CA, EEUU)

5) clon SHE78-7 que reconoce una secuencia localizada en la región comprendida entre los aminoácidos 178-245 (dominio cadherina 1) (Laur *et al*, 2002) (Zymed).

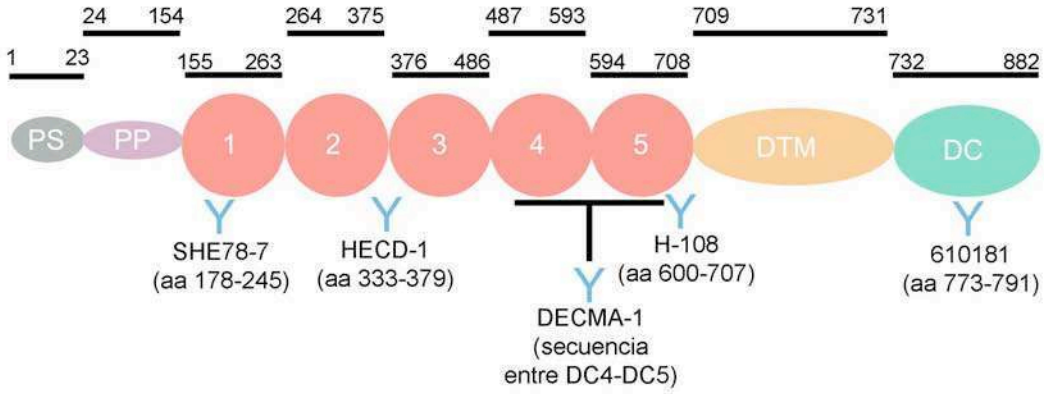


Figura 3.I.1: Representación esquemática de los dominios de reconocimiento de los anticuerpos anti cadE humana utilizados en los diferentes ensayos. El dibujo muestra la molécula de cadE con el péptido señal (PS) y propéptido (PP); los dominios extracelulares cadE (EC 1-5), el dominio transmembrana (DTM) y el dominio citoplasmático (DC). En la parte superior se indican la posición de los aminoácidos (aa) de la molécula.

Asimismo, para la detección de las proteínas del complejo adherente β-catenina y actina se usaron los siguientes anticuerpos: anti β-catenina, 610153 (anticuerpo monoclonal) (BD Biosciences) y 06-734 (anticuerpo policlonal) (Upstate, Lake Placid, NY, EEUU); anti actina: I-19 (anticuerpo policlonal) (Santa Cruz Biotech), A2668 (anticuerpo policlonal) (Sigma) y clon ACTN05 (anticuerpo monoclonal) (Neomarkers, Basel, Suiza).

A lo largo del desarrollo del proyecto, se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios:

Para los ensayos de inmunocitoquímica: anti inmunoglobulina G (IgG) de conejo acoplado al colorante fluorescente CY3 (Chemicon-Millipore), anti IgG de ratón acoplado a CY3 (Sigma) y anti IgG de rata acoplado al colorante fluorescente Texas Red (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, EEUU).

Para los ensayos de "Western ImmunoBlotting" (WIB): anti IgG de ratón o conejo, según corresponda, acoplados a la enzima peroxidasa (Vector Lab. Inc.).

Las siguientes IgGs purificadas del suero de animales no inmunizados fueron utilizadas como controles negativos en los diferentes experimentos: IgG

normal de conejo (I5006, Sigma), IgG normal de ratón (I5381, Sigma) e IgG normal de rata (10700, Caltag Lab, Invitrogen).

3.I.3 Medios de cultivo

Para los ensayos en los que se utilizaron gametas humanas se emplearon los medios de cultivos que se describen a continuación:

1) medio HSM (Human Sperm Medium) (Suarez *et al*, 1986): NaCl 0,68% p/v, NaH_2PO_4 0,003% p/v, KCl 0,06% p/v, $Cl_2Ca.2H_2O$ 0,03% p/v, $MgCl_2$ 0,05% p/v, glucosa 0,036% p/v, lactato de sodio 0,26% v/v, $NaHCO_3$ 0,21% p/v, piruvato de sodio 0,003% p/v, estreptomicina 0,005% p/v, penicilina 0,007% p/v.

2) medio BWW (Biggers-Whitten-Whittingham) (World Health Organization, 1999): NaCl 0,55% p/v, KCl 0,03% p/v, $CaCl_2.2H_2O$ 0,02% p/v, KH_2PO_4 0,01% p/v, $MgSO_4.7H_2O$ 0,01% p/v, $NaHCO_3$ 0,21% p/v, glucosa 0,1% p/v, lactato de sodio 0,36% v/v, piruvato de sodio 0,003% p/v, estreptomicina 0,005% p/v, penicilina 0,007% p/v.

3) medio HTF (Human Tubal Fluid) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EEUU) (sin formulación disponible).

Los medios fueron suplementados con albúmina sérica humana (HSA, del inglés Human Serum Albumin) o albúmina sérica bovina (BSA, del inglés Bovine Serum Albumin), según se indica en cada protocolo.

3.I.4 Procedimientos de laboratorio

Todos los procedimientos de laboratorio desarrollados en el curso del proyecto se realizaron siguiendo normas aceptadas de seguridad química y biológica.

3.I.5 Muestras biológicas

Todas las muestras biológicas humanas usadas en esta parte del proyecto (semen, suero, orina, fluido folicular, ovocitos y tejidos reproductivos) se obtuvieron bajo consentimiento escrito de los donantes. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, del Instituto de Biología y Medicina Experimental, del centro Médico Fertilab (Buenos Aires, Argentina) y del Instituto de Fertilidad IFER (Buenos Aires, Argentina) (ver **Apéndice A**).

3.I.6 Obtención de tejidos y gametas

Los tejidos testicular y epididimario humanos fueron obtenidos de pacientes adultos sometidos a un procedimiento quirúrgico de orquidectomía radical como tratamiento del carcinoma prostático realizado sin tratamiento hormonal previo a la cirugía.

Las muestras de semen humano provenientes de donantes normozoospérmicos se evaluaron siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1999). Las muestras se obtuvieron por masturbación luego de un período de abstinencia sexual de 2 a 4 días. El eyaculado fue recogido en envase estéril, manteniéndose a 37º C hasta completar la licuefacción. En todos los casos se realizó un examen de rutina del semen, con determinación de volumen de muestra, concentración y motilidad subjetiva, empleando las metodologías que se detallan más adelante (World Health Organization, 1999). Solo se incluyeron en los estudios las muestras que presentaron más del 80% de los espermatozoides vivos en el eyaculado, 75% de motilidad progresiva y 14% de formas normales según el criterio estricto inicialmente descrito por el Dr. T. Kruger (Kruger *et al*, 1986).

Además de las muestras de los donantes, se evaluaron muestras de semen de pacientes en tratamiento por infertilidad. En este caso se procesaron alícuotas del semen de pacientes en tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad empleando técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) y/o inyección intracitoplasmática de espermatozoides en el ooplasma (ICSI, del inglés,

Intracytoplasmic Sperm Injection). En algunos casos las alícuotas de semen fueron previamente congeladas. En esos casos, se hicieron también procedimientos de criopreservación con muestras de donantes normozoospérmicos.

Los ovocitos humanos se obtuvieron de mujeres que se encontraban bajo tratamiento por infertilidad con procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad en la clínica Fertilab. En todos los casos, las mujeres fueron menores de 35 años y fueron tratadas por diagnóstico de infertilidad de su pareja o bien por patología de causa femenina que no afecta la calidad ovocitaria. Los ovocitos donados para la realización de los ensayos constituyen material excedente o de descarte (no inseminados por presentar signos de inmadurez o atresia, estado que no compromete la calidad de la ZP). Para la obtención de los ovocitos, las donantes fueron sometidas a protocolos de superovulación como parte del tratamiento de reproducción asistida. La recolección de los complejos ovocito *cumulus* se realizó 36 horas después de la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG, del inglés human Chorionic Gonadotropin), por aspiración transvaginal guiada por ultrasonido. Los complejos ovocitos *cumulus* se incubaron por 6-8 horas en medio HTF para completar su maduración. Pasado dicho tiempo, se removieron las células del *cumulus oophorus* por tratamiento con 80 UI de hialuronidasa durante 20 segundos seguido por lavado con buffer fosfato salino Dulbecco (PBS-D: $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,22% p/v; KH_2PO_4 0,02% p/v; $CaCl_2$ 0,01% p/v; KCl 0,02% p/v; NaCl 0,8% p/v; $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,01% p/v) y procesamiento posterior para detección de proteínas en ensayos de inmunocitoquímica. Para su uso en el ensayo de hemizona (HZA) (ver más adelante), los ovocitos fueron almacenados en una solución de alta concentración salina (buffer Tris 0,1 M (pH 7,0) con $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 M y dextrano al 0,5% p/v) a 4º C hasta ser utilizados.

Los ovocitos de hámster fueron recolectados y procesados como se describe en el manual de la OMS (World Health Organization, 1999). Brevemente, se realizó un protocolo estándar de estimulación de hembras de 8 a 12 semanas de vida. Las hembras fueron inyectadas Intra-Peritonealmente (IP) con 30 UI de gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMSG, del inglés Pregnant Mare Serum Gonadotropin; Sigma-Aldrich) a las 11 horas del día 1 del

protocolo. Pasadas las 48 horas, se administró de la misma manera y en la misma dosis la hormona hCG. Los complejos ovocito *cumulus* fueron recuperados por punción de la región de la *Ampulla* del oviducto 14 a 18 horas post-inyección de hCG. Para obtener ovocitos libres de células del *cumulus oophorus* (ovocitos con ZP), dichas células se incubaron durante 1-2 minutos con 30 mg/ml de hialuronidasa (Sigma-Aldrich) en medio BWW, luego de lo cual los ovocitos se lavaron por tres pasajes sucesivos en gotas de medio. Para remover la ZP, los ovocitos libres de células del *cumulus oophorus* se incubaron por no más de 5 minutos en presencia de 0,5 mg/ml de tripsina en medio BWW y se lavaron inmediatamente con pasajes sucesivos en gotas de medio. En la **Figura 3.I.2** se presenta un esquema general del procedimiento.

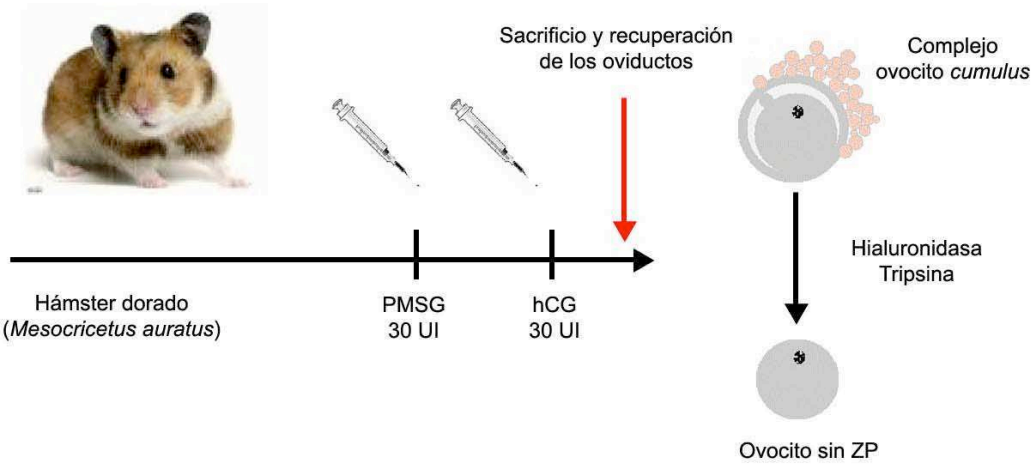


Figura 3.I.2: Diagrama esquemático del protocolo de superovulación de hembras de hámster y tratamiento de los ovocitos.

En la **Figura 3.I.3** se muestran fotografías correspondientes al protocolo de recuperación de los complejos ovocito *cumulus* de la sección de la *Ampulla* del oviducto y posterior tratamiento enzimático de los mismos.

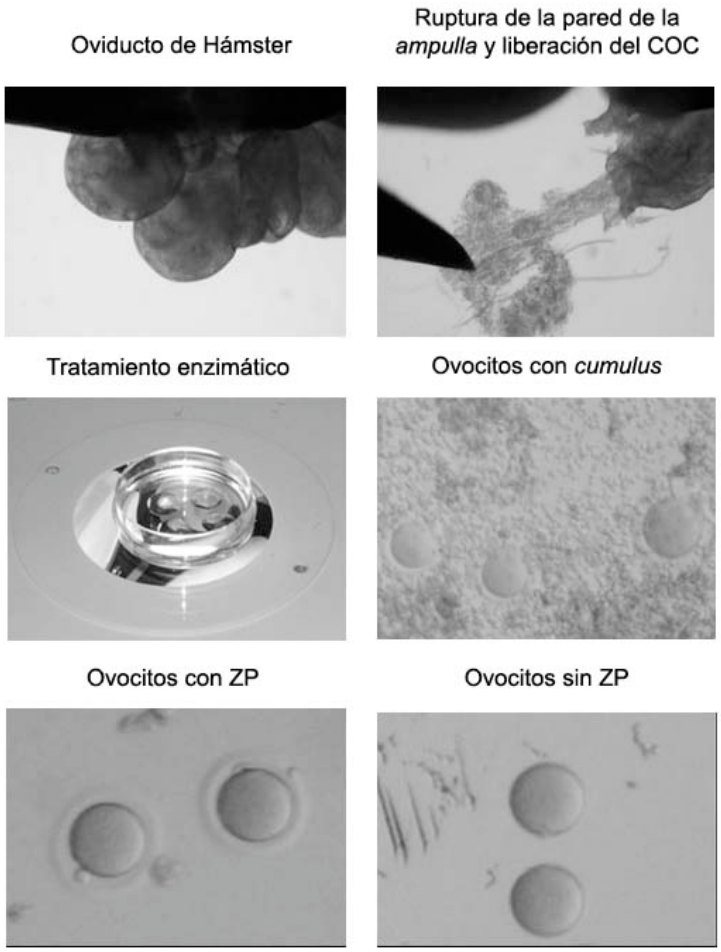


Figura 3.I.3: Imágenes correspondientes al protocolo de recuperación de ovocitos de hámster y tratamiento enzimático de los ovocitos para eliminar las células del *cumulus oophorus* y ZP. COC: complejo ovocito *cumulus*.

El manejo de los ovocitos humanos y de hámster se llevó a cabo en cápsulas de Petri, en gotas de medio de cultivo cubiertas con aceite mineral y mantenidas a 37º C en atmósfera gaseada. La manipulación de los mismos se realizó bajo lupa estereoscópica, utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetro de sección adecuado para cada paso.

3.I.7 Criopreservación de las muestras de semen

Para la criopreservación de las muestras de semen de donantes de fertilidad comprobada y de pacientes se tomó una alícuota de semen fresco (0,5-2,0 ml) y se diluyó con un volumen igual de buffer de criopreservación (TEST Yolk Buffer, Irvine Scientific, Sta. Ana, CA, EEUU) y se dejó estabilizar por 10 minutos a temperatura ambiente en un criovial (Cryovial, Simport Plastics,

Beloeil, Canadá); posteriormente se almacenó a 4º C por 30 minutos, seguido de tres descensos de 20 cm en vapores de nitrógeno de 10 minutos cada uno, para finalmente sumergirlo en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso.

Para la recuperación de espermatozoides criopreservados, se tomó el criovial del termo de nitrógeno líquido y se lo colocó durante dos minutos en agua a 35º C. Posteriormente, las muestras se procesaron para ensayos de inmunocitoquimica y WIB.

3.I.8 Caracterización de la secuencia codificante del transcripto de cadE epididimario empleando una biblioteca de expresión

Para caracterizar la secuencia de ARNm codificante de cadE epididimaria se realizó un "screening" de la biblioteca de expresión de ARN de epidídimo humano adulto construida en nuestro laboratorio en conjunto con la empresa Stratagene, para lo cual se eligió el vector unidireccional Lambda ZAP Express® (Stratagene, San Diego, CA, EEUU). Las características principales de la biblioteca se detallan a continuación:

Sitio de clonado : *EcoR* I y *Xho*I

Tamaños de inserto: 0,7-4 kb (calculado a partir de 12 clones tomados al azar)

Tamaño promedio de inserto: 2,0 kb (calculado a partir de 12 clones tomados al azar)

Título estimado de la biblioteca (no amplificada): 5×10^6 pfu/ml

Título estimado de la biblioteca (amplificada): $3,1 \times 10^9$ pfu/ml (representa 10^6 recombinantes)

Estimación de no recombinantes: 3%

Para el “screening” se empleó un anticuerpo anti cadE policlonal específico (H-108) utilizando un kit comercial (*pico*Blue™ Immunoscreening kit, Stratagene) siguiendo protocolos sugeridos por la empresa Stratagene. Brevemente, las bacterias fueron crecidas en cultivo líquido junto con los fagos. Posteriormente las bacterias conteniendo los fagos fueron mezcladas con agar top, plaqueadas y crecidas sobre placas conteniendo LB Agar y tetraciclina con alta densidad de playas de lisis (50.000 playas de lisis/placa). Para la identificación de colonias expresadoras de cadE, se colocaron discos de membranas de nitrocelulosa, sobre las placas de Petri conteniendo los cultivos bacterianos y se dejaron incubando (3,5 horas a 37º C) para permitir la activación del fago y lisis bacteriana. Una vez finalizada la incubación se removió la membrana, se lavó en medio TBS-Tween 0,05% y se sometió a un protocolo de revelado. Inicialmente, el bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó por incubación toda la noche a 4º C en buffer TBS suplementado con BSA 1% (p/v) y posteriormente se incubó con anticuerpo anti cadE H-108 (0,4 µg/ml, toda la noche a 4º C); finalizada la incubación, se removió el anticuerpo no unido (3 lavados de 5 minutos cada uno en TBS-Tween 0,5%) y se incubó con el segundo anticuerpo anti conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1:5.000). Finalmente se removió el anticuerpo no unido por lavados como se indicó anteriormente y se incubó en presencia de la solución de revelado aportada por el kit comercial. Una vez completada la primera ronda de "screening", se identificó un grupo de positivos, se recuperaron y se volvieron a plaquear, se sometieron a revelado siguiendo el mismo protocolo que el mencionado previamente. Luego de 3 rondas de "dilución y re-screening" los positivos fueron clonados. Para continuar con su caracterización, se obtuvieron los fagémidos.

Para la obtención de los fagémidos, las bacterias se incubaron en buffer SM (NaCl 0,58% p/v, $MgSO_4$. $7H_2O$ 0,2% p/v, Tris-HCl 1M (pH 7,5) 5% v/v, gelatina (2%) 0,5% v/v) y cloroformo y se centrifugaron para obtener las partículas de los fagos en el medio SM. Los fagos, junto con células KL1-Blue MRF (catálogo N° 200230) y el fago ExAssist helper (catálogo N° 211203), fueron incubados durante 15 minutos a 37º C, luego de lo cual se agregó medio NZY (NaCl 0,5% p/v, $MgSO_4$. $7H_2O$ 0,2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, caseina 1% p/v) y se incubaron durante 2,5-3 horas a 37º C; pasado dicho tiempo la mezcla se calentó (60-70º C, 20 minutos) y centrifugó (1.000 xg, 15

minutos) para obtener en el sobrenadante los fagémidos, los que se incubaron en presencia de células XLOLR por 15 minutos a 37º C y 45 minutos adicionales con el agregado de medio NZY. Finalmente se incubaron en placas con LB Agar y kanamicina (50 µg/ml). Las colonias que aparecieron en la placa contenían el fago vector con el inserto de ADN clonado.

Posteriormente se procedió a purificar el ADN de los fagémidos, los que fueron sujetos a una PCR estándar con los cebadores T3 y T7 (secuencias T3: 5´-AATTAACCCTCAACTAAAGGG-3´; T7: 5´-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3´) flanqueantes a las secuencias de los extremos de los clones seleccionados. Finalmente se determinó la secuencia completa de los clones, para lo cual se diseñaron cebadores a medida que se iba determinando la secuencia de los insertos de los clones evaluados.

La determinación de la secuencia nucleotídica de los clones seleccionados se llevó a cabo en el Core Research Center de la Universidad de Chicago (Chicago, IL, EEUU). Una vez caracterizada la secuencia, se evaluó su similitud con la secuencia ya reportada para cadE (NM_004360). Para eso se emplearon programas bioinformáticos de dominio público (ver Sección 3.I.19).

3.I.9 Evaluación de los niveles de expresión del transcripto de cadE en testículo y epidídimo humano

Se evaluaron los niveles de expresión del transcripto de cadE en la gonada masculina y las diferentes regiones del epidídimo. Para ello, se purificó ARN total de testículo humano y de *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario utilizando un kit comercial (RNeasy® kit, Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El principio del kit consiste en utilizar una columna compuesta de sílica capaz de unir selectivamente el ARN. Luego de obtener el homogenato de la muestra de tejido con buffers desnaturalizantes conteniendo inhibidores de enzimas que degradan el ARN (ARNasas), éste es vertido en la columna, y lavado varias veces con buffers especiales de modo tal de eliminar proteínas y otros componentes distintos del ARN. Finalmente, el ARN es eluido de la columna con agua. Se utilizó en cada procedimiento aproximadamente 30 mg de tejido. El lisado y homogenización de las muestras se realizó en presencia de buffer RLT

conteniendo 1% β-mercaptoetanol. Para el lisado y homogenización de los tejidos se empleó un homogeneizador eléctrico (Polytron, Kinematica, Lucerna, Suiza). El homogenato fue centrifugado por 3 minutos a 14.000 xg y el sedimento fue resuspendido en un volumen de etanol al 70%. Posteriormente, parte de la muestra disuelta en etanol fue colocada en la "RNeasy Spin Column" provista por el kit y centrifugada por 15 segundos a 10.000 xg. Luego, se llevaron a cabo lavados sucesivos con 700 µl del buffer RW1 y 500 µl del buffer RPE, centrifugando 15 segundos a 10.000 xg cada vez. Finalmente, el ARN purificado fue eluido con 30 µl de agua libre de ARNasas, centrifugando 1 minuto a 10.000 xg. Una vez completado el procedimiento, el ARN obtenido fue cuantificado utilizando el fluorímetro RNA Qubit (Invitrogen) y almacenado a -70º C hasta el momento de su uso.

Seguidamente, a partir del ARN se obtuvo el ADN complementario (ADNc) usando una mezcla de reacción conteniendo el ARN total, el cebador o "primer", oligo dT (ADN sintético compuesto por nucleótidos con base timina, complementario a la terminación poliadenilada presente en el ARN mensajero), dNTPs (mezcla de deoxinucleotido trifosfatos dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la enzima transcriptasa reversa SuperScript II® (Invitrogen). En todos los casos se preparó una mezcla de reacción de 20 µl empleando cantidades sugeridas por la empresa de producción de los reactivos de retrotranscripción (Invitrogen). La mezcla se compone de: 1-2 µg de ARN, Oligo dT_{15} (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), mezcla de dNTPs (Invitrogen) y agua destilada estéril (Invitrogen). Se calentaron 5 minutos a 65º C para disociar interacciones en el ARN que llevan a la formación de estructuras secundarias. Luego se agregó buffer para la enzima "First Strand Buffer" (250mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), ditiotritol (DTT) e inhibidores de ARNasas ("RNaseOUT", Invitrogen). Posteriormente se incubó 2 minutos a 42º C y se adicionó la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Se incubó 50 minutos a 42º C y finalizado este período se inactivó la enzima mediante 15 minutos de incubación a 72º C. En todos los ensayos, se incluyeron controles negativos en los que se omitió el agregado a la mezcla de reacción de la enzima transcriptasa reversa o el molde de ARN.

Posteriormente se desarrollaron protocolos de PCR para determinar la presencia del transcripto de cadE en los tejidos epididimario y testicular (PCR a punto final seguido de una electroforesis en geles de agarosa) y para cuantificar los niveles de expresión del trancripto en ambos tejidos (PCR en tiempo real). En ambos protocolos se utilizaron los siguientes cebadores para cadE:

"forward" 5´-GACCAAGTGACCACCTTAGA-3´
"reverse" 5´-CTCCGAAGAAACAGCAAGAGC-3´.

Se utilizó como gen de expresión constitutiva al gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH, del inglés Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Los cebadores utilizados fueron:

"forward": 5´-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3´
"reverse": 5´-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3´.

Para el análisis de los cebadores diseñados se empleó el programa "OligoAnalyzer3.1" (http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/). En el diseño se tuvo en cuenta que éstos amplifiquen fragmentos que contengan más de un exón; de esta manera se puede determinar la amplificación específica del transcripto y distinguir, en caso que la hubiese, contaminación con ADN genómico, ya que en dicho caso el fragmento amplificado es de mayor tamaño dado que incluye la secuencia intrónica. Asimismo, se tuvo en cuenta que los cebadores no formen dímeros ni estructuras secundarias de alta estabilidad, que no presenten repeticiones invertidas ni repeticiones de un mismo nucleótido; finalmente, para el diseño se evitó la presencia de 2 o más G/C en la región 3' de la secuencia del cebador.

El tamaño esperado para los fragmentos de cadE y GAPDH fue de 172 y 87 pares de base, respectivamente.

PCR a punto final: Para estos ensayos de PCR, se prepararon mezclas de reacción conteniendo el buffer formulado para funcionamiento adecuado de la enzima TAQ polimerasa de Invitrogen-Life Technologies (stock 10x), molde de ADNc, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 mM de cada uno, Invitrogen-Life

Technologies), $MgCl_2$ (“stock” 50 mM), cebadores “forward” (“stock” 25 µM) y “reverse” (“stock” 25 µM) y enzima Taq polimerasa (1,25 U/µl), cantidades sugeridas por el proveedor. En todos los ensayos se incluyeron un control negativo en el que se omitió el agregado de ADNc y un control positivo de PCR en el que se utilizó una fuente de ADNc en el que se había comprobado con anterioridad la presencia del transcripto de interés.

El protocolo de amplificación para cadE incluyó:
1) Desnaturalización inicial: 94º C, 1 minuto;
2) Desnaturalización: 94º C, 1 minuto;
3) Hibridación: 58º C, 1 minuto;
4) Extensión/Elongación: 72º C, 1 minuto;
repetición de pasos 2) a 4) 35 veces totales y
5) Extensión final: 72º C, 5 minutos.

El protocolo de amplificación GAPDH incluyó:
1) Desnaturalización inicial: 95º C, 2 minutos;
2) Desnaturalización: 95º C, 35 segundos;
3) Hibridación: 60º C, 35 segundos;
4) Extensión/Elongación: 72º C, 1 minuto;
repetición de pasos 2) a 4) 30 veces totales y
5) Extensión final: 72º C, 5 minutos.

Una vez finalizado el procedimiento, las muestras fueron almacenadas a -20º C hasta su análisis.

Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa utilizando protocolos estándar, seguido de visualización de las muestras por tinción con bromuro de etidio y observación con fuente de luz fluorescente. La agarosa fue disuelta en buffer de corrida TBE pH 8,0 (buffer Tris 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM) y suplementado con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. El porcentaje de agarosa se determinó según el tamaño de los fragmentos a identificar (ejemplo: agarosa 2,5% p/v para fragmentos menores a 300 pb). A las muestras se les adicionó buffer TBE conteniendo el colorante xileno cianol y un agente densificador, luego de lo cual

fueron sembradas. Conjuntamente con las muestras a evaluar, las corridas incluyeron mezclas de estándares de peso molecular (escalera 100 pb; ADN ladder; P-BL Productos BioLógicos, Argentina) que permitieron estimar el tamaño molecular aparente de los productos amplificados. El gel se corrió entre 50 y 75 V en la cuba electroforética con buffer TBE. Finalizada la corrida electroforética, las muestras fueron visualizadas en un sistema de transiluminación de luz con detección en el rango ultravioleta y, posteriormente, se realizó el registro fotográfico digital.

PCR en tiempo real: Las reacciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla preformada llamada SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contiene: Stock 2X de una mezcla optimizada de colorante fluorescente SYBR Green I, ADN polimerasa AmpliTaqGold®, dNTPs con dUTP, colorante de referencia pasiva ROX y componentes optimizados de buffer. A esta mezcla se agregaron los cebadores (300 nM), moldes (100 ng de ADNc) y el agua, que fue agregada en cantidades adecuadas para completar un volumen final de 25 µl. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron los controles de la retrotranscripción y el control adicional de PCR en el que se omitió el ADN molde.

Las evaluaciones se realizaron en un equipo Applied Biosystems 7500 Real Time PCR. El programa de amplificación estándar a utilizar involucra los siguientes pasos:

1) Activación: 95º C por 10 minutos;
2) Desnaturalización: 95º C por 15 segundos;
3) Hibridación/Extensión ó Elongación: 60º C por 1 minuto.
Los pasos 2 y 3 se repiten 40 veces.

La medición de la fluorescencia se realiza al final del paso 3 de cada ciclo de amplificación. La detección del producto amplificado se monitorea en el equipo de PCR que mide el aumento de la fluorescencia en cada ciclo de PCR causado por la unión del SYBR Green al ADN doble cadena. El equipo determina un nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción, y el número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho

umbral se conoce como Ct ("Cycle Threshold"), el que está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Dado que se obtiene una señal siempre que haya moléculas de ADN doble cadena, *a posteriori* del ensayo de PCR se realizan curvas de disociación (Curva de "Melting") para determinar la especificidad de la señal y así eliminar falsos positivos debidos a productos inespecíficos y dímeros de cebadores, entre otros.

El cálculo de los niveles de expresión de cadE en los segmentos epididimarios se llevó a cabo usando a GAPDH como gen de expresión constitutiva (su nivel de expresión se mantiene en distintos tejidos y regiones de los mismos) y los resultados fueron comparados tomando al tejido testicular humano como muestra de referencia. Los datos de expresión de cadE normalizados se relacionan mediante la siguiente fórmula aritmética:

Ecuación : $2^{-\Delta\Delta Ct}$

donde:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ cadE epididimaria (*Caput*, *Corpus* o *Cauda*) - ΔCt cadE testicular

ΔCt= Ct gen de interés (cadE) - Ct gen constitutivo (GAPDH)

Previo a las evaluaciones realizadas sobre las mezclas de ARN purificados a partir de tejidos reproductivos humanos de epidídimo y testículo, se realizaron una serie de estudios de optimización del protocolo de PCR en tiempo real para poder cuantificar los niveles del transcripto de cadE (ver **Apéndice B**).

3.I.10 Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos de epidídimo humano se obtuvieron como parte del procedimiento para aislar ARN total con el reactivo de Trizol® (Invitrogen). El "pellet" fue sonicado tres veces (Sonifier Cell Disruptor, model W140, Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Plainview, LI, NY, EEUU) a máxima potencia por un período de 30 segundos cada vez y los extractos proteicos fueron almacenados a -70º C hasta el momento de su análisis.

Para la preparación de extractos proteicos de espermatozoides, las células recuperadas luego del procedimiento de "swim up" (ver 3.I.15) se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS) (Na_2HPO_4 0,169% p/v; KH_2PO_4 0,02% p/v; NaCl 0,68% p/v) con el agregado de inhibidores de proteasas (p-aminobenzamidina (pAB) 2 mM, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF, del inglés Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride) 1 mM, aprotinina 10 μg/ml y leupeptina 10 μg/ml) seguido de centrifugación a 400-600 xg durante 10 minutos. Las células concentradas en el "pellet" se resuspendieron en buffer muestra Laemmli (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; glicerol 10%, SDS 2%) y se almacenaron hasta el momento de su análisis.

En algunos casos se obtuvieron extractos proteicos de espermatozoides previamente criopreservados empleando el siguiente procedimiento: inicialmente se eliminó el buffer de criopreservación por dilución con PBS con el agregado de inhibidores de proteasas (pAB 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 μg/ml y leupeptina 10 μg/ml) seguido de centrifugación a 400-600 xg durante 10 minutos. El “pellet” conteniendo los espermatozoides se resuspendió en buffer muestra Laemmli y la suspensión se almacenó -20º C hasta el momento de su análisis.

Respecto de los extractos proteicos de células provenientes de los complejos ovocito *cumulus* de hámster, luego de su obtención por punción de la *ampulla*, las células del *cumulus* adheridas a los ovocitos fueron separadas por tratamiento con hialuronidasa y pipeteo. Ambos tipos celulares fueron colocados en buffer muestra Laemmli y almacenados a -20º C hasta su uso.

Además de los tejidos, se procesaron los siguientes fluidos biológicos humanos:

1) el plasma de *cauda* epididimario (PCE) se obtuvo por perfusión retrógrada del vaso deferente humano, seguido de centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos.

2) el plasma seminal total (PST) se obtuvo de muestras de semen que habían completado la licuefacción, las que fueron sometidas a 2 centrifugaciones

secuenciales: una a 600 xg durante 15 minutos seguida de otra centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos, ambas a 4º C.

3) el suero humano se obtuvo de muestras de sangre de donantes sanos, que fueron centrifugada durante 20 minutos a 15.000 xg.

4) las muestras de orina humana se obtuvieron de donantes normales; la obtención se realizó en recipientes estériles conteniendo buffer HEPES 10 mM (pH 7,6) suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina KUI/ml), y antibióticos (penicilina 50 UI/ml y estreptomicina 50 UI/ml; concentración final en la orina; Banks *et al*, 1995). Las muestras se procesaron dentro de las 4 horas de obtenidas. Luego de una centrifugación para remover el material celular, las muestras fueron dializadas, concentradas y almacenadas a -20º C hasta el momento de su uso.

Para la obtención de vesículas membranosas del plasma seminal, se tomaron alícuotas del mismo, se suplementaron con inhibidores de proteasas y se diluyeron con buffer TBS-Ca^{2+} (Tris-HCl 30 mM, pH 7,6, suplementado con NaCl 130 mM y $CaCl_2$ 2 mM). Las muestras fueron ultracentrifugadas a 100.000 xg por 2 horas a 4º C. Se recuperó el sobrenadante (PSU, Plasma Seminal Ultra centrifugado) y se almacenó a -20º C hasta su análisis. El "pellet" obtenido se lavó con TBS-Ca^{2+} y se centrifugó nuevamente a 100.000 xg durante una hora adicional a 4º C. El "pellet" resultante se resuspendió en el mismo buffer y se filtró en una columna Sephadexg-200 (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Buckinghamshire, Gran Bretaña) como se ha descrito previamente (Stegmayr & Ronquist, 1982). Se recolectaron las diferentes fracciones con monitoreo de la absorbancia a 280 nm; se seleccionaron algunas fracciones en base a las lecturas de absorbancia, y con ellas se armó un "pool" de fracciones, que fue centrifugado nuevamente (2 horas a 100.000 xg). Los "pellets" conteniendo las vesículas membranosas (VM) purificadas se almacenaron a -20º C hasta el momento de su análisis. Sobre esta fracción purificada se determinó la actividad aminopeptidasa siguiendo un procedimiento previamente descrito (Laurel *et al*, 1982). Brevemente, se disolvieron 5 mg del sustrato succinil-(alanil) 3-p-nitro-anilida en 11 ml de buffer Tris-HCl (pH 8.0) 0,2 M; se agregaron 25 μl

de la muestra conteniendo las vesículas a 500 µl de la solución de sustrato y se realizaron lecturas a 410 nm luego de 20 minutos de incubación.

Las fracciones conteniendo las vesículas membranosas fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión usando protocolos estándar (Pietrobon *et al*, 2001). Brevemente, las alícuotas conteniendo las vesículas se resuspendieron en 200 µl de PBS a los que se les agregó un volumen igual de OsO_4 2% (p/v) y se incubaron por 18 horas a 4º C. Posteriormente, las vesículas fueron centrifugadas a 750 xg durante 10 minutos, los "pellets" obtenidos se deshidrataron en etanol-acetona y finalmente se embebieron en resina Epon 812 (Pelco, Pelco Way, Clovis, CA, EEUU). Se obtuvieron secciones delgadas utilizando un ultramicrotomo Ultracut R (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se observaron en un microscopio de transmisión Elmiskop I (Siemens, Munich, Alemania). Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. Miguel Fornés y su grupo de investigación, del Instituto de Histología y Embriología (IHEM-CONICET) de la ciudad de Mendoza, Argentina.

3.I.11 Extracción de proteínas de la membrana del espermatozoide

En algunos casos, los espermatozoides fueron resuspendidos en un buffer conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,25 M de sacarosa y 50 mM de benzamidina (buffer A), suplementado con 1 M de NaCl y fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, las muestras se centrifugaron a 400 xg por 10 minutos, se recuperaron y almacenaron el sobrenadante (HSE, de las siglas en ingles High Salt Extract) y pellet. El procedimiento se repitió usando buffer A conteniendo 2 y 4 mM de NaCl. Los sobrenadantes del procedimiento se procesaron usando un Centricón YM-10 (Amicon-Millipore, Bedford, MA, EEUU) y buffer PBS-D, para concentrar las muestras y remover el NaCl de manera de evitar distorsiones en la corrida electroforética.

En otros casos, las suspensiones de espermatozoides recuperadas del "swim up" fueron incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente en buffer A con 0,25 M de NaCl. Posteriormente fueron centrifugadas durante 10 minutos a

600 xg, resuspendidas en 10 mM de buffer Tris-HCl (pH 7,5) conteniendo inhibidores de proteasas y 144 mM NaCl (buffer B) y centrifugadas nuevamente. Los espermatozoides fueron resuspendidos en buffer B con o sin (condición control) 5 U de la enzima fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol (PI-PLC; PhosphatidylInositol-specific Phospholipase C de Bacillus cereus; P5542) y se incubaron por 2 horas a 30º C. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 600 xg durante 10 minutos y los extractos proteicos se concentraron por precipitación con ácido tricloroacético.

3.I.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las proteínas a analizar (provenientes de extractos proteicos de epidídimo, espermatozoides, ovocitos, células del *cumulus*, orina, plasma seminal, vesículas membranosas del plasma seminal y plasma seminal ultracentrifugado) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, del inglés SDS-PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis).

La electroforesis se llevó a cabo en el sistema de minigeles Mighty Small SE 250 (Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) a 25 mA por gel, utilizando buffer de electroforesis (Tris HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%) (Laemmli, 1970). En todos los casos, las muestras fueron resuspendidas en buffer muestra Laemmli en condiciones reductoras por agregado de β-mercaptoetanol al 5%. Para su procesamiento final, se agregó a las muestras azul de bromofenol 0,1% y se incubaron durante 10 minutos a 100º C previo a la siembra en el gel.

Como estándares de peso molecular se empleó la siguiente mezcla de proteínas: Miosina, 200 KDa; β-galactosidasa, 116 KDa; Fosforilasa b, 97 KDa; albúmina sérica bovina (BSA), 66 KDa; Ovoalbúmina, 45 KDa; Anhidrasa carbónica, 31 KDa; Inhibidor de tripsina de soja, 21,5 KDa; Lisozima, 14,4 KDa; Aprotinina, 6,5 KDa (BioRad).

En todos los casos, la determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante la técnica de Bradford, para lo cual se empleó un reactivo comercial (BioRad) y se siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante.

3.I.13 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y "Western Immunoblotting" con anticuerpos específicos

Luego de la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham/GE, Buckinghamshire, Gran Bretaña) mediante electrotransferencia a 100V durante 1 hora en buffer Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) (Towbin *et al*, 1979). Finalizado el procedimiento, la membrana fue teñida con Rojo Ponceau S 0,2% (p/v) en solución de ácido acético 0,5% (v/v).

Posteriormente, las membranas fueron sumergidas en solución de bloqueo de sitios inespecíficos, empleando buffer PBS conteniendo Tween-20 0,02% (v/v) (PBS-T 0,02%) y suplementado con leche descremada al 10% (p/v), e incubadas durante una hora a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4º C en presencia de los anticuerpos específicos en solución de bloqueo (anti cadE 610181: 0,25 μg/ml; anti cadE H-108: 2 μg/ml; anti cadE HECD-1; 2 μg/ml; anti β-catenina 610153: 0,5 μg/ml; anti actina I-19: 0,06 μg/ml). Como segundo anticuerpo se utilizaron anti IgG de conejo (Sigma-Aldrich) o de ratón (Vector Lab. Inc.) conjugados con peroxidasa (0,4 μg/ml en solución de bloqueo). La unión de los anticuerpos se reveló con el sistema de quimioluminiscencia (ECL kit, Amersham Life Science, Reino Unido) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación constante; entre las distintas etapas las membranas fueron sometidas a lavados con PBS-T 0,02%.

3.I.14 Evaluación de la expresión y localización de cadE en cortes histológicos de epidídimo humano por inmunohistoquímica

Se obtuvieron pequeñas porciones de las secciones del tejido epididimario humano *caput*, *corpus* y *cauda*, las que fueron fijadas y procesadas para inmunohistoquímica siguiendo un procedimiento ya descrito por nuestro grupo de investigación (Lasserre *et al*, 2003). Básicamente, los fragmentos de tejido fueron fijados por inmersión en formaldehido al 10% en buffer fosfato (pH 7,4) durante 6 horas. Posteriormente, los tejidos se transfirieron a una solución de etanol al 70% por 24-48 horas, se embebieron en parafina, se obtuvieron secciones, se montaron y se analizaron.

Las secciones de tejido desparafinado y rehidratado fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS suplementado con BSA al 4% durante 1 hora), seguido de incubación en una solución conteniendo el anticuerpo anti cadE H-108 (2 µg/ml) durante una hora; una vez finalizada la incubación, los cortes fueron lavados e incubados con segundo anticuerpo (IgG anti-conejo marcado con peroxidasa) y sometidos a revelado con diaminobencidina (DAB). Finalizado el protocolo de inmunodetección, se realizó una contra-tinción con Hematoxilina de Harris, deshidratación y montado. El análisis de la localización de cadE se realizó con objetivo 40x y 100x y el registro de imágenes se hizo usando un microscopio óptico (Alphaphot-2 YS2; Nikon, Tokio, Japón).

3.I.15 Evaluación básica de las muestras de semen y obtención de la fracción enriquecida en espermatozoides mótiles

Todas las muestras de semen utilizadas en el presente estudio (donantes y pacientes en tratamiento por infertilidad) fueron sometidas a un examen de rutina del semen siguiendo los lineamientos sugeridos por el manual de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1999). Particularmente, para la determinación de concentración y motilidad se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

Concentración espermática: Este parámetro fue determinado utilizando una cámara de Neubauer. Luego de la licuefacción del coágulo, el semen fue

homogeneizado por pipeteo. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 μl y se mezcló con 190 μl de diluyente, conteniendo fijador (World Health Organization, 1999). Esta dilución fue realizada por duplicado, colocándose alícuotas de ambas suspensiones en una cámara de Neubauer. La concentración de espermatozoides fue determinada usando microscopía óptica de campo claro, utilizando un aumento de 400x (Alphaphot-2 YS2, Nikon, Tokio, Japón).

Motilidad espermática: En las evaluaciones de las muestras utilizadas, se determinó el porcentaje de espermatozoides mótiles y el tipo de motilidad de manera subjetiva. Una alícuota de 10 μl de semen fue colocada entre porta y cubreobjetos y fue analizada utilizando un microscopio óptico de campo claro, con una magnificación de 400x. Se evaluaron un total de 100 espermatozoides, clasificándolos en mótiles e inmótiles.

Una vez completadas las evaluaciones de rutina, las muestras de semen fueron procesadas para la obtención de la fracción mótil. Para ello, se emplearon diferentes procedimientos según el tipo de muestra de partida (semen fresco o congelado, donantes o pacientes). Los protocolos empleados se describen a continuación:

1) Las muestras de semen fresco de donantes fueron procesadas empleando la técnica de "swim up". Esta técnica se basa en la recuperación de los espermatozoides mótiles por su capacidad de nadar a un medio libre de células colocado por encima del semen. Para ello se colocaron en tubo de cultivo de 15 ml, 1-1,5 ml de medio HSM suplementado con BSA (0,3% p/v) por encima de 1 ml de semen formando dos fases bien definidas. La incubación se realizó en gradilla en un ángulo de 45º de inclinación en estufa gaseada (5% CO_2 en aire) a 37º C por una hora.

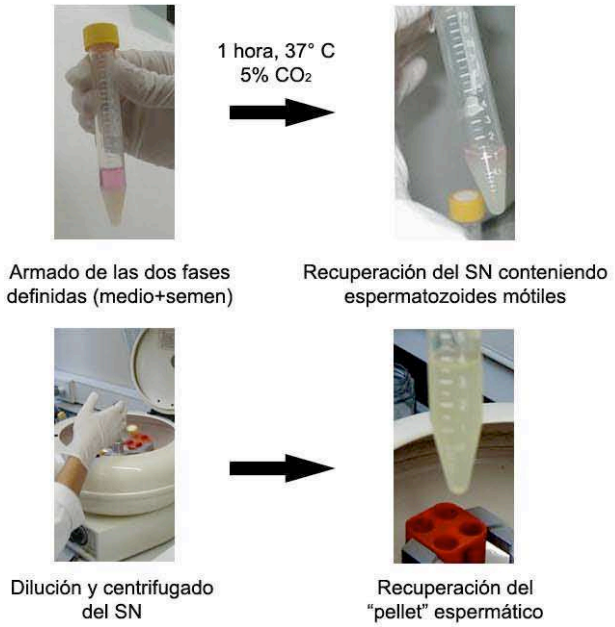


Figura 3.I.4: Esquema de la técnica de "swim-up".

Pasado dicho tiempo se recogió la fase superior (medio con espermatozoides mótiles) y se concentraron las células por agregado de 1 volumen de medio a la suspensión espermática seguido de centrifugación (400 xg durante 10 minutos) y recuperación de las células en el "pellet" post-centrifugación.

2) Las muestras de semen del eyaculado fresco de los pacientes tratados en la clínica IFER y de los cuales se obtuvo una alícuota para evaluación fueron procesados para la obtención de la fracción mótil empleando el procedimiento de separación en gradientes de densidad Pure Sperm® (Nidacon Int., Mölndal, Suecia). Básicamente, se colocó en el fondo de un tubo cónico de 15 ml 1 ml de Pure Sperm® 90% y se agregó lentamente sobre esta capa igual volumen de Pure Sperm® 47%. Posteriormente se colocó sobre la superficie del gradiente 0,5-1 ml de la muestra de semen evitando la generación de turbulencias y se centrifugó durante 20 minutos a 400 xg. Se retiraron las capas superiores del gradiente, dejando el "pellet" de espermatozoides y la parte inferior de la fase de 90% de Pure Sperm®. Se realizó un lavado con 5-8 ml de medio de cultivo HSM suplementado con 0,3% de BSA y, finalmente, se eliminó el sobrenadante por centrifugación (400 xg durante 10 minutos).

3) Las muestras provenientes de donantes y pacientes previamente congeladas fueron procesadas para la obtención de la fracción mótil mediante la técnica de filtración de espermatozoides en columnas de lana de vidrio. En este caso, la muestra conteniendo la suspensión de espermatozoides previamente congelados fue diluida en 1 volumen de medio HSM suplementado con 0,3% de BSA y sembrada en una columna de 0,014 g de lana de vidrio previamente empaquetada y equilibrada con el mismo medio a 37º C. Se tomó el eluido y se realizó una dilución con 2 volúmenes del mismo medio seguido de centrifugación en centrífuga clínica durante 10 minutos a 400 xg. Se resuspendió el "pellet" en medio HSM suplementado con 2,6% de BSA. Se evaluó la concentración, motilidad y vitalidad espermáticas. En la **Figura 3.I.5** se presenta un esquema del procedimiento:

Figura 3.I.5: Esquema de la técnica de lana de vidrio.

En todos los casos, el porcentaje de recuperación de espermatozoides mótiles se calculó de la siguiente manera:

Ecuación $(V_f \times C_f \times M_f / V_i \times C_i \times M_i) \times 100$

Donde:

V_f y V_i: volumen final e inicial,

C_f y C_i: concentración final e inicial,

M_f y Mi: motilidad final e inicial.

Los espermatozoides recuperados se resuspendieron en el mismo medio suplementado con 2,6% BSA (p/v) y sobre estas suspensiones se evaluó la concentración, motilidad y vitalidad espermáticas. Se tomó una alícuota de espermatozoides en cada caso y se procesaron para inmunocitoquímica (espermatozoides No Capacitados).

3.I.16 Capacitación espermática e inducción de la exocitosis acrosomal

En algunos casos, la fracción mótil de espermatozoides fue incubada en condiciones que promueven la capacitación espermática. Para ello se incubaron las células en medio HSM suplementado con 2,6% de BSA a 37º C en estufa gaseada (5% CO_2 en aire) a una concentración de 5 x 10^6 espermatozoides/ml por el período indicado en cada caso.

Para obtener una población de espermatozoides reaccionados se incubaron células en condiciones capacitantes y posteriormente se agregó 10 µM de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich) como inductor farmacológico de la exocitosis acrosomal. En paralelo, se realizó el ensayo control colocando la misma cantidad del diluyente del ionóforo (DiMetil SulfOxido; DMSO).

En todos los casos, luego de los tratamientos, las gametas recuperadas fueron fijadas y sembradas en portaobjetos. Brevemente, las células fueron fijadas por agregado de formaldehído al 2% (v/v) en PBS-D, concentradas por centrifugación (600 xg, 3 minutos) y finalmente sembradas en portaobjetos pre-tratados con polilisina (Sigma-Aldrich) y secadas al aire.

Para determinar el estado del acrosoma, los espermatozoides fijados fueron incubados con la lectina aglutinina de *Pissum Sativum* (del nombre original *Pissum Sativum* Agglutinin, PSA) marcada con isotiocianato de fluoresceina 50 µg/ml (FITC, del inglés Fluorescein IsoThiocyanate (PSA-FITC)) durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se eliminó la lectina no unida por medio de lavados con PBS-D y finalmente los

preparados fueron montados con solución de Vectashield (Vector Lab. Inc.) y analizados. Los espermatozoides se clasificaron como “intactos” (no reaccionados) cuando presentaron una tinción homogénea de gran intensidad sobre el acrosoma, mientras que se clasificaron como “reaccionados” (pérdida del contenido acrosomal) cuando solo se observó tinción en la región del segmento ecuatorial (SE), o en casos en los que se detectó pérdida parcial del contenido acrosomal (“Patchy”) o no se observó señal de la lectina en la cabeza del espermatozoide (negativo, N):

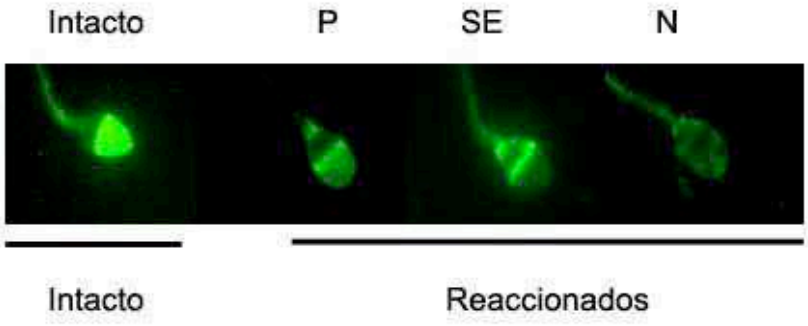


Figura 3.I.6: Patrones de tinción con PSA-FITC en espermatozoides humanos. Patrón Intacto: señal en el capuchón acrosomal; Patrones reaccionados: Patrón P o “Patchy”: señal punteada en el capuchón acrosomal; Patrón SE: señal en el segmento ecuatorial; Patrón N: negativo, con señal muy pobre o ausencia de señal.

3.I.17 Inmunolocalización de cadE y proteínas relacionadas en espermatozoides y ovocitos

Se realizó la evaluación de la localización de cadE y otros componentes del complejo de adhesión (β-catenina y actina) sobre muestras de espermatozoides de donantes normales (No Capacitados, Capacitados y Reaccionados) y de pacientes en tratamiento por infertilidad. Se empleó la técnica de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para las proteínas de interés según se indique en cada caso: anti cadE H-108 2 μg/ml, HECD-1: 20 μg/ml, DECMA-1: 58 μg/ml; anti β-catenina: 10 μg/ml; anti actina: 134 μg/ml. Para los controles negativos se utilizaron las IgGs purificadas de conejo o ratón, según corresponda la especie del primer anticuerpo, agregadas en la misma concentración que el anticuerpo específico.

En algunos casos, los espermatozoides no capacitados se incubaron durante una hora con anticuerpo HECD-1 previo al paso de fijación y,

posteriormente, las células se procesaron como se describe para los espermatozoides fijados. La localización de cadE fue analizada a una magnificación 1.000x utilizando un microscopio Nikon equipado para análisis de fluorescencia, con cámara acoplada a un programa de captura y procesamiento de imágenes (IPLab, Scientific Image Processing, Ver.3,06; Scanalytic Inc, EE.UU). Los resultados se expresaron como valores promedio para cada patrón de localización de cadE de los registros obtenidos sobre por lo menos 200 células para cada individuo.

Para evaluar en cada célula el estado del acrosoma simultáneamente con la localización de cadE, se llevó a cabo el ensayo de inmunodetección de cadE seguido de la incubación con PSA-FITC. Para ello, los extendidos fueron permeabilizados por 20 segundos y luego tratados con el primer anticuerpo anti cadE (H-108) como se indicó anteriormente. Luego de la incubación con el segundo anticuerpo y de los lavados correspondientes, se incubó durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad con PSA-FITC 50 µg/ml, se eliminó la lectina no unida por medio de lavados con PBS-D; finalmente los preparados fueron montados con Vectashield (Vector Lab. Inc.) y analizados utilizando los criterios mencionados previamente para clasificar los espermatozoides “intactos” y “reaccionados”. Los resultados se expresaron como valores promedio para cada patrón de localización de cadE en las poblaciones de espermatozoides “intactos” y “reaccionados” sobre al menos 200 células para cada individuo.

Además de las evaluaciones realizadas sobre espermatozoides, se llevaron a cabo estudios de inmunolocalización de cadE en ovocitos humanos y de hámster libres de células del *cumulus*. Las gametas femeninas fueron incubadas en solución de bloqueo (PBS suplementado con BSA 4% p/v) durante 30 minutos seguido de incubación con anticuerpo anti cadE H-108 (20 µg/ml) en medio de cultivo (humanos: HTF, hámster: BWW) durante una hora a 37º C. Finalizada la incubación se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavados en PBS suplementado con 1% BSA y posteriormente los ovocitos fueron fijados en formaldehído 2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de incubación con el segundo anticuerpo (IgG anti-conejo acoplado a CY3; 2 µg/ml en PBS-D). Se realizaron lavados por pasajes sucesivos en gotas y posteriormente se montaron con la solución de Vectashield. En paralelo, se

realizaron controles negativos omitiendo el primer anticuerpo o agregando IgG de la misma especie que el primer anticuerpo a la misma concentración. El análisis de la localización de cadE y el registro de imágenes en ovocitos se realizó de manera similar a lo mencionado para los espermatozoides.

3.I.18 Ensayos de interacción del espermatozoide con el ovocito

Para evaluar la participación de cadE en eventos de la interacción espermatozoide-ovocito, se diseñaron protocolos de ensayos de interacción de gametas, en las que se incluyó la preincubación de anticuerpos anti cadE dirigidos contra el dominio extracelular de la proteína de adhesión, a fin de bloquear la adhesión celular mediada por cadE. El desarrollo de esta parte del proyecto incluyó 1) la realización del ensayo de Hemizona humana en colaboración con la Lic. Fernanda González-Echeverría de Raffo (Centro Médico Fertilab, Buenos Aires) y 2) la implementación en el laboratorio del ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP. Los protocolos empleados se detallan a continuación:

Ensayo de Hemizona

El ensayo de hemizona (HZA, de su sigla en inglés Hemi Zona Assay), fue realizado siguiendo el protocolo descrito inicialmente por Burkman & col. (Burkman *et al*, 1988).

Los ovocitos humanos, almacenados en una solución de alta concentración salina, fueron recuperados y colocados en gotas de PBS y posteriormente bi-seccionados en partes iguales (hemizonas, HZ) usando un micromanipulador (Narishigue, Tokio, Japón) acoplado a un microscopio invertido (Nikon Diaphot, Tokio, Japón). Paralelamente, los espermatozoides fueron preincubados en medio capacitante por 4 horas seguido de una hora en presencia de anticuerpos anti cadE (condición tratado) o en condición control, incubados con la IgG normal en reemplazo del mismo. Para la realización de los ensayos se utilizaron el anticuerpo policlonal H-108 (100 μg/ml) y el anticuerpo monoclonal SHE78-7 (100 y 50 μg/ml).

Finalizada la incubación, el anticuerpo no unido se removió por dilución con medio seguido de centrifugación y se monitoreó la viabilidad y motilidad de los espermatozoides.

Las suspensiones de espermatozoides tratados y sus controles fueron colocadas en forma de gotas de 100 μl conteniendo 6 x 10^4 espermatozoides mótiles tratados o control en placas de Petri cubiertas con aceite mineral, a las que se agregaron cada una de las HZ. Luego de 4 horas de coincubación a 37º C en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire, se procedió al lavado de las hemizonas mediante pipeteo vigoroso y pasajes sucesivos en medio HSM, para remover los espermatozoides débilmente unidos. Se registró el número de espermatozoides estrechamente unidos a la superficie externa de cada hemizona bajo una magnificación de 400x usando un microscopio de óptica de interferencia Hoffman (Modulation Optics Inc., Greenvale, NY, EEUU). Los resultados se expresaron como número de espermatozoides unidos por HZ.

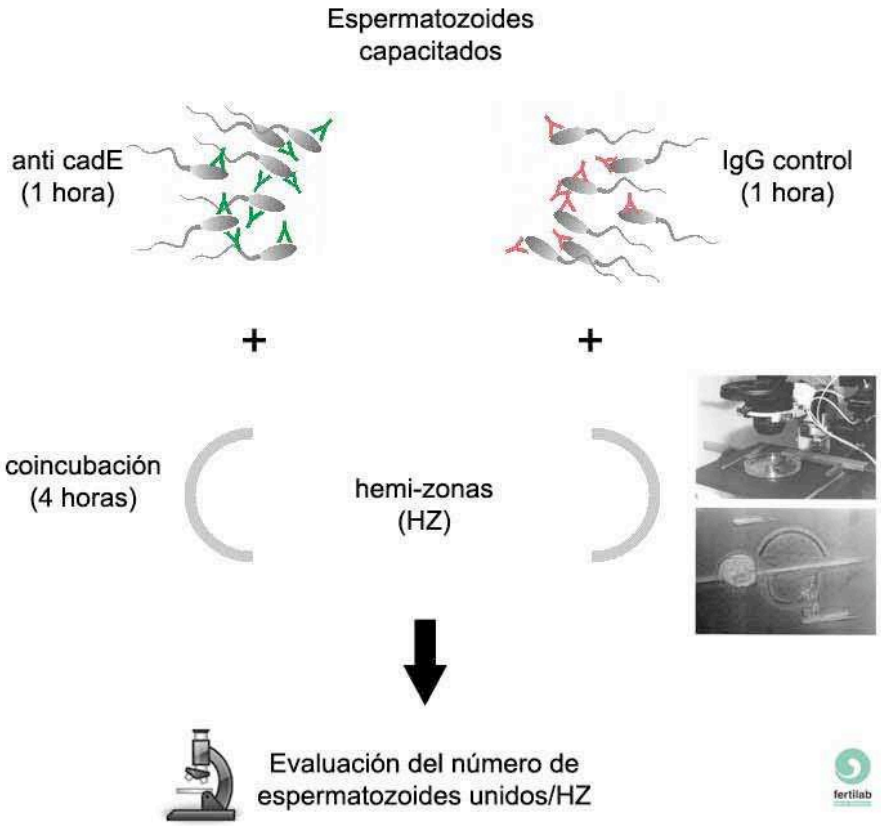


Figura 3.I.7: Representación esquemática del ensayo de interacción de espermatozoides con hemi-ZPs (Burkman *et al*, 1988) utilizado para evaluar el efecto de los anticuerpos anti cadE sobre la interacción del espermatozoide con la ZP. Los espermatozoides capacitados y preincubados con

el anticuerpo anti cadE se pusieron en contacto con hemi-ZPs. Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas se recuperaron las hemi-ZPs y se evaluó el número de espermatozoides unidos por cada hemi-ZP.

En algunos casos se evaluó el estado del acrosoma de los espermatozoides recuperados de la gota de incubación mediante la tinción con PSA-FITC.

Ensayo de Penetración de ovocitos de hámster sin ZP

Para evaluar la participación de cadE en la interacción espermatozoide-oolema se empleó el ensayo heterólogo de interacción de espermatozoides humanos con ovocitos de hámster desprovistos de ZP, conocido como SPA (de sus siglas en inglés Sperm Penetration Assay) (World Health Organization, 1999).

Por cada experimento se utilizaron 4 hembras de hámster dorado sometidas al protocolo de estimulación de superovulación que se detalló en la Sección 3.I.6. El tratamiento enzimático de las gametas femeninas con hialuronidasa y tripsina según se explicara anteriormente permitió obtener ovocitos libres de células del *cumulus* y de ZP. Se utilizaron espermatozoides mótiles seleccionados, incubados en condiciones capacitantes durante 18 horas en medio BWW suplementado con BSA 2,6% (p/v). Treinta minutos antes de la inseminación de los ovocitos, la suspensión espermática fue centrifugada a 400 xg durante 10 minutos y el “pellet” fue resuspendido en medio BWW suplementado con BSA o HSA 0,3% (p/v).

Los ovocitos fueron incubados durante 30 minutos en medio conteniendo 20 μg/ml del anticuerpo anti cadE H-108 (condición tratado) o IgG normal de conejo (condición control), luego de lo cual se transfirieron a una gota conteniendo espermatozoides capacitados. Las gametas se co-incubaron por un período adicional de 2,5 horas a 37º C, en atmósfera gaseada (5% CO_2 en aire). Finalizado el ensayo, la motilidad espermática fue monitoreada de manera subjetiva. Los ovocitos se recuperaron de la gota y se sometieron a pasajes sucesivos en gotas de medio de cultivo para eliminar los espermatozoides

unidos débilmente. Los ovocitos fueron montados en portaobjetos y analizados por microscopía de contraste de fase (magnificación 400x) (**Figura 3.I.8**).

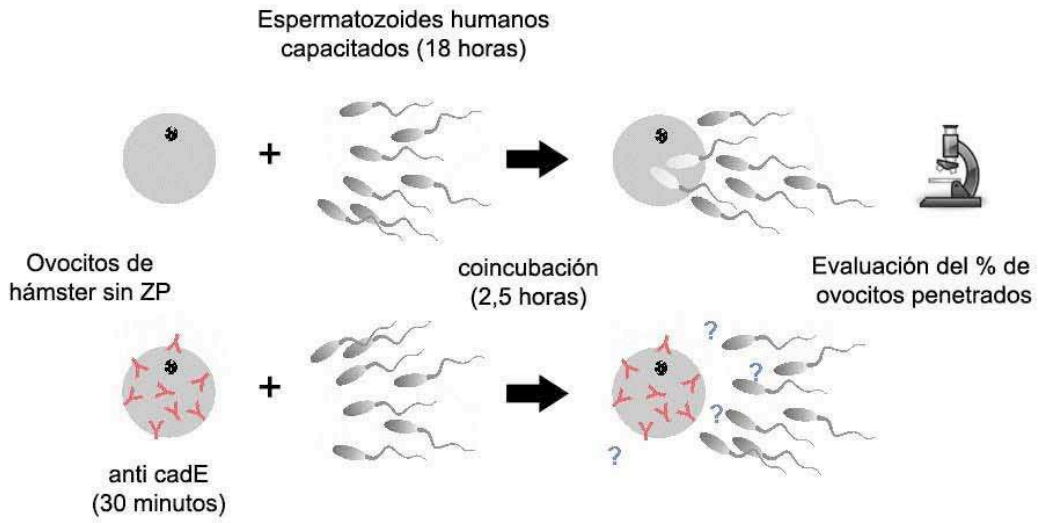


Figura 3.I.8: Representación esquemática del ensayo de penetración de ovocitos de hámster desprovistos de ZP (World Health Organization, 1999) utilizado para evaluar la participación de cadE en la interacción espermatozoide-oolema. Los espermatozoides capacitados por 18 horas se pusieron en contacto con ovocitos libres de ZP y preincubados en presencia de anticuerpo anti cadE (H-108, 20 µg/ml). Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas se recuperaron los ovocitos y se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados.

Se efectuó el registro de la presencia de penetraciones espermáticas. Se tomó como criterio de penetración la presencia de al menos una cabeza descondensada asociada a una cola en el citoplasma ovocitario (**Figura 3.I.9**). Los resultados se presentaron como el porcentaje de ovocitos con al menos una penetración y se calcularon como: [número de ovocitos penetrados/número de ovocitos inseminados] x 100.

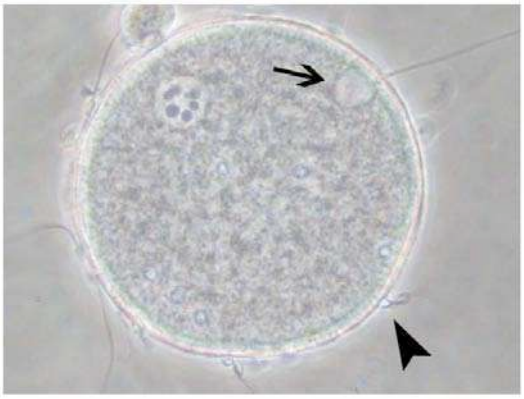


Figura 3.I.9: Registro fotográfico de imagen de ovocito de hámster desprovisto de ZP, expuesto a espermatozoides humanos y observado en microscopio con óptica de contraste de fase. La flecha indica la presencia de una cabeza espermática decondensada dentro del ooplasma, la punta de flecha muestra un espermatozoide unido a la superficie del ovocito.

La viabilidad de los ovocitos fue evaluada luego de la incubación con anticuerpos utilizando una tinción con Azul Tripán 0,25% (p/v) en PBS suplementado con BSA 1% (p/v) e incubación durante 10 minutos a 37º C. La viabilidad de los mismos fue evaluada por observación con lupa estereoscópica; se consideraron viables aquellos ovocitos no coloreados y muertos los teñidos de color azul (**Figura 3.I.10**). Como control positivo de la tinción, en cada ensayo se tomaron algunos ovocitos y se indujo la muerte celular por incubación a 70º C durante 30 min.

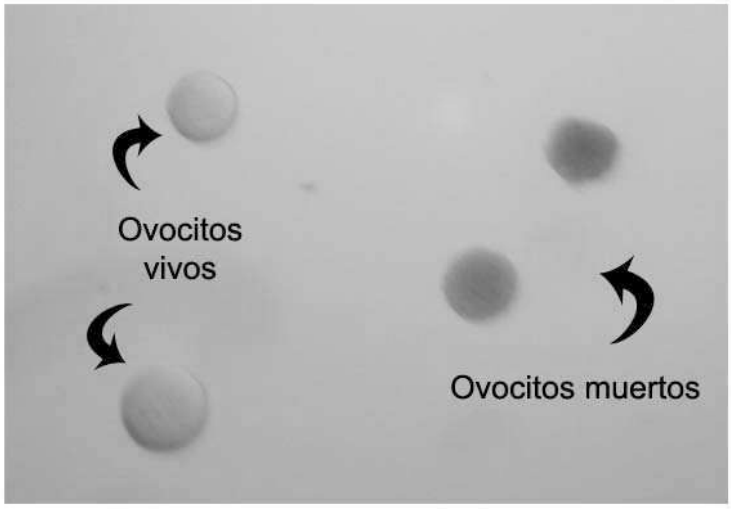


Figura 3.I.10: Patrones de tinción vital de ovocitos luego de la incubación con Azul Tripán.

3.I.19 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Para el desarrollo del proyecto (Parte I y II) se debió acceder a bancos de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Se utilizaron varios de los programas de búsqueda y análisis disponibles en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). El NCBI es responsable por los datos de secuencias inicialmente a cargo del GenBank, a los que se agregan constantemente aportes individuales y aquellos que se reciben como intercambio de otros bancos de datos como el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y el DNA Database of Japan (DDBJ). Además del GenBank, NCBI apoya y distribuye una gran variedad de bancos de datos para la comunidad médica y científica, entre ellos un sistema de búsqueda y obtención de secuencias, mapas genéticos, estructuras, referencias, entre otros; denominado Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/).

Asimismo, se accedió a BLAST (http://genopole.toulouse.inra.fr/blast), un programa que permite analizar la similitud de secuencias; BLAST se puede usar para la evaluación tanto de 2 secuencias entre sí como para confrontar una secuencia específica contra un banco de ADN total (Altschul *et al*, 1990).

También se utilizó el programa Translate (http://www.expasy.ch/tools/dna.html), que traduce una secuencia nucleotídica (ADN/ARN) en la proteica correspondiente.

Para la alineación múltiple de secuencias se utilizó el programa CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html).

3.I.20 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el valor promedio ± Error Estándar del Promedio (EEP) para cada serie de experimentos. En todos los casos los datos fueron analizados y graficados con el software GraphPad Prism 4 (GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego CA, EEUU; www.graphpad.com). Para evaluar la significancia estadística de los ensayos de HZA y SPA, en las diferentes condiciones experimentales, se utilizó

el estadístico de Wilcoxon. Los resultados fueron considerados con diferencias significativas cuando mostraron un valor $P < 0,05$.

Parte II: Empleo del modelo murino para la evaluación de la expresión, localización y participación de cadE en la fecundación. Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios y evaluación de su expresión en el epidídimo

3.II.1 Reactivos generales

De manera similar a lo descrito para la Parte I, todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU), excepto que se indique expresamente. Los insumos para electroforesis fueron obtenidos de BioRad (Richmond, CA, EEUU) o indicados específicamente. Los reactivos para biología molecular utilizados fueron obtenidos de Qiagen (Hilden, Alemania) e Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU).

3.II.2 Anticuerpos

Además de los anticuerpos dirigidos contra cadE empleados en la Parte I del proyecto (ver detalles en la Sección 3.I.2) 1) H-108, 2) clon DECMA-1, 3) 610181, para los ensayos biológicos en el modelo murino se empleó el anticuerpo 4) clon ECCD1 dirigido contra los aminoácidos 13-20 (dominio cadherina 1) de la molécula de adhesión (Yoshida-Noro *et al*, 1984; Nose *et al*, 1990) (Zymed-Invitrogen, South San Francisco, CA, EEUU).

Para la detección de las proteínas del complejo adherente β-catenina y actina se usaron los mismos anticuerpos que en el modelo humano (detalles en la Sección 3.I.2). Para evaluar la presencia de actina filamentosa (actina-F), las gametas y células del *cumulus* se incubaron con faloidina marcada con el fluorocromo AlexaFluor 488 (Invitrogen Life Technologies).

A lo largo de esta parte del estudio se utilizaron los mismos anticuerpos secundarios que los descritos en la Parte I del proyecto, tanto para los ensayos de inmunocitoquímica como para los ensayos de Western Immunoblotting. Asimismo, se emplearon las mismas IgGs de suero normal de diversas especies como controles negativos.

3.II.3 Medios de cultivo

Para todos los ensayos utilizando gametas murinas se empleó el de cultivo desarrollado originalmente para uso en ensayos de fecundación *in vitro* (FIV): NaCl 0,5803% p/v; glucosa 0,1% p/v; KCl 0,0201% p/v; $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0,0056% p/v; piruvato de sodio 0,0055% p/v; $CaCl_2.2H_2O$ 0,0264% p/v; $MgCl_2.6H_2O$ 0,0102% p/v; lactato de sodio 0,35% v/v; $NaHCO_3$ 0,2106% p/v; penicilina 0,0063% p/v; estreptomicina 0,005% p/v suplementado con BSA 0,3% p/v (Fraser *et al*, 1975).

3.II.4 Cepas de ratones y manejo de animales

A lo largo del estudio se emplearon ratones macho de las cepas CF1, Balb-c y C57 y hembras de la cepa CF1. Específicamente respecto de la cepa CF1, se estableció y mantuvo la colonia de animales a partir de 2 parejas "fundadoras". Se aseguró la variabilidad genética a través del cruzamiento periódico de animales de diferente "background" genético basado en el seguimiento de las cruzas. Al momento se cuenta con una colonia que consta de tres jaulas de parentales (en relación un macho una hembra) las cuales se mantienen en "racks" ventilados bajo estricto orden de cruza para evitar la endogamia. Contamos además con espacio suficiente como para que los animales completen su crecimiento hasta la edad adulta. Esta colonia de ratones fue establecida y mantenida por el laboratorio para realizar los trabajos aquí presentados y seguir con las diferentes líneas de investigación desarrolladas en el laboratorio y constituye la única colonia de ratones exocriados con la que cuenta el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) actualmente.

Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del IBYME, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con suministro de alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo al manual de buenas prácticas de laboratorio (The National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) y aprobados por el Comité Institucional de Control para el uso de Animales de Laboratorio.

3.II.5 Obtención de tejidos, fluidos y gametas

Se obtuvo tejido testicular y epididimario de ratones adultos (≥ 8 semanas de vida) sacrificados por dislocación cervical.

Para los ensayos de inmunohistoquímica, los fragmentos de tejido fueron fijados por inmersión en solución de formol al 10% en PBS (pH 7,4) durante 6 horas. Posteriormente se transfirieron a etanol 70% por 24-48 horas, se embebieron en parafina, se obtuvieron secciones, se montaron en portaobjetos con carga positiva y almacenaron por períodos cortos de tiempo hasta su procesamiento para inmunodetección de cadE. Los procedimientos de preparación de tacos y obtención de secciones se hicieron con el servicio de Patología del Instituto Roffo de la ciudad de Buenos Aires.

Para la obtención de extractos proteicos de testículo y epidídimo, los fragmentos de los tejidos recuperados se colocaron inmediatamente en buffer de homogeneización y se procesaron (ver la sección 3.II.7).

Para los procedimientos de purificación de ARN total de testículo y epidídimo, los fragmentos de los tejidos se colocaron en reactivo de Trizol® (Invitrogen Life Technologies) y se almacenaron a -70º C hasta el momento de su procesamiento.

El fluido de *cauda* epididimario de ratones adultos se obtuvo por perfusión retrograda del conducto deferente con jeringa con aguja 25Gx5/8", empleando 0,5 ml de buffer P1 (PBS suplementado con Benzamidina 50 mM y pAB 2 mM). Los fluidos se centrifugaron a 600 xg durante 5 minutos para remover los espermatozoides y los sobrenadantes fueron centrifugados a 15.000 xg durante 15 minutos para remover restos celulares. Ambos procedimientos se realizaron manteniendo las muestras en hielo. Finalmente, el sobrenadante obtenido luego de la segunda centrifugación fue sometido a una ultracentrifugación a 120.000 xg a 4º C durante 2 horas, para lo cual se empleó una ultracentrífuga Sorvall RC 5B Plus (A.L. Scientific, Brooklyn, NY, USA) con Rotor de ángulo fijo T-865.1. Los "pellets" conteniendo vesículas membranosas de *cauda* epididimario fueron resuspendidos en volúmenes de 20-50 μl de buffer

de muestra Laemmli o de PBS-BSA 3%; las suspensiones conteniendo las membranas fueron alicuotadas y almacenadas a -70º C hasta su uso para la detección de cadE mediante las técnicas de Western Immunoblotting o procesadas para InmunoMicroscopía Electrónica de Transmisión (IMET) (ver más adelante).

Se obtuvieron espermatozoides testiculares y epididimarios de ratones adultos de las cepas CF1, C57 y Balb-c. Para ello, se recuperaron los tejidos de animales adultos sacrificados por dislocación cervical, se seccionaron en fragmentos de 0,5 cm^3 y se incubaron durante 5-10 minutos en una gota bajo aceite de 200 µl de medio de FIV. Las gametas recuperadas fueron fijadas en solución de formaldehído al 2% en PBS, concentradas por centrifugación (600 xg 3 minutos), sembradas en portaobjetos pretratados con polilisina (P-6516, Sigma-Aldrich) y finalmente secadas al aire y procesadas para ensayos de detección de proteínas.

Para la obtención de ovocitos maduros se realizó un protocolo estándar de estimulación de hembras de la cepa CF1 de 4 a 8 semanas de edad. Brevemente, las hembras fueron inyectadas intra-peritonealmente con 7,5 UI de PMSG (Sigma-Aldrich) entre las 14:00 y 16:00 horas del día 1 del protocolo. Pasadas 48 horas desde la primera inyección, se administró por la misma vía y en la misma dosis la hormona hCG (Sigma-Aldrich). Finalmente, los complejos ovocito *cumulus* fueron recuperados por punción de la *ampulla* en cápsulas de cultivo conteniendo medio FIV, luego de la recuperación de los oviductos 12 a 14 horas post-inyección de la hCG.

En los casos en los que se usaron ovocitos libres de células del *cumulus*, estas células se removieron por incubación de los complejos ovocito *cumulus* con 0,3% (p/v) de hialuronidasa (Sigma-Aldrich) en medio de FIV durante 2-3 minutos, luego de lo cual los ovocitos se lavaron por tres pasajes sucesivos en gotas de medio FIV hasta completar la separación total de las células del *cumulus*.

Para los ensayos en los que se usaron ovocitos sin ZP, los ovocitos libres de células del *cumulus* se incubaron durante 5 segundos en una gota de medio

ácido Tyrode (Nicolson *et al*, 1975) (NaCl 0,8% p/v; KCl 0,02% p/v; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,026% p/v; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,0046% p/v; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0055% p/v; Glucosa 0,1% p/v; $NaHCO_3$ 0,1% p/v; PVP 0,4% p/v) y se sometieron inmediatamente a pasajes sucesivos en gotas de medio de FIV para detener el efecto del medio ácido.

3.II.6 Obtención de ARN total de tejido testicular y epididimario

Para realizar la evaluación del transcripto de cadE en la gonada y el epidídimo de ratón adulto, se purificó el ARN total de ambos tejidos utilizando un reactivo comercial (Trizol®, Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Básicamente, el protocolo involucró 5 etapas, que se detallan a continuación:

1. Homogeneización: Los tejidos se disgregaron utilizando un homogeneizador Polytron en 1 ml del reactivo Trizol (1 ml cada 50-100 mg de tejido).

2. Separación: Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se añadieron a cada muestra 0,2 ml de cloroformo por cada ml del reactivo Trizol utilizado en la fase de homogeneización y, luego de mezclar por inversión, las muestras fueron incubadas de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 4º C por 15 minutos a una velocidad de 12.000 xg.

3. Precipitación: El ARN presente en la fase acuosa formada luego de la centrifugación fue precipitado mediante la adición de alcohol isopropílico (0,5 ml por cada 1 ml de reactivo Trizol utilizado en la etapa de homogeneización). Luego de incubar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos, éstas fueron centrifugadas a 4º C a una velocidad de 12.000 xg.

4. Lavado del ARN: Luego de remover el sobrenadante, el pellet de ARN fue lavado con etanol al 75% (no menos de 1ml por cada 1 ml del reactivo Trizol utilizado en el paso de homogeneización). Las muestras fueron centrifugadas a 4º C durante 5 minutos a una velocidad de 7.500 xg.

5. Redisolución del ARN: El “pellet” formado conteniendo el ARN se dejó secar de 5 a 10 minutos y luego se disolvió por pipeteo en agua libre de ARNasas.

El contenido y pureza de ARN obtenido fue evaluado usando el sistema de Qubit (Invitrogen Life Technologies); posteriormente, las muestras se almacenaron a -70º C hasta el momento de su evaluación.

Para obtener el ADNc, 1 microgramo de ARN total purificado fue utilizado en un ensayo empleando la enzima transcriptasa reversa Superscript II® (Invitrogen Life Technologies) y oligo dT en un volumen de reacción de 20 µl, de manera similar a lo indicado en la Parte I del proyecto. Previo al inicio de dicho ensayo, el ARN total fue desnaturalizado por calentamiento a 65º C durante 5 minutos.

El ensayo fue seguido de una PCR, realizando el siguiente protocolo:

desnaturalización del molde (ADNc) a 95º C por 35 segundos,
asociación de primers a 60º C por 35 segundos, y
extensión a 72º C por 1 minuto.
Este protocolo se repitió 30 veces.

Las secuencias de cebadores de cadE utilizados para este procedimiento fueron:

cadE

"forward": 5'-GCTCTCATCATCGCCACAG-3',
"reverse": 5'-CTGGGATGGGAGCGTTGTC-3';

β-actina

"forward": 5'-CAGCCTTCCTTCTTGGG-3'
"reverse": 5'-GAGGTCTTTACGGATGTCA-3'.

El tamaño esperado para los fragmentos de cadE y β-actina fue de 100 y 93 pares de bases, respectivamente.

Para la cuantificación de los niveles de transcripto de cadE en la gonada y el epidídimo, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Básicamente, el

protocolo utilizado fue el mismo que el descrito para el modelo humano (ver sección 3.I.9). En este caso se utilizó el gen de β-actina como gen de expresión constitutiva. Los "primers" o cebadores empleados fueron los mismos que los utilizados en el protocolo de PCR a punto final.

En todos los casos, las corridas incluyeron los controles de la retrotranscripción y PCR. Asimismo, *a posteriori* del ensayo de PCR se realizaron las curvas de disociación (Curva de "Melting") para determinar la especificidad de la señal y así eliminar falsos positivos debidos a productos inespecíficos y dímeros de cebadores, entre otros.

Previo a las evaluaciones realizadas sobre las mezclas de ARN purificados a partir de epidídimo y testículo murinos, se realizaron una serie de estudios de optimización del protocolo de PCR en tiempo real para poder cuantificar los niveles del transcripto de cadE (ver **Apéndice C**).

3.II.7 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de proteínas de espermatozoides de *cauda* epididimario de ratón, el tejido recuperado de animales adultos fue seccionado en fragmentos de 0,5 cm^3 y colocado en una gota de 200 μl de medio de cultivo utilizado para los ensayos de fecundación *in vitro* (FIV) (Fraser *et al*, 1975) suplementado con 4 mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich) y 4 mM de EGTA (Sigma-Aldrich). Luego de permitir la difusión espontánea de los espermatozoides al medio de cultivo durante unos minutos, los espermatozoides se recuperaron de la gota y se concentraron por centrifugación a 300 xg durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el "pellet" fue resuspendido en buffer P_2. La suspensión espermática fue incubada durante 2 horas en hielo con agitación ocasional. Finalizada la incubación, la preparación se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm a 4º C y el sobrenadante se resuspendió en buffer muestra Laemmli. Los extractos proteicos se almacenaron a -70º C hasta su uso.

Los ovocitos obtenidos por punción de la sección de la *Ampulla* del oviducto fueron sometidos a pasajes sucesivos por pipeta de boro del tamaño del ovocito en medio conteniendo hialuronidasa (0,3% p/v) para remover las

células del *cumulus*. Por su parte, las células del *cumulus* fueron recuperadas y concentradas por centrifugación. Ambos tipos celulares fueron resuspendidos en buffer muestra Laemmli y almacenados a -70º C hasta su procesamiento final.

En todos los casos, los extractos proteicos fueron calentados durante 5-10 minutos a 100º C, suplementados con 5% de β-mercaptoetanol previo a ser sembrados en el gel de poliacrilamida. Las proteínas a analizar fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa empleando el mismo protocolo que el mencionado para el modelo humano (Ver Parte I). En todas las corridas se incluyeron estándares de peso molecular (BioRad "broad range"; en la Parte I se presenta el listado de proteínas de la mezcla).

Para la inmunodetección de las proteínas de interés en los diferentes extractos proteicos, las membranas de nitrocelulosa fueron inmunorreveladas con anticuerpos específicos. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en primer lugar las membranas fueron incubadas en PBS-Tween 20 0,02% (PBS-T 0,02%) conteniendo leche descremada al 10% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente para bloquear los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo. Posteriormente, fueron incubadas durante toda la noche a 4º C en presencia de anticuerpos específicos en solución de bloqueo (anti cadE 610181: 0,25 μg/ml; anti β-catenina 610153: 0,5 μg/ml; anti actina: I-19: 0,06 μg/ml). Una vez finalizada esta incubación, las membranas fueron sometidas a lavados con PBS-T 0,02% para remover el anticuerpo no unido, luego de lo cual se agregó el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La unión de los anticuerpos se reveló con el reactivo de ECL, siguiendo el mismo protocolo que el detallado para el modelo humano (ver Parte I).

3.II.8 Capacitación e inducción de la exocitosis acrosomal

Para estos estudios, se obtuvieron espermatozoides de *cauda* epididimario de ratones adultos de la cepa CF1 utilizando el mismo protocolo que se describió anteriormente. Los tejidos se colocaron en la gota de medio de

cultivo de FIV bajo aceite y luego de 2-5 minutos se tomó una alícuota de 50 µl (espermatozoides No Capacitados).

La población de espermatozoides capacitados se obtuvo incubando las suspensiones celulares en gotas de 200 µl de medio FIV bajo aceite durante 120 minutos a 37º C en una atmósfera de 5% CO_2 en aire, a una concentración de 1 x10^6 espermatozoides/ml, condiciones que promueven la capacitación espermática (Shoeb *et al*, 2004).

Para obtener una población de espermatozoides reaccionados, se incubaron las gametas en condiciones capacitantes durante 105 minutos y posteriormente se agregó ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich) 10 µM durante 15 minutos. El ensayo control se realizó en paralelo colocando la misma cantidad del diluyente del ionóforo (DMSO).

En todos los casos las gametas fueron recuperadas de las gotas de incubación, fijadas y sembradas en portaobjetos de manera similar a los espermatozoides testiculares y epididimarios (ver 3.II.5).

3.II.9 Evaluación de la exocitosis acrosomal

La exocitosis acrosomal espontánea e inducida con ionóforo de calcio A23187 fue evaluada en una alícuota de la misma muestra por dos métodos diferentes: 1) tinción con Azul brillante de Coomassie (Invitrogen Life Technologies), empleando una metodología descripta previamente (Larson *et al*, 1999) y 2) tinción con la lectina aglutinina *Pisum sativum* marcada con FITC (PSA-FITC; Sigma-Aldrich).

Para la tinción con Azul brillante de Coomassie, una vez fijados los espermatozoides, se lavaron por 5 minutos con agua destilada, se permeabilizaron con metanol por 5 minutos, se realizó un lavado con agua destilada y finalmente se incubaron en solución de Azul brillante de Coomassie (0,22% p/v Coomassie G250, Metanol 50% v/v, Acido Acético Glacial 10% v/v en agua destilada) por 2-3 minutos. Pasado dicho tiempo se realizó un lavado con

agua corriente y los portaobjetos, se montaron con glicerol 90% y se observaron inmediatamente para evitar la difusión del colorante.

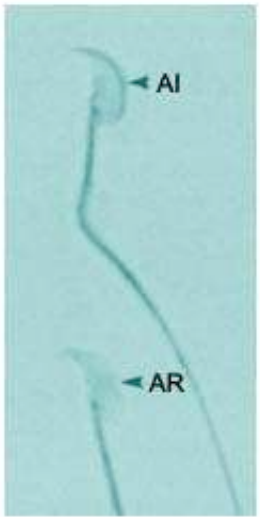


Figura 3.II.1: Patrones de tinción con Azul brillante de Coomassie en espermatozoides murinos. Patrón Acrosoma Intacto (AI): señal en región acrosomal; Patrón Acrosoma Reaccionado (AR): ausencia de señal en región acrosomal (modificado de Bleil & Wassarman, 1986).

En el caso en que se evaluó el estado acrosomal por tinción con PSA-FITC, los extendidos fueron permeabilizados por 20 segundos y luego se incubó durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad con PSA-FITC 50 µg/ml, se eliminó la lectina no unida por medio de lavados con PBS-D y finalmente los preparados fueron montados y analizados. Los espermatozoides que mostraron tinción positiva para PSA-FITC en el acrosoma fueron considerados “intactos”, mientras que los que no presentaron señal fueron considerados “reaccionados” (Barraud-Lange *et al*, 2007)

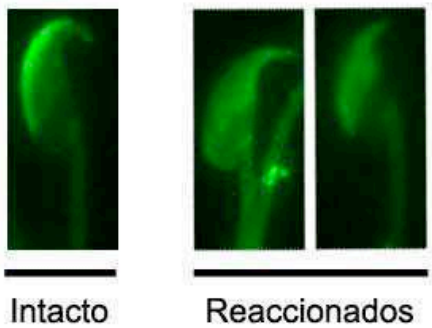


Figura 3.II.2: Patrones de tinción con PSA-FITC en espermatozoides murinos. Patrón Intacto: señal en región acrosomal; Patrones reaccionados: ausencia de señal en región acrosomal con

una señal de baja intensidad en el segmento ecuatorial con o sin señal adicional en la región post-acrosomal.

Se evaluaron 200 células en cada condición experimental para cada animal. Los resultados de la cuantificación de los diferentes patrones se expresaron como el valor promedio obtenido en cada caso y se calculó el Error Estándar del promedio (promedio ± EEP).

3.II.10 Ensayos de inmunohistoquímica para localización de cadE en cortes histológicos de epidídimo

Se obtuvieron fragmentos de tejido epididimario de las regiones del *caput*, *corpus* y *cauda*, los que fueron fijados por inmersión en solución de formaldehido al 10% en buffer fosfato (pH 7,4) durante 6 horas. Posteriormente, los tejidos se transfirieron a una solución de etanol al 70% por 24-48 horas, se embebieron en parafina, se obtuvieron secciones y se montaron. Las secciones de tejido desparafinado y rehidratado fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS suplementado con BSA al 4% p/v) durante 1 hora y, posteriormente, incubadas durante 18 horas en una solución conteniendo el anticuerpo anti cadE H-108. Luego de remover el anticuerpo no unido por lavado con PBS, las secciones se incubaron con segundo anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente, se removió el anticuerpo no unido por lavados sucesivos y finalmente se montaron. La localización de cadE y el registro de imágenes se realizaron de manera similar a lo descrito para el modelo humano (ver Parte I).

3.II.11 Ensayos de inmunolocalización de cadE en espermatozoides

Los espermatozoides previamente fijados fueron incubados por 18 horas a 4º C con el anticuerpo policlonal anti cadE H-108 o con el anticuerpo monoclonal anti cadE DECMA-1. Luego de remover el anticuerpo no unido, las células se incubaron con segundo anticuerpo (anti IgG de conejo acoplado a CY3 o anti IgG de rata acoplado a Texas Red) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el anticuerpo no unido por sucesivos lavados con PBS-D y las células se montaron en portaobjetos con cubreobjetos en presencia de solución de Vectashield.

Los estudios de inmunodetección de cadE se realizaron sobre espermatozoides fijados no capacitados, capacitados y reaccionados, de manera similar a lo especificado en el modelo humano. La evaluación de la localización y el registro de imágenes de cadE fue realizada a una magnificación 1.000x como se mencionó anteriormente para los espermatozoides humanos. Para evaluar en cada célula el estado del acrosoma de manera simultánea con la localización de cadE, se llevó a cabo el ensayo de inmunodetección de cadE seguido de la incubación con PSA-FITC; el procedimiento utilizado fue similar al descrito para el modelo humano.

3.II.12 Inmunolocalización de β-catenina y actina en espermatozoides

Además de los estudios de inmunolocalización de cadE, se desarrollaron protocolos para la inmunodetección de β-catenina utilizando un anticuerpo policlonal (anti IgG conejo, Upstate, Lake Placed, NY, EEUU). Para ello, los espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados fueron fijados en solución de formol 2% en PBS durante 5 minutos y posteriormente fueron permeabilizados con Tritón X 100 0,1% por 10 minutos. Finalizada esta incubación, se realizó un bloqueo de sitios inespecíficos por incubación con PBS suplementado con BSA 4% (p/v) a temperatura ambiente durante 45 minutos, seguido de incubación por 18 horas con el anticuerpo anti β-catenina (10 µg/ml) en solución de bloqueo. Finalizada la incubación, se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavados con PBS y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo anti conejo acoplado a CY3 (2 µg/ml) en PBS. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno y posteriormente las células se sembraron en portaobjetos y se montaron con solución Vectashield. En paralelo, se realizaron controles negativos de primer anticuerpo (utilizando IgG normal de conejo (I-5006; Sigma-Aldrich) en la misma concentración que el primer anticuerpo) y de segundo anticuerpo (incubaciones realizadas colocando solución de bloqueo en vez de primer anticuerpo).

Se realizaron varios protocolos orientados a evaluar la presencia de actina total y filamentosa espermática. Para ello, se utilizó un anticuerpo anti actina (anti IgG de conejo, A-2668; Sigma-Aldrich) en el primer caso y en el segundo caso se utilizó una toxina que se une a actina filamentosa denominada

faloidina (Faloidina-Alexa fluor 488, Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies). La faloidina es una falotoxina que deriva del hongo *Amanita phalloides*, se une específicamente a actina-F evitando la depolimerización del filamento.

Los espermatozoides procesados de manera similar a los teñidos con el anticuerpo anti β-catenina, fueron incubados con el anticuerpo anti actina toda la noche a 4º C, seguidamente sometidos a lavados con PBS para eliminar el anticuerpo primario no unido y posteriormente incubados con segundo anticuerpo anti conejo acoplado a CY3 durante una hora a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Finalmente el anticuerpo no unido se removió por sucesivos lavados con PBS, luego de lo cual las células se montaron y observaron al microscopio.

Para el caso de la detección de actina filamentosa, los espermatozoides de cada condición (no capacitados, capacitados y reaccionados), fueron fijados y permeabilizados como se indicó anteriormente y posteriormente fueron incubados con Faloidina Alexa-Fluor 488 3 μM durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad, siguiendo el protocolo descrito por Maier *et al* (2003). Posteriormente se hicieron lavados con PBS y finalmente las células se montaron para completar su análisis.

En todos los casos la evaluación de la localización y el registro de imágenes se realizaron como se mencionó anteriormente para el caso de cadE.

3.II.13 Localización ultraestructural de cadE en espermatozoides y vesículas del fluido del *cauda* epididimario

Para estos estudios se obtuvieron espermatozoides de *cauda* epididimario de ratones adultos de la cepa Balb-c por perfusión retrógrada desde el conducto deferente. La concentración de las células recuperadas fue ajustada a 1 x10^6 espermatozoides/ml y, luego de realizar un lavado en PBS-BSA 3%, los espermatozoides fueron incubados con el primer anticuerpo (anti cadE H-108) durante una hora a temperatura ambiente, con agitación esporádica. Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados con el segundo

anticuerpo (anti IgG de conejo acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm, una hora a temperatura ambiente). Finalmente, las gametas fueron lavadas en PBS y fijadas en glutaraldehido al 3% en PBS.

Las vesículas epididimarias de ratón obtenidas con el procedimiento detallado en la sección 3.II.5 se incubaron durante una hora en PBS suplementado con 1% BSA (p/v), seguido por la incubación en presencia de anticuerpo anti cadE durante una hora. Se removió el anticuerpo por centrifugación y el "pellet" de vesículas se resuspendió en presencia del segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro colloidal de 10 nm. Luego de una hora las vesículas fueron lavadas en PBS y fijadas en glutaraldehido al 2% en PBS durante 2 horas.

Los "pellets" conteniendo las gametas o las vesículas se procesaron por la metodología habitual de evaluación por microscopía electrónica de transmisión en un equipo EM Zeiss 900 (Pietrobon *et al*, 2001). Brevemente, las alícuotas conteniendo los espermatozoides o vesículas de cada experimento se resuspendieron en 200 µl de PBS y en un volumen igual de OsO_4 2% (p/v) y se incubaron por 18 horas a 4º C. Posteriormente las células y las vesículas fueron centrifugadas a 750 xg durante 10 minutos, los "pellets" obtenidos se deshidrataron en etanol-acetona y finalmente se embebieron en la resina Epon 812 (Pelco, Pelco Way, Clovis, CA). Se obtuvieron secciones delgadas utilizando un ultramicrotomo Ultracut R (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se observaron bajo microscopía electrónica de transmisión.

3.II.14 Inmunolocalización en ovocitos de ratón con y sin ZP

Los ovocitos libres de células del *cumulus*, con y sin ZP, fueron fijados en solución de formaldehido al 2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se inició el protocolo de inmunodetección con la incubación con solución de PBS-BSA 0,5% (p/v) suplementada con suero de cabra 1%, Tritón X-100 0,01% y glicina 100mM durante 30 minutos para el bloqueo de sitios inespecíficos. Luego, las células se incubaron durante una hora a 37º C en presencia de 4 µg/ml de primer anticuerpo anti cadE H-108 en PBS-D 4% BSA (p/v). Finalizada la incubación, se eliminó el anticuerpo no unido

mediante lavados en medio de FIV y posteriormente se incubó durante 1 hora con el segundo anticuerpo anti conejo acoplado a CY3 (2 µg/ml) en PBS-D. Se realizaron lavados por pasajes sucesivos en gotas y posteriormente se montaron con solución Vectashield. En paralelo se realizaron controles negativos de primer anticuerpo utilizando IgG de conejo normal (Sigma-Aldrich) en la misma concentración que el primer anticuerpo.

Para la inmunolocalización de las proteínas del complejo adherente β-catenina y actina, los ovocitos libres de células del *cumulus* y las células del *cumulus* aisladas fueron previamente fijados (formol 2% en PBS), posteriormente permeabilizados con Tritón X-100 0,1% por 5 minutos a temperatura ambiente, y finalmente incubados en solución de bloqueo y anticuerpos (primero y segundo) siguiendo un procedimiento similar al descrito para la inmunolocalización de cadE. Para la inmunolocalización de β-catenina se utilizó el anticuerpo policlonal (Upstate) a una concentración de 10 µg/ml. Para evaluar la presencia de actina filamentosa, los ovocitos se incubaron en presencia de faloidina-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 0,08 µM.

La inmunolocalización de las diferentes proteínas se monitoreó utilizando microscopia láser confocal (C1, Nikon, Tokio, Japón). Las observaciones se realizaron empleando un objetivos PLAN 20x/0.4, Plan Apo 40x/0.95 y PLAN APO 60x/1.4 oil 60 x (excitación/emisión: 488 nm/515-530 nm y 544 nm/570 LP) y se registraron y analizaron usando el mismo equipo y procedimientos que los descritos para los estudios en el modelo humano.

3.II.15 Ensayos de interacción ovocito-espermatozoide, fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario temprano

Utilizando una estrategia similar a la mencionada en la sección correspondiente a ensayos de interacción espermatozoide-ovocito en el modelo humano, se desarrollaron una serie de ensayos biológicos *in vitro* para evaluar la participación de cadE en la interacción entre las gametas en el modelo murino. En este caso, los ensayos desarrollados y optimizados fueron los siguientes: 1) ensayo de fecundación *in vitro* empleando complejos ovocito *cumulus*, 2) ensayo de fecundación *in vitro* empleando ovocitos denudados, 3) ensayo de interacción

espermatozoide-ZP; 4) ensayo de interacción espermatozoide-oolema. En el último caso, el ensayo se desdobló en dos evaluaciones: ensayo de unión y ensayo de fusión al oolema.

Como abordaje para la evaluación del rol de cadE se utilizó el bloqueo con anticuerpos. Para hacer los estudios se eligieron los anticuerpos dirigidos contra dominios extracelulares de la proteína de adhesión: 1) el anticuerpo monoclonal ECCD1, que reconoce específicamente cadE murina y 2) el anticuerpo policlonal H-108, desarrollado contra la proteína humana. En nuestro conocimiento no hay antecedentes sobre la capacidad del anticuerpo de bloquear la adhesión celular y, particularmente, en células murinas. Dado que el anticuerpo anti cadE ECCD1 ha demostrado la capacidad de inhibir la interacción entre las blastómeras de los embriones tempranos en el desarrollo y bloquear la compactación de la mórula (Shirayoshi *et al*, 1983), se decidió realizar ensayos de desarrollo temprano de embriones de ratón en presencia del anticuerpo H-108 en paralelo con el anticuerpo ECCD1 y evaluar la capacidad del primero de inhibir la adhesión entre las blastómeras. Estos estudios se realizaron previo a los estudios de interacción entre las gametas:

Ensayo de desarrollo embrionario temprano y monitoreo de compactación de blastómeras de la mórula: Para estos estudios se realizó un protocolo previamente empleado por nuestro grupo de investigación (Veaute *et al*, 2009). Básicamente, se realizó un protocolo estándar de estimulación ovárica de super-ovulación de ratones hembra de la cepa CF1, como el empleado para la obtención de folículos supernumerarios. Luego de la inyección con hCG (Sigma-Aldrich), las hembras se aparearon con machos en relación 1:1. Completadas las 48 horas, las hembras fueron sacrificadas y los oviductos fueron extraídos. Los embriones de 2 células fueron obtenidos por punción de los oviductos utilizando jeringa de tuberculina con PBS y transferidos a medio de cultivo KSOM. El cultivo embrionario se realizó a 37º C en atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Para evaluar el efecto del anticuerpo anti cadE H-108 (Santa Cruz) en el desarrollo embrionario, el cultivo se realizó en presencia o ausencia de 200 μg/ml del anticuerpo. En paralelo se realizaron ensayos en presencia de la misma concentración del anticuerpo anti cadE ECCD1 (Zymed-Invitrogen) efectivo en su capacidad de inhibir la compactación de embriones murinos; en

los ensayos se incluyeron controles omitiendo los anticuerpos (control). En cada caso se evaluó el porcentaje de embriones que alcanzaron el estado de mórula compactada, monitoreando periódicamente los cultivos por un período de hasta 72 horas y tomando registros fotográficos con un microscopio Olympus CK 40 con objetivo LWD CDPLAN 40 FRP 0.55 160/1 (Tokio, Japón). Los resultados se expresaron como porcentajes de embriones en estado de mórula compactada calculado respecto del número total de embriones evaluados en cada condición experimental. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Mónica S de Cameo y la Lic. Virginia Choren del laboratorio BR (Biología de la Reproducción; Buenos Aires, Argentina).

Como se mencionó anteriormente, para todos los procedimientos se realizó un protocolo estándar de estimulación de hembras de la cepa CF1 de 4 a 8 semanas de edad. Al finalizar cada ensayo, se evaluó la vitalidad ovocitaria por medio de la tinción con Azul Tripán (0,25% p/v en PBS) y la motilidad espermática fue estimada por evaluación subjetiva de una alícuota de espermatozoides de la gota de co-incubación con los ovocitos.

Ensayo de fecundación *in vitro* (FIV): El ensayo se realizó co-incubando complejos ovocito *cumulus* y espermatozoides o, alternativamente, ovocitos denudados y espermatozoides. Los protocolos implementados siguieron como modelo otros previamente reportados (Herrero *et al*, 2005; Veaute *et al*, 2009).

Los complejos ovocito *cumulus* o los ovocitos denudados fueron recuperados empleando los procedimientos detallados anteriormente. Los espermatozoides del *cauda* epididimario fueron recolectados en medio de FIV e incubados bajo condiciones capacitantes por un período total de 2 horas. El anticuerpo anti cadE (H-108 o ECCD1) fue agregado a la suspensión espermática en los últimos 30 minutos de incubación de la capacitación. En la condición control los espermatozoides fueron pre-incubados con IgG normal de la especie en la que está hecho el primer anticuerpo (conejo o rata, respectivamente) agregada a la misma concentración que el anticuerpo específico.

Los complejos ovocito *cumulus* o los ovocitos denudados fueron agregados a las gotas conteniendo los espermatozoides. Las gametas femeninas y masculinas fueron co-incubadas en cápsulas de cultivo en gotas bajo aceite mineral por un período total de 8 horas a 37º C en estufa gaseada (5% CO_2 en aire). Finalizada la incubación, los complejos ovocito *cumulus* fueron procesados para separar las células del *cumulus*, visualizar los ovocitos y determinar si habían sido fecundados; alternativamente se recuperaron los ovocitos denudados. Se evaluó el porcentaje de ovocitos fecundados (tasa de fecundación). Se tomó como criterio de fecundación la identificación de la presencia de 2 pronúcleos y la extrusión del segundo cuerpo polar en ovocitos observados a una magnificación 400x. Se determinó la tasa de fecundación siguiendo la fórmula:

[(# ovocitos fecundados (2PN) / # de ovocitos inseminados)] x 100.

Ensayo de unión de espermatozoides a la ZP: Los ensayos se implementaron utilizando como modelo protocolos descritos previamente (Busso *et al*, 2007). Para estos ensayos se emplearon ovocitos denudados recuperados de los complejos ovocitos *cumulus* como se mencionó previamente y posteriormente tratados con hialuronidasa para remover las células del *cumulus*. El tiempo de co-incubación de las gametas fue de 30 minutos. Finalizada la incubación, se tomaron los ovocitos conteniendo espermatozoides asociados y se fijaron en solución de formaldehído 2% (v/v) en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, se montaron y se determinó el número de espermatozoides unidos por ovocito a una magnificación 400x. El recuento se realizó evaluando el número de cabezas unidas a la superficie de la ZP.

Alternativamente, los ovocitos libres de células del *cumulus* se preincubaron en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1 (20 μg/ml) durante 30 minutos, posteriormente se agregó a la gota de incubación una alícuota de espermatozoides capacitados por un período total de 2 horas. Las gametas se coincubaron durante 30 minutos adicionales y pasado dicho tiempo se evaluó el número de espermatozoides unidos a ZP por ovocito, de manera similar a la indicada anteriormente.

En todos los casos se realizó una gota control en medio de FIV, una gota control con IgG normal y al menos una gota con agregado de anticuerpo anti cadE, en cada gota se colocaron entre 10 y 20 ovocitos.

En algunos casos se evaluó el estado del acrosoma de los espermatozoides unidos a la estructura de la ZP utilizando óptica de Nomarski u óptica de contraste interdiferencial (DIC, de sus siglas en inglés).

Se registró el número de espermatozoides unidos a la superficie de la ZP bajo una magnificación de 400x. Los resultados se expresaron como número promedio ± Error Estándar Promedio (promedio ± EEP) de espermatozoides unidos por ZP.

Ensayo de unión y fusión del espermatozoide al oolema: Los ensayos se realizaron siguiendo protocolos descritos anteriormente (Herrero *et al*, 2005) incluyendo algunas modificaciones. Brevemente, para evaluar la capacidad del anticuerpo anti cadE de inhibir la unión del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito (oolema), así como también la fusión de las gametas, se emplearon ovocitos denudados y sin ZP. Se evaluaron diversos tiempos de coincubación entre las gametas (ver resultados) y los ensayos se realizaron por hasta 60 minutos. Pasado dicho tiempo, los ovocitos se fijaron empleando una solución de formaldehído 2% (v/v) en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se tiñeron con el colorante vital fluorescente HOECHST 33342 (0,1 µg/ml, 10 minutos a temperatura ambiente) y se montaron sobre portaobjetos. Finalmente se determinó el número de cabezas unidas y/o el porcentaje de ovocitos con al menos una cabeza descondensada en cada condición experimental.

Los ovocitos libres de células del *cumulus* y sin ZP fueron incubados con espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes por un período total de 2 horas. El anticuerpo anti cadE (H-108: 20 µg/ml o ECCD1: 200, 20, 2 o 0,2 µg/ml) se incorporó a la suspensión espermática en los últimos 30 minutos de incubación de la capacitación. Se realizaron controles con la misma cantidad de IgG normal de la especie en la que está hecho el primer anticuerpo (conejo o rata, respectivamente). Las gametas fueron co-incubadas por un período total de

60 minutos a 37º C en estufa gaseada (5% CO_2 en aire). Finalizada la incubación, se evaluó el número de espermatozoides unidos por ovocito y el porcentaje de ovocitos que presentaron al menos una cabeza descondensada asociada a una cola espermática, adicionalmente la presencia de los cromosomas en la placa metafásica fue un indicador de falta de descondensación.

En los ensayos en los que se incubaron los ovocitos con el anticuerpo previo a la co-incubación de las gametas, una vez obtenidos los ovocitos libres de ZP se preincubaron con el anticuerpo anti cadE ECCD1 o la IgG normal de rata (20 µg/ml) durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron en la gota los espermatozoides capacitados por 2 horas, las gametas se co-incubaron por 60 minutos y finalmente se siguió el procedimiento como se mencionó anteriormente.

En todos los casos se evaluó la unión y fusión de los espermatozoides a los ovocitos en una gota de medio control, en una gota de control con IgG normal de la especie correspondiente y en una gota con anticuerpo anti cadE. En las gotas se colocaron entre 10 y 20 ovocitos, sobre los que se evaluó el número de espermatozoides unidos por ovocito y el porcentaje de ovocitos penetrados para cada condición. Los resultados se expresan como el valor promedio ± Error Estándar Promedio (promedio ± EEP) del número de espermatozoides unidos/ ovocito y como el porcentaje de ovocitos con al menos una penetración.

3.II.16 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como los valores promedio ± Error Estándar del Promedio (EEP) para cada serie de experimentos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunodetección de cadE en espermatozoides en distintas condiciones funcionales se expresaron como valores promedio para cada patrón de localización de cadE en cada condición (acrosoma intacto o reaccionado, identificado por tinción con PSA-FITC) de los

registros obtenidos sobre al menos 200 células para cada animal. En todos los casos se evaluaron al menos tres animales.

En todos los casos los datos fueron analizados y graficados con el software GraphPad Prism 4. Para evaluar la significancia estadística de los ensayos de FIV y en el porcentaje de ovocitos fusionados, se utilizó el test estadístico de Fischer. En el caso en el que se evaluó el número de espermatozoides unidos a MP o ZP se utilizó el estadístico de Kruskal-Wallis. Los resultados fueron considerados con diferencias significativas cuando mostraron un valor $P < 0,05$.

Resultados

Parte I: Evaluación de la expresión, localización y función de cadE en espermatozoides y ovocitos humanos. Análisis de su expresión en testículo y epidídimo humano y presencia en fluidos del tracto reproductor masculino. Estudios preliminares sobre muestras de semen de pacientes en consulta por infertilidad

El proceso de fecundación involucra una secuencia altamente coordinada de interacciones entre el espermatozoide y el ovocito que dan origen a una cigota viable. Como resultado de estudios realizados en varias especies de mamíferos, el mecanismo propuesto establece que los espermatozoides que han completado la capacitación interactúan y atraviesan las células del *cumulus* que rodean al ovocito, luego de lo cual contactan y se unen a la ZP; este proceso gatilla la exocitosis acrosomal (EA), permitiendo a los espermatozoides reaccionados penetrar la ZP, alcanzar el espacio perivitelino, unirse y fusionarse a la membrana plasmática del ovocito u oolema.

En esta secuencia de eventos se pueden identificar tres fenómenos de adhesión celular: 1) entre los espermatozoides capacitados y las células del *cumulus*, 2) entre los espermatozoides capacitados y la ZP y 3) entre los espermatozoides reaccionados y el oolema. Si bien las bases moleculares de estos procesos han sido estudiadas y se han identificado proteínas que participarían en estos eventos, los mecanismos moleculares del mismo y las moléculas responsables aún no se conocen en su totalidad (Yanagimachi, 1994; Wassarman *et al*, 2005; Talbot *et al*, 2003).

Dado que proponemos la participación de cadE en dichos fenómenos de adhesión, se procedió a evaluar la expresión y localización de cadE en ambas gametas y se implementaron una serie de ensayos para evaluar los eventos de la interacción de gametas y empleando estrategias de bloqueo con anticuerpos específicos se abordó el estudio de la participación de esta proteína de adhesión en los mismos.

En la primera sección de este capítulo se presenta la descripción detallada de los resultados correspondientes al estudio de las formas proteicas de cadE y de las proteínas del complejo de adhesión β-catenina y actina, en

extractos proteicos de espermatozoides, (Sección 4.I.1). En las secciones siguientes (Secciones 4.I.2 y 4.I.3) se presentan los resultados de los estudios realizados para evaluar la expresión y localización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides recuperados del eyaculado y procesados para generar poblaciones de espermatozoides capacitados y reaccionados *in vitro*, a fin de imitar los eventos del transito de la gameta por el tracto femenino y su interacción con la ZP del ovocito. En este capítulo se presentan, además, estudios realizados sobre la expresión del ARN mensajero de cadE en tejido testicular y epididimario, así como sobre la localización de la proteína de adhesión en cortes histológicos de epidídimo y su detección en fluidos del *cauda* epididimario y plasma seminal y vesículas purificadas del plasma seminal (Sección 4.I.4). Posteriormente se presentan resultados correspondientes a la evaluación de la participación de cadE en el proceso de fecundación (Sección 4.I.5). En la última sección, se presentan resultados correspondientes a la evaluación de la presencia y localización de cadE en espermatozoides recuperados del semen de un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad (Sección 4.I.6).

Los estudios iniciales de caracterización de la presencia y localización de cadE en espermatozoides y plasma seminal (Secciones 4.I.1 a 4.I.4) se realizaron a partir de muestras de semen de donantes que presentaron valores de los parámetros de rutina dentro de los rangos establecidos para muestras normozoospérmicas según las normativas de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1999; volumen seminal: al menos 2 ml; concentración espermática al menos 20 millones/ml; motilidad espermática al menos 50% espermatozoides progresivos; morfología espermática mayor que 14% formas normales según criterio estricto de Kruger; aglutinación espermática menor que 10%). Los tejidos epididimarios y testiculares fueron obtenidos de procedimientos de cirugía terapéutica para el carcinoma de próstata luego de haber obtenido consentimiento escrito de los pacientes donantes de los tejidos. Los estudios con ovocitos y con espermatozoides de pacientes se realizaron con gametas donadas por pacientes en tratamiento por infertilidad con técnica de reproducción asistida de alta complejidad.

4.I.1 Identificación de las formas de cadE, β-catenina y actina en extractos proteicos de espermatozoides mótiles del eyaculado

Se iniciaron estudios enfocados a evaluar la presencia de cadE y otros miembros del complejo adherente, particularmente β-catenina y actina, en extractos proteicos de espermatozoides humanos provenientes de individuos normozoospérmicos. Para ello se implementaron protocolos de electroforesis en geles de poliacrilamida seguido de Western Immunoblotting con anticuerpos específicos para cada una de las proteínas en estudio (anti cadE: H-108 (Santa Cruz Biotech), 610181 (BD Biosciences); anti β-catenina: 610153 (BD Biosciences), anti actina: I-19 (Santa Cruz Biotech). Alícuotas de semen del eyaculado fueron sometidas a protocolos de selección de la fracción mótil de espermatozoides empleando el procedimiento de "swim up". Solo preparaciones libres de células redondas con altos porcentajes de espermatozoides mótiles (>90% espermatozoides con motilidad progresiva) fueron procesadas para obtener los extractos proteicos.

En los extractos espermáticos revelados con el anticuerpo policlonal específico anti cadE dirigido contra dominio extracelular cadherina 5 (EC5; H-108, Sta Cruz) se identificó la forma de 120 KDa. Esta forma molecular de cadE fue descrita con anterioridad en otros tipos celulares y tejidos y corresponde a la forma madura de la proteína que incluye los cinco dominios extracelulares, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático (Lapyckyj *et al*, 2010). Además de la forma completa de cadE se detectó la presencia de formas truncadas de 105, 97 y 86 KDa (**Figura 4.I.1**).

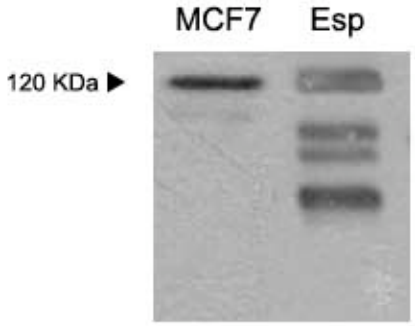


Figura 4.I.1: Inmunodetección de cadE en ensayos de Western Immunoblotting sobre extractos proteicos de espermatozoides eyaculados mótiles (Esp). En los perfiles inmunorrevelados con el anticuerpo H-108 se detectaron cuatro formas proteicas de cadE de 120, 105, 97 y 86 KDa.

Los ensayos realizados sobre los extractos proteicos empleando anticuerpos específicos para β-catenina y actina revelaron la presencia de una señal específica para formas proteicas de 92 KDa y 42 KDa, respectivamente, tamaños que coinciden con los previamente descritos en células somáticas para estas proteínas (Gooding *et al*, 2004; Elzinga *et al*, 1973) (**Figura 4.I.2**).

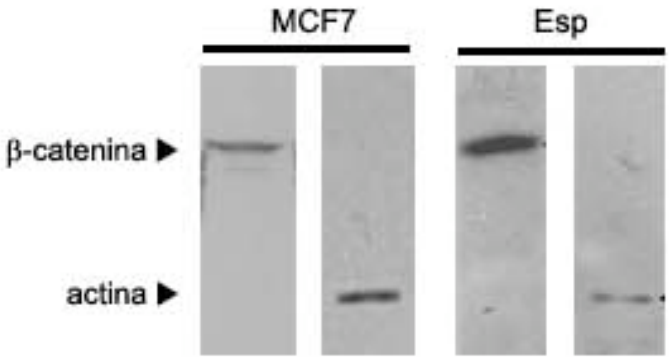


Figura 4.I.2: Inmunodetección de β-catenina y actina en ensayos de Western Immunoblotting sobre extractos proteicos de espermatozoides eyaculados mótiles. En los perfiles inmunorrevelados con anticuerpos específicos para cada proteína se detectaron formas de tamaño molecular esperado para ambas proteínas (β-catenina: 92 KDa; actina: 42 KDa).

Con el interés de identificar las formas truncadas de cadE detectadas en el perfil proteico de los extractos totales de espermatozoides, las membranas fueron reveladas además con anticuerpos anti cadE dirigidos contra otras regiones de la proteína de adhesión. Para ello se eligieron, además del anticuerpo policlonal H-108 dirigido contra la región comprendida entre los residuos 600 y 707 (EC5), los anticuerpos monoclonales HECD-1, que reconoce la región comprendida entre los residuos 333-379 (dominios extracelulares EC2) y el anticuerpo monoclonal 610181, cuyo epítope ha sido mapeado entre los aminoácidos 773-791 (dominio citoplasmático) de cadE. Los resultados de estos estudios se presentan en la **Figura 4.I.3**:

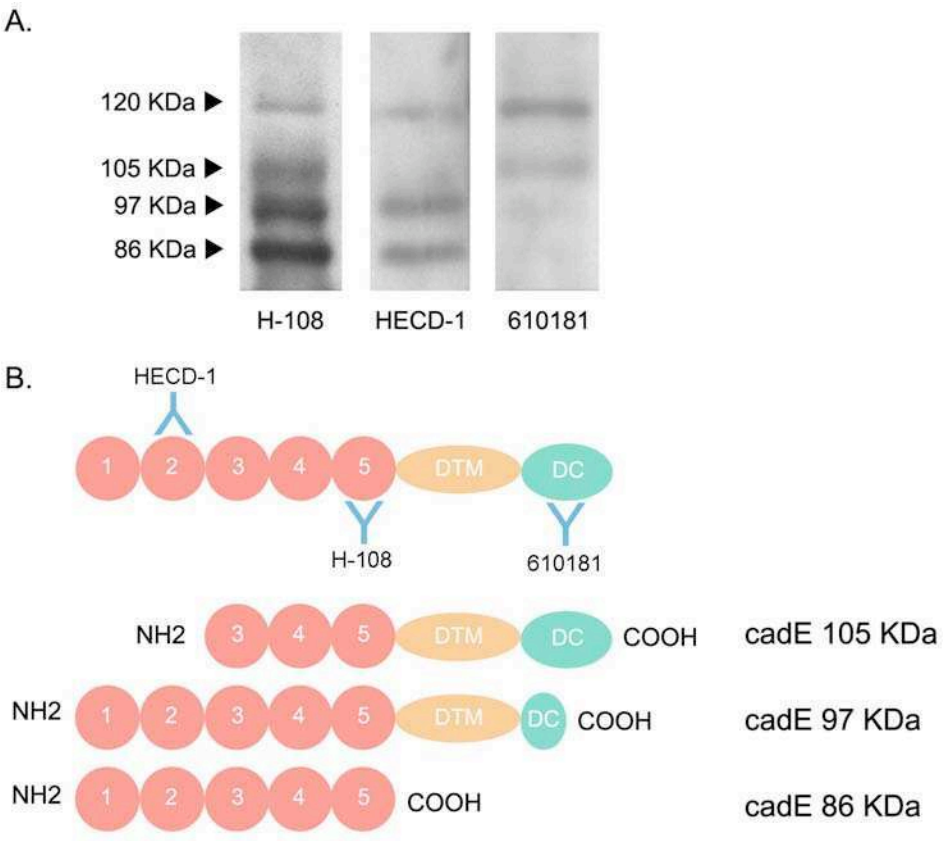


Figura 4.I.3: Detección de formas proteicas para cadE por medio de ensayos de Western Immunoblotting sobre extractos proteicos de espermatozoides eyaculados mótiles con tres anticuerpos específicos para cadE: HECD-1, H-108 y 610181. **A.** Los anticuerpos específicos anti cadE revelaron la presencia de 4 formas proteicas de tamaño molecular aparente de 120, 105, 97 y 86 KDa para la proteína de adhesión, en extractos proteicos de espermatozoides humanos mótiles libres de plasma seminal. Los detalles del análisis se presentan en el texto. **B.** Representación esquemática de las formas proteicas truncadas reconocidas por los diferentes anticuerpos. Los dominios extracelulares cadherina 1 a 5 (EC1 a EC5) se indican con números del 1 al 5, el dominio transmembrana como DTM y el citoplasmático como DC.

Como resultado de estas evaluaciones se determinó que: 1) la forma truncada de cadE de 105 KDa fue detectada con el anticuerpo 610181 pero no con el anticuerpo HECD-1, resultados que sugieren que esta forma estaría truncada en el extremo amino terminal. Asimismo, 2) las formas proteicas de 97 y 86 KDa fueron detectadas además por el anticuerpo HECD-1, pero no así con el 610181, resultados que sugieren que ambas formas proteicas estarían truncadas en el extremo carboxilo terminal. En células somáticas previamente se describió que la forma de 86 KDa corresponde al ectodominio de cadE, el que resulta del procesamiento de la forma madura de la proteína por

metaloproteasas de membrana (ej. matrilisina y estromelisina); el procesamiento por esta enzima conduce a la liberación del ectodominio de cadE (86 KDa), dejando asociado a la membrana plasmática un fragmento de 35 KDa (Maretzky *et al*, 2005), el que es reconocido por el anticuerpo 610181 (**Figura 4.I.4**):

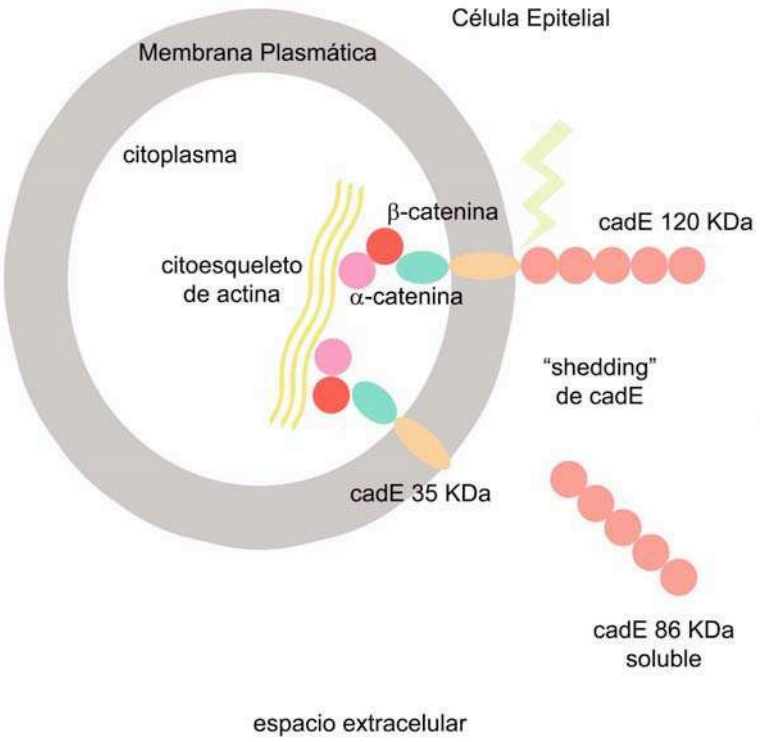


Figura 4.I.4: Representación esquemática del "shedding" de cadE. Las metaloproteasas de membrana (ej. matrilisina y estromelisina) clivan la forma madura de cadE (120 KDa) y dan como producto la liberación del ectodominio de la proteína (forma soluble de 86 KDa), dejando en la membrana plasmática de la célula una forma proteica de 35 KDa que se corresponde con el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

El fragmento de 35 KDa no es detectado en los perfiles proteicos de la Figura 4.I.3, dado que los mismos corresponden a separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida al 8%, en los que las proteínas de ese tamaño comigran con el frente de corrida. Respecto del ectodominio de cadE, éste también fue detectado en fluido del plasma epididimario y en el plasma seminal (ver más adelante).

Posteriormente, se realizaron una serie de ensayos orientados a analizar la asociación a la membrana plasmática del espermatozoide de las formas

truncadas de cadE de 97 y 86 KDa detectadas en los lisados de espermatozoides. Cuando los espermatozoides fueron incubados en una solución buffer conteniendo diferentes concentraciones de sal (1, 2 y 4 M de NaCl), la forma de 86 KDa fue recuperada en el sobrenadante (**Figura 4.I.5**, SN); el análisis de la fracción del "pellet" no reveló la presencia de la forma de 35 KDa (**Figura 4.I.5**, P; estos perfiles corresponden a geles de poliacrilamida al 10% en el que pueden detectarse conjuntamente las formas de cadE de 120 y 35 KDa). Los resultados sugieren que la forma de 86 KDa correspondería al ectodominio de cadE, el que se encontraría asociado a otras formas y que no resultaría de proteólisis de la forma completa durante el procesamiento de la muestra:

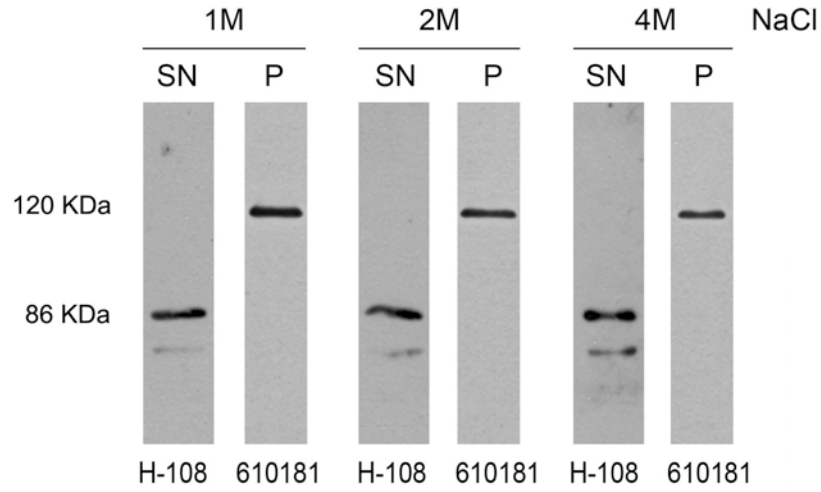


Figura 4.I.5: Análisis de las formas proteicas para cadE en espermatozoides incubados con soluciones de NaCl 1, 2 y 4 M, por medio de la técnica de Western Immunoblotting. Los sobrenadantes (SN) de estas incubaciones conteniendo las proteínas extraídas fueron analizados en geles de poliacrilamida al 7%, seguido de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con el anticuerpo anti cadE H-108. Las proteínas no extraídas (P) fueron sujetas al mismo análisis empleando geles de poliacrilamida al 10% seguidos de Western Immunoblotting con el anticuerpo anti cadE 610181.

Además de las formas transmembrana de las cadherinas, se ha demostrado la expresión de cadherinas que se asocian a la membrana plasmática a través de gliceril fosfatidil inositol (GPI); este es el caso de la cadherina T (Angst *et al*, 2001). Para evaluar si la forma de cadE de 97 KDa correspondería a una forma de cadE asociada a la membrana plasmática de manera similar a lo descrito para cadherina T, los espermatozoides mótiles libres

de plasma seminal fueron incubados con la enzima fosfolipasa C específica para inositol fosfato (PI-PLC) seguido de análisis por Western Immunoblotting, empleando protocolos que se detallan en la sección de Materiales y Métodos. Como resultado de estas evaluaciones (**Figura 4.I.6**), no se observó la liberación de la forma truncada de cadE de 97 KDa, sugiriendo que su extracción es resistente a la enzima o que corresponde a la forma completa, blanco de otra actividad enzimática en la región amino terminal. Por otra parte, se detectó la presencia de la forma de 86 KDa, en este caso acompañada del fragmento de 35 KDa; estos resultados sugieren que el ectodominio detectado en los perfiles revelados resultaría del clivaje de la forma completa de cadE y no de la actividad de la PI-PLC:

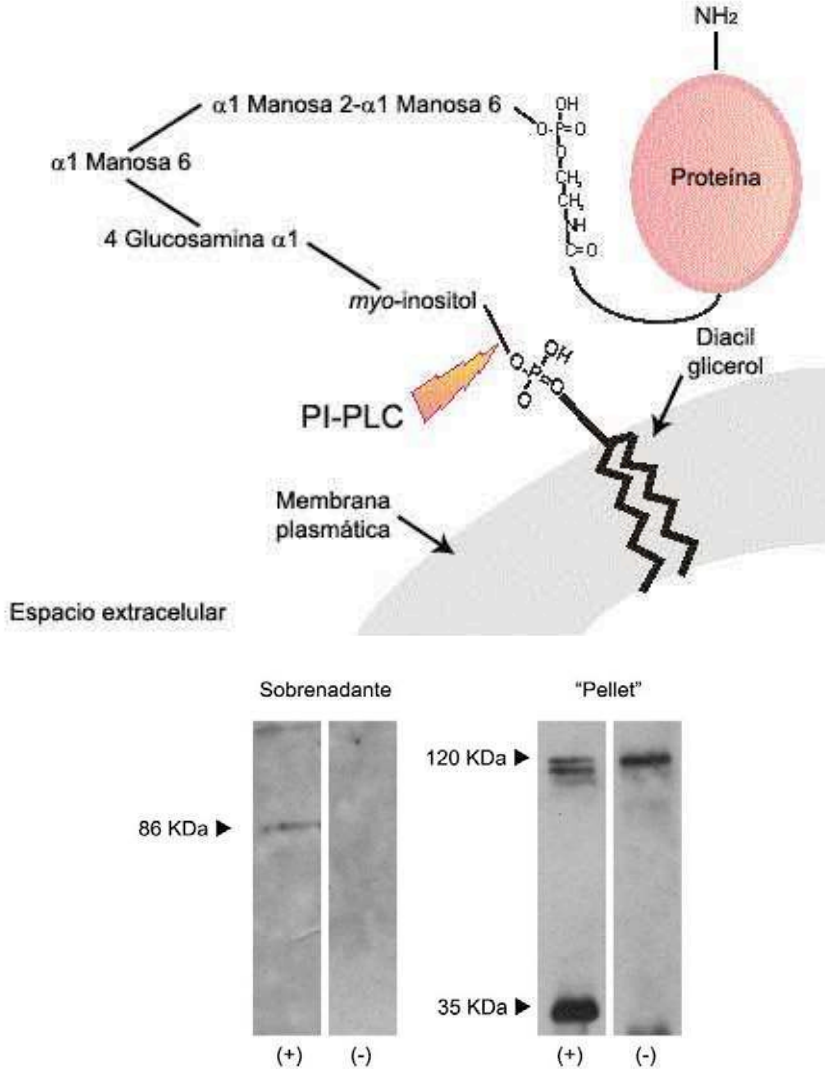


Figura 4.I.6: Análisis de las formas proteicas para cadE en espermatozoides incubados con la enzima PI-PLC por medio de la técnica de Western Immunoblotting. El sobrenadante del tratamiento con la enzima (+) y en la condición control (-) conteniendo las proteínas extraídas

fueron analizados en geles de poliacrilamida al 7%, seguido de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado con el anticuerpo anti cadE H-108 para observar las formas. Las proteínas no extraídas por la enzima ("pellet"), en la condición tratado (+) y control (-), fueron sujetas al mismo análisis empleando geles de poliacrilamida al 10% seguidos de Western Immunoblotting con el anticuerpo anti cadE 610181.

En conjunto, los resultados muestran que los espermatozoides presentan la forma madura de cadE de 120 KDa, así como se detectan otros miembros del complejo adherente β-catenina y actina, de tamaño molecular similar al descrito en otros tipos celulares. Los perfiles para cadE presentan además formas truncadas de la molécula de adhesión de 105, 97 y 86 KDa que resultarían de procesamiento proteolítico de la forma de 120 KDa.

4.I.2 Ensayos de inmunolocalización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides mótiles del eyaculado

Con el fin de determinar la localización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides del eyaculado, se realizaron ensayos de inmunofluoresecencia indirecta con anticuerpos específicos para las tres proteínas en estudio. Las evaluaciones se realizaron sobre un total de cuatro muestras de donantes normozoospérmicos. Las características seminales de las muestras empleadas se presentan a continuación:

	Concentración ($x10^6$/ml)	**Motilidad (%)**	**Volumen (ml)**
D 1	149	67	5,5
D 2	83	82	4,5
D 3	60	82	3
D 4	42	50*	4

Tabla 4.I.1: Evaluación de los parámetros seminales de los donantes utilizados (D1 a D4). En la tabla se muestran el volumen de la muestra y los valores de concentración y motilidad espermática

en el total de las cuatro muestras utilizadas para ensayos de inmunolocalización de cadE. *A la muestra del donante4 se le evaluó adicionalmente la vitalidad arrojando un valor de 91% de espermatozoides vivos. En todos los casos las muestras presentaron una morfología espermática dentro de los valores normales (% formas normales > 14%; Criterio estricto de Kruger; datos no mostrados).

En todos los casos, el semen utilizado para el estudio fue sometido a un procedimiento de selección de espermatozoides mótiles por la técnica de "swim up", obteniéndose recuperaciones espermáticas de entre el 6 y el 45% de la muestra original. Las suspensiones de espermatozoides mótiles seleccionados incluidas en el estudio presentaron porcentajes de células mótiles en un rango de entre 70 y 92% (82,20 ± 5,21% de espermatozoides mótiles, promedio ± EEP), parámetro evaluado de manera subjetiva por observación al microscopio. Conjuntamente, las preparaciones presentaron altos porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos (valor promedio del 80%; rango 70-93%); en todos los casos, la clasificación del estado del acrosoma de los espermatozoides (intactos, reaccionando y reaccionados) fue realizada luego de la evaluación de las células fijadas y teñidas con la lectina aglutinina de *Pisum Sativum* marcada con isotiocianato de fluoresceina (PSA-FITC). Los espermatozoides de estas suspensiones serán denominados a lo largo del estudio como "no capacitados".

Los ensayos de inmunolocalización de la proteína cadE con el anticuerpo H-108 (Sta Cruz) sobre los espermatozoides no capacitados previamente fijados revelaron la presencia de una señal específica e intensa principalmente localizada en la región del acrosoma y el flagelo espermáticos en una gran proporción de las células de la muestra; la intensidad de la señal observada fue variable entre las células de la misma suspensión, particularmente la correspondiente al flagelo. Evaluaciones similares realizadas para las proteínas β-catenina y actina revelaron la misma localización celular que la determinada para cadE. En la **Figura 4.I.7** se presentan imágenes representativas de los resultados de los ensayos de inmunolocalización para cada una de las tres proteínas:

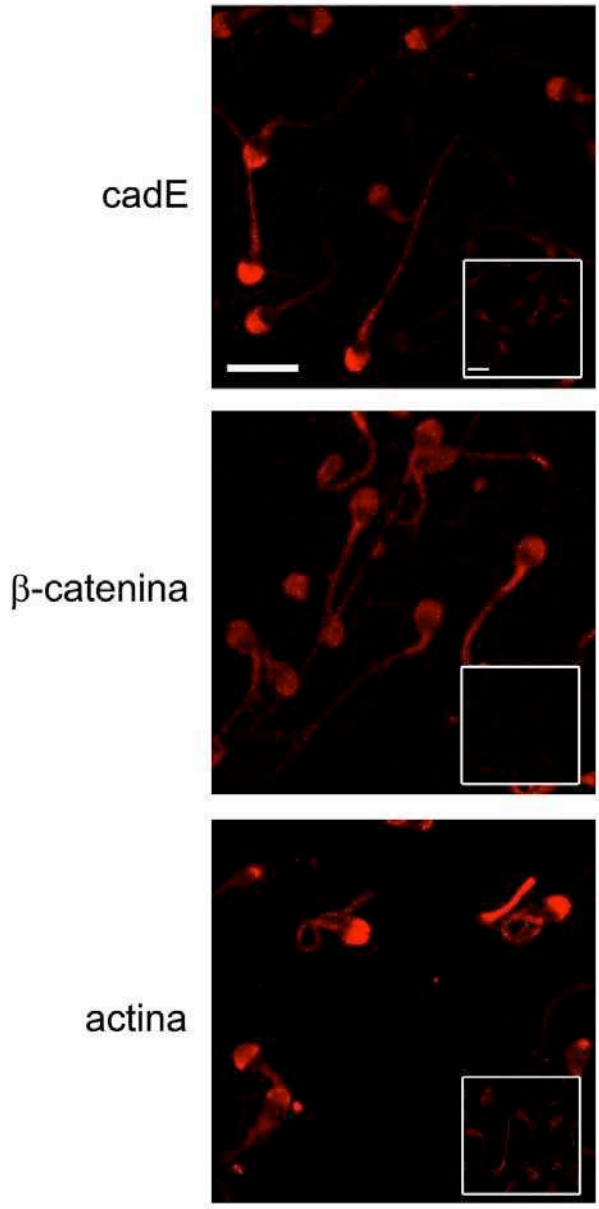


Figura 4.I.7: Inmunodetección de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides mótiles recuperados del eyaculado. En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, los espermatozoides mótiles seleccionados luego del "swim up" (no capacitados) fueron incubados con los anticuerpos anti cadE (H-108), anti β-catenina (AB19022, Millipore) y anti actina (A268, SIGMA) seguido de lavados e incubaciones con segundos anticuerpos marcados con el fluorocromo CY3. Imágenes tomadas empleando microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil (la barra indica 20 µm). En los paneles internos se muestran los controles negativos en donde el primer anticuerpo fue reemplazado por la IgG específica de cada especie agregada a la misma concentración en la que se utilizó el primer anticuerpo.

El estudio detallado de los patrones de inmunolocalización de cadE en la población espermática de espermatozoides no capacitados y su cuantificación

reveló la presencia de un patrón predominante con señal intensa en el acrosoma (77,8 ± 7,9%, promedio ± EEP, n= 5). En el resto de los espermatozoides de las suspensiones espermáticas se detectó principalmente un patrón de localización homogénea y tenue sobre toda la cabeza (19,7 ± 7,0%) (**Figura 4.I.8**):

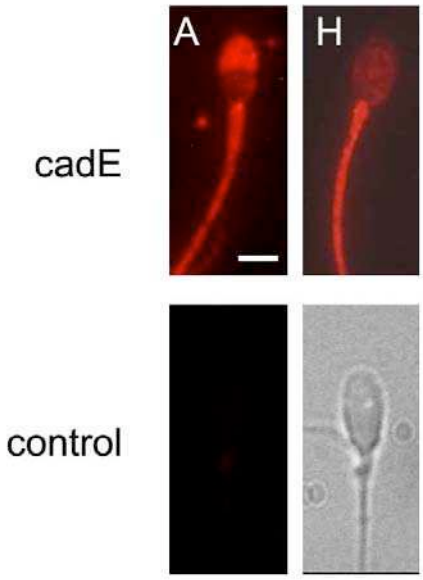


Figura 4.I.8: Localización de cadE en espermatozoides humanos no capacitados. Las imágenes muestran los patrones mayoritarios de localización para espermatozoides. A: tinción en el capuchón acrosomal y H: tinción tenue y homogénea sobre la superficie entera de la cabeza del espermatozoide. En todos los casos se observó señal para cadE en el flagelo. Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100 x (la barra indica 2,5 µm).

Empleando la misma metodología, se realizaron ensayos de inmunodetección de cadE en espermatozoides no capacitados utilizando los anticuerpos monoclonales HECD-1 y DECMA-1. Los resultados de estas evaluaciones realizadas sobre cadE se muestran en la **Tabla 4.I.2**:

	A	**H**	**Otros**
H-108	77,8 ± 7,9	19,7 ± 7,0	2,5 ± 0,9
DECMA-1	66,0 ± 10,3	16,9 ± 12,4	16,9 ± 4,7
HECD-1	47,6 ± 9,6	44,4 ± 8,5	8,2 ± 1,8

Tabla 4.I.2: Localización de cadE en espermatozoides humanos no capacitados utilizando los anticuerpos DECMA-1 y HECD-1, dirigidos contra diferentes dominios proteicos (detalles presentados en la sección Materiales y Métodos). La tabla muestra el valor promedio observado para cada patrón de localización de cadE con los diferentes anticuerpos (promedio ± EEP; n= 4). En todos los casos para cada individuo se leyeron al menos 100 células.

De manera similar a lo observado para los estudios de inmunolocalización de cadE con el anticuerpo policlonal anti cadE H-108, los ensayos realizados con el anticuerpo DECMA-1 revelaron la presencia de un patrón predominante de inmunolocalización de cadE en la región del capuchón acrosomal. En el caso del anticuerpo HECD-1, se obtuvieron porcentajes similares de células teñidas con el patron acrosomal y con el patrón homogéneo.

Con el objetivo de evaluar si la localización de cadE corresponde a la membrana plasmática del espermatozoide y teniendo en cuenta que los procesos de fijación pueden alterar las características de esta membrana, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y localización de la proteína de adhesión incubando los espermatozoides con el primer anticuerpo previo a la fijación. Los estudios realizados con el anticuerpo monoclonal HECD-1 permitieron detectar cadE en los espermatozoides, observándose localización de la proteína de adhesión en el capuchón acrosomal de las células, patrón similar al observado en los ensayos en los que se emplearon espermatozoides previamente fijados (**Figura 4.I.9**).

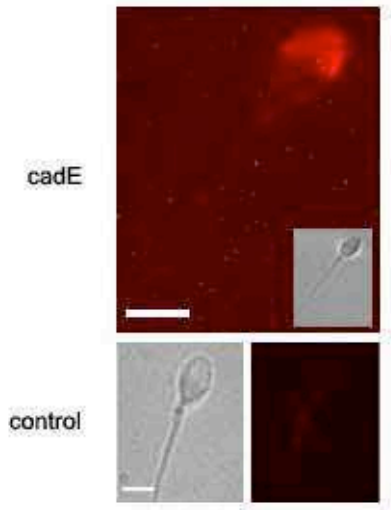


Figura 4.I.9: Localización de cadE en espermatozoides humanos no capacitados previo a ser fijados. La imagen muestra localización de la proteína de adhesión en el acrosoma de espermatozoides incubados *in vivo* con el primer anticuerpo anti cadE HECD-1. Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100 x (la barra indica 2,5 µm).

4.I.3 Inmunolocalización de cadE en espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación y en espermatozoides reaccionados

Los espermatozoides depositados en el tracto femenino sufren una serie de cambios en su tránsito hacia el sitio de la fecundación, que en conjunto se denominan capacitación espermática. Como parte de este proceso, se produce la relocalización de algunas proteínas espermáticas de superficie. Dado que el proceso de capacitación puede reproducirse, al menos en parte, *in vitro* en condiciones definidas, se realizaron estudios de inmunodeteccion de cadE en espermatozoides capacitados siguiendo una estrategia similar a la descrita para espermatozoides no capacitados.

Los ensayos de inmunolocalización de cadE con el anticuerpo H-108 en células incubadas por 18 horas en condiciones que promueven la capacitación revelan nuevamente la presencia de un patrón predominante de localización de la proteína de adhesión en la región acrosomal del espermatozoide (56,2 ± 14,6%, promedio ± EEP, n= 5), si bien el porcentaje de células teñidas en algunos casos fue menor que en las muestras de espermatozoides no capacitados.

De manera concomitante con esta disminución, se observó un aumento del patrón de localización homogénea sobre la cabeza entera del espermatozoide en comparación con los espermatozoides recuperados del eyaculado (40,1 ± 13,0%, promedio ± EEP, n= 5; **Figura 4.I.10**).

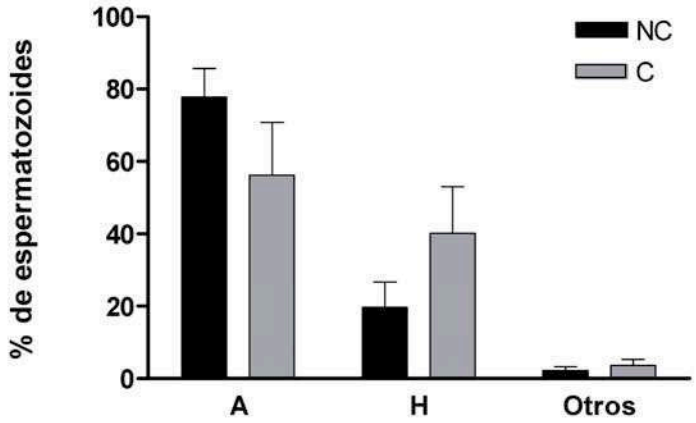


Figura 4.I.10: Distribución de patrones de inmunolocalización de cadE con el anticuerpo policlonal H-108, luego de su cuantificación en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C). El gráfico muestra el porcentaje de células con cada patrón en muestras de espermatozoides mótiles del eyaculado no capacitados (NC) e incubadas en condiciones que promueven la capacitación (C). Los resultados se presentan como los valores medios ± EEP. En todos los casos se leyó un mínimo de 100 células en cada muestra evaluada (n= 5).

Luego de la capacitación, los espermatozoides son capaces de unirse y fusionarse al ovocito. El mecanismo clásico de la interacción de las gametas propone que la interacción del espermatozoide con la matriz extracelular que rodea al ovocito, la *Zona Pellucida* (ZP), induce la exocitosis acrosomal (EA). Con el fin de evaluar si cadE está sujeta a cambios en la localización como consecuencia de los cambios asociados a la EA, se analizó la localización de la proteína de adhesión en espermatozoides capacitados y posteriormente incubados con un inductor farmacológico de la EA. Seguido a la inmunodetección de cadE se realizó la tinción con la lectina de *Pisum Sativum* (PSA-FITC), de manera de poder determinar el estado del acrosoma de cada espermatozoide en el que se analizó la localización de cadE.

En todas las muestras evaluadas, los porcentajes de EA inducida por el ionóforo se encontraron dentro de los valores esperados y reportados en la literatura. La tasa de reacción acrosomal en las muestras incubadas con el inductor fue del 75% (rango 70-87, n= 5), mientras que en el grupo control del ensayo, colocando la misma cantidad del diluyente del ionóforo (DMSO), el porcentaje de espermatozoides reaccionados fue de alrededor del 15%. La

inducción de la exocitosis acrosomal con el ionóforo de calcio, no produjo una disminución de la motilidad espermática.

Los resultados de la inmunolocalización de cadE acoplado a la tinción del acrosoma se muestran en la **Figura 4.I.11:**

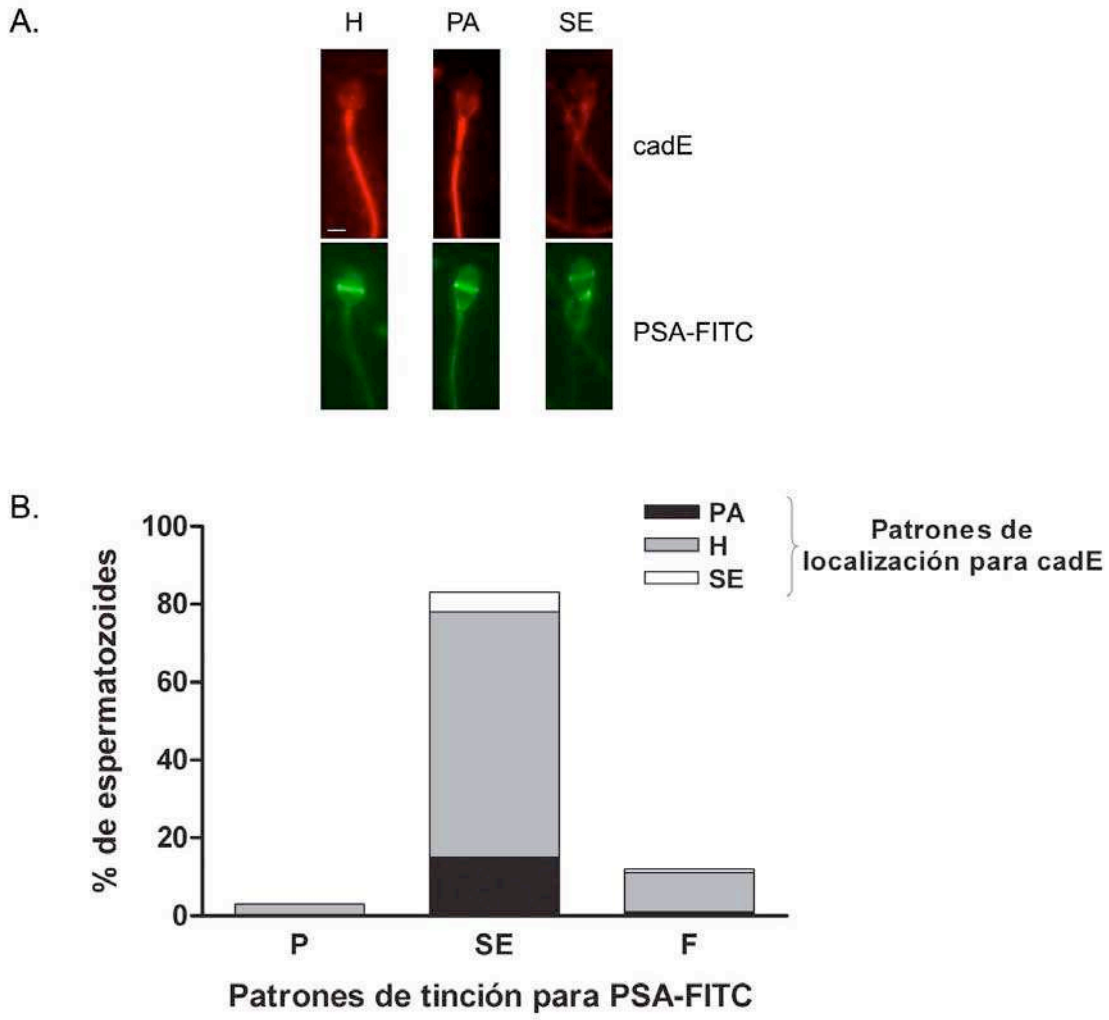


Figura 4.I.11: A- Colocalización cadE/PSA–FITC en espermatozoides reaccionados humanos. La imagen muestra los patrones de localización para la proteína de adhesión en conjunto con la tinción con la lectina PSA-FITC que indica la pérdida de contenido acrosomal y la presencia de la señal remanente principalmente localizada en el segmento ecuatorial. Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100 x (la barra indica 2,5 µm). **B-** Distribución de patrones para cadE en la población de espermatozoides reaccionados. El gráfico muestra la distribución de células con cada patrón de cadE (PA, H y SE) dentro de la población de espermatozoides reaccionados (P, SE y F). El patrón mayoritario para cadE en espermatozoides reaccionados es una localización H que se corresponde con el patrón SE para la tinción con PSA-

FITC. Los resultados se presentan como los valores promedio ± EEP. En todos los casos se leyó un mínimo de 100 células.

Según se observa, se identificaron tres patrones de localización para cadE (panel A): localización en el segmento ecuatorial (SE: 4,5 ± 3,8%), localización en la región post-acrosomal (PA: 14,7 ± 4,1%) y una tinción homogénea sobre la cabeza del espermatozoide (H: 51,3 ± 7,6%). El patrón de localización H fue el predominante dentro de los espermatozoides clasificados como reaccionados con la PSA-FITC y constituyó el 63% de las células reaccionadas con patrón SE y un 76% del total de las reaccionadas (panel B).

Los estudios de inmunolocalización en espermatozoides no capacitados y capacitados fueron realizados además con el anticuerpo monoclonal anti cadE dirigido contra el dominio 4-5 de la proteína de adhesión (DECMA-1). El anticuerpo reconoció a la proteína de adhesión en espermatozoides no capacitados y capacitados (**Figura 4.I.12**). Comparado con los resultados obtenidos con el anticuerpo anti cadE H-108, los porcentajes de espermatozoides con señal en el capuchón acrosomal para las suspensiones de espermatozoides no capacitados fueron ligeramente menores (DECMA-1= 66,0 ± 10,3 versus H-108= 77,8 ± 7,9) y similares en los capacitados (DECMA-1= 53,1 ± 8,7 versus H-108= 56,2 ± 14,6) (promedio ± EEP; n= 5).

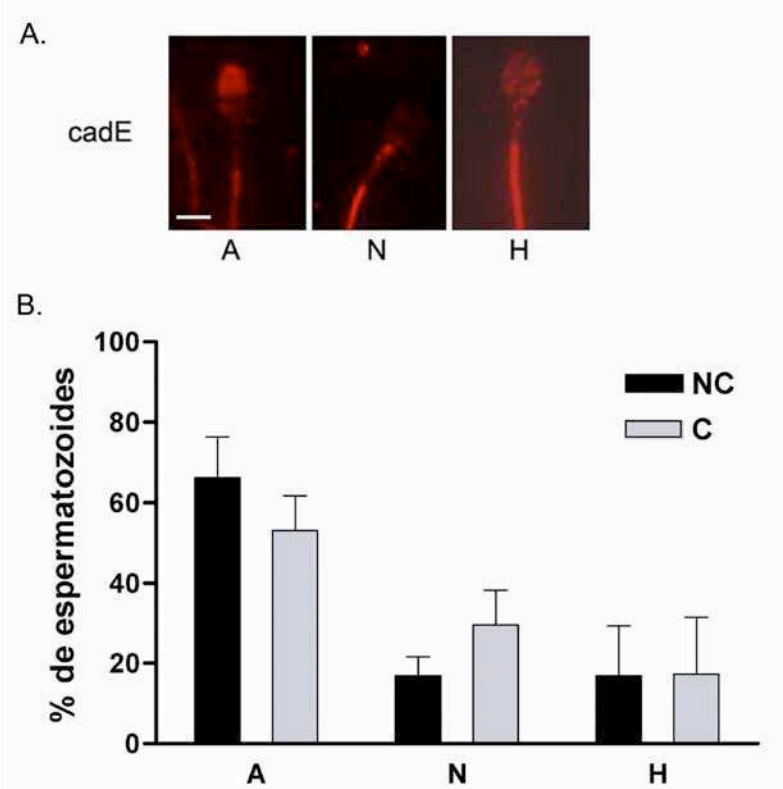


Figura 4.I.12: A-Patrones de inmunolocalización de cadE con el anticuerpo DECMA-1. Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100 x (la barra indica 2,5 µm). **B-** Distribución de patrones para cadE en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C) utilizando el anticuerpo monoclonal anti cadE DECMA-1. El gráfico muestra el porcentaje de células con cada patrón, en suspensiones de espermatozoides recuperadas del eyaculado no capacitados (NC) e incubadas en condiciones que promueven la capacitación (C). Los resultados se presentan como los valores promedio ± EEP, n= 5. En todos los casos se evaluaron al menos 100 células.

En conjunto, los resultados muestran la inmunodetección de cadE en la región del capuchón acrosomal y flagelo de espermatozoides no capacitados. Asimismo, los estudios sugieren su localización en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide.

4.I.4 Expresión de cadE en tejidos del tracto reproductor masculino y detección de su presencia en tejidos y fluidos

Con el interés de determinar el origen tisular de cadE detectada en el espermatozoide, se realizaron una serie de estudios enfocados a evaluar la expresión del ARN mensajero de cadE en tejido testicular y epididimario humano

por medio de ensayos de retro-transcripción acoplado al ensayo en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Posteriormente, se desarrollaron una serie de estudios de caracterización de la secuencia codificante del transcripto de cadE epididimaria empleando como material de partida una biblioteca de expresión de tejido epididimario humano desarrollada por nuestro grupo de investigación. Una vez completados estos estudios, se realizaron ensayos para evaluar la expresión de la proteína de adhesión por inmunohistoquímica en cortes histológicos de tejido epididimario y se realizaron experimentos orientados a la identificación de las formas proteicas de cadE en ensayos de Western Immunoblotting sobre homogenatos de tejido y sobre el fluido del *cauda* epididimario y el plasma seminal. Los detalles de los resultados obtenidos se presentan en los párrafos que siguen.

Inicialmente se realizaron ensayos de retrotranscripción del ARN acoplado a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN total aislado de tejido testicular y de los tres segmentos del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) para la detección de cadE; los estudios incluyeron la evaluación del gen endógeno GAPDH. Los protocolos empleados se detallan en la Sección de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la **Figura 4.I.13**:

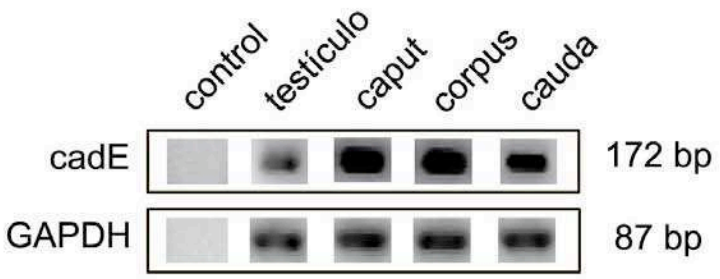


Figura 4.I.13: Detección del transcripto de cadE sobre extractos de RNA total de testículo, *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario humano. El ensayo de RT-PCR sobre tejido testicular y epididimario, muestra productos de amplificación de tamaño molecular esperado para cadE (172 pb). Se utilizó como control interno de expresión constitutiva el gen GAPDH.

Según se observa en la figura, en ambos tejidos evaluados se detectó de manera específica la presencia del fragmento de amplificación del tamaño esperado para cadE. El análisis subjetivo de la intensidad de la señal de los fragmentos obtenidos sugiere mayores niveles de expresión en los segmentos

del *caput* y *corpus* epididimario, comparados con el segmento *cauda*; la señal detectada en el testículo es menor que la observada en el segmento distal del epidídimo, resultado que indicaría menor expresión de cadE en la gonada que en el epidídimo.

En base a los resultados obtenidos, se realizaron estudios de cuantificación de los niveles del transcripto en testículo y segmentos del epidídimo empleando tecnología de PCR en tiempo real. Los resultados de estos estudios (**Figura 4.I.14**) revelaron la presencia de niveles de expresión de cadE en el epidídimo 100 a 1.000 veces mayores que en el testículo. Cuando se compararon los niveles de expresión en los tres segmentos del epidídimo, éstos fueron hasta 10 veces mayores en el *caput* y *corpus* que en la región del *cauda* epididimario:

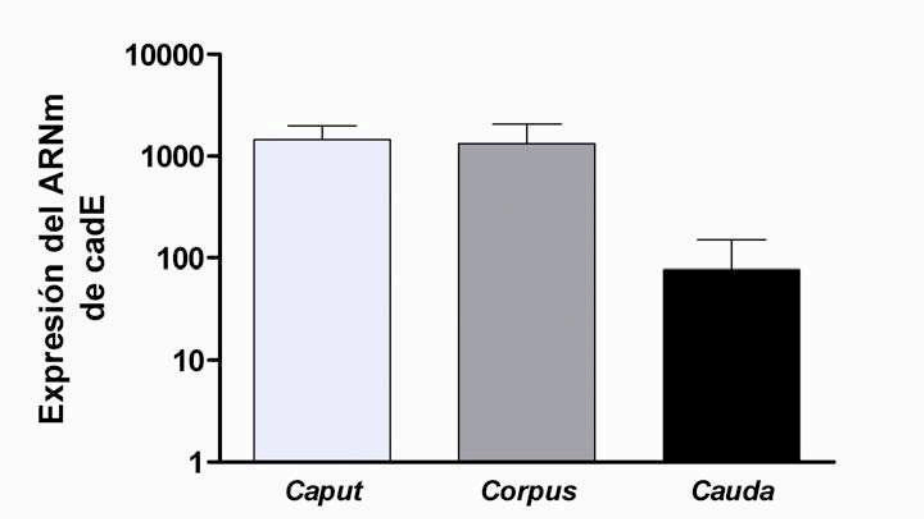


Figura 4.I.14: Ensayo de RT-PCR sobre RNA total de testículo, *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario humanos. Se utilizó como control interno de expresión constitutiva el gen GAPDH, y al testículo humano como muestra referente. Los resultados se expresan con el valor promedio ± EEP (Error Estándar del Promedio; n= 3) y se representan a escala logarítmica.

Posteriormente se realizó el "screening" de una biblioteca de expresión de epidídimo humano generada por nuestro grupo de investigación según se describió en la sección de Materiales y Métodos. De un total estimado de 50.000 fagos testeados, se identificaron 19 playas de lisis positivas, de las cuales 4 fueron clonadas por dilución. Una vez obtenidos los fagémidos, la presencia de

la secuencia de cadE fue verificada por PCR en cada uno de los 4 clones, así como su secuencia nucleotídica fue caracterizada. La determinación de la secuencia de los clones seleccionados se realizó en un servicio de secuenciación empleando inicialmente los cebadores T3 y T7 cuyas secuencias fueron incorporadas en la construcción de los fagos de la biblioteca. Una vez completada la primera ronda de lectura, se sintentizaron cebadores empleando secuencias dentro de la región clonada hasta completar la lectura. Los resultados de los ensayos de PCR sobre los clones y la estrategia de secuenciación se presentan en la **Figura 4.I.15**:

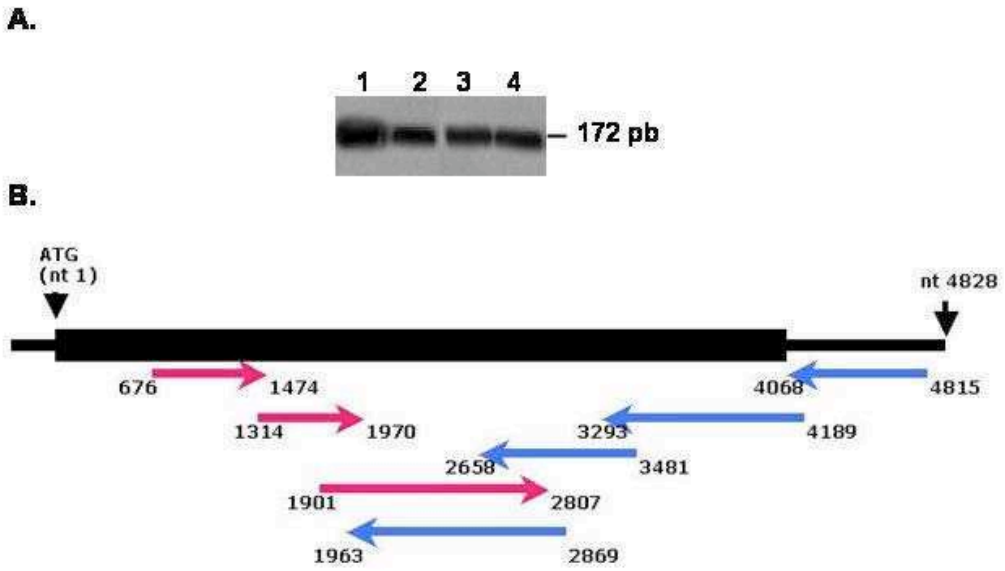


Figura 4.I.15: Secuenciación de clones obtenidos de la biblioteca de expresión de epidídimo humano. **A**- Ensayo de PCR para confirmación de clones de cadE. **B**- Representación esquemática de la estrategia empleada para la secuenciación de los clones obtenidos.

La secuencia determinada en los clones secuenciados se correspondió con un fragmento comprendido entre los nucleótidos 676 a 4815 del transcripto de cadE reportado previamente (NM_004360). El resultado de la comparación de la secuencia determinada con la ya reportada arrojó una identidad de más del 99% entre ambas secuencias.

Una vez caracterizada la secuencia codificante de cadE en tejido epididimario, se realizaron estudios de inmunohistoquímica sobre los tres segmentos del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) para determinar la expresión de la proteína en el tejido evaluado. Para estos estudios se utilizó el anticuerpo

H-108, con el que se inmunolocalizó la proteína en el citoplasma celular, así como también en la región apical y lateral de las células epiteliales principales (**Figura 4.I.16**).

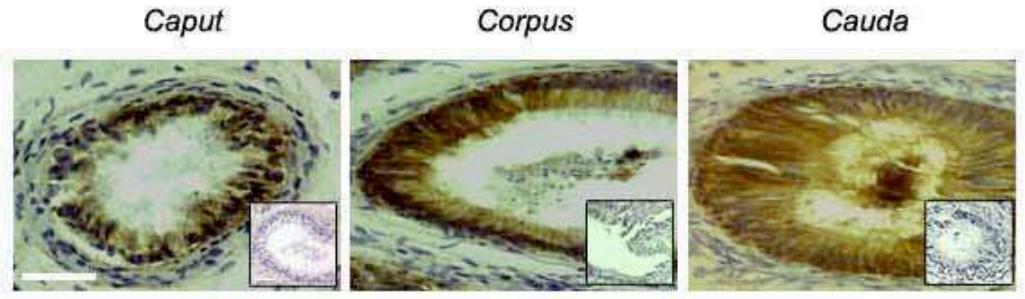


Figura 4.I.16: Localización de cadE en cortes histológicos de epidídimo humano adulto. Las imágenes muestran inmunolocalización para la proteína de adhesión en la región apical y lateral de las células principales de los tres segmentos del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. Imágenes tomadas con microscopía óptica con magnificación 400 x (la barra indica 50 µm).

En ensayos de Western Immunoblotting de extractos totales de proteínas de tejido epididimario se detectó la presencia de una forma de 120 KDa para cadE (**Figura 4.I.17**). En algunos perfiles se identificó además una forma de 140 KDa, correspondiente al precursor proteico (datos no mostrados).

En extractos de proteína del fluido del *cauda* epididimario recuperado por perfusión retrógrada del ducto desde el conducto deferente se identificó la presencia de la forma de cadE de 86 KDa, que correspondería al ectodominio de la proteína de adhesión (**Figura 4.I.17**, calle FCE). Esta forma también fue detectada en perfiles electroforéticos de proteínas totales del plasma seminal (**Figura 4.I.17**, calle PS). La presencia de esta forma proteica que comprende los 5 dominios extracelulares y que resulta del "shedding" mediado por metaloproteinasas, ha sido previamente descrita en suero y orina. En este estudio, se determinó que las formas de cadE de PM estimado en 86 KDa detectadas en FCE y PS co-migraron con el ectodominio de la proteína de adhesión presente en orina y suero (**Figura 4.I.17**, calles O y S respectivamente).

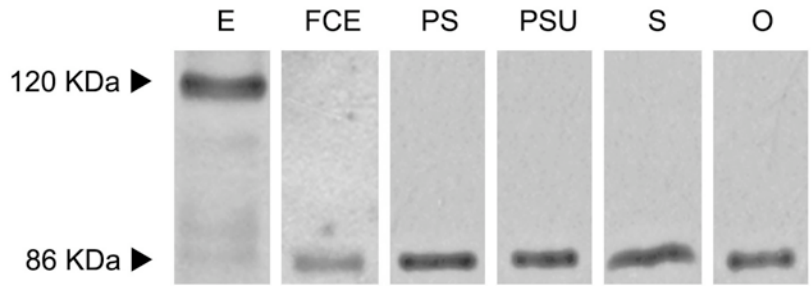


Figura 4.I.17: Determinación de las formas proteicas de cadE en epidídimo y fluidos humanos. El análisis de Western Immunoblotting de extractos proteicos de tejido epididimario humano adulto (E), mostró la presencia de la forma completa para cadE (120 KDa); mientras que la evaluación de los fluidos del cauda epididimario (FCE), plasma seminal (PS), plasma seminal ultracentrifugado (PSU), suero (S) y orina (O) humano, mostraron la forma del ectodominio de cadE (86 KDa). Los ensayos de inmunodetección se realizaron con el anticuerpo policlonal anti cadE H-108.

Estudios previos han demostrado que el plasma seminal contiene vesículas membranosas pequeñas, llamadas prostasomas (vesículas derivadas de la próstata) y epididimosomas (vesículas derivadas del epidídimo), las que tendrían funciones variadas, entre ellas transferir proteínas a la membrana plasmática del espermatozoide (Sullivan *et al*, 2007). Para determinar si la señal detectada en el plasma seminal está asociada a las fracciones soluble o membranosa del plasma seminal, o a ambas; se aislaron dichas vesículas por ultracentrifugación y posteriormente se purificaron por filtración en Sephadex G-200, según se detalla en la sección de Materiales y Métodos (ver sección 4.I.9). Las fracciones eluidas de la columna con más alto contenido proteico mostraron la máxima actividad enzimática aminopeptidasa, confirmando la eficacia del procedimiento de purificación (**Figura 4.I.18**). Las imágenes obtenidas luego del análisis por microscopía electrónica de transmisión de la fracción membranosa luego de la filtración en gel, reveló la presencia de unas vesículas pequeñas electrónicamente densas y otras más grandes pálidas (**Figura 4.I.18**):

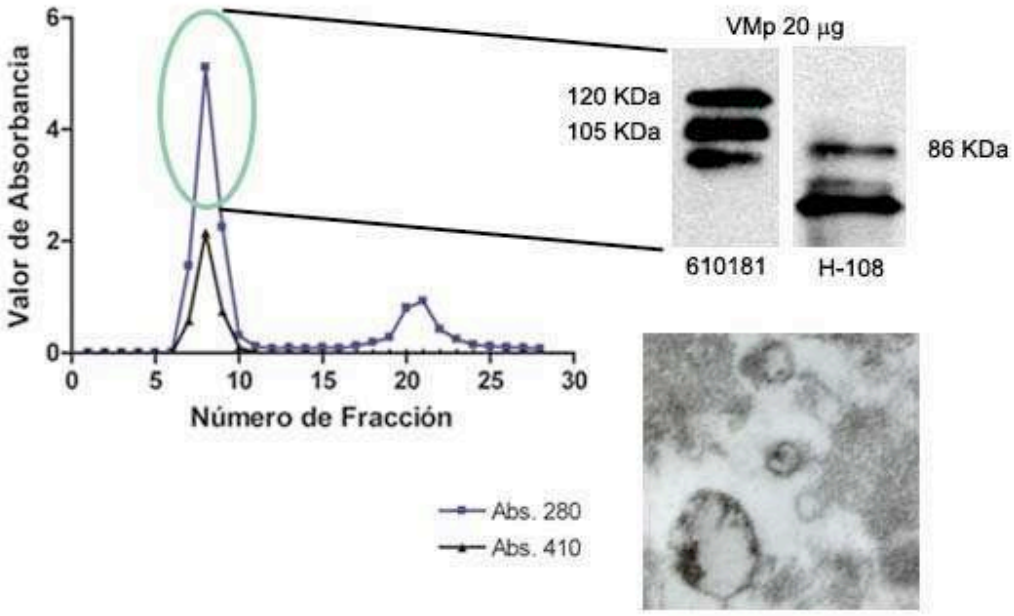


Figura 4.I.18: Análisis de purificación de la fracción vesicular obtenida por ultracentifugación del plasma seminal. La imagen muestra que la fracción eluida de la columna con más alto contenido proteico y actividad aminopeptidasa se corresponde con vesículas electrónicamente densas. El análisis de las formas proteicas para cadE en la fracción vesicular purificada y analizada con dos anticuerpos anti cadE muestra la forma completa de cadE de 120 KDa y algunas formas de degradación, en particular el ectodominio de cadE.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de las formas de cadE presentes en las fracciones de vesículas membranosas purificadas (VMp) y en el fluido ultracentrifugado (PSU) empleando Western Immunoblotting. En la fracción del plasma seminal ultracentrifugado (PSU) solo la forma del ectodominio de cadE fue detectada por el anticuerpo policlonal H-108 (**Figura 4.I.17**, calle PSU), pero no por el anticuerpo 610181 que reconoce el dominio citoplasmático (datos no mostrados). En los extractos de proteínas de las vesículas membranosas (VMp), el anticuerpo 610181 reconoció principalmente dos formas de cadE de alto peso molecular: la forma madura de la proteína de 120 KDa y una forma truncada de 105 KDa (**Figura 4.I.18**); la forma de 120 KDa también fue detectada por este anticuerpo en perfiles de plasma seminal (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados presentados muestran la presencia de cadE en el fluido del *cauda* epididimario y en el plasma seminal. Además de la forma soluble correspondiente al ectodominio de la proteína de adhesión, se detectó la

forma completa y fragmentos transmembrana truncados en fracciones membranosas purificadas, sugiriendo su presencia en vesículas secretorias presentes en los fluidos del tracto reproductor masculino.

4.I.5 Evaluación de la participación de cadE en el proceso de interacción de gametas

Los estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados revelaron la presencia de cadE en regiones de la cabeza del espermatozoide involucradas en la interacción con el ovocito durante la fecundación. Con el fin de evaluar la participación de cadE en la interacción espermatozoide-ovocito en el modelo humano, se realizaron dos ensayos: 1) el ensayo de Hemizona (HZA del inglés Hemi Zona Assay) y 2) el ensayo heterólogo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP.

Ensayo de Hemizona:

Los ensayos en los que se evaluó el efecto de anticuerpos sobre la interacción espermatozoide-ZP fueron realizados en colaboración con la Lic. Fernanda González-Echeverría de Raffo del Instituto Medico Fertilab, Buenos Aires, Argentina. En el protocolo experimental los espermatozoides mótiles seleccionados por la técnica de “swim up” y posteriormente incubados en condiciones que promueven la capacitación por 4 horas fueron preincubados con anticuerpo anti cadE (o en el control preincubados con IgG de la especie en la que se desarrolló el anticuerpo anti cadE y agregado a la misma concentración) durante una hora; luego de remover el anticuerpo no unido por centrifugación de las suspensiones espermáticas seguido de resuspensión en medio sin anticuerpo, los espermatozoides se co-incubaron con las hemi ZPs por 4 horas. Al finalizar el ensayo, se lavaron las ZP para remover los espermatozoides débilmente unidos y se determinó el número de espermatozoides unidos a cada hemi-ZP en cada condición experimental. El esquema experimental de este ensayo se presenta en la siguiente figura:

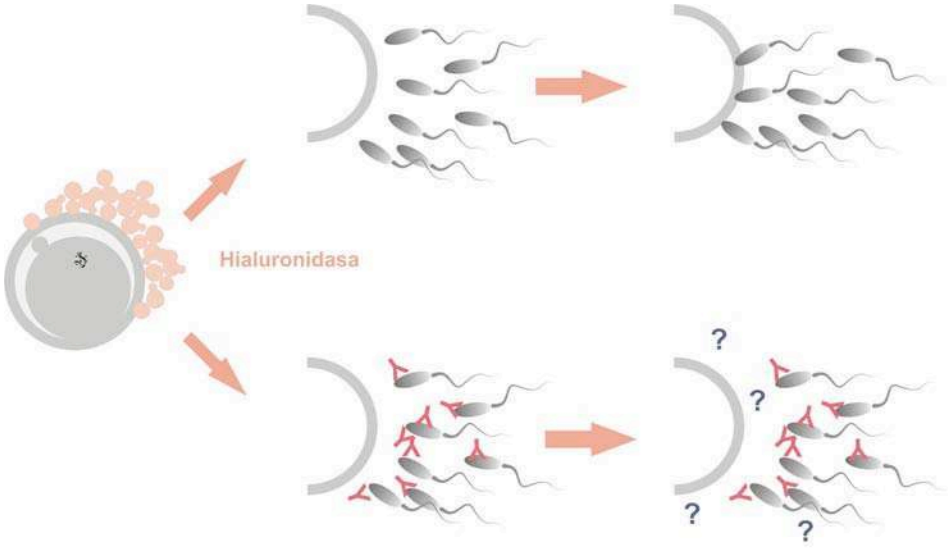


Figura 4.I.19: Representación esquemática del ensayo de interacción de espermatozoides con hemi-ZPs con anticuerpos anti cadE o IgG control. Los espermatozoides capacitados fueron preincubados con el anticuerpo anti cadE y posteriormente se pusieron en contacto con hemi-ZPs. Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas se recuperaron las hemi-ZPs y se evaluó el número de espermatozoides unidos por cada hemi-ZP (ver sección Materiales y Métodos).

Los resultados de estos estudios revelaron la capacidad de los anticuerpos anti cadE de inhibir la unión de los espermatozoides a la ZP homóloga (SHE78-7 100 µg/ml= 10 ± 2,8 versus control= 18,6 ± 4,5; n= 8; SHE78-7 50 µg/ml= 19,9 ± 5,6 versus control= 34,2 ± 6,4; n= 9; H-108 100 µg/ml= 17,7 ± 4,7 versus control= 30,6 ± 8,6; n= 7; en todos los casos promedio ± EEP; $p < 0,05$, test de Wilcoxon) (**Figura 4.I.20**).

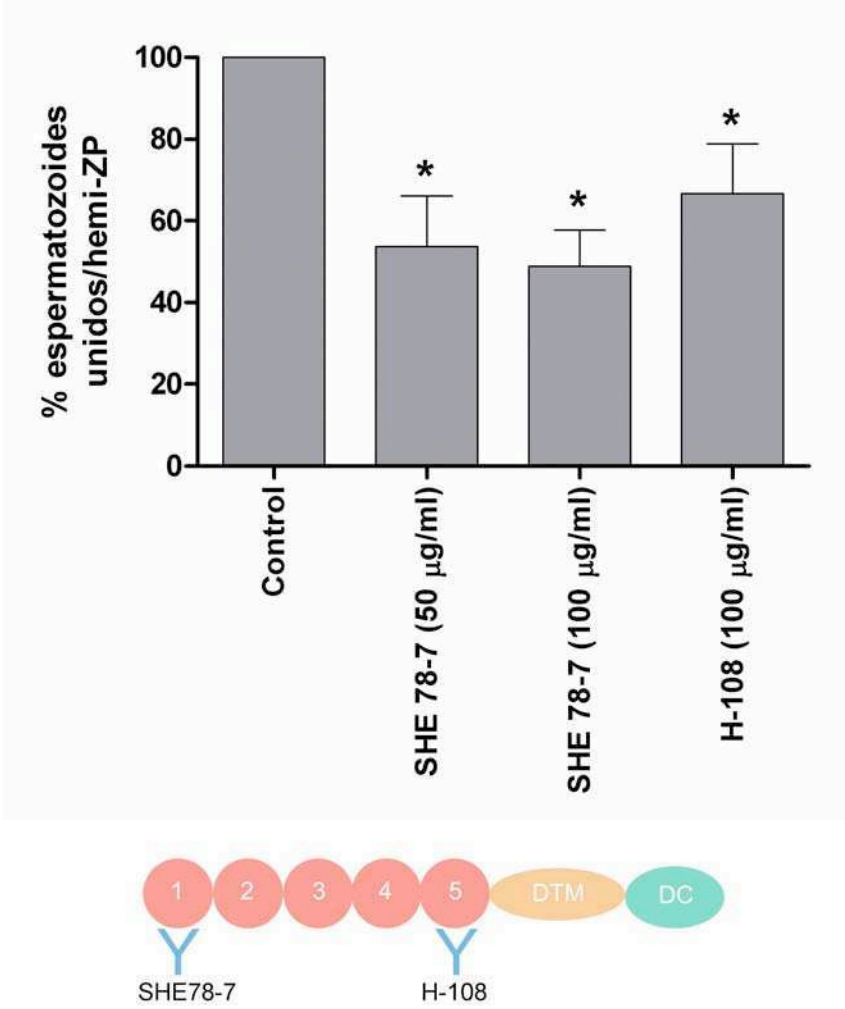


Figura 4.I.20: Participación de cadE en eventos de interacción con la ZP. Ensayo de unión de espermatozoides a hemi-ZP (HZA). La preincubación de los espermatozoides con los anticuerpos anti cadE conduce a una disminución significativa en el número de espermatozoides unidos a hemi-ZP (p < 0,05; test de Wilcoxon). Los resultados se expresan como porcentaje relativo al control en el que se colocó la misma cantidad de IgG control de la especie en la que se desarrolló el primer anticuerpo en reemplazo del mismo.

Los resultados de estos estudios llevaron a investigar la presencia de cadE en la ZP del ovocito. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta de cadE de la ZP humana utilizando el anticuerpo policlonal anti cadE H-108 (Sta. Cruz). Como resultado de estas evaluaciones, se detectó una señal para cadE en la estructura de la ZP humana (**Figura 4.I.21**); la tinción fue específica, no observándose en los ensayos en que el primer anticuerpo fue reemplazado por IgG conejo control.

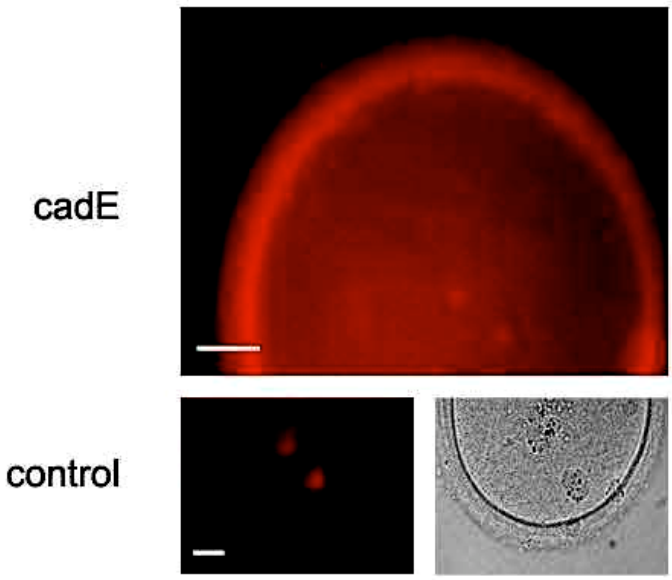


Figura 4.I.21: Inmunolocalización de cadE en la ZP de ovocitos humanos recuperados luego de la punción ovárica como parte del procedimiento de reproducción asistida para el tratamiento de la infertilidad. Las imágenes muestran la inmunoreactividad positiva para cadE en la estructura de la ZP, las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 40 x (la barra indica 20 µm, n= 4 ovocitos en cada condición). Se muestra además un control negativo en el que el primer anticuerpo anti cadE fue reemplazado por IgG de conejo.

Ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP:

La participación de una proteína en el proceso de adhesión/fusión de las gametas humanas no puede ser estudiada utilizando células homólogas, porque el ensayo podría generar un embrión humano, situación que tendría connotaciones éticas inaceptables. Basados en que los espermatozoides humanos son capaces de fusionarse, penetrar y descondensar su núcleo en ovocitos de hámster desprovistos de ZP, Yanagimachi & col. (1976) desarrollaron el **ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP**.

En el presente estudio, este ensayo fue implementado para evaluar la participación de cadE en la interacción del espermatozoide con el oolema. Los detalles de la metodología utilizada para el desarrollo de estos estudios han sido presentados en la sección de Materiales y Métodos.

Como se mostrara en los estudios de inmunolocalización realizados en espermatozoides, la cadE espermática es inmunodetectada mayoritariamente en la membrana plasmática del espermatozoide intacto y en la membrana acrosomal interna del espermatozoide reaccionado; asimismo, el proceso de inducción de la EA es dinámico y puede ocurrir durante la co-incubación con los ovocitos. Por lo tanto para el ensayo de penetración de los ovocitos de hámster se decidió utilizar un diseño experimental en el que los ovocitos de hámster libres de ZP fueran preincubados con el anticuerpo anti cadE (o con la IgG de conejo en la condición control) y luego co-incubados con los espermatozoides de manera de bloquear los sitios en la membrana del ovocito a ser reconocidos por la proteína de adhesión del espermatozoide reaccionado. En la siguiente figura se presenta un esquema representativo del ensayo empleado:

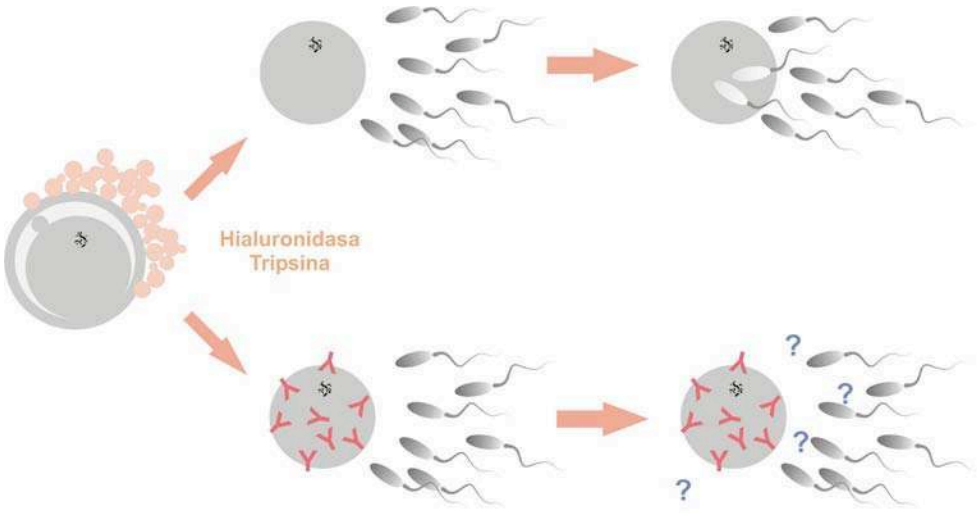


Figura 4.I.22: Representación esquemática del ensayo de interacción de espermatozoides humanos con ovocitos de hámster sin ZP. Los espermatozoides capacitados por 18 horas se pusieron en contacto con ovocitos libres de ZP y preincubados en presencia de anticuerpo anti cadE (H-108, 20 µg/ml). Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas se recuperaron los ovocitos y se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados (ver sección Materiales y Métodos).

Hasta el momento de iniciar estos estudios no había antecedentes sobre la capacidad del anticuerpo anti cadE H-108 de reconocer la proteína en el hámster; por lo tanto, previamente a la realización del ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP en presencia o ausencia de anticuerpos anti cadE, se llevaron a cabo una serie de evaluaciones para determinar la capacidad del

anticuerpo a utilizar de reconocer la proteína cadE presente en el ovocito de hámster. Para ello, inicialmente se realizó un análisis bioinformático de búsqueda y comparación de secuencias aminoacídicas de cadE humana y de hámster. Se efectuaron búsquedas en bases de datos de proteínas; el detalle de este análisis se presenta en el **Apéndice D**. Como resultado de esta evaluación, se determinó que del total del segmento peptídico de la proteína cadE humana usado como antígeno para la generación del anticuerpo (residuos 600-707), en el fragmento de la proteína de hámster disponible en los bancos de datos se encontró una secuencia comparable para los residuos 600-684, determinándose una identidad del 71% y una similitud del 95% entre ambas secuencias.

Para confirmar la capacidad de los anticuerpos anti cadE de detectar la proteína de adhesión en los ovocitos de hámster, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta sobre ovocitos de hámster libres de ZP recuperados y procesados siguiendo el mismo diseño experimental que el usado para el ensayo biológico. Como resultado de estas evaluaciones, los ovocitos libres de ZP mostraron localización de cadE en la membrana plasmática y citoplasma de ovocitos maduros (**Figura 4.I.23**).

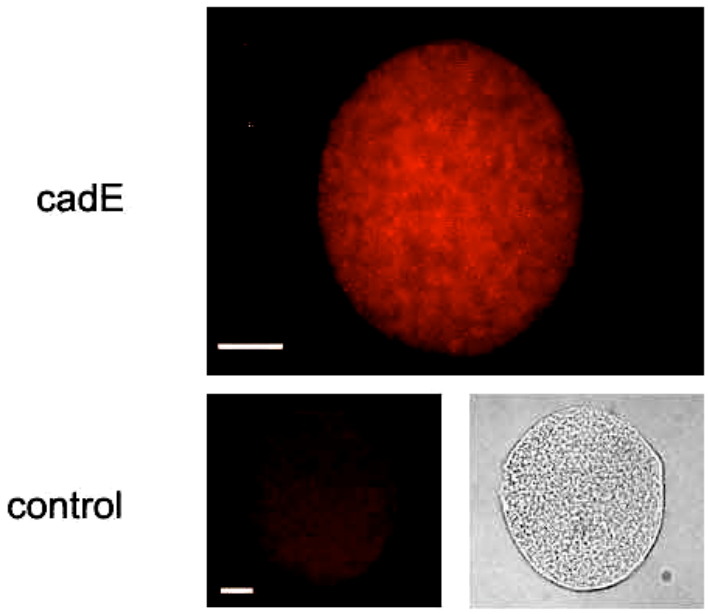


Figura 4.I.23: Inmunolocalización de cadE en ovocitos de hámster maduros sin ZP. La proteína cadE fue inmunolocalizada en la membrana plasmática y en el citoplasma de los ovocitos.

Imágenes tomadas mediante microscopía óptica de fluorescencia con objetivo PLAN 20x/0.5 (la barra indica 20 µm).

Conjuntamente, en ensayos de Western Immunoblotting de extractos de ovocitos de hámster se identificaron las formas proteicas del peso molecular esperado para la proteína de adhesión cadE y otros miembros del complejo adherente, particularmente β-catenina y actina:

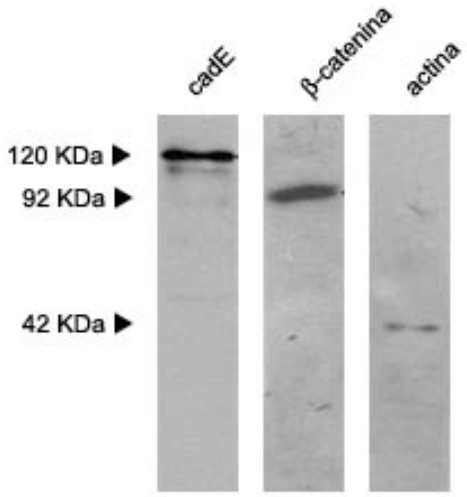


Figura 4.I.24: Evaluación de la presencia de las proteínas del complejo de adhesión en extractos proteicos de ovocitos de hámster. Se observan formas proteicas de 120 KDa, 92 KDa y 42 KDa, para cadE, β-catenina y actina respectivamente.

Luego de confirmar la capacidad del anticuerpo anti cadE H-108 de reconocer la proteína del hámster, se llevó a cabo el ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP. Como resultado de estos ensayos se determinó que la preincubación de los ovocitos con el anticuerpo anti cadE H-108 resultó en una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados en comparación con la condición control (H-108 20 µg/ml= 56,5 ± 4,4% (n= 95 ovocitos totales) versus control= 90,8 ± 5,1% (n=60 ovocitos totales) ovocitos penetrados, promedio ± EEP, n= 6; $p < 0,05$, test de Wilcoxon) (**Figura 4.I.25**).

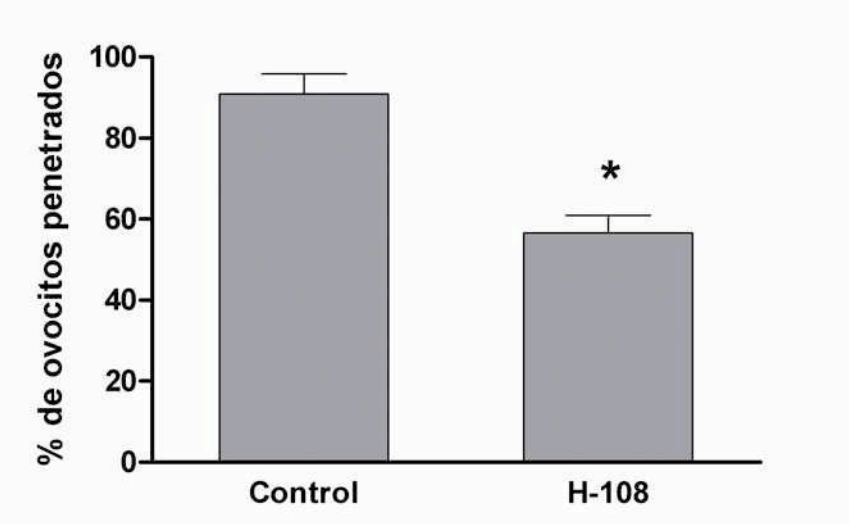


Figura 4.I.25: Participación de cadE en eventos de unión y fusión al oolema. Ensayo de penetración de ovocitos de hámster libres de ZP. La preincubación de ovocitos de hámster en presencia del anticuerpo policlonal anti cadE H-108 (20 µg/ml), condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides penetrados. Los resultados se presentan como los valores promedio ± EEP (p < 0,05, test de Wilcoxon; n= 6 ensayos). Los resultados se expresan como porcentaje relativo al control en el que se colocó la misma cantidad de IgG control de la especie en la que se desarrolló el primer anticuerpo en reemplazo del mismo.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína de adhesión en ovocitos humanos, los que fueron tratados para remover la ZP y poder de esta manera analizar con mayor detalle la localización de la proteína en el oolema. En la **Figura 4.I.26** se presentan los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la detección de cadE y β-catenina:

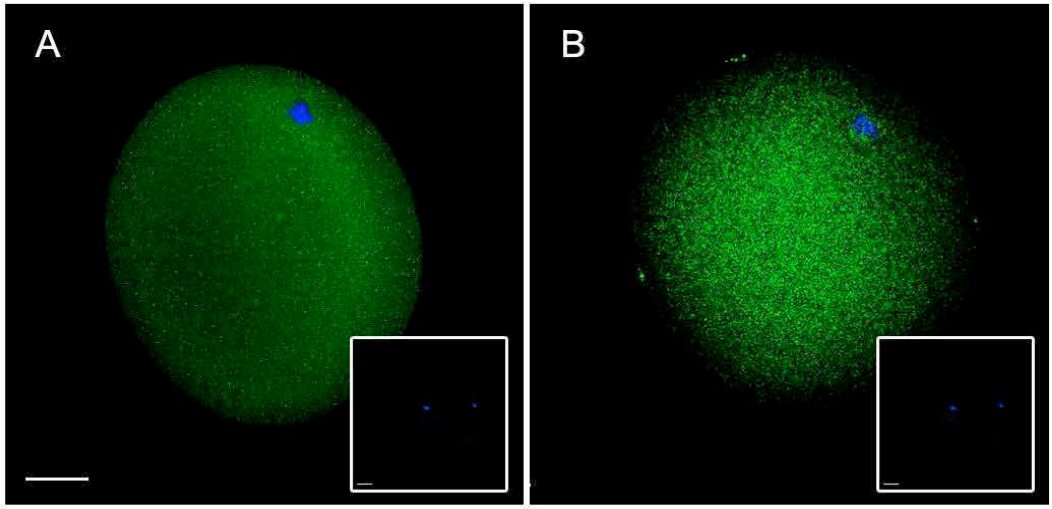


Figura 4.I.26: Inmunolocalización de cadE **(A)** y β-catenina **(B)** en ovocitos humanos maduros sin ZP. Las proteínas se inmunolocalizaron en la membrana plasmática y en el citoplasma de los ovocitos. Como primeros anticuerpos se emplearon H-108 (Santa Cruz) para cadE y 610153 (BD Biosciences) para β-catenina; en ambos casos se empleó un segundo anticuerpo marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen-Molecular Probes). Para contrastar el ADN se utilizó TOTO-3 iodide (Invitrogen-Molecular Probes). En el "inset" se muestran los controles negativos en donde se omitió el primer anticuerpo. Las imágenes se tomaron con microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 40x/0.95) (la barra indica 20 µm).

Los resultados confirman la presencia de cadE en la superficie y citoplasma del ovocito humano, mostrando una distribución homogénea en toda la célula. De manera similar, β-catenina fue inmunodetectada en los ovocitos humanos, con una distribución de la señal similar a la observada con cadE.

4.I.6 Evaluación de la presencia y localización de cadE en espermatozoides recuperados del semen de un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad

La infertilidad es una patología que afecta hasta un 10% de las parejas en edad reproductiva. Se ha estimado que hasta en un 30% de los casos, alteraciones en la fertilidad del hombre son causales directas de las dificultades en la concepción y en hasta un 50% de los casos contribuyen, al menos en parte, a la imposibilidad del éxito del embarazo. Las técnicas de reproducción asistida han contribuido al tratamiento de las parejas con estos problemas. Hasta el presente, las herramientas de diagnóstico de la infertilidad, en particular la

infertilidad masculina, son limitadas y en muchos casos se reducen a la evaluación de los parámetros de rutina del semen, estudios que no incluyen el análisis de marcadores de funcionalidad espermática. De esta manera, en muchos casos se encuentran situaciones en las que las parejas fracasan en la concepción, con pacientes que presentan muestras de semen con parámetros seminales dentro de los valores establecidos como normales y en los que su pareja no tiene causal diagnosticable de falla de fertilidad. En consecuencia, la identificación de moléculas involucradas en la fecundación y la evaluación de sus posibles alteraciones en pacientes con infertilidad es de gran relevancia, pues contribuirá a un mejor conocimiento del proceso, así como podrá ofrecer alternativas para el diagnóstico y tratamiento de alteraciones en la capacidad fecundante del espermatozoide.

En tal sentido, se inició un estudio con el objetivo de evaluar la presencia y localización de cadE en espermatozoides mótiles recuperados del semen de un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad. Para ello se estableció una colaboración con la Clínica IFER, Instituto de Fertilidad, de la ciudad de Buenos Aires, para el desarrollo del proyecto de manera conjunta. Para la realización de los estudios se utilizó el sobrante de muestras de semen de pacientes que concurren a la clínica por tratamientos con técnicas de reproducción asistida que acordaron por consentimiento informado la donación de ese excedente del semen. Los estudios se organizaron en dos partes:

Parte A: Evaluación de muestras obtenidas a partir de semen fresco de pacientes con parámetros seminales normales o con alguna anormalidad.

Parte B: Evaluación de muestras obtenidas a partir de semen previamente congelado con diagnóstico de Esterilidad sin Causa Aparente (ESCA).

Los resultados de estos estudios preliminares se presentan a continuación.

Parte A: Evaluación de muestras obtenidas a partir de semen fresco de pacientes con parámetros seminales normales o con alguna anormalidad

Se realizó evaluación de la presencia y localización de señal para cadE en espermatozoides del semen de un total de 21 pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de fecundación *in vitro* estándar (FIV) o con Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

En todos los casos se completó el análisis de rutina del semen y se siguieron como criterios de normalidad la presencia de una concentración espermática de al menos 10 millones/ml, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de al menos 50% y un porcentaje de espermatozoides con morfología normal de al menos 9%. Estos valores varían respecto de los establecidos por la Organización Mundial de la Salud, dado que han sido adaptados por el centro de fertilidad para el uso como estándares en muestras a ser usadas en procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad como son la FIV y el ICSI. En estas muestras, el procedimiento de selección de espermatozoides mótiles empleado fue un gradiente de centrifugación (Pure Sperm), según se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Los espermatozoides mótiles recuperados se fijaron y las células se tiñeron con anticuerpo anti cadE H-108 (20 y 2 µg/ml); posteriormente se agregó el segundo anticuerpo acoplado a CY3. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Parámetros espermáticos	Concentración	Motilidad	Morfología*	cadE Patrón Acrosomal
PN1	160	65	13	97
PN2	45	55	12	97
PN3	100	60	14	91
PN4	70	56	12	96
PN5	46	46	12	96
PN6	70	40	10	90
PN13	100	65	12	95
PN14	70	53	13	92
PN15	120	70	9	97
PN17	**200**	**65**	**14**	**40**
PA7	40	35	8	89
PA8	30	42	7	94
PA9	25	45	6	96

PA10	10	48	5	84
PA11	70	40	10	93
PA12	42	29	6	96
PA16	**46**	**55**	**4**	**25**
PA18	80	62	4	90
PA19	50	60	9	82
PA20	12	33	6	86
PA21	**10**	**22**	**9**	**72**

Tabla 4.I.3: Evaluación de las características seminales y localización de cadE de la población de pacientes en tratamiento por infertilidad. La tabla muestra los valores de concentración (millones/ml), motilidad (% de espermatozoides con motilidad progresiva) y morfología espermática (% de formas normales; * criterio estricto de Kruger), así como también los porcentajes de espermatozoides con localización de cadE en la región acrosomal. En todos los casos para cada individuo se leyeron al menos 100 células para cada evaluación.

Del total de los 21 pacientes evaluados, se identificaron 10 individuos con parámetros de concentración y motilidad normal y con un porcentaje de formas normales igual o superior a 9% (muestras normales o con buen pronóstico de fecundación *in vitro*) (Pacientes Normales; PN). Los restantes 11 pacientes presentaron alguna alteración en la motilidad y/o morfología (Pacientes Anormales; PA).

En el grupo de los pacientes con parámetros seminales normales, 9 de los 10 individuos presentaron altos porcentajes de células con señal para cadE en el capuchón acrosomal (90-97%). Los valores obtenidos fueron similares a los registrados en los donantes normozoospérmicos evaluados en paralelo (DN: 90,2 ± 0,9% de espermatozoides con localización de cadE en la región acrosomal: promedio ± EEP, n= 3). En el caso de **PN17**, el porcentaje de espermatozoides mótiles recuperados post-selección espermática, inmunorreactivos para cadE en el acrosoma fue del 40%, valor francamente disminuido respecto del determinado en los donantes evaluados a lo largo del proyecto y particularmente respecto de los evaluados conjuntamente con los pacientes infértiles. La muestra de semen presentó parámetros de rutina del semen dentro de los valores normales (concentración espermática: 200 millones/ml; motilidad: 65% espermatozoides progresivos; morfología: 14% formas normales). En la misma muestra se evaluó el porcentaje de células con acrosomas intactos luego de la tinción con PSA-FITC, obteniéndose un

porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos de 78%, resultado similar a los valores obtenidos para poblaciones de espermatozoides recuperados del semen, no capacitados (84,6 ± 5,2%; rango 70-93%; promedio ± EEP). El paciente fue sometido a un procedimiento de FIV estándar, en el que la tasa de fecundación obtenida fue del 80%, valor considerado en el límite de normalidad para el procedimiento de FIV estándar por el centro IFER. En el resto de los pacientes tratados con FIV (PN1, PN2, PN3, PN4, PN5, PN13, PN14) las tasas de fecundación fueron entre el 88 y 100%; los pacientes PN6 y PN15 fueron tratados con ICSI.

En el grupo de los 11 pacientes que presentaron alguna anormalidad en el semen se identificaron 8 de los 11 pacientes con un porcentaje de formas normales menor al 9%, en un rango de 4-8%; asimismo, en 8 de los 11 casos se determinaron porcentajes anormales de espermatozoides mótiles en el semen (22-48%). En 6 casos (PA7, PA8, PA9, PA10, PA12 y PA20), los dos parámetros presentaron valores considerados anormales. Respecto de **PA16,** el bajo porcentaje de células clasificadas con morfología normal (4%) fue acompañado por un porcentaje bajo de células inmunorreactivas para cadE (25%). La evaluación del estado del acrosoma en este paciente arrojó un valor del 64% de células con sus acrosomas intactos y un alto porcentaje de células negativas para la tinción con la lectina (28%); mientras que el donante normal presenta un 84,6 ± 5,2% (rango 70-93%; promedio ± EEP) de espermatozoides con sus acrosomas intactos. Cuando se realizó la inmunolocalización de cadE con anticuerpo anti cadE a 2 µg/ml, el porcentaje de células con localización de la proteína en acrosoma disminuyó aún más, determinándose solo en el 1% de las células. Si bien la tasa de fecundación (TF) arrojó valores normales (100%), dadas las características originales de la muestra del paciente no se realizó una FIV convencional y se realizó un tratamiento de alta complejidad con ICSI, de forma tal que los eventos de interacción célula-célula que ocurren durante la fecundación normal fueron pasados por alto.

En el mismo grupo se identificó el paciente **PA21**, con una motilidad alterada y un porcentaje de células con morfología normal en el límite inferior de normalidad (9%). En este caso, el porcentaje de células positivas para cadE en el acrosoma fue del 72%, un valor menor (20%) al observado en el grupo de

donantes normales (DN: 90,2 ± 0,9%). Cuando se realizó la tinción a 2 µg/ml de anticuerpo anti cadE nuevamente se observó que el porcentaje de células con localización de cadE en acrosoma fue menor que el encontrado en los espermatozoides control (PA21: 76% versus control 88,3 ± 3,4%). El paciente también fue sometido a un procedimiento de ICSI, obteniéndose una la tasa de fecundación del 71%. El restro de los pacientes del grupo fueron tratados con el procedimiento de ICSI.

En conjunto, de los 21 casos evaluados, se identificaron tres muestras (**PN17, PA16 y PA21**) en las que el porcentaje de células inmunorreactivas para cadE fue menor al valor obtenido con donantes que presentaron parámetros seminales dentro de los valores normales y con alguna alteración.

Parte B: Evaluación de un conjunto de muestras a partir de semen previamente congelado de pacientes diagnosticados con Esterilidad sin Causa Aparente (ESCA)

Con el objetivo de realizar análisis de expresión y localización de cadE en individuos con Esterilidad Sin Causa Aparente (ESCA), se comenzó por seleccionar un grupo de pacientes con dicho diagnóstico. Dada la baja incidencia de pacientes con este diagnóstico, estimados entre el 10 y el 15% de las parejas en consulta por infertilidad (Bouvet e*t al*, 2003), se decidió almacenar las muestras hasta tener un número mínimo aceptable (n= 10) como para su procesamiento en un lapso de tiempo corto y eliminar variables adicionales derivadas de la metodología de evaluación (ej. lotes de medio de cultivo, de suplementos proteicos, anticuerpos para la detección de la proteína, entre otros). De esta manera se criopreservaron 10 muestras con diagnóstico ESCA y un grupo de pacientes en los que la causa de infertilidad era dada por una patología femenina definida (n= 6). Para la criopreservación se emplearon protocolos estándar, que se detallan en la sección de Materiales y Métodos. En ambos grupos, todas las muestras de semen presentaron parámetros de rutina dentro de los valores normales (criterio OMS 1999; datos no mostrados; más adelante se muestran los datos de concentración y motilidad espermáticas de la muestra descongelada de los pacientes). Las muestras criopreservadas fueron utilizadas para evaluar la inmunolocalización de cadE por medio de ensayos de

inmunofluorescencia indirecta y la expresión de la proteína por medio de ensayos de Western Immunoblotting.

Con el interés de determinar las condiciones óptimas para realizar los estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides provenientes de las muestras criopreservadas, se comenzó por evaluar los métodos de recuperación de la fracción mótil, el estado de capacitación y la integridad del acrosoma de la población de espermatozoides en muestras de donantes de fertilidad comprobada previamente criopreservadas siguiendo el protocolo de congelamiento del laboratorio que provee las muestra de pacientes en tratamiento por infertilidad.

Para ello se obtuvieron muestras de semen de 3 donantes normozoospérmicos y se sometieron a protocolos de criopreservación. Se procesó en paralelo la muestra criopreservada y sin criopreservar del mismo donante y se seleccionó la fracción mótil utilizando el procedimiento de filtración en columna de lana de vidrio. Se utilizó esta técnica de separación de espermatozoides con el fin de obtener un alto número de células luego de la criopreservación y obtener una población de espermatozoides con una tasa de exocitosis acrosomal baja. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el laboratorio para recuperar espermatozoides mótiles del eyaculado sin previa congelación, y permitió obtener porcentajes de recuperación del 24 al 75% (56,3 ± 16,2%) de espermatozoides previamente criopreservados. En ambos casos se evaluó la exocitosis acrosomal (EA) por medio de la tinción con PSA-FITC, en espermatozoides no capacitados y capacitados por 18 horas. En el caso de espermatozoides del eyaculado, se obtuvo un porcentaje de EA del 7,0 ± 1,5% para no capacitados y del 14,6 ± 3,4% para capacitados; para espermatozoides evaluados post criopreservación, los valores fueron del 16,0 ± 1,0% y 22,6 ± 3,5% respectivamente, valores ligeramente superiores a los obtenidos con las muestras sin previa criopreservación.

En las muestras criopreservadas provenientes de los 3 donantes normozoospérmicos, el porcentaje de células inmunorreactivas para cadE en el acrosoma fue 70,3 ± 4,2% (promedio ± EEP). Este valor fue menor al determinado para las muestras de los mismos donantes sin criopreservar,

determinándose en ese caso un valor promedio de 90,2 ± 0,9%. Esta caída no fue el resultado de alteraciones en un individuo en particular, sino que la tendencia a una caída en el porcentaje de células inmunorreactivas para cadE fue observado en los tres casos: **D1** Fresco: 88,5%, crio: 62%; **D2** Fresco: 91,5%, crio: 75%; **D3** Fresco: 90,5%, crio: 74%.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de procesamiento, se realizó la evaluación de la localización de cadE en un total de 6 muestras de casos de pacientes con parámetros seminales normales (PNc) y en un total de 10 casos clasificados como ESCA. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Parámetros espermáticos	Concentración	Motilidad	cadE Patrón Acrosomal
PNc1	86	55	77
PNc10	26	56	74
PNc12	**60**	**65**	**52**
PNc13	200	72	76
PNc15	120	80	63
PNc16	104	72	75
ESCA2	30	55	74
ESCA3	93	51	88
ESCA4	**96**	**56**	**61**
ESCA5	141	57	66
ESCA6	57	52	84
ESCA7	76	53	62
ESCA9	43	53	69
ESCA11	120	75	87
ESCA14	130	74	64
ESCA17	90	76	90

Tabla 4.I.4: Características seminales de las muestras de semen criopreservadas de la población de pacientes en tratamiento por infertilidad. La tabla muestra los valores de concentración (en millones/ml), motilidad (% de espermatozoides motiles) de la muestra y los porcentajes de espermatozoides con localización de cadE en el acrosoma utilizando 20 µg/ml de anticuerpo anti cadE. En todos los casos para cada individuo se leyeron al menos 100 células.

Los resultados muestran que, dentro de la población de pacientes estudiados, los valores de porcentajes de patrones acrosomales para cadE observados en muchos casos resultaron inferiores a los observados en espermatozoides procesados sin criopreservar (PNcs rango: 52-77%; ESCAs rango: 61-90%). Esta disminución podría relacionarse con las alteraciones causadas en la membrana plasmática de la gameta por el proceso de criopreservación, que se reflejaría en una menor detección de la molécula de adhesión. En concordancia con los resultados, los porcentajes determinados para los donantes fueron similares a los encontrados en los pacientes estudiados 70,3 ± 4,2% (promedio ± EEP; rango: 62-75%).

En la población de los pacientes con parámetros normales y alteraciones en la fecundidad se detectó que en un caso **PNc12**, el porcentaje de células inmunorreactivas para cadE en el acrosoma fue del 52%, menor respecto al valor promedio de los donantes normales criopreservados (70,3%). Asimismo, la inmunodetección realizada con el anticuerpo anti cadE a 2 µg/ml, reveló un porcentaje de espermatozoides con localización de cadE en acrosoma del 30%; esta caída respecto del valor registrado con la concentración de anticuerpo no se detectó en el control (control anti cadE a 2 µg/ml: 68,7 ± 14,7%; n= 3 donantes). En concordancia con estos resultados, luego de la evaluación del estado del acrosoma de las muestras criopreservadas, solo un 32% de los espermatozoides presentaron sus acrosomas intactos. En este caso, el procedimiento de FIV sobre espermatozoides recuperados del eyaculado, dio una tasa de fecundación del 100%.

Cuando se examinaron los resultados correspondientes al grupo de los pacientes ESCA se identificó un caso, el paciente **ESCA4**, que mostró un porcentaje de espermatozoides con localización de cadE en región acrosomal del 61%; cuando esa evaluación se repitió con el anticuerpo a una concentración de 2 µg/ml, solo se encontraron 36% de células teñidas para cadE en el acrosoma; como se mencionara anteriormente, esta caída no fue observada en los donantes. En el resto de los casos ESCA evaluados, no se observó una caída tan importante en el porcentaje de células teñidas para cadE cuando las células se tiñeron con el anticuerpo a la concentración menor (ESCA 2: 72%; ESCA 3: 78%; ESCA 6: 56%; ESCA 9: 63%, ESCA 11: 89%; ESCA 14: 63%;

ESCA 17: 89%). En este punto debe destacarse que en el procedimiento de reproducción asistida realizado con el paciente ESCA4, se determinó una tasa de fecundación del 45% en FIV estándar, valor considerado por debajo de lo normal (TF normal > 80%).

Finalmente, se obtuvo un extracto de proteínas espermáticas a partir de los espermatozoides criopreservados; sobre estas muestras se realizaron protocolos de separación de proteínas en geles de poliacrilamida seguido de electrotransferencia a membranas y revelado para cadE. Para ello se emplearon los mismos protocolos que los usados para los donantes previamente descritos. En todos los casos se incluyó una muestra de donante normal criopreservado procesado en paralelo con las muestras de los pacientes. Se sembraron 50 µg de proteína total y se evaluó la expresión de actina como control de carga proteica, con el fin de evaluar y comparar la expresión de cadE en las muestras de pacientes. Una imagen representativa de los resultados obtenidos se observa en la siguiente figura:

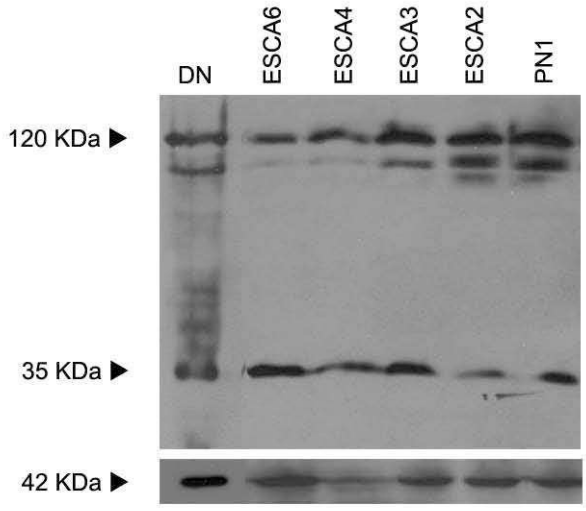


Figura 4.I.26: Evaluación de las formas proteicas de cadE en extractos de proteína total de espermatozoides criopreservados provenientes de pacientes en tratamiento por infertilidad. Imagen representativa de las formas proteicas para cadE en muestras de pacientes en comparación con un donante normal (DN). Se observan formas proteicas de 120 KDa y 35 KDa correspondientes a la forma completa y al dominio citoplasmático de cadE. Se utilizó a la proteína actina (42 KDa) como control de carga, para evaluar y comparar la expresión de cadE en las muestras de los pacientes.

La imagen representativa del grupo de pacientes evaluados muestra la presencia de perfiles similares para la proteína cadE para todos los extractos analizados de los pacientes normales (PNc), ESCAs y Donantes, identificándose la forma completa de 120 KDa, así como fragmentos de digestión, principalmente el de 35 KDa.

En conjunto, los *resultados presentados* **en la Parte I**

Describen las formas proteicas y la localización de los miembros del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina en espermatozoides humanos mótiles no capacitados.

Caracterizan en forma exhaustiva la localización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados.

Muestran la expresión del transcripto de cadE en el testículo y epidídimo, inmunolocalizan la proteína de adhesión en cortes histológicos del caput, corpus y cauda epididimario, así como determinan las formas proteicas de cadE en extractos de proteínas epididimarias y de fluidos del cauda epididimario y del plasma seminal.

Identifican la presencia de sitios inmunorreactivos para cadE en el ovocito humano, en estructuras involucradas en eventos de adhesión con el espermatozoide durante la fecundación.

Muestran el efecto inhibitorio de anticuerpos anti cadE en los estudios funcionales de interacción realizados entre gametas homólogas (Ensayo de unión a Hemizona) y heterólogas (Ensayo de penetración de ovocitos de Hámster sin ZP) y sugieren la participación de cadE en la interacción del espermatozoide con la ZP y la membrana plasmática del ovocito durante la fecundación.

Informan los resultados de un estudio preliminar de detección de cadE en espermatozoides del eyaculado frescos y previamente congelados en un grupo

de pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

Parte II: Empleo del modelo murino para la evaluación de la expresión y localización de cadE en las gametas y su participación en la fecundación. Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios y evaluación de su expresión en el epidídimo

La especie del ratón ha sido extensamente utilizada como modelo animal para el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan el proceso de la fecundación. Esta especie presenta algunas ventajas operativas de estudio si se compara con las evaluaciones que se pueden realizar en el modelo humano. Una de las ventajas principales de esta especie es el corto tiempo en el que el animal alcanza la madurez sexual, lo que permite disponer de tejidos y gametas de animales adultos en períodos cortos de tiempo. A esto se suma la disponibilidad de material biológico de animales de diferentes edades y sexo en tiempos relativamente cortos; esta posibilidad se contrapone a las limitaciones de disponibilidad de material biológico humano y los aspectos éticos relacionados a su obtención, así como la variabilidad de las muestras y las dificultades asociadas a la definición de criterios de normalidad.

La PARTE I de este trabajo ha presentado los resultados de la evaluación exhaustiva de la presencia y localización de cadE y otros miembros del complejo adherente en las gametas humanas. Asimismo, los estudios han descrito las evidencias obtenidas sobre su participación en el proceso de la fecundación, a través del empleo de ensayos homólogos con ovocitos humanos inactivados previamente, así como ensayos heterólogos empleando ovocitos de hámster desprovistos de la ZP. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el modelo humano, proponemos el uso del modelo animal murino para caracterizar la presencia y localización de la proteína de adhesión cadE, así como otros miembros del complejo adherente (β-catenina y actina), en las gametas de ratón y evaluar su expresión en tejidos del tracto reproductor masculino y su rol en el proceso de la fecundación.

Para desarrollar la segunda parte del trabajo de tesis doctoral se estableció una colonia de ratones exocriados (CF1) a partir de la donación de dos parejas fundadoras. Al momento se cuenta con una colonia que consta de tres jaulas de animales parentales (en relación un macho una hembra), las

cuales se mantienen en racks ventilados bajo estricto orden de cruza para evitar la endogamia. Contamos además con espacio suficiente como para crecer los animales hasta edad adulta. Dicha colonia de ratones fue establecida y mantenida por el laboratorio para realizar los trabajos aquí presentados y seguir con las diferentes líneas de investigación desarrolladas en el laboratorio, y es la única colonia de ratones exocriados con la que cuenta el instituto actualmente.

4.II.1 Identificación de formas proteicas e inmunolocalización de cadE y otros miembros del complejo adherente en espermatozoides del *cauda* epididimario murino no capacitados

En una primera etapa, se evaluó la presencia, formas moleculares y localización celular de cadE y de otros miembros del complejo adherente, en particular las proteínas β-catenina y actina, en espermatozoides de ratón adulto recuperados de *cauda* epididimario. Para estos estudios se emplearon técnicas de Western Immunoblotting y de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos.

Se utilizaron espermatozoides recuperados de *cauda* epididimario de ratones adultos sacrificados por dislocación cervical. Se emplearon muestras de espermatozoides con un valor promedio de concentración espermática de 14,0 ± 2,3 millones/ml de células y con una motilidad inicial de 77,7 ± 1,7% de espermatozoides mótiles (n= 3). El porcentaje de exocitosis acrosomal espontánea, determinada por la tinción de Azul de Coomassie fue de 11,0 ± 1,5%.

Como resultado de los ensayos de Western Immunoblotting sobre extractos de proteínas de espermatozoides del *cauda* epididimario con anticuerpos específicos para cadE (anti cadE 610181: 0,25 µg/ml), β-catenina (anti β-catenina 610153: 0,5 µg/ml) y actina (anti actina I-19: 0,06 µg/ml), se detectó la presencia de la forma completa de cadE de 120 KDa, así como formas moleculares de tamaños esperados para β-catenina (92 KDa) y actina (42 KDa). Los resultados se presentan en la **Figura 4.II.1:**

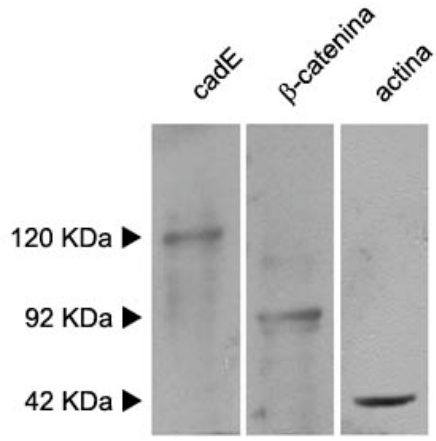


Figura 4.II.1: Ensayos de Western Immunoblotting de extractos proteicos de espermatozoides (20 µg de proteínas totales) recuperados de *cauda* epididimario de ratón adulto. Se observan formas proteicas de peso molecular esperado para las proteínas del complejo adherente cadE (120 KDa), β-catenina (92 KDa) y actina (42 KDa). Los estudios se realizaron sobre extractos espermáticos de al menos 3 animales. Se muestra el resultado representativo obtenido en al menos 3 evaluaciones.

Posteriormente se realizaron ensayos de inmunodetección y localización de las proteínas del complejo adherente en células enteras, empleando inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para cada una de las tres proteínas (cadE: H-108, dominio EC5 de cadE humana, aminoácidos 600-707, Sta Cruz; β-catenina: 06-734, Upstate; actina: A2668, Sigma), seguido del análisis de localización de la señal fluorescente con microscopía láser confocal. Si bien la hoja de producto del anticuerpo anti cadE indica que el anticuerpo reconoce la proteína de origen murino, se realizó el análisis bioinformático para evaluar la similitud entre las secuencias de cadE humana y murina en el segmento correspondiente al péptido usado como antígeno para generar el anticuerpo. Los detalles de este análisis se presentan en el Apéndice D. Como resultado de este análisis, se determinó una identidad del 71% y una similitud del 92% entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas humana y murina correspondientes a este segmento.

Posteriormente se realizaron ensayos de inmunodetección y localización de las proteínas del complejo adherente en células enteras, empleando inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para cada una de las tres proteínas (cadE: H-108, dominio EC5, aminoácidos 600-707, Sta Cruz; β-

catenina: 06-734, Upstate; actina: A2668, Sigma), seguido del análisis de localización de la señal fluorescente con microscopía láser confocal. Como resultado de estas evaluaciones, se detectó la presencia de una señal específica para cadE en la cabeza del espermatozoide, específicamente en la región acrosomal y post-acrosomal (A + PA). El patrón de inmunolocalización de β-catenina y actina fue el mismo que el identificado para cadE. Para las tres proteínas, se observó además una señal específica en el flagelo espermático (**Figura 4.II.2**):

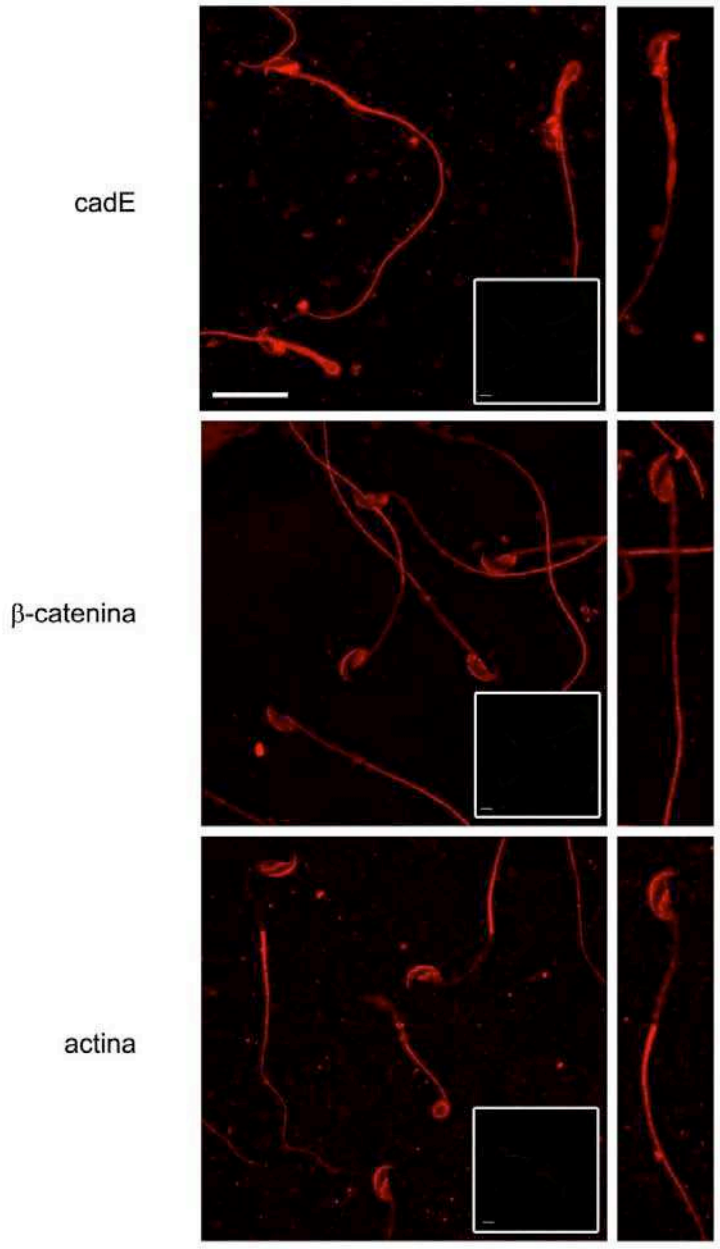


Figura 4.II.2: Ensayos para la inmunolocalización de cadE, β-catenina y actina, en espermatozoides de *cauda* epididimario de ratón adulto. Las proteínas cadE, β-catenina y actina

fueron inmunolocalizadas en la región acrosomal y post-acrosomal de la cabeza del espermatozoide y en el flagelo espermático. Imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil (la barra indica 20 µm). En el "inset" se muestran los controles negativos.

Posteriormente, se realizó un análisis de cuantificación de los patrones de localización de cadE en la población de espermatozoides no capacitados. Conjuntamente con la detección de cadE se llevó a cabo la determinación del estado del acrosoma (intacto o reaccionado) en cada célula; para este análisis se realizó la incubación de los espermatozoides con la lectina fluorescente PSA-FITC luego de la inmunodetección de cadE. Con la lectina, se identifican patrones característicos y diferentes en espermatozoides intactos y reaccionados: mientras los intactos (I) presentan una señal intensa en la región acrosomal, los reaccionados (R) la pierden. Como resultado de este análisis, se determinó que todos los espermatozoides intactos (I) (~90% de la población evaluada) presentaron señal para cadE en el acrosoma y región post-acrosomal (A + PA); por su parte, los espermatozoides clasificados como reaccionados (~10% de la población evaluada) presentaron una señal para cadE intensa en la región post-acrosomal distal (PA) o, alternativamente y en menor frecuencia, ausencia de señal (N). Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la **Figura 4.II.3**:

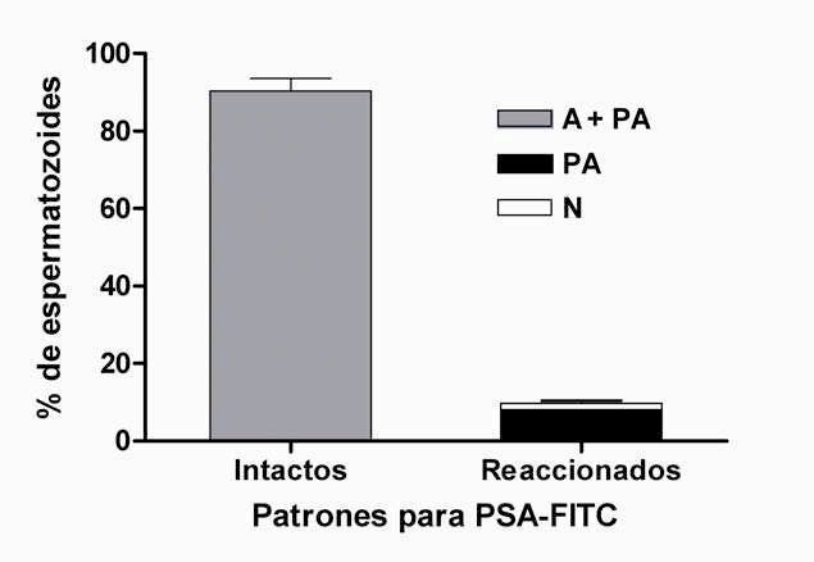


Figura 4.II.3: Ensayos de colocalización cadE/PSA-FITC en espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario de ratón adulto. Las barras representan el porcentaje de espermatozoides intactos (90,3 ± 3,3%) y reaccionados (9,7 ± 3,3%) a la tinción con PSA-FITC. Todos los

espermatozoides intactos presentan el patrón de localización para cadE A + PA (90,3 ± 3,3%), mientras que la población de espermatozoides reaccionados se corresponde con los patrones minoritarios en espermatozoides no capacitados de ratón adulto (PA= 8,0 ± 2,7%; N= 1,7 ± 1,0%) (promedio ± EEP, n= 3). En todos los casos se evaluaron al menos 100 células.

4.II.2 Estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides del *cauda* epididimario capacitados y reaccionados

Con el objetivo de evaluar el destino de cadE en los espermatozoides luego del proceso de la capacitación y de la exocitosis acrosomal, las gametas recuperadas del *cauda* epididimario se incubaron en condiciones que promueven la capacitación y, en algunos casos, se agregó un inductor farmacológico de la exocitosis acrosomal, como es el ionóforo de calcio A23187 (IO). Una vez finalizadas las incubaciones, los espermatozoides se recuperaron y se procesaron para determinar la localización de cadE por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Los espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario de ratones adultos e incubados en condiciones capacitantes presentaron un porcentaje de células mótiles post-capacitación de 75,7 ± 2,7% (n= 3). Cuando se evaluó la respuesta al IO por tinción de las gametas con Azul de Coomassie, se determinó una alta respuesta al inductor, reflejado en el porcentaje de espermatozoides reaccionados del 84,0 ± 1,5% (n= 3), mientras que en la condición control de espermatozoides capacitados solo expuestos al vehículo del ionóforo (DMSO), el porcentaje de gametas reaccionadas fue del 22,3 ± 2,2%.

Al igual que lo descrito en la sección anterior, los estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados fueron seguidos de incubaciones con la lectina PSA-FITC para determinar el estado del acrosoma en cada célula. Los resultados de los estudios sobre espermatozoides capacitados mostraron a todos los espermatozoides clasificados como intactos con el patrón de localización de cadE en la región acrosomal y post-acrosomal (A + PA). El porcentaje de espermatozoides intactos en esta subpoblación se encontró disminuido, alcanzando, con este criterio, un valor de 69,0 ± 3,5%. En los espermatozoides reaccionados de manera espontánea (31,0 ± 3,5%), el patrón mayoritario para la proteína cadE es en la

región post-acrosomal (PA), seguido del que no presentó señal para la proteína de adhesión en la cabeza (N). No se detectaron espermatozoides reaccionados con señal para cadE en el acrosoma, sugiriendo que la proteína cadE localizada en la región acrosomal se pierde durante la exocitosis del acrosoma (**Figura 4.II.4**).

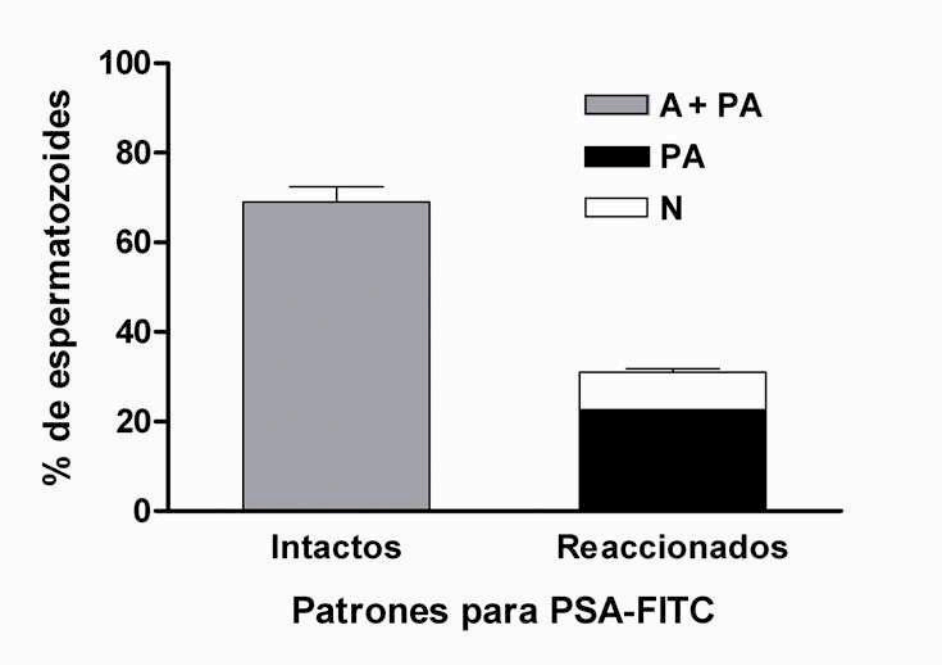


Figura 4.II.4: Ensayos de colocalización cadE/PSA-FITC en espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación. Las barras representan el porcentaje de patrones intactos (69,0 ± 3,5%) y reaccionados (31,0 ± 3,5%) a la tinción con PSA-FITC. Se puede observar que todos los espermatozoides intactos presentan el patrón de localización para cadE A + PA, mientras que la población de espermatozoides reaccionados se corresponde con los patrones PA= 22,7 ± 3,8% y N= 8,3 ± 0,9% (promedio ± EEP, n= 3). En todos los casos se evaluaron al menos 100 espermatozoides.

Los estudios realizados sobre los espermatozoides capacitados y expuestos al IO revelaron cambios en el patrón de localización de cadE. Como resultado de la exocitosis acrosomal se observó la pérdida de señal para cadE en la región acrosomal en todos los casos, siendo ahora predominante el patrón de localización de cadE en la región post-acrosomal. Los espermatozoides que no respondieron al IO y fueron clasificados como intactos, mostraron el característico patrón de localización de cadE A + PA. Los resultados de la cuantificación de los patrones de localización de cadE en relación al estado del acrosoma se presentan en la **Figura 4.II.5**:

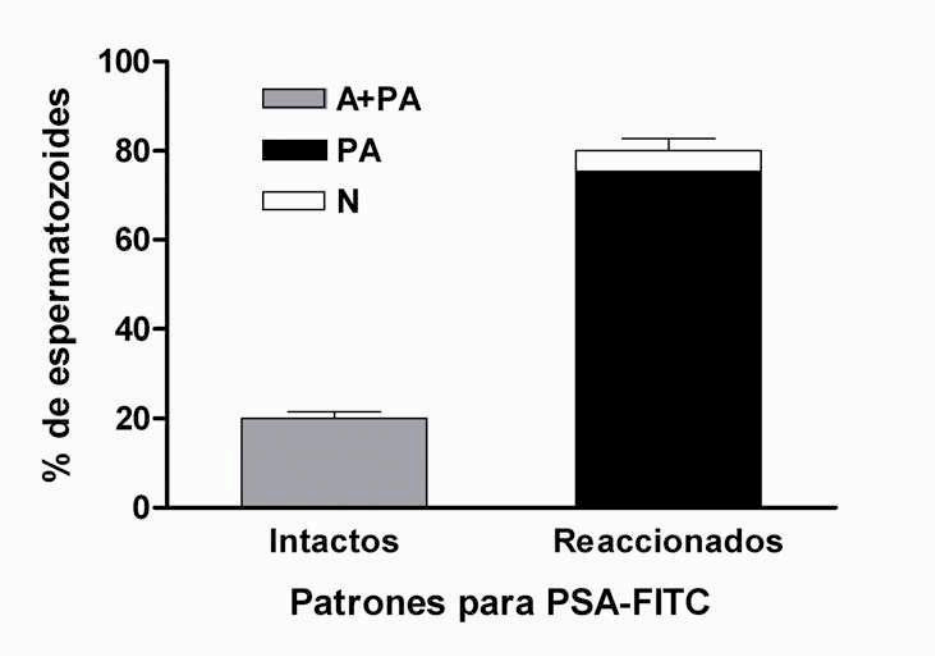


Figura 4.II.5: Ensayos de colocalización cadE/PSA-FITC en espermatozoides capacitados incubados en condiciones que promueven EA. Las barras representan el porcentaje de espermatozoides intactos (20,0 ± 1,5%) y reaccionados (80,0 ± 1,5%) a la tinción con PSA-FITC. Se puede observar que la proporción de espermatozoides intactos presentan el patrón de localización para cadE A + PA (20,0 ± 1,5%), mientras que la población de espermatozoides reaccionados se corresponde con los patrones PA (75,3 ± 4,3%) y una proporción baja de células con patrón N (8,3 ± 0,9%) (promedio ± EEP, n= 3). En todos los casos se evaluaron al menos 100 células.

Los estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados también fueron realizados utilizando el anticuerpo monoclonal anti cadE DECMA-1 (SIGMA), dirigido contra la proteína de adhesión de origen murino y que reconoce un epítope de una secuencia comprendida entre los dominios EC4 y EC5 de la molécula de adhesión. Como resultado de estos estudios se identificó la presencia de patrones similares a los descritos para el anticuerpo policlonal H-108, con la diferencia que no se detectó señal para la proteína en la región post-acrosomal.

Los resultados de la cuantificación de los patrones de localización de cadE utilizando el anticuerpo anti cadE DECMA-1, en las diferentes poblaciones espermáticas se muestran en la **Tabla 4.II.1**:

	A	PA	N	H	SE
NC	81,7 ± 2,7	0,7 ± 0,7	16,7 ± 2,9	0,3± 0,3	0,7± 0,7
C	45,3 ± 10,8	0,3 ± 0,3	52,3 ± 10,2	2,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0
R	16,0 ± 5,7	0,0 ± 0,0	83,3 ± 6,4	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3

Tabla 4.II.1: Ensayos de inmunolocalización de cadE en espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario de ratón adulto (NC, no capacitados), e incubados en condiciones que promueven la capacitación (C, capacitados) y la exocitosis acrosomal (R, reaccionados), utilizando anticuerpo anti cadE DECMA-1. La tabla muestra el porcentaje promedio de espermatozoides presentando cada uno de los patrones observados en cada condición (promedio ± EEP, n= 3). En todos los casos se evaluaron al menos 100 células.

Como resultado de estos estudios, en espermatozoides no capacitados se identificó como patrón mayoritario de cadE aquel que presentó señal para la proteína con localización en el capuchón acrosomal (A= 81,7 ± 2,7). Los espermatozoides capacitados mostraron una disminución del patrón acrosomal y un concomitante aumento de un patrón con ausencia de señal para la proteína, determinándose proporciones similares de ambos patrones (A= 45,3 ± 10,8; N= 52,3 ± 10,2). En la población de espermatozoides incubados en condiciones que promueven la exocitosis acrosomal el patrón mayoritario es de ausencia de señal para la proteína en la cabeza del espermatozoide (N= 83,3 ± 6,4) (promedio ± EEP, n= 3). En todos los casos se observaron patrones minoritarios en cantidades variables (H= tinción homogénea sobre la cabeza del espermatozoide; SE= tinción en segmento ecuatorial; PA= localización de la proteína en la región post-acrosomal). Contrastando con los registros obtenidos usando el anticuerpo anti cadE policlonal H-108, con el anticuerpo DECMA-1 no se detectó la presencia del patrón A + PA (**Figura 4.II.6**)

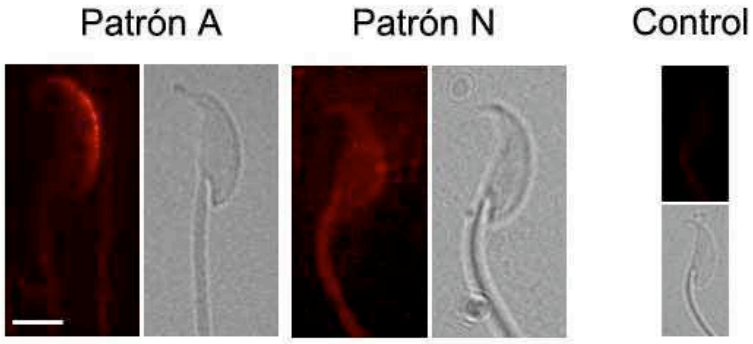


Figura 4.II.6: Inmunolocalización de cadE en espermatozoides murinos empleando el anticuerpo DECMA-1. La imagen muestra los patrones mayoritarios observados. Patrón A: localización de la proteína en capuchón acrosomal; Patrón N: ausencia de señal para la proteína (la barra indica 2,5 μm)

En conjunto, los resultados presentados en esta sección muestran la presencia y localización de cadE en espermatozoides murinos incubados *in vitro* en condiciones que promueven la capacitación y que permiten la respuesta a un inductor farmacológico de la exocitosis acrosomal, las que se emplean para imitar los procesos fisiológicos de tránsito por el tracto reproductor de la hembra e interacción con la ZP y gatillado de la exocitosis acrosomal. La proteína de adhesión fue localizada en la región acrosomal, estructura de los espermatozoides que participa en interacciones celulares del proceso de la fecundación; la señal de cadE en esta región se pierde con la exocitosis del gránulo. Asimismo, cadE fue inmunodetectada en el flagelo en todas las condiciones funcionales.

4.II.3 Estudios de inmunolocalización de β-catenina y actina en espermatozoides capacitados y reaccionados

Conjuntamente con los estudios de localización de cadE en muestras de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y con un inductor farmacológico de la exocitosis acrosomal, se evaluó la presencia y localización de β-catenina y actina utilizando anticuerpos específicos (anti β-catenina: 06-734, Upstate; y anti actina: A2668, Sigma, respectivamente).

Como resultado de estos estudios, β-catenina fue inmunolocalizada en la región acrosomal de la cabeza de los espermatozoides capacitados.

Contrastando, no se detectó señal para la proteína en la mayoría de los espermatozoides que han sufrido la exocitosis acrosomal, observándose solo algunas células que mantienen la tinción en el acrosoma. Por su parte, la proteína actina fue inmunolocalizada en la región acrosomal y post-acrosomal de espermatozoides capacitados, mientras que los espermatozoides reaccionados muestran tinción en la región apical de la cabeza donde se apoya el acrosoma (**Figura 4.II.7**).

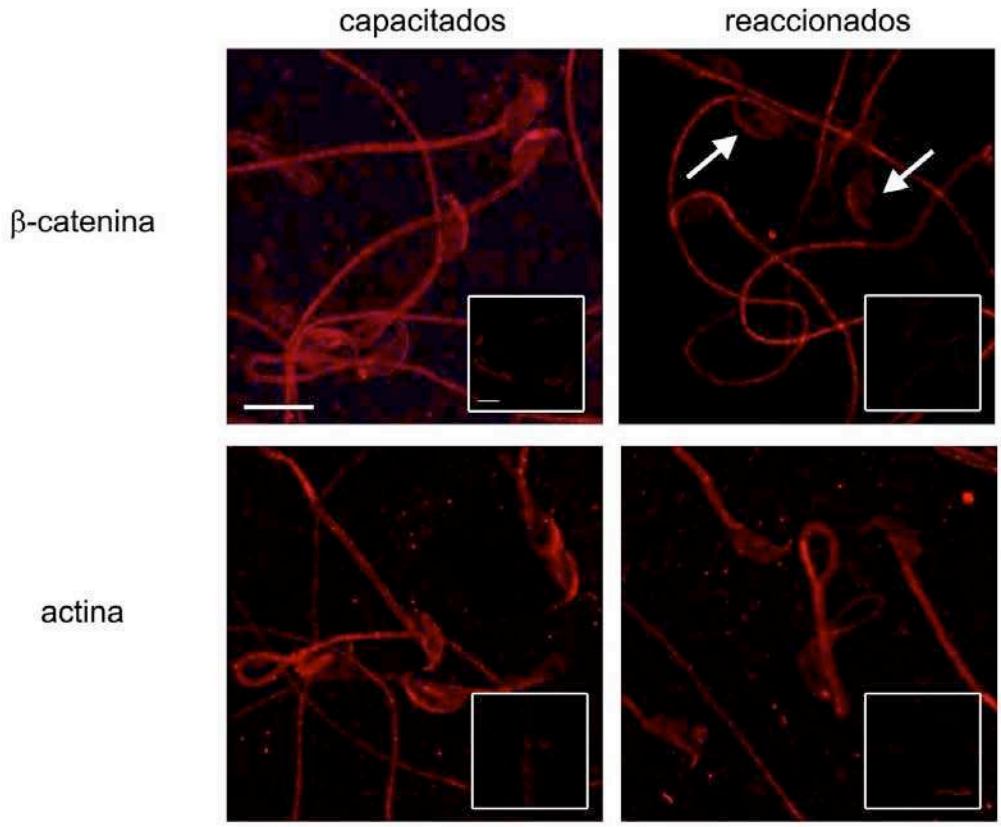


Figura 4.II.7: Ensayos para la inmunolocalización de β-catenina y actina en espermatozoides de *cauda* epididimario de ratón adulto incubados en condiciones que promueven la capacitación y la exocitosis acrosomal. La proteína β-catenina fue inmunolocalizada en la región acrosomal de espermatozoides capacitados, mientras que para la mayoría de los espermatozoides que han sufrido la EA la proteína está ausente en la cabeza del espermatozoide (las flechas indican la posición de la cabeza del espermatozoide). Actina se inmunolocaliza en la región acrosomal y post-acrosomal de espermatozoides capacitados y en la región apical de la cabeza en espermatozoides reaccionados. Imágenes tomadas mediante microscopía láser confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil (la barra indica 5 µm). En el "inset" se muestran los controles negativos en donde el primer anticuerpo fue reemplazado por IgG normal en la misma concentración que el anticuerpo específico.

En conjunto, los resultados presentados muestran un estudio detallado sobre la localización de cadE, β-catenina y actina en espermatozoides murinos del *cauda* epididimario no capacitados, capacitados y reaccionados. Los resultados muestran una señal específica para cadE en la región acrosomal y post-acrosomal de espermatozoides intactos y la pérdida de la señal acrosomal en aquellos que han sufrido la exocitosis acrosomal. La localización de las proteínas del complejo adherente, β-catenina y actina, siguió la correspondiente a cadE.

4.II.4 Estudios de detección de actina filamentosa en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados

La "faloidina" es una herramienta valiosa para marcar, identificar y cuantificar la actina filamentosa (actina-F) en tejidos y células en cultivo. Esta falotoxina es un péptido bicíclico soluble en agua aislado del hongo *Amanita phalloides.* Al unirse a la actina-F, previene su despolimerización, dado que se une específicamente a la interfase entre subunidades y las mantiene asociadas; tiene igual afinidad por los filamentos largos y cortos de actina y es incapaz de unirse a actina monomérica o glomerular (actina-G). A diferencia de los anticuerpos, la afinidad de unión a actina-F no cambia entre las diferentes especies y, acoplada a fluoróforos, tiñe a la actina-F a concentraciones nanomolar.

Se utilizó faloidina acoplada al fluoróforo Alexa Fluo 488 para evaluar la actina polimerizada sobre muestras de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados y analizados posteriormente empleando microscopía confocal. En la **Figura 4.II.8** se muestran imágenes representativas de preparados provenientes de suspensiones espermáticas de incubaciones en las tres condiciones experimentales:

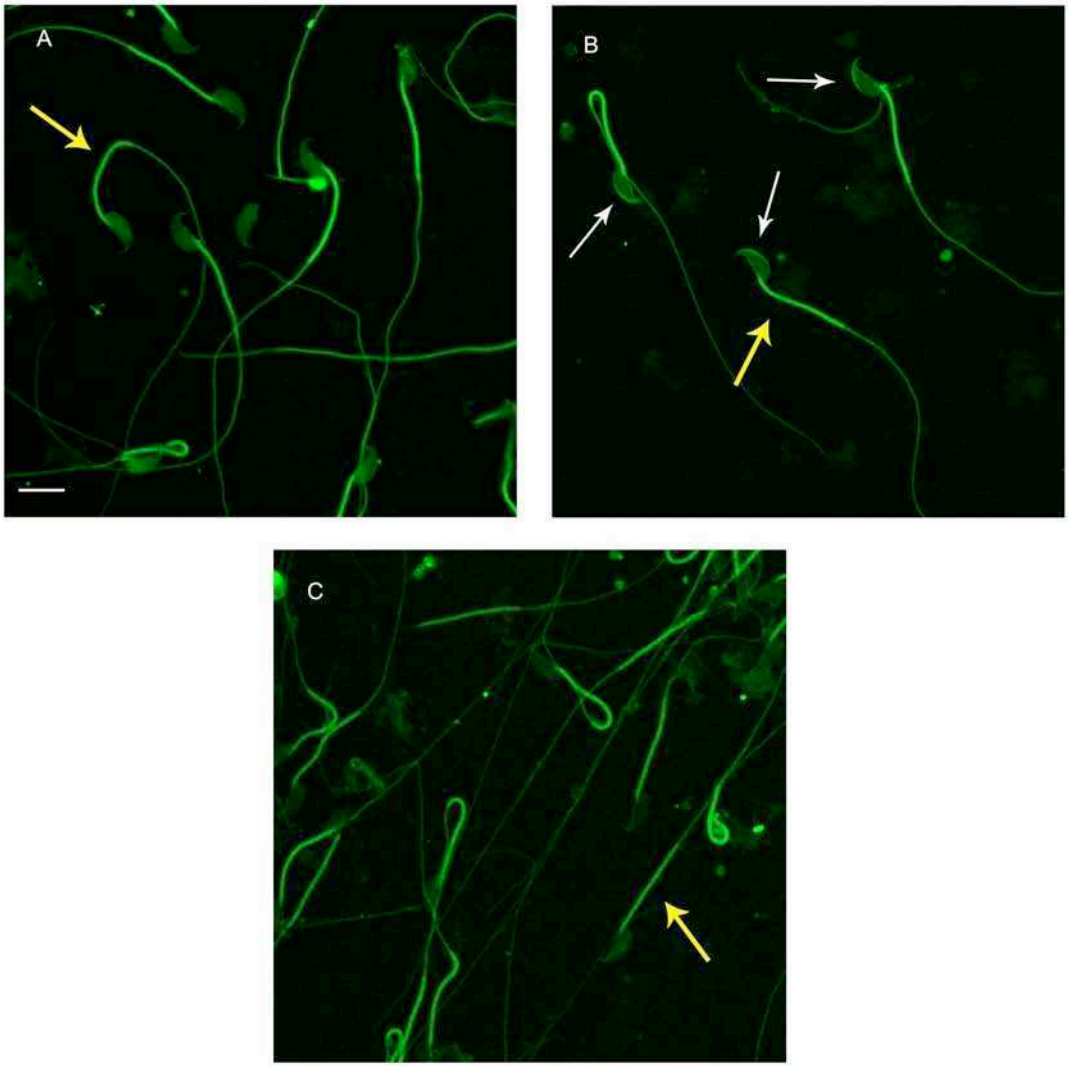


Figura 4.II.8: Localización de actina polimerizada (actina-F, filamentosa) en espermatozoides no capacitados (A), capacitados (B) y reaccionados (C), empleando faloidina-Alexa Fluo 488. Las imágenes de microscopía láser confocal muestran localización de actina-F en el acrosoma de espermatozoides capacitados (flechas blancas) y ausencia de señal detectable para la misma en la cabeza del espermatozoide reaccionado. En los tres estadios funcionales se observa una señal intensa en la pieza media del flagelo espermático (flechas amarillas). Imágenes tomadas con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil (la barra indica 10 µm).

Como resultado de estas evaluaciones, se identificó la presencia de una señal tenue y homogénea sobre la cabeza del espermatozoide y una intensa en la región de la pieza media de la cola en espermatozoides no capacitados. En los espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación, se observaron cambios en el patrón de tinción para la toxina, detectándose una señal intensa de localización de actina polimerizada en la región acrosomal

(flechas blancas) además de la señal del flagelo. Finalmente, los espermatozoides incubados en presencia de ionóforo de calcio, presentaron en su mayoría ausencia de señal fluorescente en la cabeza del espermatozoide, contrastando con una tinción en la pieza media del flagelo espermático de gran intensidad y similar a la observada en espermatozoides no capacitados y capacitados; en este último caso, el porcentaje de espermatozoides reaccionados superó el 70% en los tres ensayos realizados.

4.II.5. Estudios de localización de cadE en espermatozoides del *cauda* epididimario por inmunomicroscopía electrónica de transmisión

Con el interés de determinar con mayor detalle las estructuras inmunorreactivas para cadE en los espermatozoides murinos, se realizaron ensayos de localización de la proteína de adhesión sobre espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario empleando la técnica de Inmuno Microscopía Electrónica de Transmisión (IMET). Para realizar estas evaluaciones, se utilizó el anticuerpo específico anti cadE policlonal (H-108) y un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro coloidal. Los estudios fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Miguel Fornés, en el Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), área de Histología y Embriología, departamento de Morfología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas (UNCuyo-CONICET).

Las imágenes presentadas en la **Figura 4.II.9** muestran los resultados de la evaluación realizada sobre espermatozoides procesados inmediatamente luego ser recuperados del *cauda* epididimario por difusión espontánea del tejido o luego de ser incubados durante 20 minutos en un medio de cultivo; en ambos casos los espermatozoides fueron incubados con el anticuerpo previo a la fijación. En espermatozoide procesados inmediatamente, la deposición de las partículas de oro se localizó principalmente en la membrana plasmática que recubre el acrosoma de los espermatozoides intactos (panel A); dicha señal se perdería luego de la exocitosis acrosomal, como lo sugieren las imágenes obtenidas con los espermatozoides incubados durante un lapso de tiempo en medio de cultivo previo al agregado del anticuerpo, condición experimental que aparentemente promueve desestabilización de las membranas y lleva a la

exocitosis espontánea del gránulo acrosomal (panel B). La señal fue específica de la presencia del anticuerpo anti cadE, dado que no se observó en aquellos casos en los que se omitió primer anticuerpo.

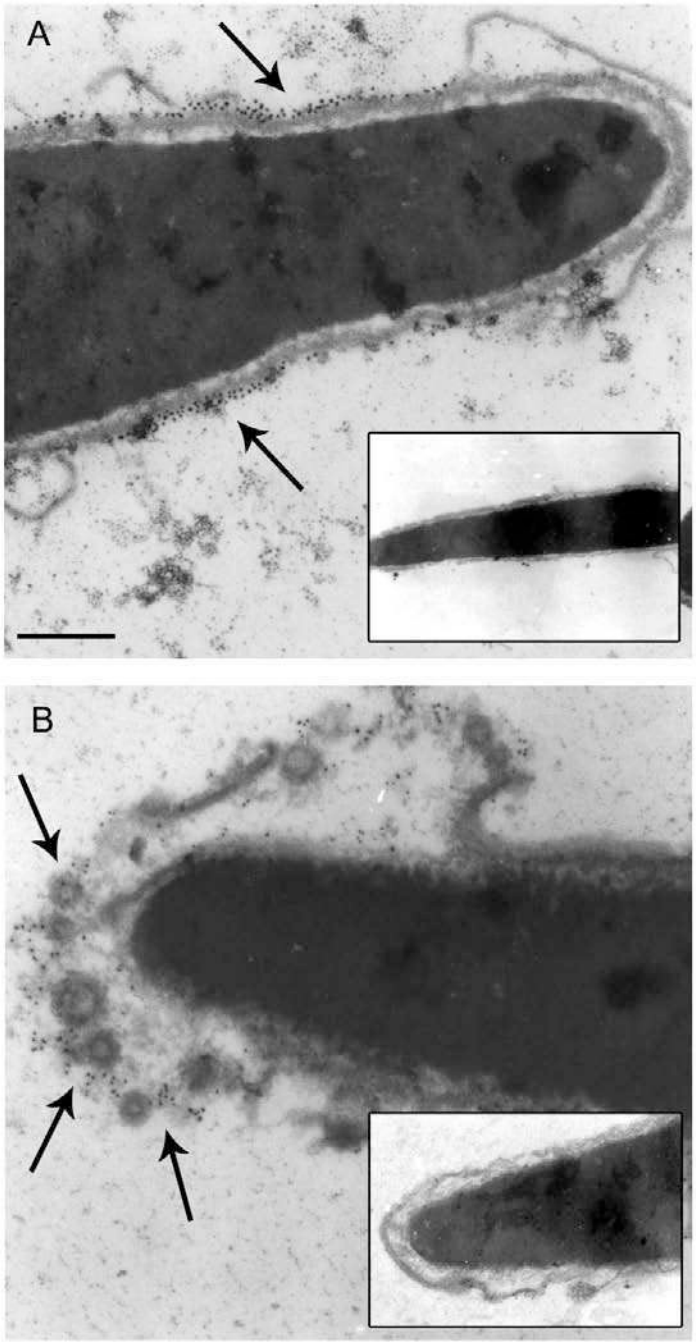


Figura 4.II.9: Ensayos de inmunolocalización de cadE empleando microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides incubados en presencia de anticuerpo anti cadE H-108 (40 µg/ml) previo a la fijación de las células y posterior incubación con un segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal. Deposición de las partículas de oro en la membrana plasmática de espermatozoides (A) y

en vesículas membranosas de espermatozoides (B). Imágenes tomadas con microscopía electrónica de transmisión en un equipo EM Zeiss 900 (la barra indica 1 µm). En el "inset" se muestran los controles negativos.

Los resultados de los estudios de IMET concuerdan con los obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti cadE H-108 y DECMA-1, en los que se obtuvo una señal fuerte y específica en la región acrosomal de espermatozoides intactos y que se encontró ausente en espermatozoides clasificados como reaccionados, tanto de manera espontánea como luego de la exposición al ionóforo de calcio A23187.

4.II.6 Evaluación de la expresión y localización de cadE en tejidos del tracto reproductor masculino

Nuestro grupo de trabajo ha descrito la presencia del ARNm de cadE en tejido testicular y epididimario humanos cuantificando los niveles de expresión en ambos órganos y ha completado el análisis de la secuencia nucleotídica codificante del transcripto epididimario. Conjuntamente, hemos caracterizado la expresión de la proteína epididimaria empleando ensayos de Western Immunoblotting e inmunohistoquímica, estudios que revelaron la presencia de la forma completa de la proteína cadE (120 KDa) en extractos totales de proteínas de epidídimo humano, la que pudo ser localizada en células epiteliales de los tres segmentos del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) (ver Parte I). En roedores, estudios previos han descrito la presencia del ARN mensajero de cadE en el epidídimo de la rata y han presentado evidencias que se distribuye diferencialmente a lo largo del tejido y sería regulado por los andrógenos circulantes (Cyr *et al*, 1992; Cyr *et al*, 1993; Munro & Blaschuk, 1996).

Con el fin de evaluar y caracterizar la expresión de cadE en el modelo murino, inicialmente se analizó la presencia del transcripto en el "pool" de ARN epididimario y testicular de ratón adulto, utilizando ensayos de retrotranscripción seguido de PCR a punto final. En paralelo, se evaluó sobre las mismas muestras la expresión de β-actina como gen de expresión constitutiva. Como resultado de estos estudios se detectó, de manera específica, un fragmento del tamaño esperado para cadE (100 pb) en muestras de ARN de tejido testicular y epididimario, la amplificación para ambos genes fue específica (**Figura 4.II.10**):

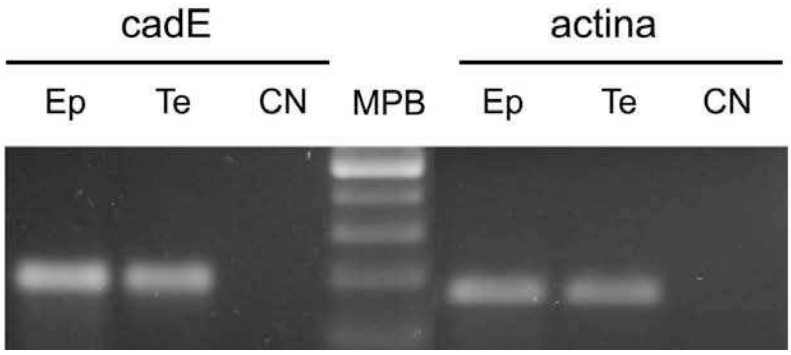


Figura 4.II.10: Ensayos de RT-PCR para cadE en extractos de ARN total de tejido epididimario (Ep) y testicular (Te). Se observan bandas de tamaño molecular esperado para cadE (100 pb) y para actina (93 pb) en extractos de ARN total de epidídimo y testículo de ratón adulto. La amplificación fue específica dado que no se observa señal en los controles sin enzima (CN). Marcadores de pares de bases (MPB).

Posteriormente, se cuantificaron y compararon los niveles de expresión del transcripto de cadE en tejido testicular y epididimario empleando ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran que en el epidídimo la expresión del mensajero de cadE fue de aproximadamente 350 veces mayor a la observada en el testículo (**Figura 4.II.11**).

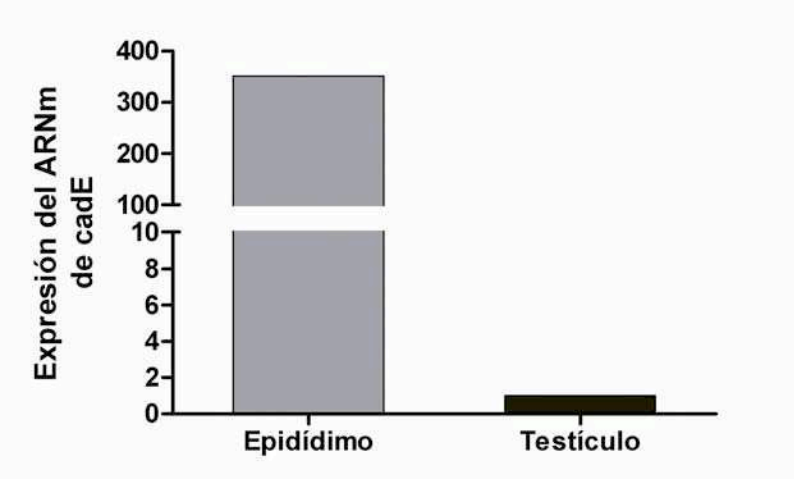


Figura 4.II.11: Expresión de cadE en tejido epididimario y testicular. Ensayo de RT-PCR en tiempo real sobre ARN total de epidídimo y testículo de ratón adulto. Se utilizó como control interno de expresión constitutiva el gen de actina y al testículo murino como muestra de referencia. En el gráfico se observa que la expresión en epidídimo es ~350 veces superior a la expresión en el testículo.

En extractos de proteínas totales de tejido testicular y epididimario de ratón adulto se identificó la presencia de la forma completa de cadE de 120 KDa en ambos tejidos, si bien la señal fue más intensa en los extractos de epidídimo (**Figura 4.II.12**). En los perfiles proteicos de tejido epididimario se detectó, además, la presencia de formas de menor peso molecular de 105 y 97 KDa, que corresponderían a productos de degradación (**Figura 4.II.12**). En membranas de extractos epididimarios sometidas a protocolos de revelado con tiempos largos de exposición se detectó además el precursor de cadE de 135 KDa (datos no mostrados). En concordancia con los estudios de expresión del transcripto de cadE en ambos tejidos, la forma completa de la proteína de adhesión presentó una intensidad mayor en el epidídimo que en el testículo (**Figura 4.II.12**).

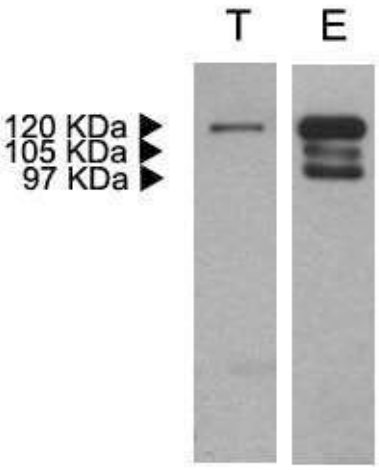


Figura 4.II.12: Expresión de cadE en extractos de proteínas de testículo y epidídimo de ratón adulto. Formas proteicas de cadE en ensayos de Western inmmunoblotting de extractos de proteínas de tejido testicular y epididimario de ratón adulto (20 µg de proteínas totales en cada caso). Las membranas fueron reveladas con anticuerpo monoclonal (BD 610181) dirigido contra el dominio citoplasmático de la proteína de adhesión. Se observan formas de peso molecular esperado para la forma completa de cadE (120 KDa) y formas productos de la degradación (105 y 97 KDa).

Los estudios de inmunolocalización de cadE en cortes histológicos de tejido epididimario del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimarios revelaron la presencia de una señal específica para la proteína de adhesión en la región apical y basolateral de las células epiteliales principales de los tres segmentos epididimarios (**Figura 4.II.13**).

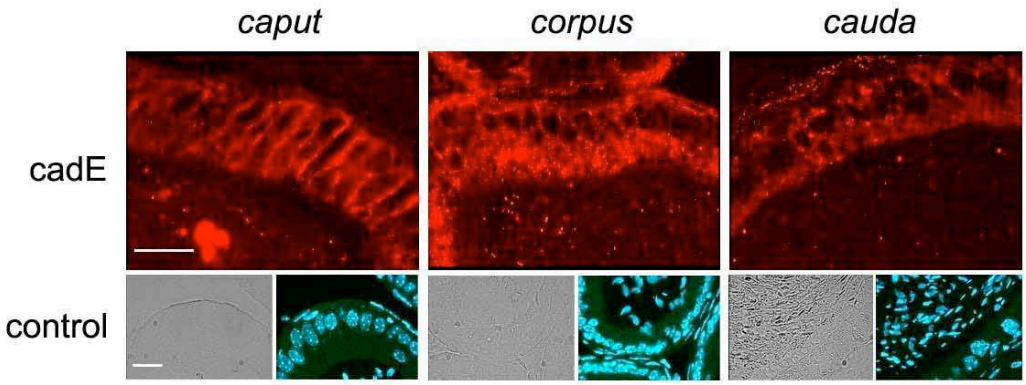


Figura 4.II.13: Inmunolocalización de cadE en cortes histológicos de epidídimo de ratón adulto. Las imágenes muestran inmunolocalización para la proteína de adhesión en la región apical y basolateral de las células epiteliales principales de los tres segmentos del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. Imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia con objetivo 40 x (la barra indica 50 µm).

En conjunto, los estudios presentados describen la expresión del transcripto de cadE en la gonada y en el epidídimo, así como la detección de la proteína de adhesión cadE en extractos totales de ambos tejidos y su inmunolocalización en células epiteliales principales de los tres segmentos epididimarios en el ratón adulto.

4.II.7 Inmunodetección de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios de ratones adultos

Con el interés de determinar el origen tisular de la proteína cadE detectada en los espermatozoides murinos del *cauda* epididimario y caracterizar los patrones de inmunolocalización de la proteína en los espermatozoides recuperados de los tejidos del tracto reproductor evaluados y sus regiones, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para cadE en espermatozoides recuperados del testículo y de las regiones del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo. Los estudios incluyeron la identificación de los patrones y la distribución de los mismos en la población total de gametas recuperadas de cada región del tracto evaluado.

En los espermatozoides testiculares se identificó la presencia de un

patrón de localización de la proteína cadE en forma homogénea (H) y tenue sobre toda la cabeza del espermatozoide; asimismo, se detectaron patrones de localización para cadE en la región acrosomal y la región post-acrosomal distal, próxima a la inserción de la cabeza con el flagelo (patrón A + PA), y un patrón con señal solo en la región post-acrosomal (patrón PA) de la cabeza. En algunos espermatozoides, se detectó un patrón con ausencia de señal para cadE en la cabeza de la gameta (patrón N). En todos los casos se inmunodetectó cadE en el flagelo. La señal correspondiente a cadE en los diferentes patrones de inmunolocalización fue específica, ya que no se observó tinción alguna en aquellos casos en los que el primer anticuerpo fue reemplazado por IgG de conejo agregada a la misma concentración (control) (**Figura 4.II.14**).

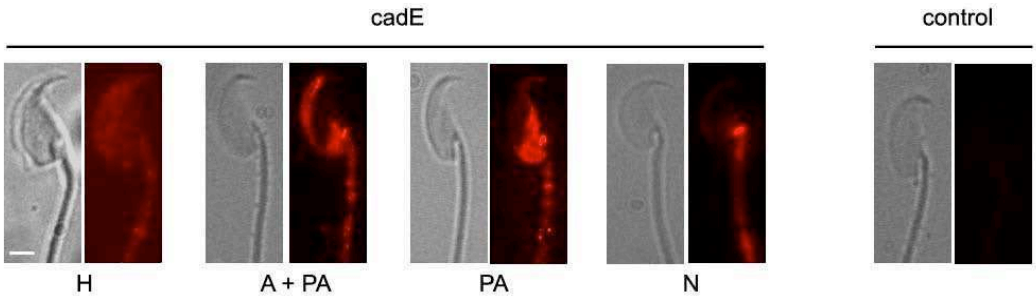


Figura 4.II.14: Patrones de localización para cadE en espermatozoides de testículo y del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario de ratón adulto. Las imágenes muestran los patrones de inmunolocalización para la proteína de adhesión: homogéneo (H), acrosomal y post-acrosomal (A + PA), solo post-acrosomal (PA) y ausencia de señal en la cabeza espermática (N). Imágenes tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo 100 x (la barra indica 2,5 µm). Se realizaron controles para los espermatozoides testiculares y de cada segmento epididimario. Solo se incluye el control correspondiente a espermatozoides recuperados del *cauda* epididimario, obteniéndose resultados similares en todos los casos (datos no mostrados).

Luego de evaluar la distribución poblacional de los diferentes patrones identificados, los estudios de cuantificación revelaron que el patrón H fue el predominante en espermatozoides testiculares, mientras que el A + PA fue el mayoritario en espermatozoides epididimarios recuperados de los tres segmentos. En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de los patrones observados en espermatozoides recuperados del testículo y epidídimo de ratones adultos de la colonia CF1 (promedio ± error estándar del promedio, EEP); los patrones mayoritarios para tejido o región se

resaltan en color (**Tabla 5.II.2**).

		H	A + PA	PA	N
CF1	**Testículo**	**53,7 ± 6,1**	31,5 ± 11,3	0,1 ± 0,1	14,6 ± 8,1
	caput	0,0 ± 0,0	**92,4 ± 2,3**	4,4 ± 1,9	3,3 ± 1,1
	corpus	0,0 ± 0,0	**91,7 ± 3,6**	1,5 ± 0,7	6,7 ± 2,9
	cauda	0,0 ± 0,0	**84,1 ± 9,3**	11,4 ± 9,6	4,5 ± 2,8

Tabla 4.II.2: Cuantificación de la distribución poblacional de los patrones de inmunolocalización para cadE en ratones adultos de la colonia CF1. Los resultados corresponden a lecturas realizadas en 4 experimentos independientes (n= 4 ratones) en los que se leyeron al menos 100 espermatozoides de cada tejido y región de tejido. Los resultados se expresan como promedio ± EEP.

Los estudios de inmunolocalización de cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios fueron realizados también en ratones de una cepa de animales endocriados, en particular de la cepa C57. De manera similar a lo descrito para los ratones de la cepa CF1, el patrón mayoritario de localización de cadE en los espermatozoides recuperados del testículo fue el H, mientras que el patrón mayoritario para las células recuperadas del epidídimo fue el A + P. En la **Tabla 4.II.3** se presentan los valores determinados para los patrones observados en espermatozoides recuperados del testículo y epidídimo de ratones adultos:

		H	A + PA	PA	N
C57	**Testículo**	**72,7 ± 8,2**	10,3 ± 6,8	6,3 ± 6,3	2,5 ± 2,5
	caput	0,0 ± 0,0	**63,6 ± 11,4**	21,6 ± 6,7	12,1 ± 9,1
	corpus	0,0 ± 0,0	**63,4 ± 14,9**	28,2 ± 11,7	7,6 ± 3,7
	cauda	0,2 ± 0,2	**60,2 ± 11,7**	32,6 ± 9,6	6,2 ± 2,4

Tabla 4.II.3: Distribución poblacional de los patrones de inmunolocalización para cadE en ratones

adultos de la cepa C57. Los resultados corresponden a lecturas realizadas en 5 experimentos independientes (n= 5 ratones) en los que se leyeron al menos 100 espermatozoides de cada tejido y región de tejido. Los resultados se expresan como promedio ± EEP.

Los resultados revelan diferencias en los patrones de localización de cadE entre espermatozoides testiculares y epididimarios en ambas cepas. Las diferencias podrían ser el resultado del desenmascaramiento o redistribución de la proteína durante el tránsito epididimario o, alternativamente, adquisición de cadE durante el proceso de maduración en el epidídimo. En referencia al último, existen varios mecanismos propuestos por los cuales las proteínas podrían incorporarse a la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito epididimario. Estos son: 1) por transferencia de las proteínas durante el contacto intimo entre el epitelio y el espermatozoide que transita el ducto epididimario (Bedford, 1975) y 2) a través de la transferencia de proteínas epididimarias secretorias liberadas al lumen en forma soluble o en vesículas membranosas llamadas epididimosomas (Legare *et al*, 1999, Frenette *et al*, 2001). Los epididimosomas fueron descritos con anterioridad en otros modelos animales como la rata, el hámster y el bovino (Fornés *et al*, 1991; Yanagimachi *et al*, 1985; Frenette *et al*, 2001).

Evidencias previas de nuestro laboratorio sugieren la presencia de miembros del complejo adherente cadE, β-catenina y actina en vesículas membranosas del fluido epididimario de toro (Caballero *et al*, tesis doctoral). En base a estos antecedentes, iniciamos estudios para determinar si cadE es detectada en vesículas recuperadas del fluido epididimario. Para estas evaluaciones. Se recuperaron vesículas epididimarias de ratón y se evaluó la presencia de cadE y otros miembros del complejo adherente. Parte de estos estudios fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Miguel Fornés en el Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), área de Histología y Embriología, departamento de Morfología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas (UNCuyo-CONICET).

Con el objetivo de obtener la fracción vesicular, el fluido del *cauda* epididimario se obtuvo con jeringa por perfusión retrógrada desde el conducto deferente, se centrifugó a baja velocidad para remover espermatozoides y residuos de otros tipos celulares y finalmente se ultracentrifugó a alta velocidad

para sedimentar las vesículas en la fracción particulada. Sobre esta última, se evaluó la presencia de vesículas y en las mismas se realizó la inmunolocalización de cadE. Como resultado de estos estudios, se detectó la presencia de vesículas de tipo membranosa en fluidos epididimarios de ratón, de manera similar a lo descrito en la rata (Fornés *et al*, 1991). Cuando la fracción vesicular fue incubada en presencia de anticuerpo anti cadE (H-108) y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro, se observaron depósitos de las partículas de oro en las membranas de las vesículas (**Figura 4.II.15**).

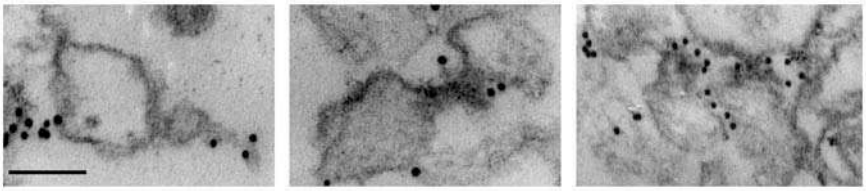


Figura 4.II.15: Imágenes de inmunomicroscopía electrónica de transmisión de la fracción de vesículas membranosas del fluido del *cauda* epididimario. Las imágenes muestran estructuras de tipo vesicular membranosa en fluido ultracentrifugado de *cauda* epididimario de ratón adulto. La incubación con anticuerpo anti cadE de la fracción vesicular, muestra deposición de partículas de oro en la membrana de las vesículas (la barra indica 0,15 µm).

Además de los estudios ultraestructurales, se evaluó la presencia de cadE en extractos de proteínas totales de las vesículas. Como resultado de estas evaluaciones, se inmunodetectó la forma completa de cadE de 120 KDa en extractos proteicos del fluido previo a la ultracentrifugación y de la fracción particulada luego de la ultracentrifugación (vesículas), pero no se detectó señal para la proteína en extractos proteicos del fluido libre de vesículas luego de la ultracentrifugación (**Figura 4.II.16**)

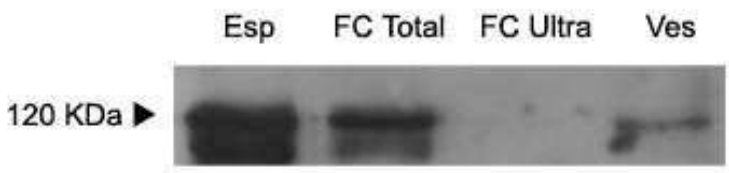


FIGURA 4.II.16: Evaluación de las formas proteicas de cadE en vesículas epididimarias de ratón adulto. Se observa la forma proteica de cadE de 120 KDa en el fluido previo a la ultracentrifugación

(FC Total), en extractos proteicos de la fracción vesicular ultracentrifugada (Ves) pero no en extractos proteicos del fluido luego de la ultracentrifugación (FC Ultra). Se incluye además el perfil proteicos de extractos de espermatozoides del cauda epididimario (Esp).

En conjunto, los resultados muestran la presencia de estructuras membranosas de tipo vesicular en el fluido de *cauda* epididimario de ratón adulto. En extractos proteicos de la fracción vesicular se inmunodetectó la presencia de cadE, resultados que indican que la proteína de adhesión está presente en las vesículas.

4.II.8 Identificación de formas proteicas e inmunolocalización de cadE y otros miembros del complejo adherente en células del *cumulus oophorus* y en ovocitos maduros de ratón

Una vez completados los estudios de localización de cadE así como de otros miembros del complejo adherente en espermatozoides en diversos estadios funcionales, en esta parte del proyecto se completaron una serie de estudios diseñados para identificar las formas proteicas y localización celular de cadE, β-catenina y actina en células del *cumulus oophorus* y en ovocitos maduros.

Estudios sobre células del *cumulus oophorus*

Se realizaron ensayos de Western Immunoblotting de extractos de células del *cumulus oophorus* de Complejos Ovocitos *Cumulus* (COCs) recuperados del oviducto de hembras superovuladas. Para ello se emplearon anticuerpos específicos para las proteínas del complejo adherente cadE, β-catenina y actina. Como resultado de estos estudios, se detectó la presencia de formas proteicas de las tres proteínas del tamaño molecular esperado: cadE, 120 KDa; β-catenina, 92 KDa, actina: 42 KDa. Adicionalmente se detectaron 2 productos de procesamiento enzimático de cadE de 105 y 54 KDa (**Figura 4.II.17**).

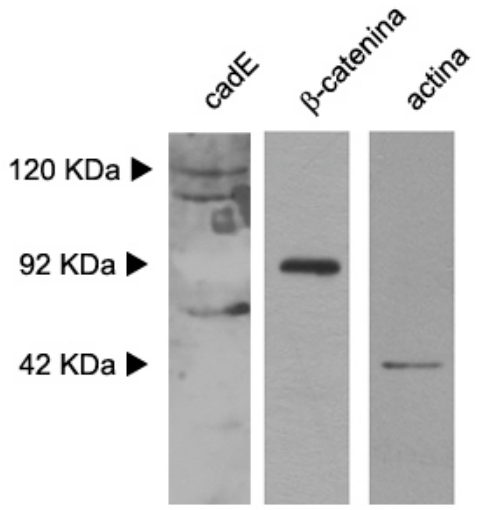


Figura 4.II.17: Ensayos de Western Immunoblotting en células de *cumulus oophorus* obtenidas a partir de COCs ovulados y recuperados del oviducto. Se identifican las formas del tamaño molecular esperado para cadE (120 KDa) y productos de degradación (105 y 54 KDa), β-catenina (92 KDa) y actina (42 KDa).

En ensayos de inmunocitoquímica sobre células del *cumulus oophorus*, cadE fue inmunolocalizada en el citoplasma y en la membrana plasmática de las células, evidenciándose una mayor intensidad en los contactos célula-célula (**Figura 4.II.18**). Los estudios de co-inmunolocalización de cadE con β-catenina revelaron la presencia de una señal conjunta, que permitiría postular la existencia de interacción entre ambas proteínas. Los controles con IgG normal confirmaron la especificidad de la señal con los anticuerpos primarios (**Figura 4.II.18**).

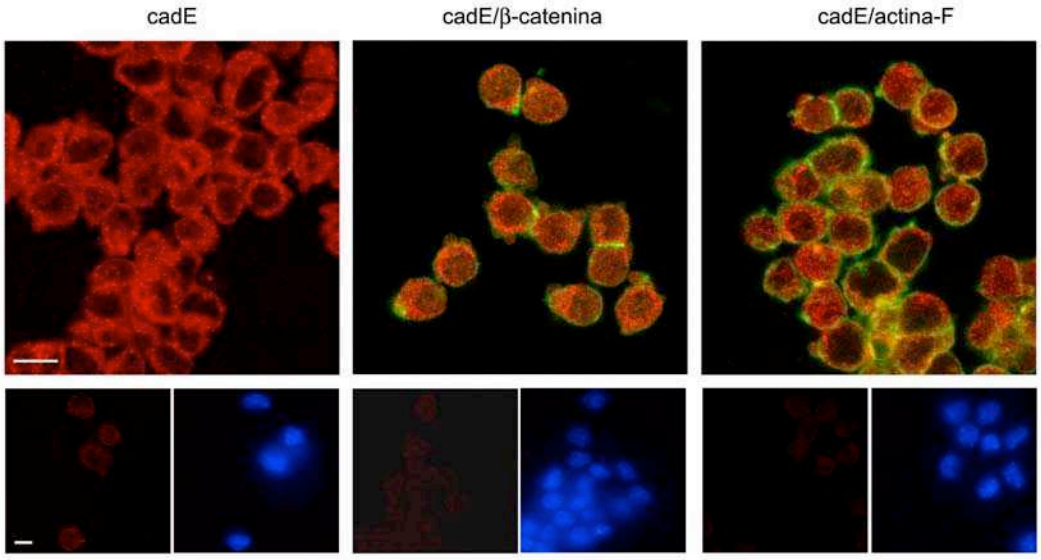


Figura 4.II.18: Ensayos de inmunolocalización de cadE y co-inmunolocalización de cadE (rojo) con

β-catenina y actina (actina-F) en células del *cumulus oophorus*. La imagen muestra la localización de cadE (panel izquierdo) en la membrana de las células del *cumulus oophorus*, siendo más intensa en la región de contacto celular. Panel central: co-localización de cadE con β-catenina. Panel derecho: co-localización de cadE con actina. Se incluyen controles en todos los casos. Las imágenes se tomaron mediante microscopía óptica confocal con objetivo PLAN APO 60x/1.4 oil 60 x (la barra indica 5 μm).

Estudios sobre ovocitos maduros

En ensayos de Western Inmunoblotting de extractos de proteínas de ovocitos con y sin ZP, se evaluó la presencia de las proteínas del complejo adherente cadE, β-catenina y actina. Los resultados se presentan en la **Figura 4.II.19**:

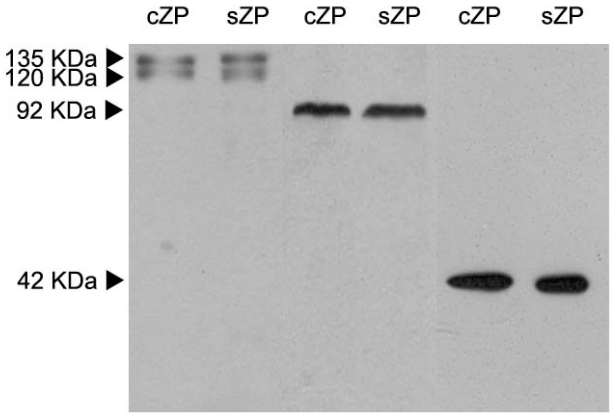


Figura 4.II.19: Evaluación de la presencia de las proteínas del complejo adherente (cadE, β-catenina, actina) en extractos proteicos de ovocitos de ratón con ZP (cZP) y libres de ZP (sZP). En los perfiles se observan las formas proteicas de 135 KDa y 120 KDa, correspondientes al precursor y la proteína madura de cadE; y formas proteicas de 92 KDa y 42 KDa, para β-catenina y actina respectivamente, en ambas preparaciones.

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunolocalización de cadE en ovocitos libres de células del *cumulus* por microscopía de fluorescencia empleando el anticuerpo anti cadE H-108. Los resultados revelaron una señal intensa para la proteína de adhesión tanto en los ovocitos con ZP y sin ZP en la membrana plasmática u oolema y en el citoplasma ovocitario. Se observó además una señal de baja intensidad para la proteína en la estructura de la ZP. La señal observada fue específica, dado que los ovocitos del grupo control (con y sin ZP) incubados en presencia de IgG normal de conejo en reemplazo del

primer anticuerpo, no mostraron señal fluorescente (**Figura 4.II.20**):

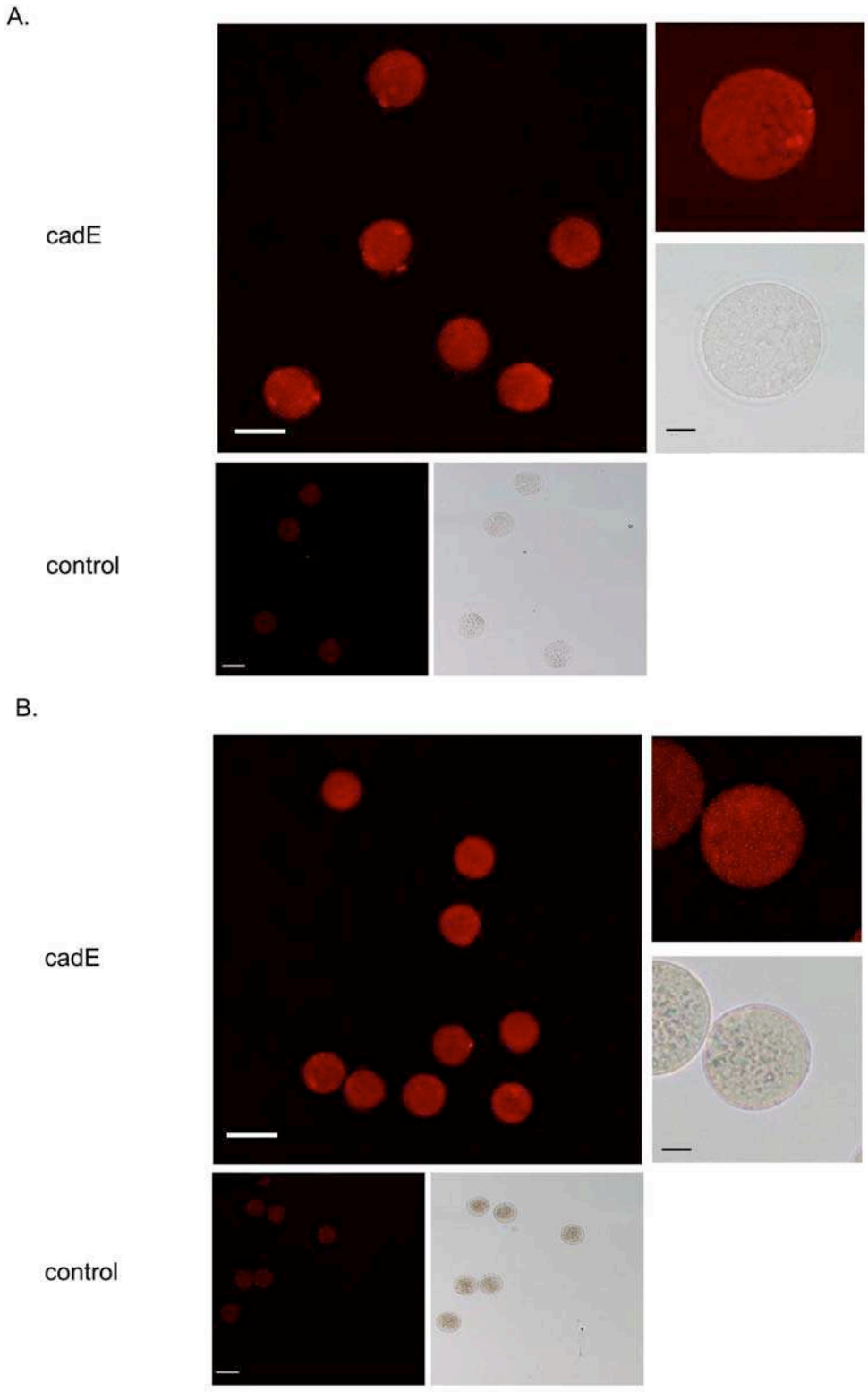


Figura 4.II.20: Ensayos de inmunofluorescencia indirecta de ovocitos de ratón maduros con ZP (A) y sin ZP (B) para la detección de cadE. La proteína de adhesión se inmunolocaliza en la membrana plasmática y en el citoplasma de los ovocitos. Las imágenes se tomaron empleando

microscopía láser confocal con objetivo PLAN 20x/0.4 (las barras indican 100 µm).

De manera similar, se evaluó la localización de β-catenina y actina filamentosa en ovocitos maduros de ratón. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la **Figura 4.II.21**:

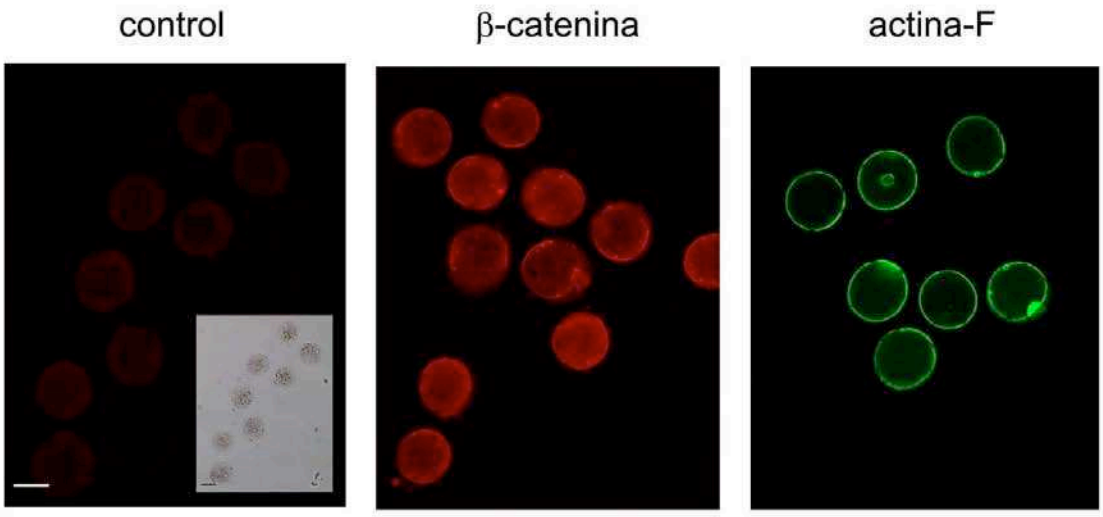


Figura 4.II.21: Ensayos de inmunolocalización de β-catenina y actina filamentosa (actina-F) en ovocitos de ratón maduros. Las imágenes muestran la inmunolocalización para β-catenina (rojo) y actina-F (verde). La proteína β-catenina muestra localización en la membrana plasmática de la célula y en el citoplasma, mientras que actina-F se localiza en el cortex celular. La señal para la catenina es específica, dado que no aparece en la condición control en que el primer anticuerpo es reemplazado por IgG de conejo a la misma concentración. Las imágenes se tomaron empleando microscopía láser confocal con objetivo PLAN 20x/0.4 (las barras indican 50 µm).

En conjunto, estos ensayos describen la presencia, localización y formas proteicas de las proteínas del complejo adherente cadE, β-catenina y actina en el ovocito murino maduro.

4.II.9 Evaluación de la participación de cadE en eventos de interacción entre las gametas durante la fecundación

Teniendo en cuenta que cadE se expresa y localiza en la superficie del ovocito, así como también en estructuras del espermatozoide involucradas en la interacción entre las gametas, se iniciaron estudios para evaluar la participación

de la proteína en el proceso de la fecundación. Como estrategia experimental para evaluar la participación de cadE en los eventos de adhesión celular durante la fecundación, se implementaron los siguientes ensayos de interacción de gametas: 1) ensayos de fecundación *in vitro* con ovocitos con y sin células del *cumulus oophorus*, 2) ensayos de interacción entre espermatozoides y la estructura de la ZP y 3) ensayos de interacción entre el espermatozoide y el oolema; en el último caso, el ensayo incluyó la evaluación de la capacidad de unión de los espermatozoides al oolema y la capacidad de los mismos de fusionarse a la membrana plasmática ovocitaria.

La estrategia para evaluar la participación de cadE en el proceso de interacción de gametas involucró el uso de anticuerpos bloqueantes de la función adhesiva de cadE, los que fueron usados para preincubar los espermatozoides o los ovocitos previo al ensayo de interacción. Como anticuerpos se emplearon el H-108, utilizado en los ensayos de inmunolocalización de la proteína de adhesión en gametas y tejidos y el anticuerpo monoclonal ECCD1. Este último fue desarrollado en la rata contra moléculas de adhesión célula-célula dependiente de iones calcio de células de teratocarcinoma murino, y se determinó que afecta el patrón de polarización de la superficie celular de las blastómeras en estadios de 8 y 16 células (Shirayoshi *et al*, 1983), e induce la decompactación de embriones en estadio de 8 células (Yoshida-Noro *et al*, 1984). El anticuerpo ECCD1 se une específicamente a células epiteliales y su unión a la superficie celular depende de la presencia de iones Ca^{2+}, por lo que probablemente el anticuerpo reconozca solo la forma activa de la proteína (Yoshida-Noro *et al*, 1984). El anticuerpo tendría su epítope en el dominio extracelular cadherina 1, más específicamente alrededor del aminoácido 16 (Nose *et al*, 1990). Si bien el anticuerpo H-108 fue eficaz en bloquear la interacción del espermatozoide humano con la ZP homóloga y con el oolema del ovocito de hámster (ver resultados Parte I de este trabajo de tesis), hasta el presente su capacidad de interferir en la interacción de las gametas murinas no había sido evaluada.

Por lo tanto, previo a su uso en los ensayos de interacción de gametas murinas, se evaluó la capacidad del anticuerpo policlonal H-108 de bloquear la interacción célula-célula usando el mismo diseño experimental que el empleado

con ECCD1 (Shirayoshi *et al*, 1983). El desarrollo de estos estudios se describe en la sección siguiente.

4.II.9.1 Evaluación de la capacidad del anticuerpo anti cadE H-108 de bloquear la adhesión célula-célula en modelos de embriones murinos en desarrollo.

En esta etapa del estudio, se evaluó la capacidad del anticuerpo policlonal anti cadE H-108 de inhibir la compactación de las mórulas por interferencia en la adhesión de las blastómeras durante el desarrollo temprano de embriones murinos. Básicamente, se realizó un protocolo de superovulación, seguido de apareo; posteriormente, se recolectaron embriones de dos células, los que se mantuvieron en cultivo en presencia de los anticuerpos H-108 o ECCD1, o en ausencia de ellos (control) por hasta 3 días luego de colectados. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la siguiente tabla:

Condición	% de mórula compactada (promedio ± EEP)	n	p
ECCD1	5,5 ± 5,5	19	*
H-108	0,0 ± 0,0	18	*
Control	64 ± 14	19	--

Tabla 4.II.4: Efecto del anticuerpo anti cadE sobre la compactación embrionaria. La tabla muestra el porcentaje de mórula compacta obtenida en los diferentes tratamientos (promedio ± EEP) (*p<0,05 respecto del control, Kruskal-Wallis).

Los resultados mostraron la capacidad del anticuerpo H-108 de inhibir la compactación embrionaria en niveles similares a lo observado previamente con el anticuerpo ECCD1.

Las imágenes características de embriones compactados en ausencia de anticuerpo a las 48 horas de incubación y de embriones no compactados al mismo tiempo de incubación en presencia de anticuerpos anti cadE se muestran

en la **Figura 4.II.22**:

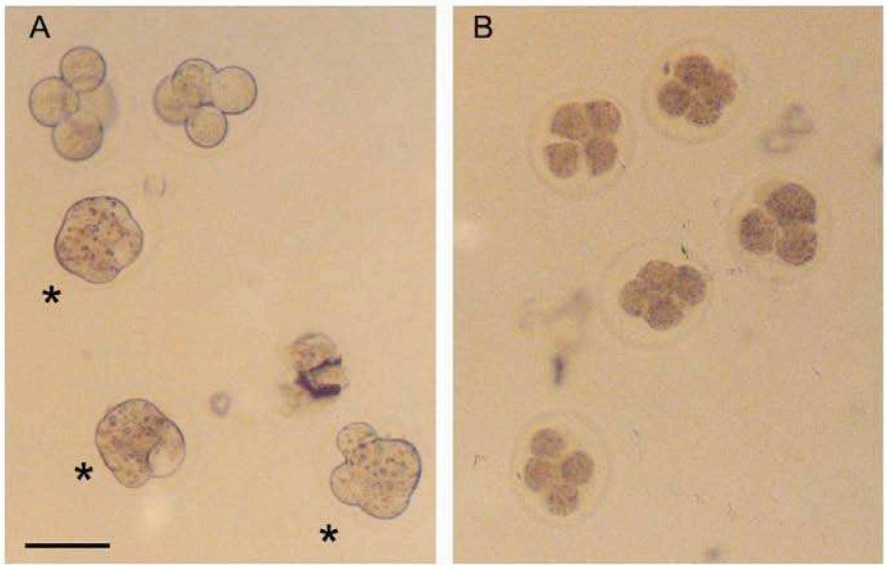


Figura 4.II.22: Efecto del anticuerpo anti cadE sobre la compactación embrionaria. Las imágenes muestran 3/5 embriones compactados (*) en la condición control (A) y 5/5 embriones no compactados en estadio de 4-6 células (B) a las 48 horas de cultivo en presencia de anticuerpo policlonal anti cadE H-108 monitoreadas hasta las 72 horas de incubación. Las imágenes se tomaron empleando microscopía óptica con objetivo PLAN 40 FRP 0.55 160/1 (la barra indica 100 µm).

En base a estos resultados, los ensayos de interacción de gametas mencionados se llevaron a cabo con ambos anticuerpos. En las secciones siguientes se presentarán los estudios realizados en relación a cada ensayo de interacción.

4.II.9.2 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de fecundación *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la participación de cadE en el proceso de interacción de gametas en el modelo murino, se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* (FIV) en presencia de anticuerpos anti cadE (H-108 y ECCD1). Básicamente, el protocolo de ensayo de fecundación *in vitro* se realizó como se describiera previamente (Veaute *et al*, 2009). Los espermatozoides se preincubaron durante 30 minutos en presencia del anticuerpo (20 µg/ml) o la

misma concentración de la IgG normal (condición control) y, posteriormente, se co-incubaron con los ovocitos con o sin células del *cumulus oophorus*.

Como criterio de fecundación se tomó la presencia de un ovocito con 2 pronúcleos y la extrusión del segundo cuerpo polar luego de 8 horas de co-incubación de las gametas.

En ensayos de fecundación *in vitro* con COCs, la preincubación de los espermatozoides con el anticuerpo anti cadE resultó en la inhibición significativa del porcentaje de ovocitos fecundados en comparación con el tratamiento control (**H-108**= 38,0 ± 3,8 (n= 179 ovocitos) vs. IgG conejo control= 60,9 ± 4,6 (n= 137 ovocitos) % ovocitos fecundados, n= 5, p<0,05, test de Fischer; **ECCD1**= 46,9 ± 10,4 (n= 95 ovocitos) vs. IgG rata control= 68,7 ± 15,7 (n= 81 ovocitos) % ovocitos fecundados, n= 3, p < 0,05, test de Fischer). Los resultados se presentan en la **Figura 4.II.23**. Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con ambos anticuerpos, en el gráfico se representa el porcentaje de ovocitos fecundados (Tasa de fecundación) en cada condición, en relación al 100% de su control.

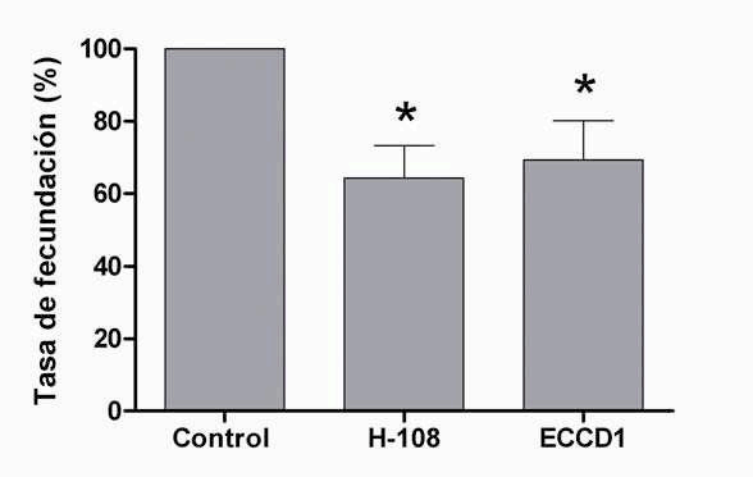


Figura 4.II.23: Ensayos de fecundación *in vitro* con COCs incubados con espermatozoides preincubados con anticuerpos anti cadE. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpos anti cadE se asoció a una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fecundados. Los resultados se presentan como la tasa de fecundación ([# de ovocitos fecundados / # de ovocitos inseminados]/100) relativo al control (promedio ± EEP, * p<0,05, test de Fischer).

Cuando los ensayos se realizaron con ovocitos denudados, nuevamente

el porcentaje de ovocitos fecundados disminuyó de manera significativa en la condición de incubación con el anticuerpo a porcentajes del 30-40% respecto del control: 1) **H-108**= 24,7 ± 8,4 (n= 87 ovocitos) vs. IgG conejo control= 52,6 ± 8,3 (n= 94 ovocitos) % ovocitos fecundados, n= 8; p<0,05; 2) **ECCD1**= 11,0 ± 1,5 (n= 95 ovocitos) vs. IgG rata control= 57,4 ± 36,7% (n= 39 ovocitos) ovocitos fecundados, p<0,05 (**Figura 4.II.24**). De igual manera que para los ensayos de fecundación *in vitro* con COCs, los resultados se presentan como el porcentaje de ovocitos fecundados (Tasa de fecundación) en cada condición, en relación al 100% de su control.

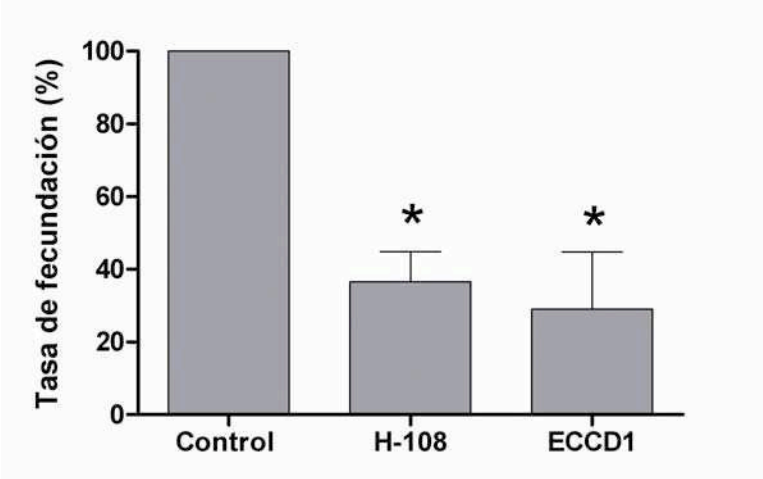


Figura 4.II.24: Ensayos de fecundación *in vitro* con ovocitos denudados (libres de células del *cumulus*) incubados con espermatozoides preincubados con anticuerpos anti cadE. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpos anti cadE se asoció a una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fecundados. Los resultados se presentan como la tasa de fecundación ([# de ovocitos fecundados / # de ovocitos inseminados]/100) relativo al control (promedio ± EEP, * p<0,05, test de Fischer).

4.II.9.3 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de interacción espermatozoide-ZP

Con el objetivo de analizar si el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti cadE sobre la FIV es el resultado del bloqueo de la interacción del espermatozoide con el ovocito específicamente por interferencia en la interacción de componentes asociados a la estructura de la matriz glicoproteica que rodea el ovocito, se desarrollaron ensayos de interacción de los espermatozoides con la ZP en presencia de anticuerpos anti cadE.

Previo al desarrollo de los ensayos de bloqueo, se evaluó la cinética de unión de los espermatozoides a la ZP. En estos ensayos, los espermatozoides se incubaron por un lapso total de 120 minutos en condiciones capacitantes, luego de lo cual se pusieron en contacto con los ovocitos libres de células del *cumulus oophorus* durante 10, 20 ó 30 minutos. Finalizado el período de co-incubación, los ovocitos fueron recuperados y procesados según se detalla en la Sección de Materiales y Métodos. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la siguiente figura:

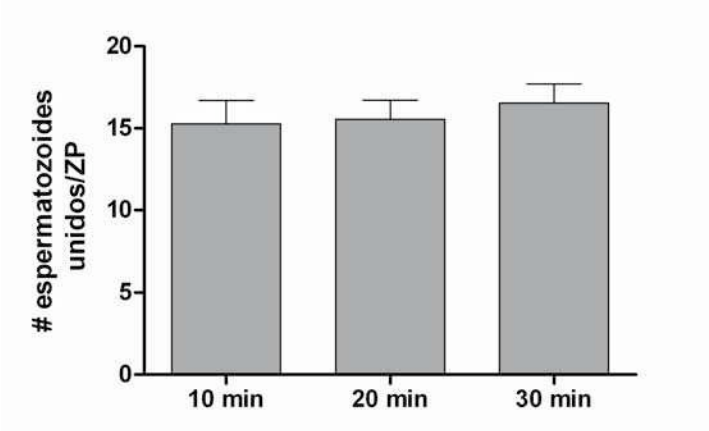


Figura 4.II.25: Ensayo de cinética de unión de espermatozoides a la ZP. Los espermatozoides se incubaron en presencia de ovocitos libres de células del *cumulus* por un tiempo total de 10, 20 o 30 minutos, pasado dicho tiempo se evaluó el número de espermatozoides unidos por ovocitos. Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos a ZP (promedio ± EEP).

Como resultado de estas evaluaciones, no se encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos a ZP entre los diferentes tiempos de incubación (10 minutos= 15,3 ± 1,4; 20 minutos= 15,5 ± 1,2; 30 minutos= 16,5 ± 1,2 espermatozoides unidos/ZP, n= 15 ovocitos en cada condición experimental). A partir de estos resultados, se eligió como tiempo de co-incubación de gametas 30 minutos. La examinación de los ovocitos con espermatozoides unidos a todos los tiempos utilizando microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski (DIC; del inglés Differential Microscopy Contrast), permitió verificar que los espermatozoides unidos a la estructura de la ZP tenían su acrosoma intacto (datos no mostrados), para lo cual se empleó el criterio previamente reportado (Wassarman & Litscher, 2008).

Posteriormente, se realizaron los ensayos para evaluar el efecto de los

anticuerpos anti cadE H-108 o ECCD1 sobre la interacción de los espermatozoides con la ZP. Los anticuerpos fueron agregados a los espermatozoides en los últimos 30 minutos de incubación en condiciones capacitantes a una concentración 20 µg/ml.

A continuación se presenta un esquema del diseño experimental empleado en estos ensayos:

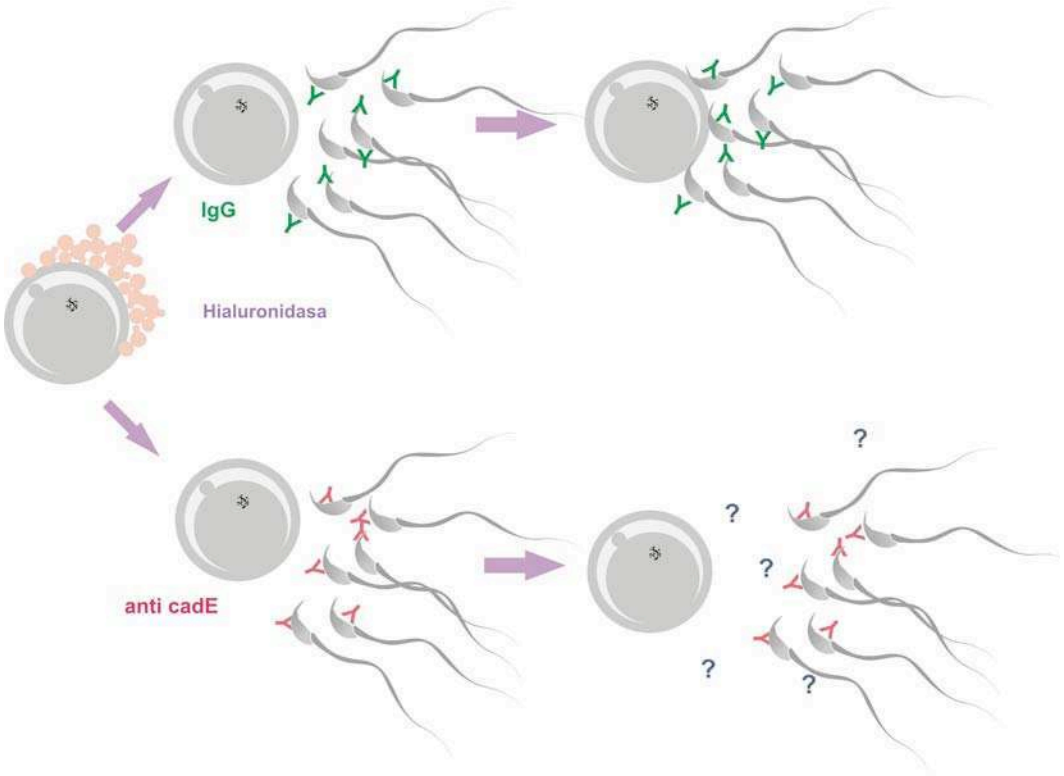


Figura 4.II.26: Representación esquemática del ensayo de interacción de espermatozoides-ZP para evaluar el efecto de los anticuerpos anti cadE. Los espermatozoides capacitados y preincubados con el anticuerpo anti cadE se pusieron en contacto con ovocitos con ZP libres de células del *cumulus*. Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas se recuperaron los ovocitos y se evaluó el número de espermatozoides unidos (ver sección Materiales y Métodos).

Como resultado de estos estudios se determinó que el agregado del anticuerpo policlonal anti cadE condujo a la inhibición significativa (Kruskal-Wallis test, $p<0,05$) de la unión de los espermatozoides a la ZP (H-108= 9,1 ± 0,4 espermatozoides unidos a ZP, n= 84 ovocitos totales, vs. IgG conejo control= 12,7 ± 0,6 espermatozoides unidos a ZP, n= 73 ovocitos totales) (promedio ± EEP; n= 4 ensayos). De manera similar, la preincubación de los espermatozoides con el anticuerpo monoclonal anti cadE ECCD1 condujo a una

inhibición significativa del número de espermatozoides unidos a la ZP (ECCD1= 2,2 ± 0,3 espermatozoides unidos a ZP; n= 51 ovocitos totales, vs. IgG rata control= 11,2 ± 1,0 espermatozoides unidos a ZP, n= 24 ovocitos totales) (promedio ± EEP; n= 3) (**Figura 4.II.27**). Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos por ZP en relación al 100% de su control.

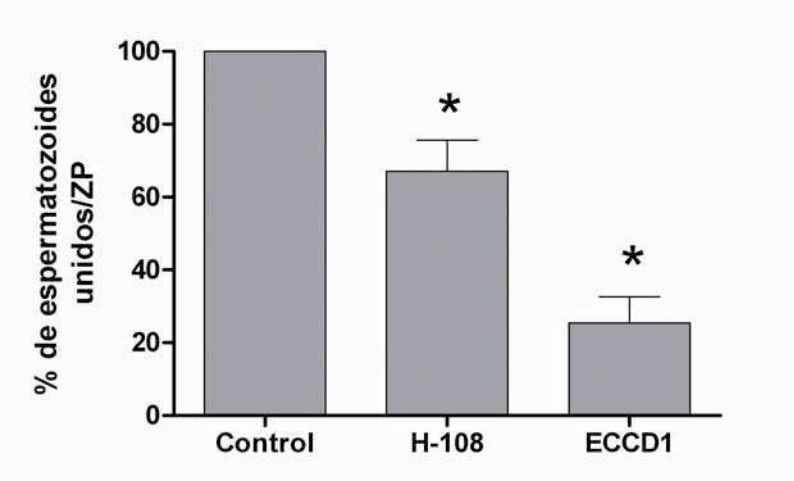


Figura 4.II.27: Participación de cadE en eventos de interacción con la estructura de la ZP. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpos anti cadE condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides unidos a la ZP. Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos a ZP en relación al control de IgG normal (promedio ± EEP).

Las interacciones mediadas por cadE son principalmente de tipo homofílicas. Los estudios de inmunodetección de cadE en ovocitos murinos revelaron una señal de baja intensidad en la estructura de la ZP. Asimismo, los resultados presentados en la Parte I de esta tesis muestran la presencia de una señal específica para cadE en la estructura de la ZP humana y a estas evidencias se suman resultados similares en el modelo bovino (Caballero *et al*, tesis doctoral). En base a estos antecedentes, se realizaron ensayos en los que se preincubaron los ovocitos libres de células del *cumulus* con el anticuerpo anti cadE y posteriormente se co-incubaron con los espermatozoides. La preincubación de los ovocitos con el anticuerpo anti cadE ECCD1 20 µg/ml condujo a una disminución significativa del número de espermatozoides unidos a la ZP (ECCD1= 15,93 ± 0,93 (n= 80 ovocitos totales) vs. IgG rata control= 26,20 ± 0,77 espermatozoides unidos a ZP (n= 69 ovocitos totales)); los resultados se presentan en la **Figura 4.II.28**:

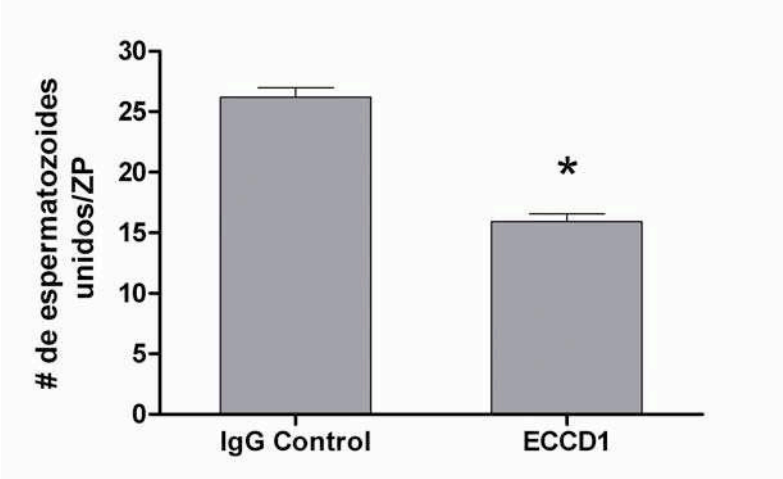


Figura 4.II.28: Participación de cadE en eventos de interacción con la estructura de la ZP. La preincubación de los ovocitos y posterior co-incubación con los espermatozoides capacitados en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1 (20 µg/ml) condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides unidos a la ZP. Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos a ZP en relación al control de IgG normal (promedio ± EEP).

Los resultados muestran la capacidad del anticuerpo anti cadE ECCD1 de bloquear la interacción espermatozoide–ZP a través del bloqueo de la proteína de adhesión presente en la estructura que rodea el ovocito.

4.II.9.4 Evaluación del efecto del agregado de anticuerpos anti cadE en ensayos de interacción espermatozoide-ovocito sin ZP

Previo a los estudios con los anticuerpos anti cadE y como parte de las determinaciones realizadas durante la optimización del ensayo, se evaluó la cinética de unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito u oolema. En estos ensayos, los espermatozoides se incubaron por un lapso total de 120 minutos en condiciones capacitantes, luego de lo cual se pusieron en contacto con los ovocitos libres de ZP durante 15, 30, 45 o 60 minutos. Finalizado el período de co-incubación, los ovocitos fueron recuperados y procesados según se detalla en la Sección de Materiales y Métodos. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la siguiente figura:

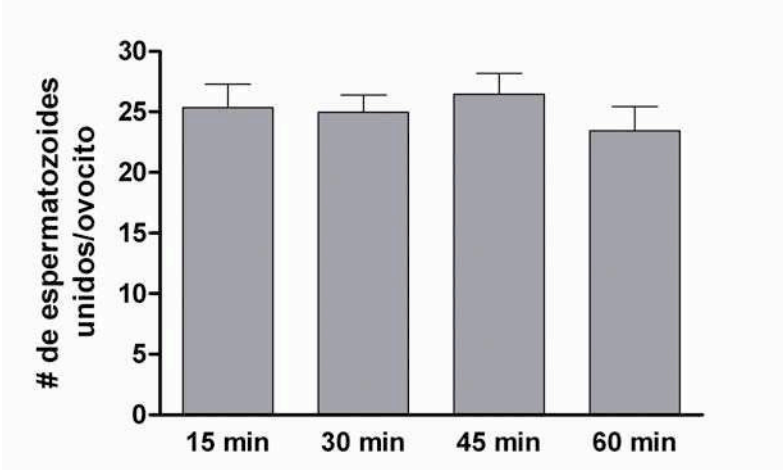


Figura 4.II.29: Ensayo de cinética de unión de espermatozoides al oolema. Los espermatozoides se incubaron en presencia de ovocitos libres de MP por un tiempo total de 15, 30, 45 o 60 minutos, pasado dicho tiempo se evaluó el número de espermatozoides unidos por ovocitos. Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos a MP (promedio ± EEP).

Como resultado de estas evaluaciones, no se encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos al oolema a los diferentes tiempos de incubación (15 min= 25,36 ± 1,94 (28 ovocitos); 30 min= 24,97 ± 1,42 (32 ovocitos); 45 min= 26,46 ± 1,71 (28 ovocitos); 60 min= 23,43 ± 2,00 (31 ovocitos) espermatozoides unidos/ZP; Kruskal-Wallis $p > 0,05$). La examinación de los ovocitos con espermatozoides unidos utilizando microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski (DIC) permitió verificar que todos los espermatozoides unidos al oolema se encontraban reaccionados, luego de 60 minutos de co-incubación de las gametas (datos no mostrados).

Para evaluar la participación de cadE en eventos de fusión del espermatozoide al ovocito, se realizaron ensayos en los que los espermatozoides capacitados se co-incubaron durante 60 minutos con ovocitos maduros libres de ZP. Pasado dicho tiempo se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados. Para ello, se emplearon los siguientes criterios:

1) Como criterio de fusión se consideró la presencia de al menos una cabeza descondensada asociada al flagelo espermático y la presencia de los cromosomas ovocitarios en migración. Las formas típicas observadas fueron las que se presentan en la **Figura 4.II.30:**

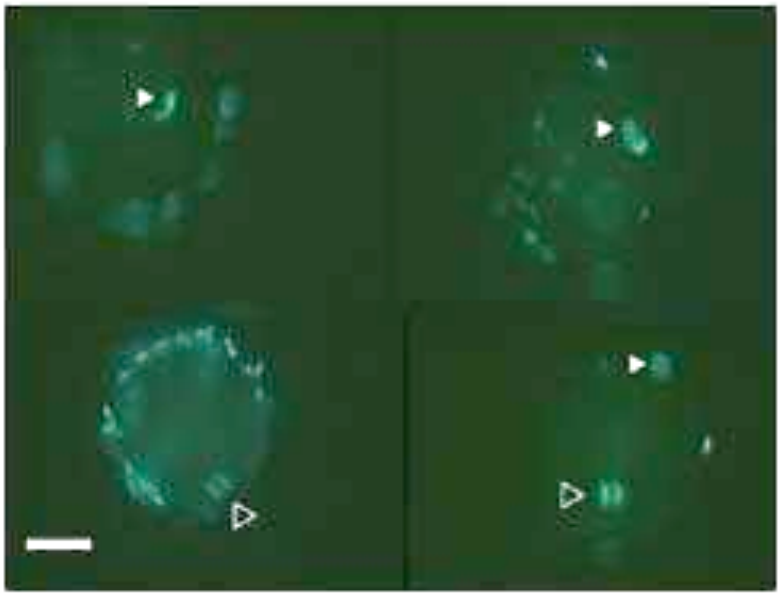


Figura 4.II.30: Evaluación de ovocitos fusionados mediante tinción con HOESCHT. En la imagen se muestran cuatro ovocitos fusionados, donde se pueden observar las cabezas espermáticas decondensadas (punta de flecha llena, ►) y los cromosomas migrando (punta de flecha vacía, ▷). Las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo PLAN 20x/0.5 (las barras indican 50 µm).

2) La presencia de los cromosomas en la placa metafásica fue un indicador de falta de descondensación. Las imágenes típicas de estos ensayos se presentan en la **Figura 4.II.31**:

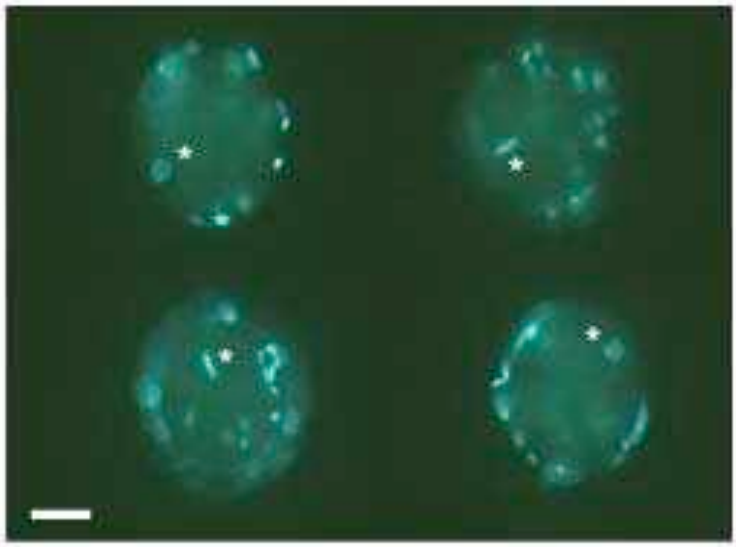


Figura 4.II.31: Evaluación de ovocitos fusionados mediante tinción con HOESCHT. La presencia de los cromosomas en la placa metafásica se tomó como indicador de la falta de descondensación espermática. En la imagen se muestran cuatro ovocitos en metafase II (*). Las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico de fluorescencia con objetivo PLAN 20x/0.5 (las barras indican 50 µm).

A partir de estos resultados, se eligió como tiempo de co-incubación de gametas 60 minutos de manera de poder evaluar al final del ensayo el número de espermatozoides unidos y el porcentaje de ovocitos penetrados.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos anti cadE sobre la unión y fusión al oolema, se empleó la estrategia que se esquematiza en la siguiente figura:

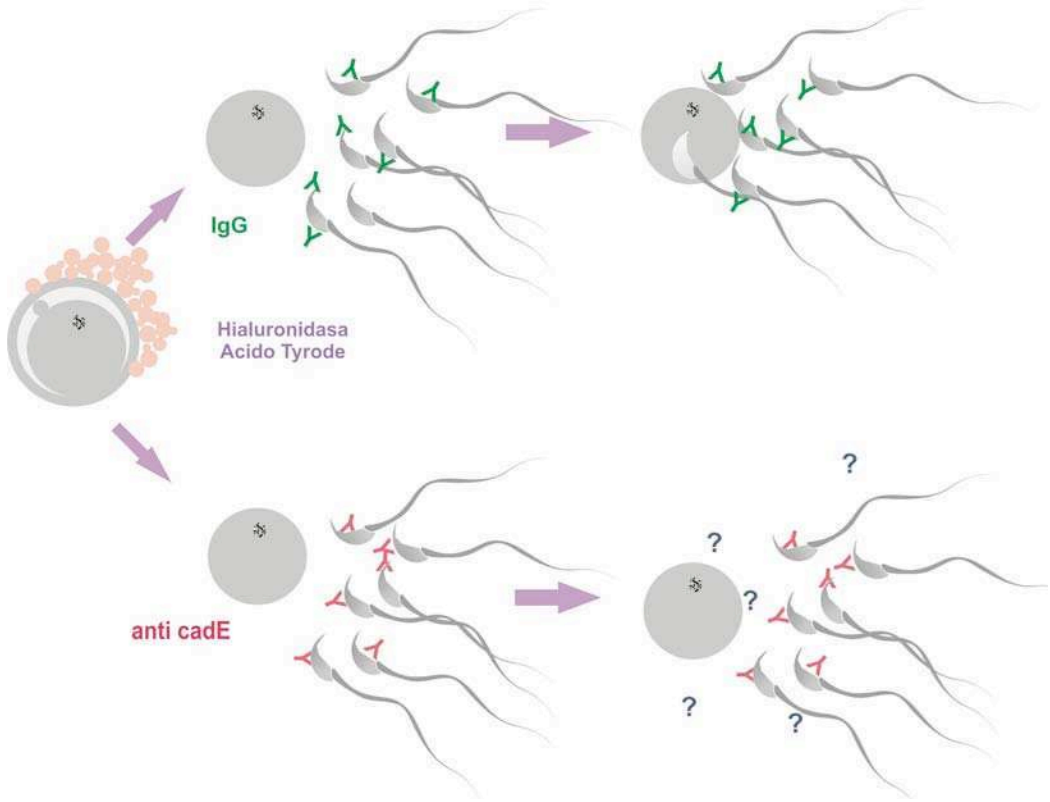


Figura 4.II.32: Representación esquemática del ensayo de interacción de espermatozoides con ovocitos sin ZP. Los espermatozoides capacitados por 2 horas totales y preincubados en presencia de anticuerpo anti cadE (H-108, 20 µg/ml) durante la última media hora de capacitación, se pusieron en contacto con ovocitos libres de ZP. Pasado el tiempo de co-incubación de las gametas (1 hora) se recuperaron los ovocitos y se evaluó el número de espermatozoides unidos por ovocito y el porcentaje de ovocitos penetrados (ver sección Materiales y Métodos).

Como resultado de estos ensayos, la presencia de anticuerpo anti cadE

(20 µg/ml, ECCD1) se asoció a un menor número de espermatozoides unidos a la membrana plasmática u oolema ($p<0,05$) en comparación con la condición de agregado de la IgG rata control (ECCD1= 11,5 ± 1,0 espermatozoides unidos al oolema, n= 60 ovocitos totales, vs. IgG control= 29,3 ± 0,6 espermatozoides unidos al oolema, n= 66 ovocitos totales) (promedio ± EEP; n= 5).

Contrastando con estas observaciones, la incubación con el anticuerpo anti cadE H-108 no condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides unidos al oolema (H-108= 11,5 ± 0,7 espermatozoides unidos al oolema, n= 130 ovocitos totales, vs. IgG conejo control= 10,8 ± 0,8 espermatozoides unidos al oolema, n= 118 ovocitos totales, $p>0,05$; n= 6 ensayos) (**Figura 4.II.33**). Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos a MP en cada condición, en relación al 100% de su control.

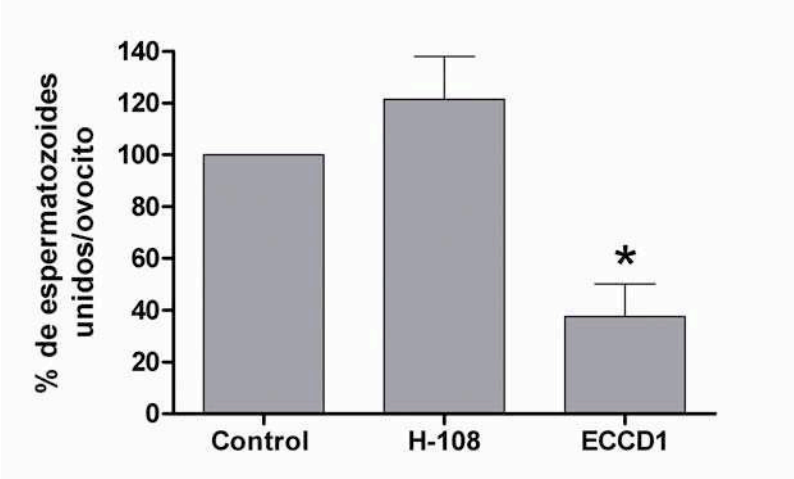


Figura 4.II.33: Participación de cadE en eventos de unión del espermatozoide al oolema. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia del anticuerpo monocloal anti cadE ECCD1 (20 µg/ml), produce una disminución significativa del número de espermatozoides unidos a la membrana plasmática del ovocito cuando se utiliza anticuerpo monoclonal anti cadE ECCD1 pero no en presencia de un anticuerpo policlonal anti cadE H-108 (20 µg/ml) (promedio ± EEP, relativo al control con IgG normal).

Cuando se evaluó la participación de cadE en el evento de fusión, se observó que la incubación de las gametas en presencia del anticuerpo ECCD1 inhibió de manera significativa ($p<0,05$) el número de ovocitos fusionados (con al menos una penetración) en la condición de tratamiento con el anticuerpo anti

cadE, se observó un 24,3% (n= 40 ovocitos totales) de ovocitos con al menos una cabeza decondensada (n= 4 ensayos), mientras que la co-incubación de las gametas en presencia de IgG normal de rata mostró un 93% (n= 52 ovocitos totales) de ovocitos fusionados. Por otra parte, no se observaron diferencias en el número de penetraciones por ovocito.

Contrastando con estos resultados, la preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas con el anticuerpo anti cadE H-108 no tuvo efecto inhibitorio sobre la capacidad de los espermatozoides de penetrar al ovocito (H-108= 59,8% (n= 75 ovocitos totales) vs. IgG conejo control 66,5% (64 ovocitos totales) de ovocitos fusionados, n= 4, p>0,05) (**Figura 4.II.34**). Los resultados de estas evaluaciones se presentan como el porcentaje de ovocitos penetrados en cada condición, en relación al 100% de su control.

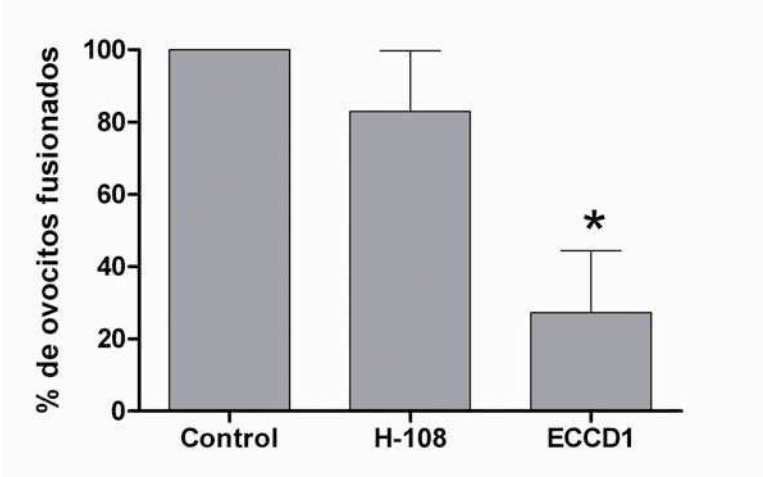


Figura 4.II.34: Ensayos de fusión de ovocitos libres de ZP en presencia de anticuerpos anti cadE. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpos anti cadE ECCD1, condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides fusionados, no así en presencia del anticuerpo policlonal H-108. Los resultados se presentan como el porcentaje de ovocitos penetrados en relación al control de IgG normal (promedio ± EEP).

El efecto inhibitorio del anticuerpo ECCD1 sobre la unión y fusión de los espermatozoides al ovocito fue dosis dependiente. El agregado de 200, 20 o 2 µg/ml del anticuerpo ECCD1 condujo a una disminución significativa del número de espermatozoides unidos a MP y del porcentaje de ovocitos penetrados, mientras que a una concentración de 0,2 µg/ml no se encontró efecto

bloqueante. Los resultados de evaluación del número de espermatozoides unidos a MP se presentan en la siguiente tabla:

	ECCD1	IgG normal	n	p
200	16,5 ± 1,4 (23)	20,6 ± 2,1 (42)	3	*
20	11,5 ± 1,0 (60)	29,3 ± 0,6 (66)	5	***
2	14,4 ± 1,1 (60)	30,4 ± 0,7 (67)	5	***
0,2	30,6 ± 1,3 (54)	27,7 ± 1,3 (43)	3	NS

Tabla 4.II.5: Ensayos de unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito de ratón en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1 en diferentes concentraciones. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1, condujo a una disminución significativa en el número de espermatozoides fusionados en todos los casos, no así en presencia de 0,2 µg/ml. Los resultados se presentan como el porcentaje de espermatozoides unidos por ovocito (promedio ± EEP). Entre paréntesis se indica la cantidad de ovocitos evaluados en un total de "n" ensayos.

Los resultados de evaluación del número de ovocitos fusionados se presentan en la tabla, se observa que la incubación en presencia de 200, 20 y 2 µg/ml de anticuerpo anti cadE produce una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fusionados, no así en presencia de 0,2 µg/ml del mismo anticuerpo.

	ECCD1	IgG normal	n	p
200	29,5 ± 9,2 (42)	82,2 ± 9,7 (27)	3	***
20	24,3 ± 14,6 (40)	93,0 ± 2,6 (52)	4	***
2	18, 0 ± 5,6 (45)	86,5 ± 7,1 (53)	4	***
0,2	72,0 ± 17,0 (54)	63,7 ± 7,0 (43)	3	NS

Tabla 4.II.6: Ensayos de fusión de ovocitos de ratón libres de ZP en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1 en diferentes concentraciones. La preincubación de los espermatozoides y posterior co-incubación de las gametas en presencia de anticuerpo anti cadE ECCD1, condujo a una disminución significativa en el número de ovocitos penetrados en todos los casos, no así en presencia de 0,2 µg/ml. Los resultados se presentan como el porcentaje de ovocitos penetrados (promedio ± EEP). Entre paréntesis se indica la cantidad e ovocitos evaluados en un total de "n" ensayos.

Teniendo en cuenta que la interacción mediada por cadE es

principalmente homofílica y que la membrana plasmática del ovocito fue inmunoreactiva para cadE, se realizaron ensayos de unión y fusión de espermatozoides a ovocitos previamente incubados con el anticuerpo ECCD1, de manera de bloquear la proteína ovocitaria.

Como resultado de estas evaluaciones, se encontró que el anticuerpo tuvo un efecto inhibitorio dramático sobre la fusión cuando fue agregado a una concentración 200 μg/ml (anti cadE ECCD1= 2,63% ovocitos fusionados (n= 38 ovocitos totales) versus medio control= 55,88% ovocitos fusionados (n= 36 ovocitos totales). El efecto bloqueante sobre la fusión no se observó cuando el anticuerpo fue agregado a una concentración de 20 μg/ml (ECCD1= 77,7% ovocitos fusionados; n= 80 ovocitos totales versus IgG rata control= 81,7% ovocitos fusionados; n= 55 ovocitos totales).

La capacidad del anticuerpo EECD1 (20 μg/ml) de inhibir los procesos de interacción de gametas no se debió a un efecto del mismo sobre la motilidad, viabilidad o estado del acrosoma de los espermatozoides; así, la incubación durante una hora no condujo a alteraciones en la motilidad (anti cadE ECCD1= 64% versus medio control= 66% o IgG rata control= 72% espermatozoides mótiles), ni a un aumento de la mortalidad (anti cadE ECCD1= 75% versus medio control = 73%, o IgG rata control= 75% espermatozoides vivos). De igual manera, se descartó que los resultados fueran consecuencia de un aumento en el número de espermatozoides reaccionados (anti cadE ECCD1= 73% versus medio control= 79%, o IgG rata control= 73% de espermatozoides intactos). Asimismo, el anticuerpo ECCD1 no afectó la viabilidad ovocitaria ya que la incubación en presencia de anticuerpos no produjo un aumento en el porcentaje de ovocitos necrosados por evaluación con la técnica de tinción con azul tripan (ovocitos con ZP= 100% vivos, n= 26; ovocitos sin ZP= 93% vivos, n= 14 ovocitos en cada condición).

Respecto a los controles sobre motilidad y estado del acrosoma de los espermatozoides incubados con el anticuerpo anti cadE H-108 se obtuvieron resultados similares, dado que la motilidad no se vio alterada (anti cadE H-108= 64% versus medio control= 66% o IgG conejo control= 69% espermatozoides mótiles), al igual que la exocitosis acrosomal luego de dos horas totales de

capacitación, la última media hora en presencia de anticuerpo o condición control con IgG normal (anti cadE H-108= 73% versus medio control o IgG conejo control= 75% de espermatozoides intactos) y el porcentaje de ovocitos vivos (anti cadE H-108= 100% versus medio control= 100% o IgG conejo control= 100% ovocitos vivos, n= 20 ovocitos en cada condición).

Tomando en conjunto, los resultados presentados describen la presencia de cadE en espermatozoides y ovocitos, su localización en regiones de interacción entre ambas células y sugieren la participación de la proteína de adhesión en eventos de interacción de las gametas que llevan a la fecundación.

En conjunto, los *resultados presentados* **en la Parte II**

Describen la expresión y la localización de los miembros del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina, en espermatozoides murinos mótiles no capacitados.

Caracterizan en forma exhaustiva la localización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados.

Muestran la expresión del transcripto de cadE en el testículo y epidídimo, inmunolocalizan la proteína de adhesión en cortes histológicos del caput, corpus y cauda epididimario, así como determinan las formas proteicas de cadE en extractos de proteínas epididimarias y testiculares.

Identifican la presencia de sitios inmunorreactivos para cadE en el ovocito y en células del cumulus oophorus.

Muestran el efecto inhibitorio de anticuerpos anti cadE sobre el proceso de la fecundación. Los estudios comprenden el ensayo de fecundación in vitro así como ensayos de interacción entre las gametas que forman parte del proceso de la fecundación. En conjunto, estos estudios sugieren la participación de cadE en la interacción del espermatozoide con la ZP y la membrana plasmática del ovocito durante la fecundación.

Discusión

El proceso de la fecundación involucra una serie de eventos moleculares de interacción entre las gametas que deben desarrollarse en una secuencia coordinada para alcanzar con éxito el inicio del desarrollo embrionario. En este proceso participan varias estructuras del espermatozoide y del ovocito e involucran contactos célula-célula y procesos de adhesión celular.

Las cadherinas conforman una vasta superfamilia de moléculas de adhesión que participan en interacciones celulares dependientes de la presencia de iones calcio. Los mecanismos moleculares que gobiernan las uniones homotípicas (mismo tipo celular) y heterotípicas (diferente tipo celular) en el contacto celular mediado por estas proteínas han sido estudiados extensivamente por numerosos grupos de investigación empleando diferentes estrategias (Cepek *et al*, 1994; Nakagawa & Takeichi, 1995; Angst *et al*, 2001; Ito *et al*, 2006; Perrais *et al*, 2007). Sin embargo, el estudio del rol de miembros de esta superfamilia de proteínas en la interacción de las gametas hasta recientemente no había sido abordado.

Dentro de esta vasta familia de glicoproteínas de membrana se encuentra la **cadherina epitelial** (**cadE**), miembro fundador de esta superfamilia e inicialmente identificado por su participación en la interacción célula-célula en células epiteliales. Estudios posteriores revelaron su participación en numerosos procesos, entre los que se destacan la adhesión celular y la transducción de señales, en procesos fisiológicos como la embriogénesis y la organización y mantenimiento de los tejidos, así como en procesos patológicos relacionados a la migración e invasión celular de la progresión tumoral y la metástasis.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso como hipótesis que **cadE está presente en los ovocitos y los espermatozoides en estructuras involucradas en el reconocimiento y adhesión entre las gametas y participa en eventos de la adhesión celular espermatozoide-ovocito que forman parte del proceso de la fecundación.**

En el presente trabajo se utilizaron estrategias celulares, bioquímicas y moleculares para evaluar la expresión y localización de cadE en tejidos reproductivos y en las gametas. Asimismo se realizaron estudios funcionales con

anticuerpos bloqueantes de la función adhesiva de cadE en células somáticas para evaluar su efecto sobre eventos de adhesión entre las gametas en el proceso de la fecundación. Los estudios se abordaron en dos especies: humano y murino.

A continuación se discuten los resultados alcanzados en cada una de las secciones.

Parte I: Estudios en el modelo humano

Evaluación de la presencia y formas proteicas de cadE en espermatozoides humanos. Evaluación de la expresión de cadE en testículo y epidídimo humano. Inmunolocalización de cadE en gametas humanas y evaluación de su participación en eventos de adhesión durante la fecundación. Detección de cadE en un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad

En una primera serie de estudios, se evaluó la presencia de la proteína de adhesión cadE y otros componentes del complejo adherente, particularmente β-catenina y actina, en espermatozoides humanos mótiles provenientes del eyaculado. Para estos estudios, se emplearon muestras de semen de donantes nomozoospérmicos. Con el fin de obtener una suspensión espermática libre de contaminación de otros tipos celulares, se llevó a cabo la selección de los espermatozoides mótiles mediante el empleo de la técnica de “swim-up”, de manera de poder realizar las evaluaciones sobre una población de espermatozoides con altos porcentajes de vitalidad y de motilidad (mayores a 80% en ambos casos), minimizando la presencia de células espermáticas inmótiles y de otros tipos, como células epiteliales, germinales y de la línea blanca (entre otros leucocitos). Se ha descripto la presencia de estos tipos celulares en el eyaculado humano, células que en algunos casos expresan cadE, y la capacidad de separarlos de los espermatozoides empleando ese método de selección (World Health Organization, 1999).

En ensayos de Western Immunoblotting realizados utilizando varios anticuerpos específicos anti cadE, se detectaron principalmente 4 formas proteicas de cadE de alto peso molecular en extractos proteicos de

espermatozoides humanos. Los anticuerpos seleccionados para estos estudios (monoclonales o policlonales) son dirigidos contra diversos dominios extracelulares e intracelulares de cadE y han sido ampliamente utilizados en la literatura relacionada a esta proteína. Además de la forma madura de la proteína de 120 KDa, detectada con todos los anticuerpos, se identificaron formas truncadas de tamaño molecular estimado en 105, 97 y 86 KDa.

Los estudios con los tres anticuerpos utilizados permitieron caracterizar parcialmente estas formas. Así, los estudios nos permiten sugerir que la forma proteica de 105 KDa estaría truncada en la región amino terminal y podría resultar de la proteolisis celular. Un análisis *in silico* hecho para la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de cadE reveló la presencia de numerosos motivos blanco de digestión por proteasas de tipo tripsina/quimotripsina (datos no mostrados), enzimas que podrían ser responsables de la generación de las formas truncadas; algunas de estas formas de procesamiento podrían perder la capacidad de ser reconocidas por el anticuerpo monoclonal HECD-1, cuyo epítope ha sido mapeado en un segmento localizado en el dominio EC2 de la proteína. Dado que el acrosoma del espermatozoide es una organela rica en proteasas, particularmente de tipo tripsina/quimotripsina, la liberación de dichas proteasas por exocitosis acrosomal prematura o muerte celular podría ser, al menos en parte, responsable de la generación de esta forma proteica truncada de cadE.

Por su parte, del mapeo con los anticuerpos se determinó que la forma proteica de 97 KDa no es reconocida por el anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo terminal, sugiriendo alteraciones de la proteína en esa región. Los resultados de los estudios de extracción de las proteínas del espermatozoide con la enzima PLC llevaron a desestimar la posibilidad de que esta forma de la proteína se encuentre asociada a la membrana por GPi. Asimismo, en trabajos anteriores se ha reportado una forma truncada para cadE de tamaño molecular entre 97 y 100 KDa en tejido de mama y de próstata; esta forma resultaría de la proteólisis del dominio citoplasmático de cadE por calpaína (Rios-Doria *et al*, 2003; Vallorosi *et al*, 2000). La presencia del sistema enzimático calpaína/calpastatina fue descrito con anterioridad en espermatozoides humanos (Rojas *et al*, 1999) de mono (Yudin *et al*, 2000) y de roedores (Hernandez-

Gonzalez *et al*, 2010) y podría ser responsable de la degradación de la forma completa de cadE a esta forma truncada; sin embargo, la capacidad de este sistema de proteasas de clivar la cadE espermática en la forma de 97 KDa aún no ha sido confirmada.

Respecto de la forma proteica de 86 KDa, su tamaño molecular aparente se corresponde con el determinado para el ectodomio de cadE. Esta forma de la proteína ha sido detectada en células somáticas, se encuentra truncada en el extremo carboxilo terminal y se ha demostrado que puede resultar del procesamiento de proteínas mediado por matrilisina (MAT, MMP-7, EC 3.4.24.23) o la metaloproteasa ADAM-10 (Maretzky *et al*, 2005; Noe *et al*, 2001; Rudolph-Owen *et al*, 1998), entre otras proteasas. La expresión de MAT fue descrita con anterioridad en el epidídimo de ratón (Wilson *et al*, 1995). Asimismo, se han reportado formas activas de metaloproteasas de la familia ADAM (ej: ADAM 16, 20, 21, 24-26, 30) en el tracto reproductor masculino (Primakoff & Myles, 2000) (Edwards *et al*, 2008). Sin embargo, la participación de estas enzimas en la liberación del ectodominio de cadE en el tracto reproductor masculino no ha sido confirmada. Dado que su estructura incluye mayormente el dominio extracelular (EC1-EC5) de la proteína que participa en las interacciones de tipo homofílicas y heterofílicas (Renaud-Young & Gallin, 2002), se ha propuesto que podría interactuar con la forma de cadE transmembrana (Noe *et al*, 2001; Wheelock *et al*, 1987). En concordancia con estos antecedentes, esta forma se encontró en los extractos espermáticos luego del tratamiento celular con NaCl, sugiriendo su asociación a otras proteínas espermáticas de membrana, muy probablemente la forma transmembrana de cadE. Asimismo, una forma proteica de 86 KDa fue detectada en el fluido de *cauda* epididimario y en la fracción soluble del plasma seminal, en concordancia con los resultados de otros estudios que muestran su presencia en otros fluidos biológicos, entre ellos orina y suero (Banks *et al*, 1995; Ito *et al*, 1999).

Las proteínas presentes en el espermatozoide eyaculado provienen de su síntesis durante la espermatogénesis y otras son adquiridas durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo y por secreciones de las glándulas anexas. Al respecto de cadE, ésta fue identificada en espermatozoides recuperados del testículo de la rata (Ziv *et al*, 2002). Conjuntamente, cadE podría ser adquirida

en el proceso de maduración epididimaria y/o por contacto de los espermatozoides con componentes del plasma seminal. Como se mencionara en la sección Introducción, varios son los trabajos que describen la presencia del ARNm de las cadherinas clásicas tanto en la gonada como en el epidídimo en diferentes modelos animales (Andersson *et al*, 1994; Mackay *et al*, 1999; Munro & Blaschuk, 996). Para profundizar estos estudios en el modelo humano, en una primera etapa se desarrollaron un conjunto de estrategias para evaluar la expresión del transcripto y proteína de cadE en muestras de tejido de testículo y epídidimo humanos obtenidos de piezas quirúrgicas. Inicialmente, se llevaron a cabo ensayos a partir de ARN total de testículo y del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario, empleando un protocolo de retrotranscripción seguido de una reacción de PCR estándar. Los ensayos fueron realizados sobre los tres segmentos epididimarios, *caput*, *corpus* y *cauda*, dado que estudios reportados en animales de experimentación y en humanos sugieren la expresión diferencial de ARNm en los segmentos del epidídimo (Yanaginachi, 1994; Hu *et al*, 2002; Johnston *et al*, 2005; Jelisky *et al*, 2007). Los resultados obtenidos revelaron la amplificación específica de un fragmento de ADN del tamaño molecular esperado en todas las muestras. Los estudios complementarios de cuantificación de los niveles de expresión en los tejidos analizados por PCR cuantitativa en tiempo real, revelaron niveles de 100 a 1.000 veces mayores de expresión en el epidídimo respecto de la gonada, mostrando además diferencias en los niveles de transcripto entre los segmentos epididimarios, con una mayor cantidad de ARNm cadE en el *caput* y *corpus* que el *cauda* epididimario. Estos hallazgos concuerdan con los reportados indicando que el *cauda* es el segmento epididimario con menor actividad transcripcional (Thimon *et al*, 2007). Resultados similares de expresión diferencial entre el testículo y el epidídimo y dentro de las diferentes secciones del epidídimo se han observado para algunos de los genes que conforman el camino de ubiquitinación y degradación por proteasomas, involucrados en la espermatogénesis y control de calidad de espermatozoides epididimarios (Tengowski *et al*, 2007). Se puede especular que los altos niveles de expresión del transcripto de cadE en el epidídimo podrían estar relacionados con altos niveles de proteína involucrada en la formación y mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria, como se ha demostrado en modelos de roedores (Levy & Robaire, 1999). Asimismo, estos altos niveles podrían relacionarse con su participación en el proceso de maduración

espermática que tiene lugar principalmente en el segmento proximal de este órgano y que asiste al espermatozoide en la adquisición de la capacidad fecundante. Desafortunadamente, no se contó con espermatozoides testiculares y epididimarios humanos para evaluar la localización de cadE, por lo que fue de gran interés abordar estos estudios en el modelo murino (ver más adelante).

Los estudios de caracterización de la secuencia codificante del transcripto de cadE clonado a partir del "screening" de la biblioteca de epidídimo generada en nuestro laboratorio revelaron una gran similitud (mayor del 95%) entre los clones evaluados y el transcripto caracterizado previamente secuenciado a partir de estudios en otros tipos celulares (Mansouri *et al*, 1988). Estos hallazgos son concordantes con la extensa literatura existente para la molécula de adhesión cadE a nivel molecular, el resultado de la evaluación de las características del transcripto obtenido de tejidos de individuos sanos y de pacientes con diversas patologías (Van Roy & Berx, 2008).

En concordancia con los estudios del ARNm, en los extractos de proteínas totales de epidídimo humano se identificó la presencia de la forma madura de cadE de 120 KDa y, en algunos casos, se detectó el precursor de 135-140 KDa. En conjunto, los estudios sugieren que cadE epididimaria es idéntica a la caracterizada en otras fuentes de tejidos. Los estudios de inmunolocalización de la proteína de adhesión en cortes histológicos del tejido epididimario revelaron una señal específica en el borde apical de las células principales y en el lumen, además de la señal en la región basolateral y en el citoplasma de estas células. Estos resultados concuerdan con un estudio previo que reportó la inmunodetección de cadE en el epidídimo humano por inmunohistoquímica (Andersson *et al*, 1994), aunque en dicho informe no se hacía referencia al segmento epididimario evaluado. La presencia de vesículas membranosas del plasma seminal y la identificación de la forma completa de cadE en estas vesículas, podría indicar su presencia en epididimosomas además de prostasomas. Los estudios complementarios desarrollados en el modelo murino permitieron abordar el análisis en vesículas epididimarias en más detalle dada la disponibilidad de material biológico (ver más adelante).

A partir de los espermatozoides provenientes del “swim-up” se realizaron, además, ensayos de inmunocitoquímica de fluorescencia con el fin de detectar y caracterizar la localización de la proteína de adhesión cadE en el espermatozoide. Los resultados de estos estudios revelaron la presencia de una señal específica para cadE en la región acrosomal en una alta proporción de espermatozoides mótiles recuperados del eyaculado, que denominamos "no capacitados"; en el resto de los espermatozoides se identificó mayoritariamente un patrón con una señal tenue en toda la cabeza, al que llamamos patrón “homogéneo, H”. En un alto porcentaje de las células se detectó una señal específica en el flagelo espermático; hasta el presente no se ha avanzado en el estudio del rol de cadE en esta región del espermatozoide.

Los resultados de la inmunolocalización de cadE en espermatozoides fueron obtenidos con células previamente fijadas utilizando el anticuerpo policlonal anti cadE H-108 dirigido contra el dominio extracelular cadherina 5 (EC5) y posteriormente fueron confirmados usando los anticuerpos monoclonales HECD-1 (que reconoce una secuencia del dominio EC2 de cadE humana) y DECMA-1 (que reconoce una secuencia entre los dominios EC4-EC5). Ambos anticuerpos han sido extensivamente usados en la literatura para la detección de cadE (Yang *et al*, 2009; Qin *et al*, 2009; Rock *et al*, 2008; Kracun *et al*, 2008). De manera similar a lo mencionado en lo referente a los perfiles de electroforesis analizados con los distintos anticuerpos, los porcentajes menores de espermatozoides inmunorreactivos para cadE observados con el anticuerpo HECD-1 respecto de los obtenidos con los otros anticuerpos podrían resultar de la pérdida del epítope (dominio EC2) debido a la digestión causada por proteasas durante el procesamiento para la fijación de la muestras, dado que este procesamiento involucra varias centrifugaciones y lavados.

Con el anticuerpo monoclonal HECD-1 también se obtuvo el mismo patrón de distribución para la proteína de adhesión en la cabeza de espermatozoides incubados con el anticuerpo antes de ser fijados. Estos resultados obtenidos sugieren la localización de cadE en la membrana plasmática del espermatozoide. Los resultados de los estudios con espermatozoides humanos que han sufrido la exocitosis acrosomal (ver más

adelante) se encuentran en línea con esta idea. En concordancia con estos hallazgos, cadE fue inmunodetectada en espermatozoides de toro previo a la fijación empleando el anticuerpo H-108 (Caballero *et al*, manuscrito en preparación) y los estudios de inmunomicroscopía electrónica de espermatozoides de ratón muestran una señal en la membrana plasmática que se apoya sobre el capuchón acrosomal del espermatozoide (este trabajo).

En conjunto, los resultados de los estudios de inmunolocalización de cadE concuerdan con estudios hechos por nuestro grupo en modelos animales de ratón (ver más adelante) y bovino (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). Sin embargo, contrastan con los reportados en estudios previos en los que se describió la presencia de una señal débil de cadE en la región post-acrosomal de espermatozoides humanos, si bien las imágenes no se muestran en el reporte publicado (Rufas *et al*, 2000). En una publicación más reciente, se describió la localización de la proteína en el segmento ecuatorial y región post-acrosomal de espermatozoides humanos y se reportó una señal débil en el acrosoma (Purohit *et al*, 2004). Las diferencias entre el presente estudio y los anteriores pueden ser atribuidas al protocolo y reactivos usados para inmunodetectar cadE (ej: fijador y anticuerpos usados, entre otros).

Los estudios de inmunodetección de β-catenina y actina mostraron una localización celular similar a la de cadE para ambas proteínas en los espermatozoides, así como revelaron formas proteicas del tamaño molecular esperado para ambas proteínas. La detección de estas proteínas en la localización identificada habla en favor de la presencia de un complejo adherente funcional, de manera similar a lo descrito en células somáticas en las que cadE media la adhesión celular (Lapyckyj *et al*, 2010).

Con el fin de continuar con la caracterización de la localización de cadE en espermatozoides humanos en diversos estadios funcionales que imitan el transporte de la gameta al sitio de la fecundación (capacitación) y la interacción con las ZP (exocitosis acrosomal), se desarrollaron protocolos para evaluar la localización de la proteína de adhesión en espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación y en los que han sufrido la EA. Durante la capacitación, los espermatozoides sufren numerosos cambios en sus

membranas tales como la remoción, alteración, relocalización y adquisición de proteínas (De Jonge, 2005). Además, se detecta la ocurrencia de una hiperpolarización de la membrana plasmática, así como un aumento en el pH celular y en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (Visconti *et al*, 2002; Darszon *et al*, 2005). Posteriormente, durante la EA tiene lugar la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa con la consecuente pérdida de vesículas híbridas, liberándose así el contenido acrosomal. De esta manera, el espermatozoide reaccionado expone proteínas de la membrana acrosomal interna y retiene, en algunos casos luego de la relocalización, proteínas de la membrana plasmática, muchas de las cuales participan en eventos posteriores de la fecundación (Yanagimachi, 1994).

Para llevar a cabo los estudios en espermatozoides capacitados y espermatozoides que han sufrido la exocitosis acrosomal, los espermatozoides provenientes del “swim-up” fueron incubados en condiciones capacitantes en un medio rico en albúmina (Marín-Briggiler *et al*, 2003) y una parte de la población espermática fue posteriormente incubada en presencia de un inductor farmacológico de la exocitosis acrosomal, como es el ionóforo de calcio A23187. Luego, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a ensayos de inmunocitoquímica de fluorescencia. Los espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación mostraron una disminución (alrededor del 15%) en el porcentaje de células teñidas para cadE; de manera concomitante con esa disminución se observó un aumento en el porcentaje de células con patrón "H". La disminución observada en el porcentaje de células inmunorreactivas para cadE en el acrosoma fue similar al aumento registrado en el porcentaje de espermatozoides clasificados como reaccionados en la población de espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación. Se sabe que, como parte del proceso de capacitación, se produce la pérdida de colesterol, con el consecuente aumento en la fluidez de las membranas; estos fenómenos podrían hacer más sensibles a los espermatozoides durante su procesamiento, resultando en el aumento de las tasas de exocitosis acrosomal prematura, con la consecuente pérdida de inmunorreactividad para cadE.

En espermatozoides incubados bajo condiciones que promueven la exocitosis del gránulo acrosomal, se observó una pérdida de la señal para la proteína de adhesión en la región acrosomal en un alto porcentaje de células. Estos resultados concuerdan con la localización en membrana plasmática para cadE, como lo sugieren los resultados de su inmunodetección en espermatozoides previo a la fijación. Durante la exocitosis del acrosoma, cadE se perdería en las vesículas híbridas liberadas cuando la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa se vesiculizan. En espermatozoides reaccionados además se observó una señal específica para cadE de baja intensidad en la cabeza entera del espermatozoide (patrón "H"), sugiriendo una localización para la proteína en la membrana acrosomal interna y en membrana plasmática del segmento ecuatorial y región post-acrosomal. En concordancia con estos hallazgos, los estudios realizados sobre espermatozoides de toro reaccionados revelaron una señal para cadE que se correspondería a la membrana acrosomal interna (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). La participación de la membrana acrosomal interna del espermatozoide en los eventos de penetración de la ZP e interacción con el oolema ha sido previamente descrita (Yu *et al*, 2006; Sutovsky *et al*, 1997). Además de la detección de la proteína IAM38 en la membrana acrosomal interna (Yu *et al*, 2006), se ha descrito la presencia de pro-acrosina (Howes *et al*, 2002) y de osteopontina (Erikson *et al*, 2007). Mientras las dos primeras son moléculas a las que se les ha atribuido un rol en la penetración de la ZP, la última estaría involucrada en la unión y fusión al oolema (Erikson *et al*, 2007).

A fin de determinar para cada célula la localización de cadE y el estado del acrosoma del espermatozoide de forma simultánea, se decidió utilizar la lectina aglutinina *Pisum sativum* (PSA-FITC), un marcador del estado del acrosoma ampliamente empleado en espermatozoides humanos. Los estudios de co-localización de cadE y PSA-FITC mostraron que los espermatozoides no capacitados y capacitados clasificados como intactos para PSA-FITC presentaban una señal intensa para cadE en el acrosoma de las células; contrastando, todos los espermatozoides provenientes de una población expuesta al ionóforo de calcio y que fueron clasificados como reaccionados por su patrón de tinción característico con PSA-FITC, no presentaron señal para cadE en el acrosoma en ningún caso, siendo el patrón de cadE correspondiente

a un espermatozoide reaccionado el de tinción tenue y homogénea sobre la cabeza entera del espermatozoide. Los resultados de estudios previos en el modelo bovino y los que se hicieron en este proyecto con los modelos humano y murino revelan la existencia de patrones de localización de cadE diferentes en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en las diferentes especies. Los comentarios al respecto se presentarán en la sección de los estudios del modelo murino (más adelante).

La presencia de cadE en regiones subcelulares del espermatozoide involucradas en eventos de adhesión durante la fecundación llevó al diseño e implementación de ensayos para evaluar su participación en la interacción espermatozoide-ovocito. Para ello se implementaron ensayos para evaluar la interacción con la ZP (ensayo de Hemizona) y con el oolema (ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP). Para el ensayo de interacción espermatozoide-ZP se emplearon dos anticuerpos: el anticuerpo monoclonal anti cadE SHE78-7 y el anticuerpo policlonal H-108. El primero reconoce la región amino-terminal de la proteína humana y ha sido empleado previamente como bloqueante de la adhesión célula-célula mediada por cadE en cultivos de células somáticas, aunque a concentraciones menores (Man *et al*, 2000; Green *et al*, 2003). Con respecto al segundo anticuerpo, estudios realizados durante el curso de este proyecto demostraron su capacidad de alterar la adhesión de las blastómeras murinas, resultados que describen por primera vez su efecto bloqueante de la adhesión celular.

Los resultados de estos estudios revelaron la capacidad de ambos anticuerpos de interferir en la interacción de los espermatozoides con la ZP. El efecto inhibitorio observado con los anticuerpos anti cadE sobre la interacción del espermatozoide con la ZP favorece la idea de la participación de esta proteína de adhesión en eventos tempranos de la fecundación. Teniendo en cuenta que principalmente se ha descrito la participación de cadE en interacciones de tipo homofílicas, esto es con otra molécula de cadE presente en la superficie de otra célula, se debería esperar la presencia de cadE en la estructura de la ZP. Respecto de la composición de la ZP, los estudios realizados en el modelo murino han analizado de manera exhaustiva a nivel bioquímico y funcional la presencia de 3 glicoproteínas (Wassarman *et al*, 2001).

Sin embargo, estudios recientes sugieren la presencia de otras proteínas adicionales en la ZP, que podrían participar en el reconocimiento entre el espermatozoide y el ovocito (Lefievre *et al*, 2004; Rodeheffer & Shur, 2004; Chiu *et al*, 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti cadE de inmunodetectar de manera específica componentes de la estructura de la ZP de ovocitos humanos. Los resultados de estos estudios revelaron la presencia de una señal específica para cadE en las ZP humanas. La señal podría atribuirse a componentes capaces de reconocer proteínas tipo cadE en la ZP hasta ahora no caracterizados. Alternativamente, la señal observada podría corresponder a la inmunodetección de moléculas de cadE presentes en las proyecciones citoplasmáticas de células del *cumulus oophorus*, como se observó en ovocitos bovinos (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad que cadE espermática interactúe con alguna proteína de la ZP por un mecanismo hasta ahora no descrito; al respecto, utilizando la estrategia de doble híbrido para evaluar proteínas del espermatozoide que interactúan con las proteínas de la ZP humana recientemente se presentaron evidencias indicando que una protocadherina, proteína miembro de la superfamilia de las cadherinas, interactúa con proteínas de la ZP (Naz & Dhandapani, 2010).

La disminución observada en la interacción espermatozoide-ZP en presencia de los anticuerpos anti cadE podría resultar de su capacidad de interferir con la formación de los dímeros en *cis* de cadE (Brieher *et al*, 1996), del "clustering" de moléculas de cadE en la membrana plasmática (Angres *et al*, 1996; Yap *et al*, 1997) y/o con la interacción homofílica (cadE-cadE) en la gameta opuesta (Shiraishi *et al*, 2005). De todas maneras, la inhibición de la interacción de las gametas por impedimento estérico no puede ser descartada; sin embargo, en este sentido, es importante destacar que el agregado de la misma cantidad de anticuerpo anti cadherina neural (cadN) no altera la capacidad de unión de los espermatozoides a la ZP, a pesar de que esta proteína fue inmunolocalizada en el capuchón acrosomal de las células intactas (Marín-Briggiler *et al*, 2010).

El ensayo de penetración de ovocitos de hámster libres de ZP fue usado para evaluar la participación de cadE en la interacción con el oolema. La

preincubación de los ovocitos con el anticuerpo anti cadE y su presencia durante la interacción de las gametas llevó a una disminución en el porcentaje de ovocitos penetrados, sugiriendo la participación de cadE en este paso de la fecundación. Los resultados sugerirían que la proteína cadE estaría involucrada en la adhesión entre moléculas presentes en ambas membranas, participaría en una interacción clásica de tipo homofílica. En relación a esta posibilidad, cadE, β-catenina y actina fueron inmunodetectados en extractos de proteínas totales de ovocitos de hámster sin ZP y cadE fue inmunolocalizada en la superficie de los ovocitos de esa especie. Asimismo, cadE fue inmunolocalizada en el oolema de ovocitos humanos (presente trabajo y Rufas *et al*, 2000) y en ovocitos ovulados de la especie murina (ver más adelante), así como en ovocitos de rata (Ziv *et al*, 2002) y ovocitos bovinos (Caballero *et al*, manuscrito en preparación).

La proteína cadE de los espermatozoides y/o los ovocitos podría también estar involucrada en eventos de adhesión con otras proteínas presentes en la otra gameta. Estudios previos mostraron la capacidad de cadE de interactuar con cadN (Volk *et al*, 1987); esta proteína de adhesión también se describió en ambas gametas (Rufas *et al*, 2000; Marín-Briggiler et al, 2010); en particular, los estudios realizados por nuestro grupo describieron detalladamente su presencia y localización en espermatozoides y ovocitos humanos en estructuras involucradas en la interacción entre las gametas. Además, las evidencias acumuladas indican que cadE puede interactuar con otras proteínas que no pertenecen a la familia de las cadherinas clásicas, como se ha demostrado la interacción entre cadE y cadherina-LI (Baumgartner *et al*, 2008), internalina (Mengaud *et al*, 1996), el receptor G1 de tipo lectina (Ito *et al*, 2006), así como las integrinas α2β1 (Whittard *et al*, 2002) y αEβ7 (Cepek *et al*, 1994). La expresión de varios miembros de la familia de integrinas fue descrita en ovocitos mamíferos (Evans, 2002). Recientemente, un trabajo describió la presencia de la integrina α6β7 en el espermatozoides de ratón (Barraud-Lange *et al*, 2007). La interacción entre cadE y las integrinas durante la fecundación permanece aún sin ser estudiada.

En **conclusión**, los estudios realizados en el modelo humano, confirmaron la expresión del ARNm de cadE en el testículo y en los tres segmentos del epidídimo; asimismo, los estudios mostraron la presencia y

localización de la proteína de adhesión en los tres segmentos del tejido epididimario. Como resultado del análisis bioquímico se identificaron varias formas proteicas de cadE en fluidos epididimario y en el espermatozoide humano. Se presentó un análisis detallado de la localización de cadE (y algunos componentes del complejo de adhesión) en los espermatozoides humanos incubados bajo diferentes condiciones que simulan los estados fisiológicos por los que atraviesa el espermatozoide en su paso por el tracto reproductor femenino y el proceso de fecundación. Finalmente, los ensayos con anticuerpos anti cadE revelaron su capacidad de inhibir la interacción de los espermatozoides con la ZP homóloga y con el oolema de los ovocitos de hámster, sugiriendo la participación de cadE en la fecundación.

Los resultados de los estudios sobre la presencia de cadE en el espermatozoide y las evidencias encontradas sobre su posible participación en la fecundación permiten considerar su potencial uso como marcador de funcionalidad espermática. Se sabe que la infertilidad es una condición que afecta hasta un 20% de las parejas en edad reproductiva, e implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida. Puede ser definida como la incapacidad de concretar un embarazo luego de un tiempo razonable (en general, un año) de mantener relaciones sexuales sin tomar medidas anticonceptivas (Balen & Jacobs, 1997).

Existen diversos factores, masculinos y femeninos, que contribuyen a la infertilidad de la pareja y que hacen que se deba recurrir a un tratamiento de reproducción asistida para lograr el embarazo. Las alteraciones en el hombre contribuyen hasta en un 50% de los casos de la infertilidad (Brugo Olmedo *et al*, 2002). Desde el surgimiento de las técnicas de reproducción asistida, y en particular las de alta complejidad como la fecundación *in vitro*, el desarrollo de ensayos sencillos, prácticos, económicos y con resultados confiables y de alto valor predictivo para evaluar la capacidad funcional de los espermatozoides ha representado uno de los grandes desafíos para los andrólogos, teniendo en cuenta las limitaciones que presenta la evaluación de rutina del semen como la herramienta más empleada para el estudio del semen. La identificación de proteínas espermáticas involucradas en el reconocimiento e interacción con el ovocito y la búsqueda de posibles alteraciones en las mismas en pacientes en

consulta y tratamiento por infertilidad ha sido de interés para numerosos profesionales del área.

Con el objetivo de evaluar si en espermatozoides de pacientes en tratamiento por infertilidad existen alteraciones en la expresión de cadE, se realizaron estudios de evaluación de la presencia y localización de la proteína de adhesión en espermatozoides recuperados del semen de un grupo de pacientes en tratamiento. Para ello, se utilizó el sobrante de muestras de semen de pacientes que concurrieron a la clínica IFER a realizar tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. Las evaluaciones se hicieron sobre un grupo de muestras de semen fresco de pacientes con parámetros seminales normales o con alguna alteración en la motilidad o morfología espermáticas.

De un total de 21 muestras de semen fresco de pacientes sujetas a evaluación, 10 presentaron parámetros seminales normales y 11 presentaron alteraciones en la motilidad y morfología espermáticas. En 3 de los 21 pacientes (14%) se detectaron porcentajes de espermatozoides inmunorreactivos para cadE menores a los determinados en los donantes. En uno de los casos se correspondió con la presencia de una morfología francamente anormal (4% formas normales; criterio estricto); al respecto, se considera que las alteraciones en la morfología son reflejo de alteraciones en la producción espermática y muy probablemente las alteraciones severas en la morfología tengan asociados cambios en marcadores moleculares como cadE. Respecto de los otros casos, debe destacarse el paciente PA21, que tiene infertilidad de muchos años con varias fallas previas en tratamientos anteriores. Estudios sobre un número mayor de pacientes permitirá evaluar si la determinación de la presencia de cadE contribuye en el diagnóstico de la infertilidad masculina, en particular, aporta a una posible subclasificación de las muestras de los pacientes en función de los porcentajes de células inmunorreactivas para cadE.

Dentro de los pacientes en tratamiento por infertilidad, resultó de gran interés evaluar un grupo de individuos cuyos parámetros seminales se encuentran dentro de los valores considerados normales pero que presentan dificultades para concebir, no habiendo signos de ninguna patología en su pareja. Estos pacientes forman parte de un grupo que presentan "Esterilidad Sin

Causa Aparente (ESCA); esta patología afecta al 10% de las parejas que concurren a los centros para el tratamiento de la infertilidad (Brugo Olmedo *et al*, 2002). Dada la baja incidencia de esta patología, se realizó un protocolo de almacenamiento de muestras de pacientes con ESCA empleando técnicas estandarizadas de criopreservación, para ser evaluadas en su totalidad al mismo tiempo; de igual manera se criopreservaron muestras de pacientes normales donde la causa de infertilidad estaba dada por el factor femenino y muestras de donantes de fertilidad comprobada para realizar un análisis comparativo.

Las evaluaciones realizadas sobre las muestras criopreservadas de los donantes revelaron una disminución del patrón de localización de cadE en la región acrosomal, indicando que el proceso de criopreservación induce cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que alteran la integridad y composición de membrana. Estas observaciones son consistentes con datos previos de la literatura, en donde se menciona que en modelos animales la criopreservación de los espermatozoides induce un estado de “pre-capacitación” (Cornier *et al*, 1997). En un ensayo preliminar se utilizaron muestras criopreservadas de donantes normales para evaluar el estado de capacitación mediante el uso de un inductor fisiológico de la exocitosis acrosomal, como es el fluido folicular humano (hFF, human folicular fluid, de sus siglas en inglés); los resultados mostraron que los espermatozoides criopreservados respondían al inductor a tiempos más cortos que los espermatozoides no criopreservados (datos no mostrados).

El análisis de 10 muestras de pacientes con ESCA permitió identificar un caso con porcentajes de espermatozoides inmunorreactivos para cadE en el capuchón acrosomal menores que los observados en los donantes normozoospérmicos evaluados con el mismo protocolo. En el grupo utilizado como control de los ESCAs y que estuvo conformado por pacientes con parámetros seminales dentro de los valores normales y en los que la infertilidad de la pareja fue atribuida a la mujer, se detectó un caso también con porcentajes menores de espermatozoides inmunorreactivos para cadE. Los resultados de los estudios de inmunocitoquímica y Western Immunoblotting llevan a considerar a la primera como técnica más sensible en la detección de alteraciones. El estudio de más pacientes de estas características permitirá determinar si cadE puede

ser un marcador diagnóstico de funcionalidad espermática; asimismo, la implementación de estudios objetivos, sensibles y cuantificables como la citometría de flujo se podrá utilizar para ahondar en el rol de cadE como marcador molecular en el estudio de la patología de la infertilidad masculina.

Parte II: Estudios en el modelo murino

Empleo del modelo murino en la evaluación de la presencia y localización de cadE en las gametas y su participación en la fecundación. Evaluación de su expresión en la gonada y en el epidídimo

Se utilizó el modelo murino para realizar un estudio exhaustivo de la expresión de cadE y otros componentes del complejo adherente en ambas gametas, su expresión en tejidos del tracto reproductor del macho y su rol en la fecundación. Los estudios en este modelo animal nos permitieron, además de implementar estrategias similares a las usadas en la evaluación realizada en el modelo humano, acceder a la evaluación de espermatozoides recuperados de diferentes regiones del tracto reproductor, analizar los componentes del fluido epididimario y desarrollar ensayos de fecundación e interacción homóloga para evaluar la fusión de gametas sin las limitaciones éticas que presenta el modelo humano. Los resultados obtenidos se discuten en las siguientes secciones.

Para evaluar la presencia del ARNm codificante de cadE en tejidos del tracto reproductor masculino de ratones adultos, se realizaron protocolos de extracción del ARN total de tejido testicular y epididimario de animales CF1 adultos, que fue usado en ensayos de RT-PCR. Como resultado de estas evaluaciones, se detectó un único fragmento del tamaño esperado en ambos tejidos, confirmando la presencia de ARNm de cadE en tejido testicular y epididimario. Estudios complementarios de RT-PCR en tiempo real permitieron cuantificar el transcripto en ambos tejidos, resultados que mostraron una mayor abundancia del ARNm de cadE en el epidídimo, en concordancia con los resultados obtenidos en el modelo humano. La presencia de las cadherinas en tejido reproductor masculino y femenino murino en estado embrionario fue descrita en un estudio previo (Mackay *et al*, 1999). Asimismo, otro trabajo ha reportado la presencia del ARNm de cadE en el testículo de animales de diferentes edades, si bien en ese estudio se reportaron niveles indetectables en el animal adulto en las condiciones ensayadas (Munro & Blaschuk, 1996). El empleo del sistema de detección de los transcriptos de alta sensibilidad con PCR en tiempo real puede explicar la diferencias entre el último estudio y la presente investigación.

Una vez confirmada la presencia de ARNm de cadE en este modelo, se evaluó la presencia de la proteína en ambos tejidos en ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida seguido de “Western Immunoblotting”. Las formas proteicas de cadE encontradas en este análisis concuerdan con las formas reportadas para la molécula de adhesión en células somáticas (Mansouri *et al*, 1988) y con los resultados presentados en el modelo humano. Las señales obtenidas en los perfiles sugieren además una mayor expresión de la proteína en el epidídimo, en concordancia con los estudios de expresión del ARNm. Los estudios de inmunohistoquímica permitieron localizar cadE principalmente en la membrana de las células epiteliales del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimarios, de manera similar a lo observado en el modelo humano (este estudio) y bovino (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). Estos hallazgos concuerdan con resultados previos de la literatura para el transcripto de cadE y/o la proteína en la rata (Cyr *et al*, 1992). La expresión de cadE en roedores ha sido asociada a la formación y mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria (Cyr *et al*, 1992; Levi & Robaire, 1999; Cyr *et al*, 1993; Johnston *et al*, 2005). Se ha descrito que la expresión del ARNm testicular de cadN en el ratón y del transcripto epididimario de cadE en la rata se encontraría bajo el control androgénico (Cyr *et al*, 1993; McCalman *et al*, 1997). Estudios futuros utilizando animales de diferentes edades, así como utilizando estrategias de castración y hemicastración permitirán determinar su efecto sobre la regulación del ARNm y/o proteína de cadE en ambos tejidos en el modelo murino.

Los ensayos de "Western immunoblotting" realizados sobre extractos proteicos de espermatozoides recuperados de *cauda* epididimario revelaron la presencia de una forma de tamaño molecular esperado para la proteína completa (120 KDa) previamente descrita en células somáticas (Mansouri *et al*, 1988) e identificada en espermatozoides humanos (Purohit *et al*, 2004; Rufas *et al*, 2000; y en el presente trabajo). Asimismo, se detectó la presencia de formas del tamaño molecular esperado para β-catenina y actina.

Durante su paso por el epidídimo, la gameta masculina adquiere motilidad progresiva y capacidad fecundante durante la “maduración”, proceso en el que los espermatozoides sufren principalmente cambios a nivel de sus membranas (Yanagimachi, 1994). El empleo del anticuerpo anti cadE H-108 en

ensayos de inmunocitoquímica sobre espermatozoides de ratón adulto recuperados de las secciones del *caput*, *corpus* y *cauda* epididimario, revelaron la presencia de tres patrones de localización para la proteína, siendo el mayoritario la tinción en acrosoma y región post-acrosomal (A+PA) para todos los segmentos del epidídimo. Los estudios de inmuno-microscopía electrónica sugieren su localización en la membrana plasmática del espermatozoide. La especificidad del anticuerpo H-108 fue verificada con el reemplazo del primer anticuerpo por IgG de conejo. A estos resultados luego se sumaron los correspondientes al uso del anticuerpo monoclonal DECMA-1 dirigido contra los dominios EC4 y EC5, con el que se obtuvieron patrones similares a los observados con el H-108 en espermatozoides de *cauda* epididimario. En los espermatozoides del *cauda* epididimario, se identificó además la presencia de una señal específica para β-catenina y para actina, resultados que sugiere la presencia del complejo adherente funcional como en otros sistemas en los que cadE tiene un rol en la adhesión intercelular (Lapyckyj *et al*, 2010).

La señal para cadE detectada en los espermatozoides recuperados del epidídimo podría provenir de la proteína expresada en el testículo durante la espermatogénesis. Sin embargo, los ensayos de inmunocitoquímica realizados sobre espermatozoides testiculares mostraron la presencia de una señal tenue para la proteína de adhesión localizada en la cabeza entera de la gameta; estos resultados están de acuerdo con estudios reportados en el modelo de rata (Ziv *et al*, 2002). Las diferencias encontradas entre la señal de cadE en los espermatozoides testiculares y epididimarios sugieren el desenmascaramiento o, alternativamente, la adquisición de cadE durante el transporte y la maduración en el epidídimo. En concordancia con estos hallazgos, estudios realizados para cadE en el modelo bovino muestran, de manera similar a lo determinado para el modelo murino, una mayor señal para la proteína de adhesión en los espermatozoides del *cauda* respecto de los testiculares (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). En trabajos anteriores, se ha descrito la presencia de proteínas en la superficie espermática de células recuperadas en el epidídimo que están ausentes o presentan diferente distribución en los espermatozoides testiculares; entre ellos se puede mencionar a la proteína HongrES1, un miembro de la familia de inhibidores de serin proteinasa (SERPIN, de sus siglas en inglés serine proteinase inhibitor), que se expresa exclusivamente en el

cauda epididimario de la rata, es regulada por andrógenos, secretada al lumen del epidídimo y se incorporaría a la cabeza del espermatozoide, actuando como un factor decapacitante (Zhou *et al*, 2008). Asimismo, la proteína arilsulfatasa A (AS-A) se encuentra ausente en espermatozoides testiculares, mientras que en espermatozoides epididimarios se localiza en región acrosomal, sería adquirida durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo y participaría de la interacción del espermatozoide con la estructura de la ZP (Weerachatyanukul *et al*, 2003). Finalmente, otro ejemplo de una proteína, sintetizada de manera dependiente de andrógenos por el epitelio epididimario e incorporada a la superficie espermática durante el tránsito por el epidídimo, es la proteína DE (Kohane *et al*, 1980).

Numerosas evidencias apoyan el rol del epidídimo en la adquisición de la capacidad del espermatozoide de interactuar con el ovocito (Lessard *et al*, 2000), a través de la incorporación de proteínas durante el tránsito de los espermatozoides por el mismo. Uno de los mecanismos propuestos por los cuales se incorporarían proteínas a la superficie espermática es mediante el contacto con vesículas secretorias del epitelio del epidídimo. A estas vesículas secretorias, llamadas epididimosomas, se les ha atribuido un rol relevante en la transferencia de factores de maduración sintetizados por el epitelio epididimario (Sullivan *et al*, 2007).

En el presente trabajo se verificó la presencia de dichas vesículas en el fluido del *cauda* epididimario de ratón adulto en estudios de inmuno-microscopía electrónica de transmisión (IMET). Asimismo, el análisis de los perfiles proteicos de los epididimosomas permitió identificar la forma completa de 120 KDa, así como fragmentos de procesamiento de la proteína (datos no mostrados). De manera similar a lo descrito para las formas de cadE en espermatozoides eyaculados en humanos, las proteínas truncadas serían resultado de la degradación mediada por proteasas de tipo tripsina y metaloproteinasas presentes en el tracto.

Muchas son las proteínas reportadas en estas vesículas; entre ellas se ha reportado la presencia de proteínas que conforman el complejo de adhesión como actina (Thimon *et al*, 2008), siendo éste el primer reporte que identifica la

presencia de un miembro de las cadherinas clásicas en vesículas de plasma del *cauda* epididimario murino. La incorporación de proteínas epididimarias a la superficie espermática, a través del contacto con las vesículas epididimarias, ya ha sido reportada en otros modelos animales incluido el ratón (Frenette & Sullivan, 2001; Griffiths *et al*, 2008). Estudios adicionales permitirán determinar la participación de cadE en la transferencia de proteínas desde los epididimosomas a los espermatozoides en el proceso de maduración.

Una vez en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides sufren el proceso de capacitación lo que les permitirá, responder a estímulos fisiológicos que llevan a la EA en el sitio de la fecundación. Una de las propiedades adquiridas durante la capacitación es la capacidad de reconocer y unirse a la ZP. Durante la capacitación espermática, las células sufren cambios como la fosforilación de proteínas (Naz *et al*, 2004), redistribución de fosfolípidos y remoción o perdida de colesterol de la membrana plasmática (Lin *et al*, 1996), exposición de proteínas de superficie espermática (Walsh *et al*, 2008; Barraud-Lange *et al*, 2007), exposición y polimerización de actina (Liu *et al*, 2005; Brener *et al*, 2003), así como también redistribución de las proteínas en los dominios de membrana (Busso *et al*, 2007). Ya en el sitio de la fecundación, la interacción del espermatozoide capacitado con la ZP resulta en la exocitosis de los componentes acrosomales, exponiendo proteínas de la membrana acrosomal interna y permitiendo al espermatozoide adquirir capacidad fusogénica. En algunos casos, se ha descrito la redistribución (Rochwerger *et al*, 1992; Herrero *et al*, 2005) y procesamiento (Pastén-Hidalgo *et al*, 2008) de proteínas espermáticas durante la capacitación y luego de la exocitosis acrosomal. Con el objetivo de evaluar si cadE sufre modificaciones durante dichos procesos se realizaron estudios de localización de cadE en espermatozoides incubados en condiciones que promueven la capacitación y la exocitosis acrosomal. Empleando ensayos de colocalización con la lectina de PSA-FITC sobre poblaciones de espermatozoides capacitados, no se identificaron cambios en la localización de cadE; resultados similares se obtuvieron en el modelo humano, en el que los espermatozoides capacitados mantienen su localización en acrosoma. Contrastando estas observaciones, en espermatozoides de toro se observaron modificaciones en los patrones de localización de cadE entre espermatozoides capacitados y no capacitados, hallazgos que se han

relacionado a la formación y liberación del reservorio oviductal (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). Tanto en el modelo humano como en el murino, la existencia del reservorio oviductal no ha podido ser confirmada.

Los ensayos de colocalización de cadE y PSA-FITC también fueron realizados sobre poblaciones de espermatozoides capacitados incubados con ionóforo de calcio A23187. Los espermatozoides clasificados como reaccionados en todos los casos presentaron ausencia de señal para cadE en la región acrosomal, muy probablemente por pérdida de la misma en las vesículas híbridas (membrana plasmática y membrana acrosomal externa) generadas durante el proceso de la exocitosis. En un alto porcentaje de los espermatozoides reaccionados se detectó una señal específica para esta proteína en la región post-acrosomal. Esta localización contrasta con la observada por nuestro grupo en otras especies; en el espermatozoide humano se observó una tinción tenue y homogénea sobre la estructura entera de la cabeza y en el espermatozoide de toro una señal de alta intensidad en la región correspondiente a la membrana acrosomal interna (Caballero *et al*, manuscrito en preparación). En relación a estas observaciones, se han identificado sitios de unión a las proteínas de la ZP de ratón ZP3 y ZP2 en la región postacrosomal del espermatozoide murino (Kerr *et al*, 2002); asimismo, hay estudios que sugieren un rol de la región post-acrosomal en el proceso de unión/fusión del espermatozoide al oolema ovocitario (Pastén-Hidalgo *et al*, 2008; Ying *et al*, 2010), y proteínas como fosfolipasa-Cζ (PLCζ) se localizan en la región post-acrosomal del espermatozoide y estarían involucradas en la activación ovocitaria (Fujimoto *et al*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, en células somáticas el dominio citoplasmático de cadE interactúa con β-catenina y otras proteínas que lo ponen en contacto con el citoesqueleto de actina; esta interacción es esencial para que cadE establezca una unión adherente estable. Con el objetivo de evaluar cualitativamente la presencia y localización de las proteínas que componen el complejo de adhesión y si estas acompañaban la localización de cadE, se realizaron estudios de inmunolocalización de β-catenina y actina sobre espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y en condiciones que promueven la exocitosis acrosomal. En ambos casos se evaluó en forma

conjunta el estado del acrosoma de los espermatozoides utilizando la lectina PSA-FITC. Los resultados muestran que el anticuerpo anti β-catenina localiza a la proteína en la región acrosomal de espermatozoides capacitados, mientras que la mayoría de los espermatozoides que han sufrido la exocitosis acrosomal no muestran localización para la proteína en la cabeza, un bajo porcentaje de las células mantienen la tinción en el acrosoma. Estos resultados muestran que la proteína β-catenina componente del complejo de adhesión se encuentra presente en espermatozoides capacitados acompañando la localización de cadE. A nuestro entender este es el primer trabajo que describe la localización de β-catenina en espermatozoides murinos incubados en diferentes condiciones fisiológicas. Existen trabajos en los que se menciona la presencia de β-catenina en citoplasma y núcleo de espermatogonias de testículo de ratón de 6 y 21 días de edad, respectivamente (Golestaneh *et al*, 2009) y solo un trabajo menciona la localización de β-catenina en espermátides elongadas y la expresión del ARNm de la proteína en células germinales, sin hacer referencia al tipo celular específico (Li *et al*, 2005).

Se ha descrito que luego de la capacitación se produce un aumento en la polimerización de actina en la cabeza del espermatozoide (Brener *et al*, 2003). Esta exposición de actina, estaría relacionada con la capacidad de los espermatozoides de unirse a la ZP, más aún actina-F ha sido propuesta como un marcador de capacitación espermática (Liu *et al*, 2005). Dado que cadE permanece en el acrosoma de los espermatozoides capacitados, al igual que β-catenina, se evaluó la presencia de actina-F sobre los espermatozoides recuperados de *cauda* epididimario, o bien luego de ser incubados en condiciones capacitantes o en condiciones que promueven la exocitosis acrosomal. En espermatozoides no capacitados, los resultados de la tinción con la faloidina revelaron una tinción tenue y homogénea sobre la cabeza del espermatozoide y una tinción intensa en la región de la pieza media de la cola, resultados que concuerdan con los ya reportados en trabajos anteriores para la especie (Brener *et al*, 2003). En espermatozoides capacitados se observó la presencia de actina-F en la región del capuchón acrosomal y en los espermatozoides reaccionados esa señal no fue detectada. Los resultados muestran que actina-F, acompaña la localización de cadE en espermatozoides

murinos en condiciones capacitantes en las que tendría un rol en los estadios tempranos de la interacción con los componentes del complejo ovocito *cumulus*.

En conjunto, demostramos la expresión y localización de cadherina epitelial en espermatozoides recuperados del tracto reproductor masculino, indicando que la proteína tendría un origen testicular, que durante la maduración epididimaria la proteína se redistribuye y/o incorpora a la superficie espermática en la región del acrosoma y región post-acrosomal. Dicha localización permanece luego de la capacitación espermática, perdiéndose la proteína ubicada en el acrosoma una vez ocurrida la exocitosis acrosomal. Dado que las proteínas del complejo de adhesión están presentes y se expresan en espermatozoides murinos, se estarían dando las condiciones para que cadE participe en uniones adherentes funcionales.

Una vez caracterizada la presencia y localización de cadE, β-catenina y actina en los espermatozoides en diferentes estadios funcionales, y habiendo localizado las proteínas en regiones subcelulares que participan en fenómenos de interacción con el ovocito, se hicieron estudios para evaluar la localización en la gameta femenina. Los ensayos realizados sobre ovocitos maduros libres de células del *cumulus oophorus* revelaron una señal específica para cadE y β-catenina en la membrana plasmática y citoplasma del ovocito, así como también se reveló la localización para actina-F en el cortex celular. Estos resultados concuerdan con algunas observaciones previas reportadas por otros grupos (Connors *et al*, 1998; Kumakiri *et al*, 2003). En coincidencia con estos resultados, cadE y los miembros del complejo adherente (β-catenina y actina) han sido detectados en ovocitos de hámster (Wang & Roy, 2010; y en el presente trabajo), humanos (Rufas *et al*, 2000; y el presente trabajo) y de rata (Ziv *et al*, 2002). Estudios complementarios de Western Immunoblotting revelaron la presencia de una forma molecular correspondiente a la proteína completa de 120 KDa en ovocitos con y sin ZP, y una forma de 135 KDa, que se corresponde con el precursor de la proteína en ambos extractos proteicos, resultados que concuerdan con un reporte previo en esta especie (Sefton *et al*, 1992). Asimismo, se observaron formas proteicas de peso molecular esperado para β-catenina y actina. A diferencia de otros modelos (humano, presente trabajo; bovino, tesis doctoral Julieta Caballero), la señal para cadE en la ZP presentó

baja intensidad; las diferencias entre las especies pueden estar dadas por los protocolos de obtención de las gametas en las diferentes especies; mientras en humanos y bovinos se recuperan ovocitos punzados de ovario, y se maduran *in vitro*, los ovocitos recuperados de la hembra de ratón son ovulados y no requieren de la maduración *in vitro*. En particular en el modelo bovino se puede observar la trayectoria de las proyecciones de las células del *cumulus* que atraviesan la estructura de la ZP, estos ovocitos se liberan de dichas células en forma mecánica, mientras que en el ratón al ocurrir la maduración *in vivo*, la retracción de las proyecciones ocurre de manera natural cuando se da la expansión del *cumulus* previo al pico hormonal de FSH que desencadena la ovulación; la remoción mecánica de las células podría estar dejando restos que son detectados mediante la inmunofluorescencia.

Por otro lado, ensayos de inmunofluorescencia y Western Immunoblotting mostraron la presencia y expresión de cadE y las proteínas del complejo de adhesión en células del *cumulus* y extractos proteicos de las mismas. De acuerdo con estos resultados, Machell *et al* (2000) mostraron la expresión de cadE en células foliculares de rata, en donde la expresión de la proteína en estas células estaría sujeta al estadio folicular. Recientemente, en el modelo humano se demostró la expresión de cadE y β-catenina en las células del *cumulus* (Wang *et al*, 2009).

La presencia de cadE, β-catenina y actina en ovocitos maduros y en las células del *cumulus*, llevaron a evaluar el posible rol de cadE en eventos de interacción de gametas. En ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de los anticuerpos anti cadE (policlonal H-108 y monoclonal ECCD1) se observó una inhibición en el porcentaje de ovocitos fecundados tanto en presencia o en ausencia de las células del *cumulus*; resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo en el modelo bovino (Caballero *et al*, resultados no publicados). Estas observaciones sugieren la participación de cadE en el proceso de fecundación. La capacidad de ambos anticuerpos anti cadE de inhibir la fecundación de los ovocitos libres de células del *cumulus* sugiere que el bloqueo, al menos en parte, sería por inhibición de la proteína en estructuras del ovocito además de la posible interacción mediada por la proteína de adhesión entre el espermatozoide y las células del *cumulus*.

Con el objetivo de dilucidar en cuál o cuáles de los eventos de la interacción espermatozoide-ovocito cadE tendría participación, se desarrollaron ensayos de interacción con la ZP y de unión y fusión a la membrana plasmática del ovocito empleando los anticuerpos monoclonal y policlonal anti cadE usados en los ensayos de fecundación. Los ensayos de interacción espermatozoide-ZP confirmaron el efecto inhibitorio de los anticuerpos en la unión de los espermatozoides a la estructura que rodea el ovocito. En los ensayos de interacción con el oolema, el anticuerpo anti-cadE ECCD1 inhibió de manera significativa los eventos de unión y fusión al oolema, sugiriendo la participación de cadE presente en el espermatozoide reaccionado con la proteína del oolema. Contrastando con estos resultados, el anticuerpo H-108 fue incapaz de inhibir dicha interacción. Las diferencias observadas con uno y otro anticuerpo podrían deberse a diferentes motivos. Mientras el anticuerpo ECCD1 tiene su epítope en el extremo amino terminal de la proteína (aminoácidos 13-20 del dominio extracelular EC1), el anticuerpo H-108 reconoce la región correspondiente al dominio extracelular pre-transmembrana (aminoácidos 600-707 del dominio extracelular EC5), podría entonces especularse posibles diferencias en la accesibilidad al epítope por parte del anticuerpo H-108, que justificaría su falta de efecto; alternativamente podría proponerse que el anticuerpo ECCD1 inhibiría de forma temprana el reconocimiento entre las cadE impidiendo la formación de la unión homofílica, llevando a una disminución en el porcentaje de espermatozoides unidos a membrana plasmática de forma efectiva.

Como se mencionó anteriormente (ver discusión Parte I) además de las interacciones homofílicas, cadE puede participar en uniones de tipo heterofílicas, en particular con integrinas, las cuales se encuentran presentes en el oolema de ovocitos provenientes de diferentes especies (Tarone *et al*, 1993; Pate *et al*, 2007; Fenichel *et al*, 1998; Sengoku *et al*, 2004). Por otro lado, cadE podría participar en los mecanismos de acercamiento de las membranas o colaborando con otras proteínas, como se ha demostrado con las tetraspaninas en el ovocito de ratón (Ziyyat *et al*, 2006). Uno de los miembros de las tetraspaninas, CD9 tiene un rol crítico en la adhesión/fusión de las gametas en los modelos murino y humano (Kaji *et al*, 2000; Le Naour *et al*, 2000; Miyado *et al*, 2000; Ziyyat *et al*, 2006). Se describió que vesículas secretadas de la superficie ovocitaria conteniendo CD9 son transferidas a la superficie del espermatozoide una vez

que este alcanza el espacio perivitelino (Miyado *et al*, 2008), resultados similares habían sido reportados previamente (Barraud-Lange *et al*, 2007b). Más recientemente se describió que, en células somáticas, la expresión de CD9 y CD82 inducen el empaquetamiento y liberación de β-catenina en vesículas denominadas exosomas, como un mecanismo para modular la señalización vía Wnt mediada por β-catenina; en el mismo trabajo se demostró la interacción física entre cadE y CD82 (Chairoungdua *et al*, 2010). La asociación de cadE a β-catenina y/o CD9 en el ovocito y/o espermatozoide aún no ha sido explorada.

Al igual que para el modelo humano, una inhibición por impedimento estérico no puede descartarse. Estudios futuros utilizando péptidos bloqueantes o modelos experimentales de eliminación específica del transcripto y proteína de cadE por silenciamiento (protocolos de ARN de interferencia y modelos "knock out" condicionales de cadE en ovocitos) permitirán confirmar los resultados obtenidos con los anticuerpos y ahondar en los mecanismos de señalización en los que podría participar cadE y que aún no han sido explorados.

La adhesión celular mediada por cadE es un evento que permite la reorganización de los tejidos en condiciones normales y patológicas. Luego de la formación del contacto intercelular por interacción entre los dominios extracelulares de cadE, el dominio citoplasmático se une a β-catenina y actina que anclan a cadE al citoesqueleto de actina y fortalecen la interacción celular. Luego de establecida la unión celular, los cambios en las propiedades adhesivas de cadE son atribuidos a modificaciones post-transcripcionales en las proteínas del complejo adherente. Dentro de estas modificaciones, se ha reportado la fosforilación en residuos Ser-Thr y Tyr mediada por Src y casein kinasas (Behrens *et al*, 1993; Dupre-Crochet *et al*, 2007; Lickert *et al*, 2000; Matsuyoshi *et al*, 2008). Existen evidencias de la expresión de miembros de caseína y SRC kinasas (Mitchell *et al*, 2008; Ruzzene *et al*, 1992) en las gametas masculinas. Alternativamente, un mecanismo regulatorio podría estar mediado por la liberación de cadE - β-catenina a través de vesículas desde la superficie del ovocito, al igual que en células somáticas como se mencionó anteriormente (Chairoungdua *et al*, 2010). Además, la disrupción de la adhesión célula-célula puede darse por endocitosis o relocalización de cadE o proteólisis del dominio extracelular iniciado por el incremento del flujo de calcio (Ito *et al*, 1999; Pey *et*

al, 1998). En espermatozoides, un incremento masivo en las concentraciones intracelulares de calcio está asociado con la exocitosis acrosomal (Yanagimachi, 1994). Por lo tanto la asociación/disociación de las moléculas del complejo adherente podría estar sujeto a la regulación mediada por eventos de fosforilación del dominio citoplasmático, que pueden asociarse a fenómenos descritos en la cabeza del espermatozoide durante la capacitación y contacto con el ovocito (Cormier *et al*, 2003), como así también por la digestión enzimática de cadE de manera de perturbar la adhesión celular mediada por la proteína.

Además de los mecanismos propuestos para la modulación de la interacción mediada por cadE entre las gametas, se podría proponer otro mecanismo basado en hallazgos recientes que se describen a continuación. En el año 2002 se reportó la identificación de un regulador de la adhesión denominado Dysadherina (Dys), también conocida como FXYD5. Dys es una glicoproteína de superficie celular con un solo paso transmembrana, identificada como un antígeno sobreexpresado en numerosos tumores, pero presente solo en algunas células no tumorales humanas. Su presencia ha sido relacionada con la disminución de la adhesión célula-célula y el aumento de la motilidad celular. Se ha propuesto que Dys provocaría una disminución en la adhesividad celular a través de la modulación negativa de la expresión y función de cadE (Ino *et al*, 2002; Nam *et al*, 2007). Respecto de la regulación negativa de la función de cadE, se ha sugerido que podría actuar sobre el dominio extracelular de cadE o sobre el dominio citoplasmático, particularmente compitiendo por el citoesqueleto de actina y de esta manera desestabilizando la unión adherente mediada por cadE. Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia del ARNm y la proteína Dys en el espermatozoide humano; la proteína se localiza en membrana plasmática de la región acrosomal y en el flagelo de espermatozoides del eyaculado e incubados en condiciones capacitantes. Dys colocaliza con cadE en la región acrosomal del espermatozoide, y la señal para Dys se pierde luego de la exocitosis acrosomal. Estudios complementarios en el modelo murino revelaron su presencia en espermatozoides recuperados de *cauda* epididimario en región acrosomal, localización que permanece luego de la capacitación y se pierde una vez ocurrida la exocitosis acrosomal (Gabrielli / Veiga *et al*, en revisión).

Como **conclusión** de esta parte del trabajo, los estudios presentados en el modelo murino han demostrado la expresión del ARNm de cadE en tejido testicular y epididimario de ratón adulto. Los estudios han mostrado evidencias de la presencia de la proteína de adhesión cadE en espermatozoides testiculares y epididimarios, así como en el epitelio y vesículas del fluido del epidídimo. Las investigaciones realizadas han demostrado además la presencia y localización de cadE en estructuras del espermatozoide y del ovocito que participan en la fecundación. Asimismo, se han presentado evidencias de la participación de cadE en fenómenos de adhesión celular que ocurren durante la fecundación, a través del efecto inhibitorio de anticuerpos específicos sobre la fecundación *in vitro*, así como por la inhibición de la unión de los espermatozoides a la ZP y al oolema.

Los estudios realizados en el modelo murino concuerdan con los hallazgos del grupo de investigación en el modelo humano presentado en la Parte I de esta monografía y comprueban la hipótesis de este trabajo. La identificación de proteínas involucradas en estos eventos es de gran importancia para entender el mecanismo de fecundación en mamíferos; eventualmente, los estudios podrán contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento para la infertilidad así como también en el diseño de nuevos métodos anticonceptivos.

Conclusiones generales

En conjunto, los *resultados presentados* **en la Parte I de este trabajo**

Describen las formas proteicas y la localización de los miembros del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina en espermatozoides humanos mótiles no capacitados

Caracterizan en forma exhaustiva la localización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados

Muestran la expresión del transcripto de cadE en el testículo y epidídimo, inmunolocalizan la proteína de adhesión en cortes histológicos del caput, corpus y cauda epididimario, así como determinan las formas proteicas de cadE en extractos de proteínas epididimarias y de fluidos del cauda epididimario y del plasma seminal.

Identifican la presencia de sitios inmunorreactivos para cadE en el ovocito humano, en estructuras involucradas en eventos de adhesión con el espermatozoide durante la fecundación.

Muestran el efecto inhibitorio de anticuerpos anti cadE. Los estudios funcionales de interacción realizados entre gametas homólogas (Ensayo de unión a Hemizona) y heterólogas (Ensayo de penetración de ovocitos de Hámster sin ZP) sugieren la participación de cadE en la interacción del espermatozoide con la ZP y la membrana plasmática del ovocito durante la fecundación.

Informan los resultados de un estudio preliminar de detección de cadE en espermatozoides del eyaculado frescos y previamente congelados en un grupo de pacientes en tratamiento por infertilidad con procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

Asimismo, los *resultados presentados* **en la Parte II de este trabajo**

Describen la expresión y la localización de los miembros del complejo adherente: cadE, β-catenina y actina, en espermatozoides murinos mótiles no capacitados.

Caracterizan en forma exhaustiva la localización de cadE en espermatozoides capacitados y reaccionados.

Muestran la expresión del transcripto de cadE en el testículo y epidídimo, inmunolocalizan la proteína de adhesión en cortes histológicos del caput, corpus y cauda epididimario, así como determinan las formas proteicas de cadE en extractos de proteínas epididimarias y testiculares.

Identifican la presencia de sitios inmunorreactivos para cadE en el ovocito y en células del cumulus oophorus.

Muestran el efecto inhibitorio de anticuerpos anti cadE sobre el proceso de la fecundación. Los estudios comprenden el ensayo de fecundación in vitro así como ensayos de interacción entre las gametas que forman parte del proceso de la fecundación. En conjunto, estos estudios sugieren la participación de cadE en la interacción del espermatozoide con la ZP y la membrana plasmática del ovocito durante la fecundación.

Apéndices

APÉNDICE A

Todas las muestras biológicas humanas usadas se obtuvieron bajo consentimiento escrito de los donantes. Los protocolos fueron aprobados por los diferentes comités de Ética. En la **Figura A.1** y **A.2** se presentan las aprobaciones del Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental y del centro Médico Fertilab (Buenos Aires, Argentina)

FUNDACION INSTITUTO DE BIOLOGIA
Y MEDICINA EXPERIMENTAL
VUELTA DE OBLIGADO 2490
(C1428ADN) BUENOS AIRES
REPUBLICA ARGENTINA

I B Y M E
CONICET
FUNDACION
INSTITUTO
DE BIOLOGIA
Y MEDICINA

BUENOS AIRES, 2 DE DICIEMBRE DE 2004

Dra. Mónica VAZQUEZ
Laboratorio de Estudios Bioquímicos y Moleculares de la
Interacción Espermatozoide-Ovocito
IBYME

De mi mayor consideración,

Tengo el agrado de dirigirme a usted en relación a su proyecto titulado "Estudios celulares, bioquímicos y moleculares sobre la expresión de cadherinas epitelial y neuronal en el tracto reproductor y en las gametas y su rol en la fecundación en mamíferos ".

El mismo ha sido reevaluado luego de la incorporación de las modificaciones sugeridas y por lo tanto informamos a Ud. que este Comité no encuentra objeciones éticas.

Sin otro particular, saludamos a usted muy atentamente.

DR. ALBERTO BALDI

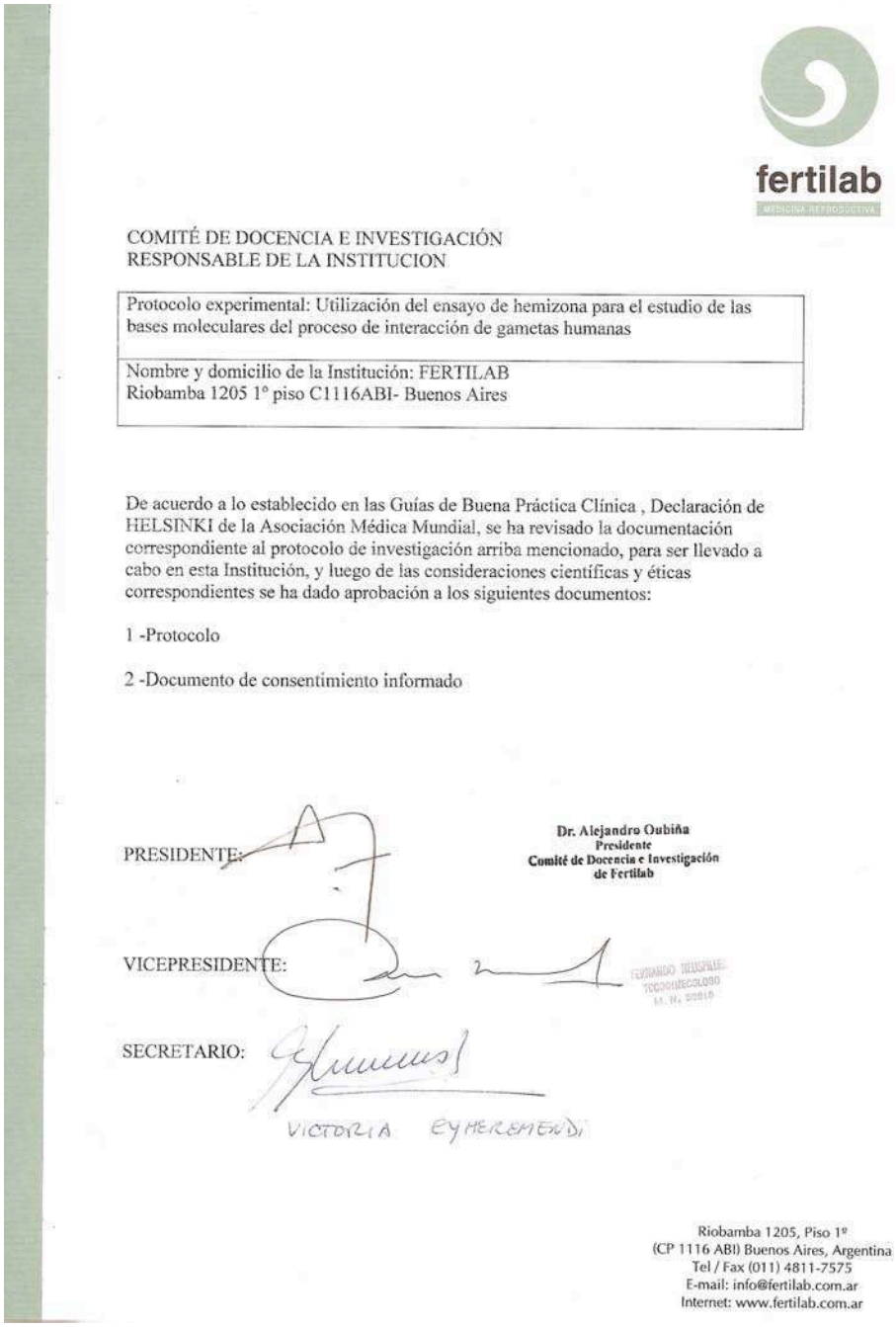
DR. RICARDO S. CALANDRA

DR ENRIQUE SEGURA

DR. CARLOS LIBERTUN

54-11 - 4783-2869 / 4781-6763 – Fax: 54-11 - 4786-2564
E-mail: ibyme@dna.uba.ar

Figura A.1: Aprobación del comité de Ética del instituto de Biología y Medicina Experimental.



fertilab
MEDICINA REPRODUCTIVA

COMITÉ DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
RESPONSABLE DE LA INSTITUCION

Protocolo experimental: Utilización del ensayo de hemizona para el estudio de las bases moleculares del proceso de interacción de gametas humanas
Nombre y domicilio de la Institución: FERTILAB Riobamba 1205 1° piso C1116ABI- Buenos Aires

De acuerdo a lo establecido en las Guías de Buena Práctica Clínica , Declaración de HELSINKI de la Asociación Médica Mundial, se ha revisado la documentación correspondiente al protocolo de investigación arriba mencionado, para ser llevado a cabo en esta Institución, y luego de las consideraciones científicas y éticas correspondientes se ha dado aprobación a los siguientes documentos:

1 -Protocolo

2 -Documento de consentimiento informado

PRESIDENTE:

Dr. Alejandro Oubiña
Presidente
Comité de Docencia e Investigación
de Fertilab

VICEPRESIDENTE:

SECRETARIO:

VICTORIA EYMERICH

Riobamba 1205, Piso 1º
(CP 1116 ABI) Buenos Aires, Argentina
Tel / Fax (011) 4811-7575
E-mail: info@fertilab.com.ar
Internet: www.fertilab.com.ar

Figura A.2: Aprobación del comité de Ética del Centro Médico FERTILAB.

Asimismo los pacientes y donantes firmaron un Consentimiento informado para la utilización de muestras de semen y ovocitos, el formato de dichos consentimientos se muestran en **las Figuras A.3** y **A.4**.

Consentimiento informado para la utilización de muestras de semen humano

Entiendo que el objetivo de los experimentos es **estudiar los mecanismos involucrados en el reconocimiento e interacción de los espermatozoides y ovocitos.** Entiendo que si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a mi salud, los resultados obtenidos eventualmente podrán ser de utilidad para un mejor diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana, así como para el desarrollo de nuevas estrategias anticonceptivas.

Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre los estudios, las cuales fueron respondidas en profundidad.

Doy mi Consentimiento para participar como donante de semen en este estudio que llevarán a cabo la Dra. Vazquez-Levin y miembros de su equipo de trabajo.

Entiendo que no recibiré tratamiento alguno antes de la obtención de la muestra de semen y el único requisito será mantener un período de abstinencia sexual de 48 h. La muestra será obtenida en el sitio elegido por mí, y entregada al laboratorio dentro de la hora de recolección. Declaro que poseo cobertura médica para una asistencia inmediata frente a cualquier eventualidad que pudiera surgir en relación a la obtención de la muestra. Entiendo que mi nombre y otros datos personales serán preservados en forma CONFIDENCIAL [(1)] en el laboratorio. Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo dejar de participar en el estudio cuando lo desee.

Entiendo que la donación de mi semen no implica ningún riesgo para mi persona, ni para terceros y que el mismo no será

utilizado para ningún otro fin. El material sobrante del estudio será descartado, siguiendo normas de bioseguridad.

Firma del donante .....
Nombre del donante .....
Firma del Testigo 1 [(2)].....
Nombre del Testigo 1 .....
Firma del Testigo 2 [(3)].....
Nombre del Testigo 2 .....
Fecha .....

[(1)] El anonimato de identidad del donante se mantendrá a través de la utilización de un sistema de codificación de las muestras de tipo numérico que se implementará en forma inmediata a la obtención de las mismas.
[(2)] El Testigo 1 es un miembro responsable del equipo de investigación que explica al donante las bases del proyecto presentadas en el texto del consentimiento y responde a las preguntas del donante relativas al mismo.
[(3)] El Testigo 2 es un sujeto presencial, que no participa en la realización del proyecto.

Figura A.3: consentimiento informado de pacientes y donantes de muestras de semen.

Consentimiento para la utilización de ovocitos humanos

Entiendo que el objetivo de los experimentos es ***estudiar los mecanismos involucrados en el reconocimiento e interacción de los espermatozoides y ovocitos.*** Entiendo que si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a mi salud, los resultados obtenidos eventualmente podrán ser de utilidad para un mejor diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana, así como para el desarrollo de nuevas estrategias anticonceptivas.

Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre los estudios, las cuales fueron respondidas en profundidad.

Doy mi Consentimiento a los miembros del Centro Médico Fertilab para participar como donante en este estudio. Mis ovocitos no fecundados, luego del procedimiento de Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), y/o descartados del programa de fecundación asistida por presentar signos de inmadurez o degeneración, **serán conservados en una solución salina y posteriormente divididos por la mitad (tratamientos que impiden el desarrollo de un embrión viable)** y luego serán utilizados con fines experimentales.

Entiendo que la donación de mis ovocitos no implica ningún riesgo para mi persona, ni para terceros y que los mismos no serán utilizados para ningún otro fin.

Entiendo que mi nombre y otros datos personales serán preservados en forma CONFIDENCIAL(1) en el laboratorio. Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo dejar de participar en el estudio cuando lo desee sin que ello afecte el derecho a una asistencia médica apropiada.

Nombre del donante .....
Firma del donante .....
Firma del Testigo 1 (2).....
Nombre del Testigo 1 .....
Firma del Testigo 2 (3).....
Nombre del Testigo 2 .....
Fecha .....

(1) El anonimato de identidad del donante se mantendrá a través de la utilización de un sistema de codificación de las muestras de tipo numérico que se implementará en forma inmediata a la obtención de las mismas.

(2) El Testigo 1 es un miembro del equipo profesional que explica al donante las bases del proyecto presentadas en el texto del consentimiento y responde a las preguntas del paciente relativas al mismo.

(3) El Testigo 2 es un sujeto presencial, que no participa en la realización del proyecto.

Figura A.4: consentimiento informado de pacientes y donantes de muestras de ovocitos.

APÉNDICE B

Descripción del procedimiento realizado para la optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del ARNm de cadE

La optimización de los ensayos de PCR en tiempo real es clave para lograr su reproducibilidad así como alcanzar la máxima sensibilidad y especificidad. Como parte de los estudios de caracterización de la expresión del transcripto de cadE en el tracto reproductor masculino, se optimizó un protocolo para realizar su detección y cuantificación empleando esta metodología.

A continuación, se detalla el procedimiento para la puesta a punto del ensayo.

Prueba de especificidad de cebadores (“primers”)

Los protocolos de PCR en tiempo real presentan mayores exigencias en el diseño de los "primers", por lo cual no todos los utilizados en ensayos de PCR a punto final pueden ser empleados en PCR en tiempo real. Para que los "primers" sean compatibles con la técnica, además de no formar dímeros ni estructuras secundarias de alta estabilidad, tampoco deben poseer repeticiones invertidas ni repeticiones de un mismo nucleótido y debe evitarse la presencia de 2 o más G/C en la región 3’ de la secuencia del "primer". Todos estos parámetros se evaluaron *in silico* con el programa Oligo Analyzer 3.0 (www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx/default.aspx)

Una vez completado el análisis de las secuencias de los "primers" a usar y completada su síntesis, se llevó a cabo un ensayo de PCR en tiempo real para confirmar si los "primers" eran compatibles con este tipo de ensayo. En este protocolo la amplificación se realizó utilizando 1 ng de ADN plasmídico (cadE) como molde y con una concentración de "primers" de 900 nM (en exceso, según los parámetros utilizados en PCR en tiempo real la concentración utilizada varía en un rango de 50-300 nM).

Tal como ha sido detallado materiales y métodos, el valor Ct ("Cycle Threshold") indica el número de ciclos que requiere cada muestra de la reacción de PCR para alcanzar el nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción, el cual es determinado por el equipo. El valor Ct está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Los resultados obtenidos revelaron un alto nivel de amplificación, reflejado por la detección del molde en un valor de Ct= 4 para cadE. En la **Figura B.1** se presentan los resultados correspondientes a la evaluación realizada para cadE:

Figura B.1: Registro del ensayo de PCR en tiempo real. Protocolo empleando como molde 1 ng de plásmido conteniendo la secuencia codificante de cadE humana. El registro se presenta en el formato de un gráfico de aumento de fluorescencia (Delta Rn) en escala logarítmica graficada en función del número de ciclos.

Posteriormente, se realizó el análisis de especificidad del producto generado mediante el uso del protocolo de disociación del fragmento de doble cadena. Como resultado de esta evaluación, se determinó la presencia de un único pico, indicando la presencia de un producto único de ADN doble cadena, que corresponde al producto resultante del ensayo de amplificación de cadE con los cebadores específicos. Como ejemplo se muestra en la **Figura B.2** la curva de disociación del transcripto.

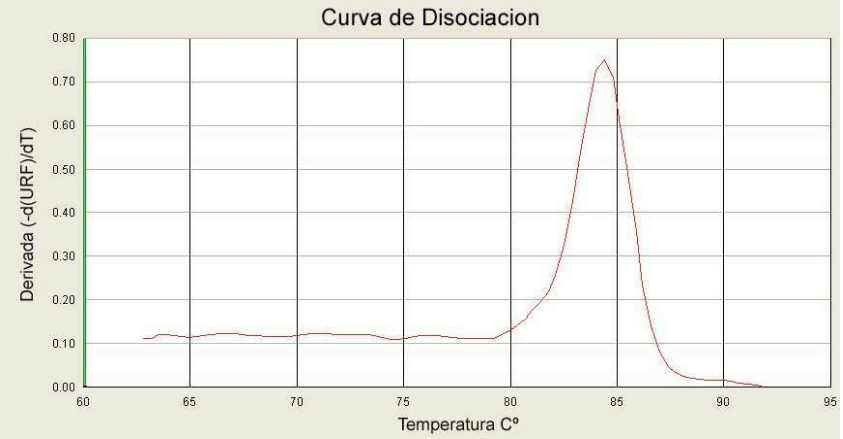


Figura B.2: Curva de disociación para la verificación de la amplificación específica del transcripto de interés. Se representa en el eje de las ordenadas la tasa de cambio de las unidades relativas de fluorescencias (URF) con el tiempo (T) (-d(URF)/dT) versus la temperatura (º C) en el eje de las abscisas. Esta tasa se marca como un pico a la temperatura específica de disociación.

Para visualizar los productos amplificados del ensayo de PCR, se realizaron ensayos de electroforesis en geles de agarosa y análisis de los productos resultantes de la amplificación por tinción de los geles con bromuro de etidio y análisis bajo luz fluorescente. Los resultados se muestran en la **Figura B.3**; en el perfil se identifica la señal correspondiente al fragmento esperado de 172 pb para cadE, no evidenciándose la amplificación de productos en el control negativo de PCR.

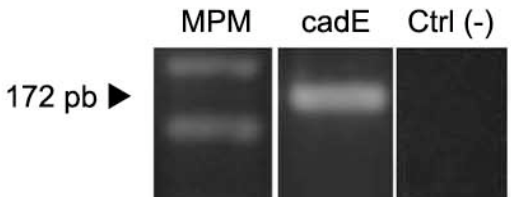


Figura B.3: Perfiles electroforéticos resultantes de los protocolos de amplificación del molde de cadE. Electroforesis en geles de agarosa para los productos amplificados luego del protocolo de PCR en tiempo real. **MPM**: estándar de peso molecular (escalera de 50 pb); **Ctl (-)**: Control negativo (sin molde).

Curvas de sensibilidad para el molde cadE

Para validar un ensayo de PCR en tiempo real, se evalúa el rango dinámico de detección mediante el empleo de una **curva de sensibilidad**. Este

análisis permite determinar la eficiencia de amplificación en un ensayo de PCR específico y su nivel de sensibilidad. Para ello se llevaron a cabo ensayos de amplificación empleando diluciones seriadas del molde de cadE (plásmido con la secuencia de cadE humana); los ensayos se realizaron en todos los casos por triplicado. A partir de los resultados obtenidos se puede evaluar:

A) a desviación estándar entre las réplicas de una misma concentración y así determinar la reproducibilidad del ensayo.

B) la pendiente entre el número de ciclos contra el logaritmo decimal de la concentración, que teóricamente debe ser -3,32, lo que se corresponde con una duplicación de la masa de producto amplificado por cada ciclo de PCR (eficiencia del 100% en la PCR).

En el primer ensayo realizado, el rango de concentraciones analizado para cadE fue de 100 pg a 1 pg. La concentración de “primers” específicos fue de 300 nM. Los resultados se encuentran resumidos en la **Tabla B.1**. Para 100 pg de plásmido, las réplicas no son reproducibles (desvío estándar el promedio= 1,65) debido a un exceso de molde en la PCR. A partir de los 10 pg de molde se obtiene un desvío estándar del promedio <0,2 (DEP) que se encuentra dentro de lo esperado para replicas reproducibles en PCR en tiempo real.

Molde de cadE	Promedio Ct	DEP
100 pg	12,94	1,65
10 pg	16,62	0,21
1 pg	19,06	0,1

Tabla B.1: Primer ensayo de PCR en tiempo real para cadE. Los ensayos formaron parte de los estudios de optimización del protocolo para los transcriptos en estudio.

A continuación, se evaluaron con el mismo protocolo concentraciones de plásmidos en el orden de 1 pg a 1 fg (**Tabla B.2**):

Molde de cadE	Promedio Ct	DEP
1 pg	19,66	0,08
100 fg	22,56	0,28
10 fg	26,63	0,01
1 fg	30,44	0,29

Tabla B.2: Segundo ensayo de PCR en tiempo real con para cadE. Los ensayos formaron parte de los estudios de optimización del protocolo para los transcriptos en estudio.

Según se observa, se amplió el rango de sensibilidad hasta 1 fg de plásmido, manteniendo la reproducibilidad entre las réplicas. La representación gráfica del valor de Ct vs. el logaritmo de la concentración se presenta en la siguiente figura (**Figura B.4**):

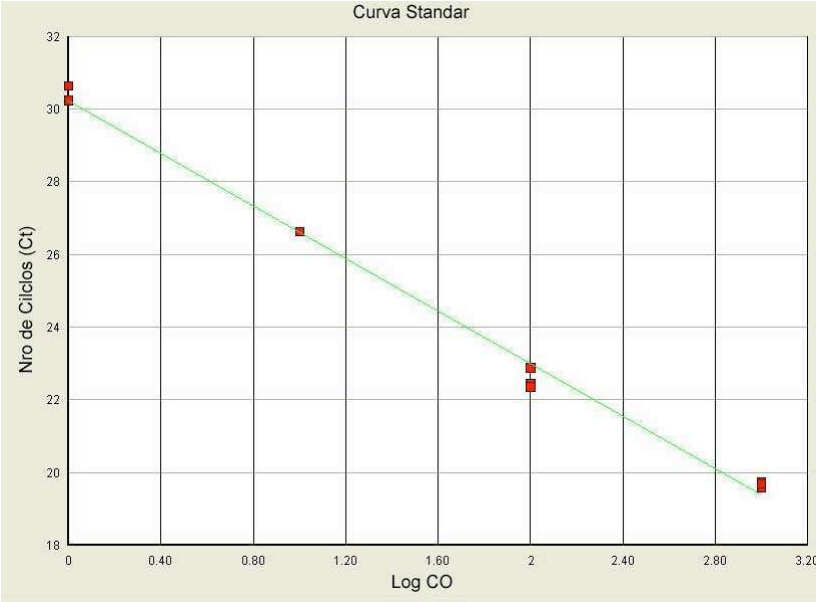


Figura B.4: Representación gráfica de los valores de Ct (número de ciclo) versus el logaritmo de la concentración inicial (Log CO) de cadE.

Como resultado de este análisis, se determinó que la pendiente de la recta se aproxima al valor teórico esperado de -3,32, siendo en este caso igual a -3,6.

Del conjunto de estos resultados se observa que los protocolos de cuantificación por PCR en tiempo real implementados para la detección del

transcripto de cadE humana son reproducibles, dado que presentan un desvío estándar menor a 0,29, y sensibles, ya que permiten estimar masa presente en la reacción en el orden del fentogramo.

APÉNDICE C

Descripción del procedimiento realizado para la optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del ARNm de cadE murina

Prueba de especificidad de cebadores ("primers")

Tal como se describió en el apéndice A, se diseñaron y analizaron secuencias de "primers" específicos para el ARNm de cadE murina. Una vez sintetizados, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para verificar si estos "primers" podían ser utilizados en este tipo de protocolos. Al no contar con un plásmido con la secuencia clonada del ARNm de cadE murina, se utilizó como molde ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción de 1 µg de ARN total de epidídimo murino. En ensayos de PCR a punto final ya se habían detectado altos niveles de amplificación del ARNm de cadE en este tejido (datos no mostrados).

Utilizando una concentración de "primers" de 300 nM (dentro del rango aceptado para la realización de ensayos de PCR en tiempo real, ver apéndice A), y empleando como molde el ADNc de epidídimo humano, se obtuvo un nivel de amplificación aceptable, reflejado por la detección del amplicón en un Ct= 22. En la **Figura C.1** se presentan los resultados correspondientes a esta evaluación realizada:

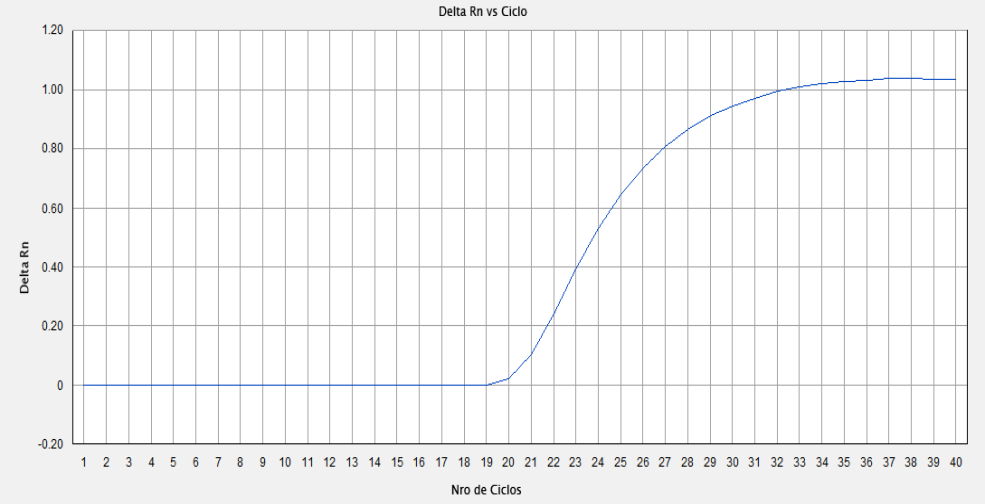


Figura C.1: Registro del ensayo de PCR en tiempo real. Protocolo empleando como molde 50 ng de ADNc de epidídimo humano generado mediante la retrotranscripción de 1 µg de ARN total del tejido evaluado. El registro se presenta en el formato de un gráfico de aumento de fluorescencia (Delta Rn) en escala logarítmica graficada en función del número de ciclos.

Posteriormente, se realizó el análisis de especificidad del producto generado mediante el uso del protocolo de disociación del fragmento de doble cadena. Como resultado de esta evaluación, se determinó la presencia de un único pico, indicando la presencia de un producto único de ADN doble cadena, que corresponde al producto resultante del ensayo de amplificación de cadE con los cebadores específicos. Como ejemplo se muestra en la **Figura C.2** la curva de disociación del transcripto:

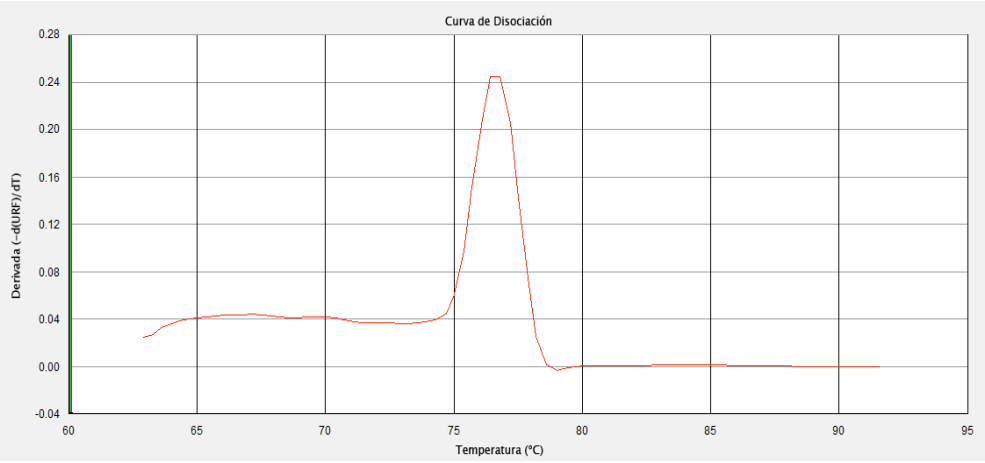


Figura C.2: Curva de disociación para la verificación de la amplificación específica del transcripto de interés. Se representa en el eje de las ordenadas la tasa de cambio de las unidades relativas de

fluorescencias (URF) con el tiempo (T) (-d(URF)/dT) versus la temperatura (º C) en el eje de las abscisas. Esta tasa se marca como un pico a la temperatura específica de disociación.

Curvas de sensibilidad para el molde cadE

Para determinar el rango dinámico de amplificación del ARNm de cadE murina se realizaron diluciones seriadas de una reacción de retrotranscripción de 20 µl de volumen final donde se utilizó 1 µg de ARN total de epidídimo de ratón como molde. Si consideramos la eficiencia de la retrotranscriptasa reversa como un 100%, tendríamos una concentración de ADNc de 50 ng/µl. Los resultados se encuentran resumidos en la **Tabla C.1:**

Molde de cadE	Promedio Ct	DEP
50 ng	22,65	0,06
5 ng	25,68	0,01
500 pg	29,20	0,01
50 pg	32,98	0,14

Tabla C.1: Ensayo de PCR en tiempo real para cadE murina. Los ensayos formaron parte de los estudios de optimización del protocolo para el transcripto en estudio.

Según se observa el rango de sensibilidad se extiende hasta 50 pg de ADNc, manteniendo la reproducibilidad entre las réplicas. La representación gráfica del valor de Ct vs. el logaritmo de la concentración se presenta en la siguiente figura (**Figura C.3**):

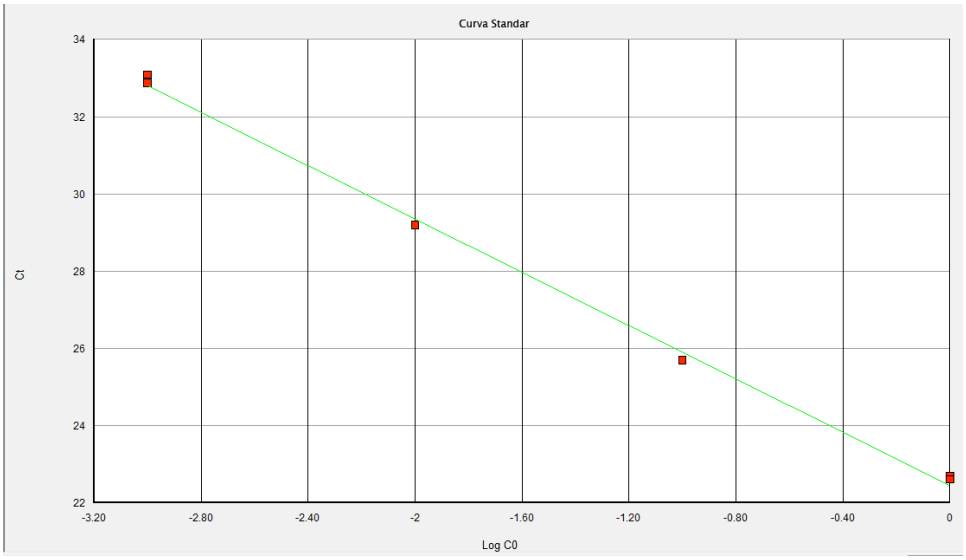


Figura C.3: Representación gráfica de los valores de Ct (número de ciclo) versus el logaritmo de la concentración inicial (Log CO) de cadE.

Como resultado de este análisis, se determinó que la pendiente de la recta se aproxima al valor teórico esperado de -3,32, siendo en este caso igual a -3,45.

Del conjunto de estos resultados se observa que los protocolos de cuantificación por PCR en tiempo real implementados para la detección del transcripto de cadE murina son reproducibles, dado que presentan un desvío estándar menor a 0,14, y sensibles, ya que permiten detectar el transcripto en una dilución de hasta 1000 veces de la retrotranscripción de 1 µg de ARN total.

APENDICE D

1. Evaluación de la similitud entre las secuencias de cadE humana y de hámster

Como se mencionara en la sección de Materiales y Métodos, el anticuerpo anti cadE H-108 fue desarrollado usando como antígeno un péptido recombinante codificante comprendido entre los aminoácidos 600-707 de cadE de origen humano, correspondiente al dominio extracelular cadherina 5. Este anticuerpo fue seleccionado para realizar los ensayos de interacción entre espermatozoides humanos y ovocitos de hámster sin ZP.

Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo policlonal H-108 de reconocer la proteína cadE de hámster, se llevó a cabo un análisis bioinformático de comparación de secuencias aminoacídicas de cadE humana y hámster disponibles.

Para ello se accedió a los bancos de secuencia y se buscó las entradas correspondientes a secuencias de cadE de hámster, encontrándose dos entradas para cadE en *Mesocricetus auratus*, ambas incompletas:

1) La primera, correspondiente a la entrada: DQ237892.1, GI:77997578. La secuencia de esta entrada se contrastó con la de cadE humana (CadE humana: NP_004351.1 GI:4757960). Para ello se realizó un alineamiento de ambas secuencias utilizando el programa bioinformática CLUSTAL W2.

```
gi|4757960|      MGPWSRSLSALLLLLQVSSWLCQEPEPCHPGFDAESYTFTVPRRHLERGRVLGRVNFEDC 60
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      TGRQRTAYFSLDTRFKVGTDGVITVKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFSTKVTLNTVG 120
gi|77997579      -------------RFKVATD--------------HDYFMIYREAYLMDDLCSLLSKRFQK 33
****.**              : :*::*       .:.: :: .

gi|4757960|      HHHRPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSPGLRRQKRDWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIKS 180
gi|77997579      HLKRYLCRVCICNEIQLSLAPLMVVS---------FMIHPWSAP---------------- 68
* :*   : .  . ** .* .:   *         ::* * *.*

gi|4757960|      NKDKEGKVFYSITGQGADTPPVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFSHAVSSNGN 240
gi|77997579      ----------------------------------LSELVNRS--------SFGKRLCGC 85
::* ::*.        *..    *

gi|4757960|      AVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNAAI 300
gi|77997579      NSVKVLEMRLDYVDDHD---------FNDKCLGGERWTGEVEHIQTRRQDTCRQTG---- 132
```

```
. :*: :  .*::*         *:.. : *     .* .: :   *   :*

gi|4757960|      AYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLVVQAADLQGEGLSTTAT 360
gi|77997579      -------EEMCPDR-----------QETCTQPVDREAIA--------------------- 153
:   **:            .. *  :***::.

gi|4757960|      AVITVTDTNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITTLKVTDADAPNTPAWEAVYTILNDDG 420
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      GQFVVTTNPVNNDGILKTAKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTVDVLDV 480
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      NEAPIFVPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEINPDTG 540
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      AISTRAELDREDFEHVKNSTYTALIIATDNGSPVATGTGTLLLILSDVNDNAPIPEPRTI 600
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      FFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPKMALEV 660
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      GDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILAL 720
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      LILILLLLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARP 780
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      EVTRNDVAPTLMSVPRYLPRPANPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGS 840
gi|77997579      ------------------------------------------------------------


gi|4757960|      EAASLSSLNSSESDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD 882
gi|77997579      ----------------------------------------
```

El análisis reveló que el fragmento no correspondía a la región de interés a ser analizada, por lo que no pudo dar resultados al estudio.

2) La segunda, correspondiente a la entrada: ACF35437.1; GI:194245654. La secuencia de 117 aminoácidos de esta entrada se contrastó con la de cadE humana (cadE humana: NP_004351.1 GI:4757960).

Para ello, nuevamente se realizó un alineamiento de ambas secuencias utilizando el programa bioinformática CLUSTAL W2:

```
Humano    MGPWSRSLSALLLLLQVSSWLCQEPEPCHPGFDAESYTFTVPRRHLERGR 50
Hámster   -------------------------------------------------

Humano    VLGRVNFEDCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTDGVITVKRPLRFHNPQIHFLV 100
Hámster   -------------------------------------------------

Humano    YAWDSTYRKFSTKVTLNTVGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSPGLR 150
Hámster   -------------------------------------------------
```

```
Humano    RQKRDWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQGADTP 200
Hámster -------------------------------------------------

Humano    PVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFSHAVSSNGNAVEDPMEILI 250
Hámster -------------------------------------------------

Humano    TVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNAAI 300
Hámster -------------------------------------------------

Humano    AYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLVVQAADL 350
Hámster -------------------------------------------------

Humano    QGEGLSTTATAVITVTDTNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITTLKVTD 400
Hámster -------------------------------------------------

Humano    ADAPNTPAWEAVYTILNDDGGQFVVTTNPVNNDGILKTAKGLDFEAKQQY 450
Hámster -------------------------------------------------

Humano    ILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTVDVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFG 500
Hámster -------------------------------------------------

Humano    VGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEINPDTGAISTRAELDR 550
Hámster -------------------------------------------------

Humano    EDFEHVKNSTYTALIIATDNGSPVATGTGTLLLILSDVNDNAPIPEPRTI 600
Hámster   ----------------ATDDGSPIATGTGTLLLVLLDVNDNAPIPEPRNM 34
                        ***:***:*********:* ***********.:

Humano    FFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESI 650
Hámster   QFCQRNPQPHIITILDPDLPPNTSPFTAELTHGASVNWTIEYNDAAQESL 84
           **:***:*::*.*:*.*****************.****:***.:***:

Humano    ILKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQP 700
Hámster   ILQPRKDLEIGEYKIHLELADNQNKDQVTTLDV----------------- 117
           **:*:  **:*:***:*:* ***********:*

Humano    VEAGLQIPAILGILGGILALLILILLLLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRD 750
Hámster   --------------------------------------------------

Humano    NVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYLPR 800
Hámster -------------------------------------------------

Humano    PANPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAASLSSLNS 850
Hámster -------------------------------------------------

Humano    SESDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD 882
Hámster -------------------------------
```

Como resultado de este análisis se encontró que el fragmento secuenciado para cadE de hámster se corresponde con parte de la secuencia del segmento de cadE humana comprendido entre los residuos 600 y 707 usado para la generación del anticuerpo. Del total del segmento peptídico usado como antígeno, en la proteína de hámster se encontró secuencia comparable para los residuos 600-684, determinándose una identidad del 71 % y una similitud del 95 % entre ambas secuencias.

2. Evaluación de la similitud entre las secuencias de cadE humana y de ratón

Como se mencionara previamente, el anticuerpo anti cadE H-108 fue desarrollado contra un péptido codificante del segmento peptídico de cadE humana comprendido entre los aminoácidos 600-707. En la hoja de descripción del producto se indica que reconoce a la proteína de origen murino. Sin embargo en la literatura no hay muchos trabajos que describan su uso en dicha especie. Dado que el anticuerpo anti cadE H-108 fue utilizado en los estudios de inmunodetección de cadE en gametas, embriones y tejidos de ratón, se decidió completar el análisis bioinformático para determinar la homología de secuencias entre ambas especies.

De manera similar al análisis realizado para comparar las secuencias codificantes de cadE humana y de hámster, se realizó una evaluación entre las secuencias de cadE humana y de ratón. Los estudios se realizaron sobre las secuencias de cadE correspondientes a las entradas para cadE humana: NP_004351 y para cadE murina: NP_033994. De manera similar al estudio anterior, se realizó el alineamiento de ambas secuencias utilizando el programa bioinformática CLUSTAL W2.

A continuación se muestra el resultado del análisis de alineamiento entre de secuencias para cadE humana y murina y se resalta en color la región de la proteína en ambas especies que es reconocida por el anticuerpo anti cadE H-108:

```
Humano MGPWSRSLSALLLLLQVSSWLCQEPEP--CHPGFDAESYTFTVPRRHLER 48
Ratón  MGARCRSFSALLLLLQVSSWLCQELEPESCSPGFSSEVYTFPVPERHLER 50
       **. .**:**************** **  * ***.:* ***.**.*****

Humano GRVLGRVNFEDCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTDGVITVKRPLRFHNPQIHF 98
Ratón  GHVLGRVRFEGCTGRPRTAFFSEDSRFKVATDGTITVKRHLKLHKLETSF 100
       *:*****.**.**** ***:** *:****.***.***** *::*: :  *

Humano LVYAWDSTYRKFSTKVTLNTVGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSPG 148
Ratón  LVRARDSSHRELSTKVTLKSMGHHHHRHHHRDPASESNPELLMFPSVYPG 150
       ** * **::*::******:::****:   *: ..*  :.*** **.  **

Humano LRRQKRDWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQGAD 198
Ratón  LRRQKRDWVIPPISCPENEKGEFPKNLVQIKSNRDKETKVFYSITGQGAD 200
       ********************* ***********:*** ************

Humano TPPVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIATYTLFSHAVSSNGNAVEDPMEI 248
Ratón  KPPVGVFIIERETGWLKVTQPLDREAIAKYILYSHAVSSNGEAVEDPMEI 250
       .******************:***** **.* *:********:********

Humano LITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNA 298
Ratón  VITVTDQNDNRPEFTQPVFEGFVAEGAVPGTSVMKVSATDADDDVNTYNA 300
       :*********:***** **:* * ***:******:*:*************
```

```
Humano AIAYTILSQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLVVQAA 348
Ratón  AIAYTIVSQDPELPHKNMFTVNRDTGVISVLTSGLDRESYPTYTLVVQAA 350
       ******:*******.*****:**:******:*:******:**********

Humano DLQGEGLSTTATAVITVTDTNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITTLKV 398
Ratón  DLQGEGLSTTAKAVITVKDINDNAPVFNPSTYQGQVPENEVNARIATLKV 400
       **********.*****.* ***.*:***:**:*******.*. *:****

Humano TDADAPNTPAWEAVYTILNDDGGQFVVTTNPVNNDGILKTAKGLDFEAKQ 448
Ratón  TDDDAPNTPAWKAVYTVVNDPDQQFVVVTDPTTNDGILKTAKGLDFEAKQ 450
       ** ********:****::** . ****.*:*..*****************
Humano QYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTVDVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSED 498
Ratón  QYILHVRVENEEPFEGSLVPSTATVTVDVVDVNEAPIFMPAERRVEVPED 500
       ****** * *  *** **..*********:********:*.*:****.**

Humano FGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRDTANWLEINPDTGAISTRAEL 548
Ratón  FGVGQEITSYTAREPDTFMDQKITYRIWRDTANWLEINPETGAIFTRAEM 550
       ************:******:******************:**** ****:

Humano DREDFEHVKNSTYTALIIATDNGSPVATGTGTLLLILSDVNDNAPIPEPR 598
Ratón  DREDAEHVKNSTYVALIIATDDGSPIATGTGTLLLVLLDVNDNAPIPEPR 600
       **** ********.*******:***:*********:* ************

Humano TIFFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQE 648
Ratón  NMQFCQRNPQPHIITILDPDLPPNTSPFTAELTHGASVNWTIEYNDAAQE 650
       .: **:***:*::*.*:*.******************.****:***.:**

Humano SIILKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKA 698
Ratón  SLILQPRKDLEIGEYKIHLKLADNQNKDQVTTLDVHVCDCEGTVNNCMKA 700
       *:**:*:  **:*:***:*** ***********:* ******:. * **

Humano QPVEAGLQIPAILGILGGILALLILILLLLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDT 748
Ratón  GIVAAGLQVPAILGILGGILALLILILLLLLFLRRRTVVKEPLLPPDDDT 750
       * ****:**************************:*********:***

Humano RDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYL 798
Ratón  RDNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPQYR 800
       ********************************************:*

Humano PRPANPDEIGNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAASLSSL 848
Ratón  PRPANPDEIGNFIDENLKAADSDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAASLSSL 850
       *********************:**************************

Humano NSSESDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD 882
Ratón  NSSESDQDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD 884
       ******:**************************
```

El análisis entre ambas secuencias reveló una identidad del 80 % entre ambas secuencias.

El análisis de la región de reconocimiento del anticuerpo (residuos 600-707 del dominio cadherina 5 humano) se muestra a continuación:

```
Humano IFFCERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESIILKPKMALE
Ratón  MQFCQRNPQPHIITILDPDLPPNTSPFTAELTHGASVNWTIEYNDAAQESLILQPRKDLE
       : **:***:*::*.*:*.*****************.****:***.:***:**:*:  **

Humano VGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIP
Ratón  IGEYKIHLKLADNQNKDQVTTLDVHVCDCEGTVNNCMKAGIVAAGLQVP
       :*:***:*** ***********:* ******:.. * **  * ****:*
```

Como resultado de este análisis, se determinó una identidad del 71% y una similitud del 92% entre ambas secuencias aminoacídicas correspondientes a este segmento.

Bibliografía

- Abou-Haila A & Tulsiani DRP (2000) “Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function” Arch Biochem Biophys Vol. 379, 173-182.
- Adham IM, Nayernia K, Engel W (1997) “Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization” Mol Reprod Dev Vol. 46, 370-376.
-Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, Baker MA (2007) “Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation” Asian J Androl Vol. 9, 554–564.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M (1990) “Biología molecular de la célula” Ed. Omega, Barcelona, España.
- Alberts B (2000) “Molecular Biology of the Cell” 4th ed. New York. NY Garland Science Publishing.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2006) “Molecular Biology of the Cell” 2nd ed. New York. NY Garland Science Publishing.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) “Basic local aligment search tool” J Mol Biol Vol. 215, 403-410.
- Amann RP & Schanbacher BD (1983) “Physiology of male reproduction” J Anim Sci Vol. 57, 380-403.
- Amann RP (1981) “A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics” J Androl Vol. 2, 37-58.
- Anakwe OO & Gerton GL (1990) “Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis” Biol Reprod Vol. 42, 317-328.
- Andersson AM, Edvardsen K, Skakkebaek NE (1994) "Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis" Int J Androl Vol. 17, 174-180.
- Angres B, Barth A, Nelson WJ (1996) "Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: Kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay" J Cell Biol Vol. 134, 549-557.
- Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001) “The cadherin superfamily” J Cell Sci Vol. 114, 625-626.
- Aumuller G, Wilhelm B, Seitz J (1999) “Apocrine secretion--fact or artifact?” Ann Anat Vol. 181, 437-446.
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T (2002) “Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg” J Biol Chem Vol. 277, 30310-30314.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y (1994) “Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization” J Biol Chem Vol. 269, 31845-31849.
- Bagis H, Keskintepe L, Sagirkaya H, Odaman H, Cetin S (2001) “Influences of cumulus cells during in vitro fertilization of mouse oocytes in different mouse strains” Turk J Vet Anim Sci Vol. 25, 778-782.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J (2007) “Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis” Development Vol. 134, 933-943.
- Balen HA & Jacobs HS (1997) “Infertility in practice” Churchill Livingstone Eds.
- Balzac F, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF (2005) "E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function" J Cell Sci Vol. 118, 4765-4783.

- Banks RE, Porter WH, Whelan P, Smith PH, Selby PJ (1995) "Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine" J Clin Pathol Vol. 48, 179-180.
- Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Saffar L, Gattegno L, Ducot B, Drillet AS, Bomsel M, Wolf JP, Ziyyat A (2007) "Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization" BMC Dev Biol Vol. 7, 102-113.
- Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf JP, Ziyyat A (2007) “Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa” FASEB J Vol. 21, 3446-3449.
- Barros C, Crosby JA, Moreno RD (1996) “Early spteps of sperm-eff interaction durin mammalian fertilization” Cell Biol Int Vol. 20, 33–39.
- Bastián Y, Roa-Espitia AL, Mújica A, Hernández-González EO (2010) “Calpain modulates capacitation and acrosome reaction through cleavage of the spectrin cytoskeleton” Reproduction Vol. 140, 673-684.
- Baumgartner W, Wendeler MW, Weth A, Koob R, Drenckhahn D, Gessner R (2008) "Heterotypic trans-interaction of LI- and E-cadherin and their localization in plasmalemmal microdomains" J Mol Biol Vol. 378, 44-54.
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G (2009) “Comparative aspects of implantation” Reproduction Vol. 138, 195-209.
- Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Schulz S, Mages J, Handschuh G, Wheelock MJ, Cleton-Jansen AM, Hofler H, Becker I (2002) “Functional allelic loss detected at the protein level in archival human tumours using allele-specific E-cadherin monoclonal antibodies” J Pathol Vol. 197, 567-574.
- Bedford JM (1998) “Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event” Biol Reprod Vol. 59,1275-1287.
- Bedford JM (1975) "Maturation, transport and fate of the spermatozoa in the epididymis" En: “Handbook of Physiology” Hamilton DW, Greep RO (Eds.). Washington,D.C. Am Physiol Soc. 303-317.
- Bedford JM (2004) “Enigmas of mammalian gamete form and function” Biol Rev Camb Philos Soc Vol. 79, 429–460.
- Bedford JM & Cooper GW (1978) “Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs” En: Membrane Surface Reviews (Membrane Fusion). Poste G, Nicolson GL (Eds.) Amsterdam, North-Holland. Vol. 5, 65-125.
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W (1993) "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene" J Cell Biol Vol. 120, 757-766.
- Bendel-Stenzela MR, Gomperts M, Anderson R, Heasman J, Wyli C (2000) “The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the Mouse” Mec Dev Vol. 91, 143 – 152.
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C (1996) “E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain” Oncogene Vol. 13, 1919-1925.

- Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemaker MJ, van Bokhoven A, van Roy F (1995) “Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1)” Genomics Vol. 26, 281-289.
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990) “Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence” Dev Biol Vol. 139, 227-229.
- Brieher WM, Yap AS, Gumbiner BM (1996) "Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin" J Cell Biol Vol. 135, 487-496.
- Bleil JD & Wassarman PM (1980) “Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the Mouse oocyte´s zona pellucida” Dev Biol Vol. 76, 185-2002.
- Bleil JD & Wassarman PM (1983) “Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein” Dev Biol Vol. 95, 317-324.
- Bleil JD & Wassarman PM (1986) “Autoradiographic Visualization of the Mouse Egg's Sperm Receptor Bound to Sperm” The Journal of Cell Biology Vol. 102, 1363-1371.
- Bleil JD & Wassarman PM (1988) “Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pelucida: role in maintenance of bindibg of acosome reacted sperm to eggs” Dev Biol Vol. 128, 376-385.
- Blobel CP (2000) “Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation” Rev Reprod Vol. 5, 75–83.
- Boissonnas CC, Montjean D, Lesaffre C, Auer J, Vaiman D, Wolf JP, Ziyyat A (2010) "Role of sperm alphavbeta3 integrin in mouse fertilization” Dev Dyn Vol. 239,773-83.
- Boué F & Sullivan R (1997) “Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm antigen” Biol Reprod Vol. 54, 1018-1024.
- Boué F, Duquenne C, Lassalle B, Lefèvre A, Finaz C (1995) "FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process" Biol Reprod Vol. 52, 267-278.
- Bouvet BR, Brufman AS, Paparella CV (2003) “Macrófagos en semen humano” Ach Esp Urol Vol. 56, 983-987.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S (2005) “Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction” Reproduction Vol. 129, 263-268.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H (2003) “Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction” Biol Reprod Vol. 68, 837-845.
- Brieher WM, Gumbiner BM (1994) “Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps” J Cell Biol Vol. 126, 519-527.
- Bronson RA, Fusi FM (1996) “Integrins and human reproduction” Mol Hum Reprod Vol. 2, 153-168.
- Brugo Olmedo S, Chillik C, Kopelman S (2002) “Definición y causas de la infertilidad” Rev Med Reprod Vol. 5, 29-45.
- Bryant DM & Stow JL (2004) “The ins and outs of E-cadherin trafficking” Trends Cell Biol Vol. 14, 427-434.
- Buffone MG, Doncel GF, Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC (2004) “Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation” Hum Reprod Vol. 19, 139-46.

- Buffone MG, Brugo-Olmedo S, Calamera JC, Verstraeten SV, Urrutia F, Grippo L, Corbetta JP, Doncel GF (2006) “Decreased protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity in spermatozoa from infertile men with varicocele” Mol Reprod Dev Vol. 73, 1591-1599.
- Buffone MG, Foster JA, Gerton GL (2008) “The role of the acrosomal matrix in fertilization” Int J Dev Biol Vol. 52, 511-522.
- Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD (1988) “The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential” Fertil Steril Vol. 49, 688-697.
- Busso D, Cohen DJ, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS (2005) “Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction” Mol Hum Rep Vol.11, 299–305.
- Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS (2007) “A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction” Biol Reprod Vol. 77, 848–854.
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD (1995) “Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo” Hum Reprod Vol. 10, 1571-1578.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB (1994) “Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by Ecadherin and the alpha E beta 7 integrin “ Nature Vol. 372, 190-193.
- Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ (2010) “Exosome release of -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling” J Cell Biol Vol. 190, 1079-1091.
- Chamberlin EM, Ringuette MJ, Philpott CC, Chamow SM, Dean J (1989) “Molecular genetics of the mouse zona pellucida” Dietl J (Ed.) en “The mammalian egg coat. Structure and function” Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM (2001) "Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion" J Cell Biol Vol. 154, 231-243.
- Chaudhury K, Das T, Chakravarty B, Bhattacharyya AK (2005) “Acrosin activity as a potential marker for sperm membrane characteristics in unexplained male infertility” Fertil Steril Vol. 83, 104-109.
- Chen H & Sampson NS (1999) “Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilinbeta” Chem Biol Vol. 6, 1-10.
- Cheng A, Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil J (1994) “Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3” The Journal of Cell Biology Vol. 125, 867-878.
- Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF (1986) “In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae” Dev Biol Vol. 114, 119-131.
- Chitaev NA & Troyanovsky SM (1998) “Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation” J Cell Biol Vol. 142, 837-846.
- Cleton-Jansen AM, Callen DF, Seshadri R, Goldup S, Mccallum B, Crawford J, Powell JA, Settasatian C, van Beerendonk H, Moerland EW, Smit VT, Harris WH, Millis R, Morgan NV, Barnes D, Mathew CG, Cornelisse CJ (2001) “Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in

712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions" Cancer Res Vol. 61, 1171-1177.
- Cohen N & Wassarman PM (2001) "Association of egg zona pellucida glycoprotein mZP3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice" Int J Dev Biol Vol. 45, 569-576.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M, Cuasnicu PS (2001) "Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg" Biol Reprod Vol. 65, 1000-1005.
- Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS (1998) "Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs" Dev Biol Vol. 200, 103-115.
- Cooper TG, Gudermann TW, Yeung CH (1986) "Characteristics of the transport of carnitine into the cauda epididymidis of the rat as ascertained by luminal perfusion in vitro" Int J Androl Vol. 5, 348-58.
- Cormier N & Bailey JL (2003) "A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa" Biol Reprod Vol. 69, 177-185.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL (1997) "Primature capacitation of bovine spermatozoa is iniciated by cryopresevation" J Androl Vol. 18, 461-468.
- Cornwall GA & Hann SR (1995) "Specialized gene expression in the epididymis" J Androl Vol. 16, 379-383.
- Cornwall GA (2009) "New insights into epididymal biology and function" Hum Reprod Update Vol. 15, 213-227.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1988) "Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida" Biol Reprod Vol. 38, 235-244.
- Cross NL (1998) "Role of cholesterol in sperm capacitation" Biol Reprod Vol. 59, 7–11.
- Crozet N (1989) "Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocytes" J Reprod Fertil Suppl Vol. 38, 9-16.
- Cyr DG, Hermo L, Blaschuk OW, Robaire B (1992) "Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis" Endocrinology Vol. 130, 353-363.
- Cyr DG, Hermo L, Robaire B (1993) "Developmental changes in epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat" Endocrinology Vol. 132, 1115-1124.
- Cyr DG, Robaire B, Hermo L (1995) "Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis" Microsc Res Tech Vol. 30, 54-66.
- Da Ros VA, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS (2008) "Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-RIch Secretory Protein 1 (CRISP1)" Dev Biol Vol. 320, 12-18.
- Daniel JM & Reynolds AB (1997) "Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function" Boessays Vol. 19, 883-891.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C (2006) "Sperm channel diversity and functional multiplicity" Reproduction Vol. 131, 977–88.

- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltran C (2005) "Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology" Int Rev Cytol Vol. 243, 79-172.
- Daugherty RL & Gottardi CJ (2007) “Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions” Physiology Vol. 22, 303-309.
- Davies BR, Worsley SD, Ponder BAJ (1998) “Expression of E-cadherin, α-catenin and -catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancer” Histopathology Vol. 32, 69-80.
- Dean J (2004) “Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics” Bioessays Vol. 26, 29-38.
- De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS (2005) “Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis” PloS Biol Vol. 3, e323.
- De WO, Derycke L, Hendrix A, De MG, Godeau F, Depypere H, Bracke M (2007) "Soluble cadherins as cancer biomarkers" Clin Exp Metastasis Vol. 24, 685-697.
- De Jonge C (2005) “Biological basis for human capacitation” Hum Reprod Update Vol. 11, 205–14.
- Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF “Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive contraceptive activities” J Biol Chem Vol. 270, 24116-24126.
- de Vries WM, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, Solter D, Knowles BB (2004) “Maternal β-catenin and E-cadherin in Mouse development” Development Vol. 131, 4435 - 4445.
- Duguay D, Foty RA, Steinberg MS (2003) “Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants” Dev Biol Vol. 253, 309-323.
- Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, Richardson EC, Fujita Y (2007) "Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts" Mol Cell Biol Vol. 27, 3804-3816.
- Dym M & Fawcett DW (1971) “Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis” Biol Reprod Vol. 4, 195-215.
- Eberspaecher U, Gerwien J, Habenicht UF, Schleuning WD, Donner P (1991) “Activation and subsequent degradation of proacrosin is mediated by zona pellucida glycoproteins, negatively charged polysaccharides, and DNA” Mol Reprod Dec Vol. 30, 164-170.
- Eddy EM & O´Brien DA (1994) “The spermatozoon” En: “The Physiology of reproduction” Knobil E y Neil JD (Eds). Segunda Edición. Raven Press, Ltd. New York. Capítulo 2, Pag. 29-77.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) “The ADAM metalloproteinases “Mol Aspects Med Vol. 29, 258-289.
- Eisenbach M & Giojalas LC (2006) “Sperm guidance in mammals an unpaver road to the egg” Mol Cell Biol Vol. 7, 276-285.
- Elzinga M, Collins JH, Kuehl WM, Adelstein RS (1973) “Complete Amino-Acid Sequence of Actin of Rabbit Skeletal Muscle” Proc Nat Acad Sci USA Vol. 70, 2687-2691.
- Ensslin MA & Shur BD (2003) “Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding” Cell Vol. 114, 405–417.

- Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ (2007) “Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization” Reproduction Vol. 133, 909-917.
- Etkovitz N, Rubinstein S, Daniel L, Breitbart H (2007) “Role of PI3-Kinase and PI4-Kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation” Biol Reprod Vol. 77, 263-273.
- Evans JP (2000) “Getting sperm and egg together: things conserved and things diverged” Biol Reprod Vol. 63, 355-360.
- Evans JP (2002) "The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization" Hum Reprod Update Vol. 8, 297-311.
- Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M (1996) “Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle” Mol Reprod Dev Vol. 43, 503-512.
- Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S (1996) “Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation” Micros Res Tech Vol. 69, 415-426.
- Fawcett DW & Dym M. (1974) “A glycogen rich segment of the tubuli recti and proximal portion of the rete testis in the guinea pig” J Reprod Fertil Vol. 38, 401-409.
- Fenichel P, Durand-Clement M (1998) "Role of integrins during fertilization in mammals" Hum Reprod Vol. 13, 31-46.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM (2001) “Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane” J Cell Sci Vol. 114, 3543-3555.
- Flesch FM & Gadella BM (2000) “Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization” Biochem Biophys Acta Vol. 1469, 197-235.
- Florman HM & Babcock DF (1991) “Progress toward understanding the molecular basis of capacitation” En: “Elements of mammalian fertilization” Wassarman PM (Ed.) Vol. 1 Boca Raton, Florida, CRC Press. Pag. 105-132.
- Florman HM & Ducibella T (2006) “Fertilization in mammals” Neill JD (Ed). The physiology of reproduction 1. San Diego: Elsevier Press, pp 55–122.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam LG, Li C, O'Toole CM (1999) “An intimate biochemistry: egg-regulated acrosome reactions of mammalian sperm” Adv Dev Biochem Vo. 5, 147-186.
- Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, Scibona M, Menchini Fabris F, Francavilla F, Francavilla S, Giovampaola CD, Rosati F (1998) “Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 Kda sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit wich is necesary to penetrate zona-free hamster eggs” Mol Hum Reprod Vol. 4, 119-125.
- Fornés MW & De Rosas JC (1991) “Interactions between rat epididymal epithelium and spermatozoa” Anat Rec Vol. 231, 193-200.
- Foster JA, Friday BB, Maulit MT, Blobel C, Winfrey VP, Olson GE, Kim KS, Gerton GL (1997) “AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins” J Biol Chem Vol. 272, 12714-12722.
- Fraser LR (1985) “Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa in vitro” J Reprod Fertil Vol. 74, 185-196.
- Fraser LR & Drury LM (1975) “The relationship between sperm concentration on fertilization in vitro of mouse eggs” Biol Reprod Vol. 13, 513–518.

- Frayne J, Hurd EA, Hall L (2002) “Human tMDC III: a sperm protein with a potential role in oocyte recognition” Mol Hum Reprod Vol. 8,817-822.
- Frenette G & Sullivan R (2001) “Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface” Mol Reprod Dev Vol. 59, 115-121.
- Frenette G, Girouard J, Sullivan R (2006) “Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis” Biol Reprod Vol. 75, 885-890.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W (1991) “E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells” J Cell Biol Vol. 113, 173-185.
- Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amani M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry ACF (2008) “Mammalian phospholipase C induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix” Deve Biol Vol. 274, 370-383.
- Furlong LI, Harris JD, Vazquez-Levin MH (2005) “Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I Studies with recombinant human ZPA, ZPB, and ZPC” Fertil Steril Vol. 83, 1780-1790.
- Fusi FM & Bronson RA (1992) “Sperm surface fibronectin. Expression folowing capacitation” J Androl Vol. 13, 28-35.
- Fusi FM, Vignali M, Busacca M, Bronson RA (1992) “Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes” Mol Reprod Dev Vol. 31, 215-222.
- Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, Montesano M, Ferrari A, Bronson RA (1996) “The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state” Mol Hum Reprod Vol. 2, 169-175.
- Galli C & Lazzari G (2008) "The manipulation of gametes and embryos in farm animals" Reprod Domest Anim Vol. 43, 1-7.
- Ganguly A, Sharma RK, Gupta SK (2008) “Bonnet Monkey (Macaca radiata) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins” Mol Reprod Dev Vol. 75, 156-166.
- Gaudreault C, Montfort L, Sullivan R (2002) “Effect of immunization of hamsters against recombinant P26h on fertility rates” Reproduction Vol. 123, 307–313.
- Geisbrecht ER & Montell DJ (2002) “Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration” Nat Cell Biol Vol. 4, 616-620.
- Geng JG, Raub TJ, Baker CA, Sawada GA, Ma L, Elhammer AP (1997) “Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectin on acrosomal membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions” J Cell Biol Vol. 137, 743-754.
- Gianfortoni JG & Gulyas BJ (1985) “The effect of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on in vitro fertilization, zona solubility, and embryonic development” Gamete Res Vo. 11, 59-68.
- Godt D & Tepass U (1998) “Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion” Nature Vol. 395, 387-391.
- Gong X, Dubois DH, Miller DJ, Shur BD (1995) “Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm” Sci Vol. 269,1718-1721.

- Gooding JM, Yap KL, Ikura M (2004) “The cadherin-cattenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures” Bioessays Vol. 26, 497-511.
- Goodwin M, Kovacs EM, Thoreson MA, Reynolds AB, Yap AS (2003) "Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation" J Biol Chem Vol. 278, 20533-20539.
- Golestaneh N, Beauchamp E, Fallen S, Kokkinaki M, Üren A, Dym M (2009) “Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells” Reproduction Vol. 138, 151–162.
- Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG (2000) “Methylation patterns of the E-cadherin 5´CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression” J Biol Chem Vol. 275, 2727-2732.
- Granados-Gonzalez V, Aknin-Seifer I, Touraine RL, Chouteau J, Wolf JP, Levy R (2008) “Preliminary study on the role of the human IZUMO gene in oocyte-spermatozoa fusion failure” Fertil Steril Vol. 90, 1246-1248.
- Green SK, Karlsson MC, Ravetch JV, Kerbel RS (2002) “Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer” Cancer Res Vol. 62, 6891-6900.
- Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Marin-Deleon PA (2008) “Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model” Mol Reprod Dev Vol. 75, 1627-1636.
- Gumbiner B & Simons K (1987) “The role of uvomorulin in the formation of epithelial occluding junctions” Ciba Found Symp Vol. 125, 168-186.
- Gumbiner BM (1996) “Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis” Cell Vol. 84, 345–357.
- Gumbiner BM (2005) “Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis” Nat Rev Mol Cell Biol Vol. 6, 622-634.
- Hamatani T, Tanabe K, Kamei K, Sakai N, Yamamoto Y, Yoshimura Y (2000) “A monoclonal antibody to human SP-10 inhibits in vitro the binding of human sperm to hamster oolemma but not to human Zona pellucida” Biol Reprod Vol. 62, 1201-1208.
- Hammami-Hamza S, Doussau M, Bernard J, Rogier E, Duquenne C, Richard Y, Lefèvre A, Finaz C (2001) “Cloning and sequencing of SOB3, a human gene coding for a sperm protein homologous to an antimicrobial protein and potentially involved in zona pellucida binding” Mol Hum Reprod Vol. 7, 625-632.
- Hall SH, Yenugu S, Radhakrishnan Y, Avellar MC, Petrusz P, French FS (2007) “Characterization and functions of beta defensins in the epididymis” Asian J Androl Vol. 9, 453-462.
- Hao Z, Wolkowicz MJ, Shetty J, Klotz K, Bolling L, Sen B, Westbrook VA, Coonrod S, Flickinger CJ, Herr JC (2002) “SAMP32, a testis-specific, isoantigenic sperm acrosomal membrane-associated protein” Biol Reprod Vol. 66, 735-744.
- Harayama H, Magargee SF, Kunze E, Shidara O, Iwamoto E, Arikawa S, Miyake M, Kato S, Hammerstedt RH (1999) "Changes in epididymal protein anti-agglutinin on ejaculated boar spermatozoa during capacitation in vitro" Reprod Fertil Dev Vol. 11, 193-199.

- Hardy DM & Garbers DL (1994) “Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg” J Biol Chem Vol. 269, 19000-19004.
- Hayasaka S, Terada Y, Inoue N, Okabe M, Yaegashi N, Okamura K (2007) “Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients” Fértil Steril Vol. 88, 214-216.
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI (1997) “N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma” Cell Adhes Commun Vol. 4, 399-411.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) “Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis” J Cell Biol Vol. 148, 779-790.
- Hendrick JL (2008) “Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development” Int J Dev Biol Vol. 52, 683-701.
- Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI (1996) “Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system” Genes Dev Vol. 10, 985-996.
- Hermo L & Jacks D (2002) "Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion" Mol Reprod Dev Vol. 63, 394-410.
- Herr JC, Flickinger CJ, Homyk M, Klotz K, John E (1990) “Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm” Biol Reprod Vol. 42, 181-193.
- Herrero MB, Mandala A, Digilioa LC, Coonroda SA, Maierb B, Herra JC (2005) “Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm–egg binding and fertilization” Dev Biol Vol. 284, 126-42.
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T (2002) “Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions” Hum Reprod Update Vol. 8, 405-2.
- Howes L & Jones R (2002) “Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization” J Reprod Immunol. Vol. 53, 181-192.
- http://rdh2010.blogspot.com/
- http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/2-mas-que-adhesion.php
- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
- http://genopole.toulouse.inra.fr/blast
- http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html
- http://www.expasy.ch/tools/dna.html
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Hu ZH, Liu Q, Shang Q, Zheng M, Yang J, Zhang YL (2002) “Identification and characterization of a new member of serpin family-HongrES1 in rat epididymis” Cell Res Vol. 12, 407-410.
- Hunter RHF, Fléchon B, Fléchon JE (1991) “Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study” Tissue Cell Vol. 23: 641-656.
- Ino Y, Gotoh M, Sakamoto M, Tsukagoshi K, Hirohashi S (2002) “Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis” Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 99, 365-370.

- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005) “The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs” Nature Vol. 434, 234-238.
- Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O (1992) “Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs” Am J Clin Pathol Vol. 98, 76-80.
- Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council-USA, 1996: Guide for the care and use of laboratory animals. Washington D.C., National academy press.
- Itagaki K, Koch WJ, Bodi I, Klöckner U, Slish DF, Schwartz A (1992) “Native-type DHP-sensitive calcium channel currents are produced by cloned rat aortic smooth muscle and cardiac alpha 1 subunits expressed in Xenopus leavis oocytes and are regulated by alpha 2- and beta-subunits” FEBS Lett Vol. 297, 221-225.
- Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K (2010) “Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization” Cell Tissue Res Vol. 340, 583-594.
- Ito K, Okamoto I, Araki N, Kawano Y, Nakao M, Fujiyama S, Tomita K, Mimori T, Saya H (1999) "Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts" Oncogene Vol. 18, 7080-7090.
- Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N (2006) "Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity" J Exp Med Vol. 203, 289-295.
- Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutiérrez-Gallego R, Jiménez-Cervantes C, Avilé M (2009) “Hamster Zona Pellucida Is Formed by Four Glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4” Journal of Proteome Research Vol. 8, 926–941.
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS (2007) “The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides” Biol Reprod Vol. 76, 561-570.
- Jha KN, Salicioni AM, Arcelay E, Chertihin O, Kumari S, Herr JC, Visconti PE (2006) “Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation” Mol Hum Reprod Vol. 12, 781-789.
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT (2005) "The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis" Biol Reprod Vol. 73, 404-413.
- Johnston DS, Turner TT, Finger JN, Owtscharuk TL, Kopf GS, Jelinsky SA (2007) “Identification of epididymis-specific transcripts in the mouse and rat by transcriptional profiling” Asian J Androl Vol. 9, 522-527.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D (2007) “Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation” Asian J Androl Vol. 9, 438-444.
- Kaji K & Kudo A (2004) “The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals” Reproduction Vol. 127, 423-429.
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000) “The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice” Nat Genet Vol. 24, 279-282.

- Kerr CL, Hanna WF, Shaper JH, Wright WW (2002) “Characterization of zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 binding sites on acrosome-intact mouse sperm” Biol Reprod Vol. 66, 1585-1595.
- Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park K-E, Kimura M, Kashiwabara S, Baba T (2006) “Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 Fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization” J Biol Chem Vol. 281, 5634–5639.
- Kim KS & Gerton GL (2003) “Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm” Dev Biol Vol. 264, 141-152.
- Kim KS, Foster JA, Gerton GL (2001) “Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis” Biol Reprod Vol. 64, 184-156.
- Kimber SJ, Bentley J, Ciemerych M, Moller CJ, Bock E (1994) “Expresión of NCAM in fertilizad pre- and preriimplantation and parthenogentically activated Mouse embryos” Eur J Cell Biol 63: 102-113.
- Kirchhoff C, Osterhoff C, Pera I, Schroter (1998) “Function of human epididymal proteins in sperm maturation” Andrología Vol. 30, 225-232.
- Klemm U, Müller-Esterl W, Engel W (1991) “Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease” Hum Genet Vol. 87, 635-641.
- Klentzeris LD, Fishel S, McDermott H, Dowell K, Hall J, Green S (1995) “A positive correlation between expression of b1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa *in vitro*” Hum Reprod Vol. 10, 728-733.
- Kohane AC, González Echeverría FM, Piñeiro L, Blaquier JA “Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa” Biol Reprod Vol. 23, 737-742.
- Koyama K, Hasegawa A, Gupta SK (2002) “Prospect for immunocontraception using the NH2-terminal recombinant peptide of human zona pellucida protein (hZPA)” Am J Reprod Immunol Vol. 47, 303-310.
- Kracun S, Harkness PC, Gibb AJ, Millar NS (2008) “Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function” Br J Pharmacol Vol. 153, 1474-1484.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986) “Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization” Fertil Steril Vol. 46, 1118-1123.
- Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K, Miyazaki S (2003) “Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B” Developmental Biology Vol. 260, 522–535.
- Laemmli UK (1970) “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4” Nature Vol. 227, 680-685.
- Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997) “Capacitation as the regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome raction and fertilization” Mol Hum Reprod Vol. 3, 175-92.
- Lapyckyj L, Castillo LF, Matos ML, Gabrielli NM, Lüthy IA, Vazquez-Levin MH (2010) “Analysis of epithelial cadherin and related proteins in IBH-6 and IBH-4 human breast cancer cell lines” J Cell Physiol Vol. 222, 596-605.

- Larson JL & Miller DJ (1999) “Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species” Mol Reprod Dev Vol. 52, 445-449.
- Lasserre A, Gonzáles-Echeverría F, MoulesC, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH (2003) “Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida” Fertil Steril Vol. 79, 1606-1615.
- Laur OY, Klingelhofer J, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM (2002) “Both the dimerization and immunochemical properties of E-cadherin EC1 domain depend on Trp(156) residue” Arch Biochem Biophys Vol. 400, 141-147.
- Lawitts JA & Biggers JD (1993) “Culture of preimplantation embryos” Methods Enzymol Vol. 225, 153-164.
- Lea IA, Richardson RT, Widgren E, O´Rand MG (1996) “Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human sperm protein, Sp17” Biochim Biophys Acta Vol. 1307, 263-266.
- Lefévre A, Martin Ruiz C, Chokomian S, Duquenne C, Finaz C (1997) “Characterization and isolation of SOB2, a human sperm protein with a potential role in oocyte membrane binding” Mol Hum Reprod Vol. 3, 507-516.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL (2004) "Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human" Hum Reprod Vol. 19, 1580-1586.
- Légaré C, Bérubé B, Boué F, Lefiévre L, Morales CR, El-Alfy M, Sullivan R (1999) “Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein” Mol Reprod Dev Vol. 52, 225-233.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000) “Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice” Science Vol. 287, 319-321.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R (2000) “Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b” J Androl Vol. 21, 700-707.
- Levy S & Robaire B (1999) "Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats" Biol Reprod Vol. 60, 1392-1401.
- Lewis JM & Kaplan WE (2009) “Anatomy and embryology of the male reproductive tract and gonadal development” En: “Infertility in the male” Lipshultz LI, Howards SS, Niederberger CS (Eds). Cuarta edición. Cambridge University Press. Capítulo 1, Pag. 1-13.
- Li Q, Ishikawa T, Miyoshi H, Oshima M, Taketo MM (2005) “A targeted mutation of Nkd1 impairs mouse spermatogenesis” J Biol Chem Vol. 280, 2831-2839.
- Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J (2000) "Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion" J Biol Chem Vol. 275, 5090-5095.
- Lin YQ, Li YJ, Wang HY, Liu J, Zhang CL, Wang WT, Liu J, Li N, Jin SH (2008) “Cloning and identification of a novel sperm binding protein, HEL-75, with antibacterial activity and expressed in the human epididymis” Hum Reprod Vol. 23, 2086–2094.
- Lin Y, Kan FWK (1996) “Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation” Biol Reprod Vol. 55, 1133-1146.
- Lin Y, Kimmel LH, Myles DG, Primakoff P (1993) “Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20” Proc Natl Acad Sci USA Vol. 90, 10071-10075.

- Litscher ES, Williams Z, Wassarman PM (2009) "Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals" Mol Reprod Dev Vol. 76, 933–941.
- Liu DY & Baker HW (1993) "Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida" Biol Reprod Vol. 48, 340–348.
- Liu DY & Baker HW (2007) "Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence" Hum Reprod Vol. 22, 1597-1602.
- Liu DY, Martic M, Clarke GN, Dunlop ME, Baker HW (1999) "An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosoma reaction" Mol Hum Reprod Vol. 5, 941-949.
- Liu DY, Martic M, Clarke GN, Grkovic I, Garrett C, Dunlop ME, Baker HW (2002) "An anti-actin monoclonal antibody inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction and hyperactivated motility of human sperm" Mol Hum Reprod Vol. 8, 37-47.
- Liu DY, Clarke GN, Baker HWG (2005) "Exposure of actin on the surface of the human sperm head during in vitro culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding" Hum Reprod Vol. 20, 999-1005.
- Liu DY, Clarke GN, Baker HW (2006) "Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosoma reaction" Hum Reprod Vol. 21, 1002-1008.
- Luconi M & Baldi E (2003) "How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility" Cell Mol Biol 49, 357-369.
- MacCalman CD, Farookhi R, Blaschuk OW (1994) "Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary" Clin Exp Metastasis Vol. 12, 276-282.
- MacCalman CD, Farookhi R, Blaschuk OW (1995) "Estradiol regulates N-cadherin mRNA levels in the mouse ovary" Dev Genet Vol. 16, 20 - 24.
- MacCalman CD, Getsios S, Tarookhi R, Blaschuk OW (1997) "Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells" Endocrinology Vol. 138, 41-48.
- Machell NH, Blaschuk OW, Farookhi R (2000) "Developmental expression and distribution of N- and E-cadherin in the rat ovary" Biol Reprod Vol. 63, 797-804.
- Mackay S, Nicholson CL, Lewis SP (1999) "E-cadherin in the developing mouse gonad" Anat Embryol Vol. 200, 91-102.
- Magerkurth C, Töpfer-Petersen E, Schwartz P, Michelmann HW (1999) "Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida influence of maturity and fertilization on mophology and sperm binding pattern" Hum Reprod Vol. 14, 1057-1066.
- Maier B, Medrano S, Sleight SB, Visconti PE, Scrable H (2003) "Developmental association of the synaptic activity-regulated protein Arc with the mouse acrosomal organelle and the sperm tail" Biol Reprod Vol. 68, 67-76.
- Maines-Bandiera SL & Auersperg N (1997) "Increased E-cadherin expression in ovarian epithelium: an early step in metaplasia and dysplasia?" Int J Gynecol Pathol Vol. 16, 250-255.
- Man Y, Hart VJ, Ring CJ, Sanjar S, West MR (2000) "Loss of epithelial integrity from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection" Am J Respir Cell Mol Biol Vol. 23, 610-617.

- Mansouri A, Spurr N, Goodfellow PN, Kemler R (1988) "Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin" Differentiation Vol. 38, 67-71.
- Martinez ML & Harris JD (2000) “Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen” J Reprod Fertil Vol. 120, 19-32.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation" Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 102, 9182-9187.
- Marí SI, Rawe V, Biancotti JC, Charreau EH, Dain L, Vazquez-Levin MH (2003) “Biochemical and molecular studies of the proacrosin/acrosin system in patients with unexplained infertility” Fertil Steril Vol. 79, 1676-1679.
- Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría MF, Harris JD, Vazquez-Levin MH (2008) “Recombinant human zona pellucida protein C produced in Chinese hamster ovary cells binds to human spermatozoa and inhibits sperm-zona pellucida interaction” Fertil Steril. Vol. 90, 879-82.
- Marín-Briggiler CI, Lapyckyj L, González Echeverría MF, Rawe VY, Alvarez Sedó C, Vazquez-Levin MH (2010) "Neural cadherin is expressed in human gametes and participates in sperm-oocyte interaction events" Int J Androl Vol. 33, 228-239.
- Marín-Briggiler CI, Veiga MF, Matos ML, Echeverría MF, Furlong LI, Vazquez-Levin MH (2008) “Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization” Mol Hum Reprod Vol. 14, 561-571.
- Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría F, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH (2003) “Calcium requirements for human sperm function *in vitro*” Fertil Steril Vol. 79, 1396-1403.
- Marquez B & Suarez SS (2004) “Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation” Biol Reprod Vol. 70,1626-1633.
- Marsden M & De Simone DW (2003) “Integrin-ECM interactions regulate cadherindependent cell adhesion and are required for convergent extension in Xenopus” Curr Biol Vol. 13, 1182-1191.
- Martin-Deleon PA (2006) “Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function” Mol Cell Endocrinol Vol. 250, 114–21.
- Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1992) "Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-*src* tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts" J Cell Biol Vol. 118, 703-714.
- Mayorga LS, Tomes CN, Belmonte SA (2007) “Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion” IUBMB Life Vol. 59, 286-292.
- McGuire JK, Li Q, Parks WC (2003) "Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium" Am J Pathol Vol. 162, 1831-1843.
- McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM (1998) “Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction” Int Rev Cytol Vol. 177, 57-112.
- Mège RM, Gavard J, Lambert M (2006) “Regulation of cell-cell junctions by cytoskeleton” Curr Opin Cell Biol Vol. 18, 541-548.
- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R-M, Cossart P (1996) "E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells" Cell Vol. 84, 923-932.

- Menkhorst E & Selwood L (2008) “Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats” Biol Reprod Col Vol. 79, 790–797.
- Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD (1991) “Sperm selection capacity of the human zona pellucida” Mol Reprod Dev Vol. 30, 346-352.
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG (2000) “Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent” J Cell Biol Vol. 149,1289-96.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD (1992) “Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding” Nature Vol. 357, 589-593.
- Miller DJ, Cross NL, Vazquez-Levin M, Shur BD (1994) “The role of sperm galactosyltransferase in fertilization: presence and possible function in humans and other mammalas” En: “Comparative spermatology: 20 years after” Baccetti B (Eds). New York, NY, Raven Press. Pagg: 569-574.
- Miranda PV, González-Echeverría F, Blaquier JA, Mahuran DJ, Tezón JG (2000) “Evidence for the participation of beta-hexosaminidasa in human sperm-zona pellucida interaction in vitro” Mol Hum Reprod Vol. 6, 699-706.
- Mitchell LA, Nixon B, Baker MA, Aitken RJ (2008) "Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa" Mol Hum Reprod Vol. 14, 235-243.
- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E (2000) “Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization” Science Vol. 287, 321-324.
- Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A (2008) “The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice” PNAS Vol. 105, 12921-12926.
- Mohan A, Nalini V, Mallikarjuna K, Jyotirmay B, Krishnakumar S (2007) “Expression of motility-related protein MRP1/CD9, N-cadherin, E-cadherin, α-catenin and β-catenin in retinoblastoma” Exp Eye Res Vol. 84, 781-789.
- Mortimer ST & Mortimer D (1990) “Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitation conditions” J Anrol Vol. 11, 195-203.
- Munro SB & Blaschuk OW (1996) "A comprehensive survey of the cadherins expressed in the testes of fetal, immature, and adult mice utilizing the polymerase chain reaction" Biol Reprod Vol. 55, 822-827.
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M (1987) “Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA” Nature Vol. 329, 341-343.
- Najy AJ, Day KC, Day ML (2008) "The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation" J Biol Chem Vol. 283, 18393-18401.
- Nakagawa S & Takeichi M (1995) “Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulationspecific expression of novel cadherins” Development Vol. 121, 1321-1332.
- Nam JS, Hirohashi S, Wakefield LM (2007) “Dysadherin: a new player in cancer progression” Cancer Lett Vol. 255, 161-169.
- Nayernia K, Adham IM, Shamsadin R, Müller C, Sancken U, Engel W (2002) “Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility” Mol Hum Reprod Vol. 8, 434-440.

- Naz RK (1999) “Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation” Biol Reprod Vol. 60, 1402–1409.
- Naz RK & Dhandapani L (2010) “Identification of human sperm proteins that interact with human zona pellucida3 (ZP3) using yeast two-hybrid system” J Reprod Immunol Vol. 84, 24-31.
- Naz RK, Rajesh PB (2004) “Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction” Reprod Biol Endocrinol Vol. 2, 75-87.
- Nicolson GL, Yanagimachi R, Yanagimachi H (1975) “Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs” J Cell Biol Vol. 66, 263-274.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999) “N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression” J Cell Biol Vol. 147, 631-644.
- Niswender GD & Nett TM (1994) "Corpus luteum and its control in infraprimate species " Knobil E, Neill JD (eds) "The Physiology of Reproduction" Raven Press, New York. US. Pag. 781-816.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001) "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1" J Cell Sci Vol. 114, 111-118.
- Nollet F, Kools P, van Roy F (2000) “Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members” J Mol Biol Vol. 299, 551-572.
- Noren NK, Niessen CM, Gumbiner BM, Burridge K (2001) "Cadherin engagement regulates Rho family GTPases" J Biol Chem Vol. 276, 33305-33308.
- Nose A, Tsuji K, Takeichi M (1990) “Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules” Cell Vol. 61, 147-155.
- Okamura D, Kimura T, Nakano T, Matsui Y (2003) “Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice” Development Vol. 130, 6423-6430.
- Ozawa M, Hoschutzky H, Herrenknecht K, Kemler R (1990) “A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin” Mech Dev Vol. 33, 49-56.
- Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C (2005) "Lysosomal targeting of Ecadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions" Mol Cell Biol Vol. 25, 389-402.
- Pastén-Hidalgo K, Hernández-Rivas R, Roa-Espitia AL, Sánchez-Gutiérrez M, Martínez-Pérez F, Monrroy AO, Hernández-González EO, Mújica A (2008) “Presence, processing, and localization of mouse ADAM15 during sperm maturation and the role of its disintegrin domain during sperm–egg binding” Reproduction Vo. 136, 41-51.
- Pate BJ, White KL, Winger QA, Rickords LF, Aston KI, Sessons BR, Li GP, Campbell KD, Weimer B, Bunch TD (2007) “Specific integrin subunits in bovine oocytes, including novel sequences for alpha 6 and beta 3 subunits” Mol Reprod Dev Vol. 74, 600-607.
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honing B, Shapiro L (2003) “Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family” Curr Opin Struct Biol Vol. 13, 690-698.
- Patil AA, Cai Y, Sang Y, Blecha F, Zhang G (2005) “Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract” Physiol Genomics Vol. 23, 5-17.

- Peluso JJ (2006) “M-cadherin mediated cell contact inhibits germinal vesicle breakdown in mouse oocytes maintained *in vitro*” Reproduction Vol. 131, 429-437.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) “Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progresión: an alliance against the epithelial phenotype?” Nat Rev Cancer Vol. 7, 415-428.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998) “A causal role for Ecadherin in the transition from adenoma to carcinoma” Nature Vol. 392, 190-193.
- Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM (2007) “E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions” Mol Biol Cell Vol. 18, 2013-2025.
- Pertz O, Bozic D, Koxh AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) “A new cristal structure, Ca^{2+} dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homo-association” EMBO Journal Vo. 18, 1738-1747.
- Pey R, Vial C, Schatten G, Hafner M (1998) "Increase of intracellular Ca2+ and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos" Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 95, 12977-12982.
- Pietrobon EO, Dominguez LA, Vicenti AE, Burgos MH, Fornés MW (2001) “Detection of the mouse acrosome reaction by acid phosphatase. Comparison with chlortetracycline and electron microscopy” J Androl Vol. 22, 96-103.
- Piko L (1979) “Gamete structure and sperm entry in mammals” En: “Fertilization” Melz CB, Monroy A (Eds.). Vol. 2, New York. Academic Press. Pag. 325-403.
- Picton HM (2001) “Activation of follicle development: the primordial follicle” Theriogenology Vol. 55, 1193-1210.
- Primakoff P & Myles DG (2002) “Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction” Science Vol. 296, 2183-2185.
- Purohit S, Brahmaraju M, Palta A, Shukla S, Laloraya M, Kumar PG (2004) "Impaired E-cadherin expression in human spermatozoa in a male factor infertility subset signifies E-cadherin-mediated adhesion mechanisms operative in sperm-oolemma interactions" Biochem Biophys Res Commun Vol. 316, 903-909.
- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J (2003) “Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs” Dev Cell Vol. 5, 33-43.
- Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD (2002) “Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction” Biol Reprod Vol. 67, 1043–1051.
- Rattanachaiyanont M, Weerachatyanukul W, Léveillé MC, Taylor T, D'Amours D, Rivers D, Leader A, Tanphaichitr N (2001) "Anti-SLIP1-reactive proteins exist on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding” Mol Hum Reprod Vol. 7, 633-640.
- Renaud-Young M & Gallin WJ (2002) "In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion" J Biol Chem Vol. 277, 39609-39616.
- Rifkin JM & Olson GE (1985) “Characterization of maturation-dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface” J Cell Biol Vol. 100, 1582-1591.

- Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML (2003) "The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells" J Biol Chem. Vol. 278, 1372-1379.
- Robaire B & Fan X (1998) “Regulation of apoptotic cell death in the rat epididymis” J Reprod Fertil Suppl Vol. 53, 211-214.
- Rochwerger L, Cuasnicu PS (1992) “Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vivo and in vitro capacitation” Mol Reprod Dev Vol. 31, 34-41.
- Rock JR, Futtner CR, Harfe BD (2008) “The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea” Dev Biol Vol. 321, 141-149.
- Rodeheffer C & Shur BD (2004) "Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding lignad that facilitates sperm adhesion to the egg coat" Development Vol. 131, 503-612.
- Rojas FJ, Brush M, Moretti-Rojas I (1999) "Calpain-calpastatin: a novel, complete calcium-dependent protease system in human spermatozoa" Mol Hum Reprod Vol. 5, 520-526.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de HA, Dunach M (1999) "Regulation of Ecadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation" J Biol Chem Vol. 274, 36734-36740.
- Rowlands TM, Symonds JM, Farookhi R, Blaschuk OW (2000) “Cadherins: crucial regulators of structure and fuction in reproductive tissues” Rev Reprod Vol. 5, 53-61.
- Rubinstein E, Ziyyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C (2009) “The molecular players of sperm–egg fusion in mammals” Sem Cell Devl Biol Vol. 17; 254–263.
- Rudolph-Owen LA, Cannon P, Matrisian LM (1998) "Overexpression of the matrix metalloproteinase matrilysin results in premature mammary gland differentiation and male infertility" Mol Biol Cell Vol. 9, 421-435.
- Rufas O, Fisch B, Ziv S, Shalgi R (2000) "Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes" Mol Hum Reprod Vol. 6, 163-169.
- Ruzzene M, Vianello F, Donella-Deana A, Deana R (1992) "Purification and characterization of two casein kinases from ejaculated bovine spermatozoa" J Biochem Vol. 112, 768-774.
- Saez F, Gilles F, Sullivan R (2003) “Epididymosomes and prostasomes: their roles in post testicular maturation of the sperm cells” J Androl Vol. 24, 149-154.
- Saling PM (1991) “How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies” Biol Reprod Vol. 44, 246-251.
- Sánchez-Gutiérrez M, Contreras RG, Mújica A (2002) “Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrana fusion with the egg plasma membrana” Mol Reprod Dev Vol. 63, 518-528.
- Sano, K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S (1993) “Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system” EMBO J Vol. 12, 2249-2256.
- SeftonM, Johnson MH, Clayton L (1992) "Syntesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development" Development Vol. 115, 313-318.
- Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, Ishikawa M (2004) "Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion" Hum Reprod Vol. 19, 639-644.
- Shetty J, Wolkowicz MJ, Digilio LC, Klotz KL, Jayes FL, Diekman AB, Westbrook VA, Farris EM, Hao Z, Coonrod SA, Flickinger CJ, Herr JC (2003) “SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchores member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen

activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction” J Biol Chem Vol. 278, 30506-30515.

- Shih HC, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Feng YZ, Kurai M, Konishi I (2004) “Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in the normal and malignant human endometrium: an inverse correlation between E-cadherin and nuclear beta-catenin expression” Anticancer Res Vol. 24, 3843-3850.

- Shiraishi K, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Kumazawa C, Nozaki K, Abe T, Tsubota K, Takeuchi T (2005) "Critical role of the fifth domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with alpha E beta 7, but not for homophilic adhesion" J Immunol Vol. 175, 1014-1021.

- Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M (1983) “The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development” Cell Vol. 35, 631-863.

- Shoeb M, Laloraya M, Kumar PG (2004) “Formation and dynamic alterations of horizontal microdomains in sperm membranes during progesterone-induced acrosome reaction” Biochem Biophys Res Commun Vol. 315, 763-70.

- Shore EM & Nelson WJ (1991) “Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells” J Biol Chem Vol. 266, 19672 - 19680.

- Siddiquey AK & Cohen J (1982) “In-vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes” J Reprod Fertil Vol. 66, 237-242.

- Siegel MS, Bechtold DS, Kopta CI, Polakoski KL (1986) “The rapid purification and partial characterization of human sperm proacrosin using an automated fast protein liquid chromatography (FPLC) system" Biochim Biophys Acta Vol. 883, 567-573.

- Sivasankar S, Brieher W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D (1999) "Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains" Proc Natl Acad Sci USA Vol. 96, 11820-11824.

- Smith SR, Fulton N, Collins CS, Welsh M, Bayne RA, Coutts SM, Childs AJ, Anderson RA (2010) “N- and E-cadherin expression in human ovarian and urogenital duct development” Fertil Steril Vol. 93, 2348-2353.

- Smith TT & Yanagimachi R (1990) “The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival” Biol Reprod Vol. 42, 450-457.

- Stappert J & Kemler RA (1994) “Short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated” Cell Adhes Commun Vol. 2, 319-327.

- Stegmayr B & Ronquist G (1982) "Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes" Urol Res Vol. 10, 253-257.

- Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O (2001) "Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis" J Biol Chem Vol. 276, 4972-4980.

- Strathdee G (2002) “Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin” Semin Cancer Biol Vol. 12, 373-379.

- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S (1986) “Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid” Gam Res Vol. 14,107-121.

- Suarez SS & Pacey AA (2006) “Sperm transport in the female reproductive tract” Hum Reprod Update Vol. 12, 23–37.

- Sullivan R (2004) “Male fertility markers, myth or reality” Anim Reprod Sci Vol. 82-83, 341-347.
- Sullivan R & Bleau G (1985) “Interaction between isolated components from mammalian sperm and egg” Gamete Res Vol. 12, 101– 116.
- Sullivan R, Frenette G, Lessard C, Legare C (2003) “Sperm antigen acquisition in the epididymis: a role for epididymosomes” En: “Epididymis III” Hinton BT, Turner T, (Eds.). Charlottesville. Van Doren Company Pag.130-136.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G (2005) “Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract” Blood Cells Mol Dis Vol. 35, 1-10.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J (2007) “Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit” Asian J Androl Vol. 9, 483-491.
- Sundfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, Nilsson O, Hellberg P, Brännström M, Janson PO, Enerback S, Hedin L (1997) “E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary” int J Cancer Vol. 74, 275-280.
- Sutovsky P (2009) “Sperm-egg adhesion and fusion in mammals” Expert Rev Mol Med 11:e11.
- Sutovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G (1997) “The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization” Dev Biol Vol. 188, 75-84.
- Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Obrink B (1987) “Trophectoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts” Development Vol. 100, 653-660.
- Takano H & Abe K (2004) “AFM studdy of surface structure changes in mouse spermatozoa associated with maturation” Methods Mol Biol Vol. 242, 85-94.
- Takeichi M (1977) “Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins” J Cell Biol Vol. 75, 464-474.
- Takeichi M (1991) “Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator” Sci Vol. 251, 1451-1455.
- Takeichi M, Watabe M, Shibamoto S, Ito F, Oda H, Uemura T, Shimamura K (1993) “Dynamic control of cell-cell adhesion for multicellular organization” C R Acad Sci Vol. 316, 813-821.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG (2003) “Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion” Biol Reprod Vol. 68, 1-9.
- Tarone G, Russo MA, Hirsch E, Odorisio T, Altruda F, Silengo L, Siracusa G (1993) “Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte” Development Vol. 117, 1369-1375.
- Tengowski MW, Feng D, Sutovsky M, Sutovsky P (2007) “Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of Theophylline- or 1,3-Dinitrobenzene-exposed rats” Biol Reprod Vol. 76, 149-163.
- Tesarik J, Drahorad J, Testart J, Mendoza C (1990) “Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosoma reaction” Development Vol. 110, 391-400.
- Thimon V, Koukoui O, Calvo E, Sullivan R (2007) "Region-specific gene expression profiling along the human epididymis" Mol Hum Reprod Vol. 13, 691-704.
- Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E (2004) “Conditional targeting of Ecadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses” Proc Natl Acad Sci U S A 101, 552-557.

- Tomes CN (2007) “Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis” Soc Reprod Fertil Vol. 65, 275-291.
- Tomes CN, Carballada R, Moses DF, Katz DF, Saling PM (1998) “Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation” Mol Hum Reprod Vol. 4, 17-25.
- Tomes CN, Michaut M, De Blas G, Visconti P, Matti U, Mayorga LS (2002) “SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction” Dev Biol Vol. 243, 326-338.
- Tomes CN, De Blas GA, Michaut MA, Farré EV, Cherhitin O, Visconti PE, Mayorga LS (2005) “alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction” Mol Hum Reprod Vol. 11, 43-51.
- Tomes CN, Roggero CM, De Blas G, Saling PM, Mayorga LS (2004) “Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis” Dev Biol Vol. 265, 399-415.
- Toshimori K (2003) “Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue” Microsc Res Tech Vol. 61, 1-6.
- Toshimori K, Saxena DK, Tanii I, Yoshinaga K (1998) “An MN9 antigenic molecule, Equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice” Biol Reprod Vol. 59, 22-29.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications” Proc Natl Acad Sci Vol. 76, 4350-4354.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BM (1998) “The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization” Exp Cell Res Vol. 240, 151-164.
- Turner TT, Gleavy JL, Harris JM (1990) “Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy” J Androl Vol. 11, 422-428.
- Turner TT (2009) “The epididymis and accessory sex organs” En: Infertility in the male. Capítulo 6. Lipshultz LT, Howards SS, Niederberger CS (Eds.). Cambridge University Press.
- Turner RM (2003) “Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?” J Androl Vol. 24, 790-803.
- Urch UA (1991) “Biochemistry and function of acrosin” En: “Elements of mammalian fertilization” Wassarman P (Ed.). Boca Raton, FL. CRC Press. Pag. 233-248.
- Urch UA & Patel H (1991) “The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysultated polysaccharides” Development Vol. 111, 1165-1172.
- Vallorosi CJ, Day KC, Zhao X, Rashid MG, Rubin MA, Johnson KR, Wheelock MJ, Day ML (2000) "Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution" J Biol Chem Vol. 275, 3328-3334.
- van Roy E & Berx G (2008) “The cell-cell adhesion molecule E-cadherin” Cell Mol Life Sci Vol 65, 3756 – 3788.
- Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G (2005) “SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions” Nucleic Acids Res Vol. 33, 6566-6578.

- Vazquez-Levin MH, Furlong LI, Veaute C, Ghiringhelli PD (2005) “An overview of the proacrosin/acrosin system in human spermatozoa” En: “Endocrinología molecular” Reventós J (Ed.) Proceedings de la Societat Catalana de Biología. Barcelona, España. Vol. 56, 1-16.
- Vazquez-Levin MH & Marín-Briggiler CI (2009) “An overview of the molecular mechanisms envolved in human fertilization” En: Infertility in the male. Capítulo 7. Lipshultz LT, Howards SS, Niederberger CS (Eds.). Cambridge University Press.
- Veaute C, Furlong LI, Cameo M, Harris JD, Vazquez-Levin MH (2009) “Antiacrosin antibodies and fertility. II. Gene immunization with proacrosin to assess the effect of immunity toward proacrosin/acrosin upon protein activities and animal fertility“ Fertil Steril Vol. 91, 1256-1268.
- Veaute C, Liu de Y, Furlong LI, Biancotti JC, Baker HW, Vazquez-Levin MH (2010) “Anti-human proacrosin antibody inhibits the zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction of ZP-bound spermatozoa” Fertil Steril Vol. 93, 2456-2459.
- Visconti PE & Kopf GS (1998) “Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation” Biol Reprod Vol. 59, 1-6.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB (2002) “Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity” J Reprod Immunol Vol. 53,133–50.
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991) “Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role” Cell Vol. 66, 107-119.
- Vo LH, Yen Ten-Yang, Macher BA, Hedrick JL (2003) “Identification of the ZPC Oligosaccharide Ligand Involved in Sperm Binding and the Glycan Structures of Xenopus laevis Vitelline Envelope Glycoproteins” Biol Reprod Vol. 69, 1822-1830.
- Volk T, Cohen O, Geiger B (1987) "Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells" Cell Vol. 50, 987-994.
- Vuento M, Kuusela P, Virkki M, Koskimies A (1984) “Characterization of fibronectin on human spermatozoa” Hoppe Seylers Z Physiol Chem Vol. 365, 757-762.
- Walsh A, Whelan D, Bielanowicz A, Skinner B, Aitken RJ, O’Bryan MK, Nixon B (2008) “Identification of the molecular chaperone, Heat Shock Protein 1 (Chaperonin 10), in the reproductive tract and in capacitating spermatozoa in the male mouse” Biol Reprod Vol. 78, 983–993.
- Wang C & Roy SK (2010) "Expression of E-cadherin and N-cadherin in perinatal hamster ovary: possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone" Endocrinology Vol. 151, 2319-2330.
- Wang H-X, Tekpetey FR, Kidder GM (2009) "Identification of WNT/β-catenin signaling pathway components in human cumulus cells" Mol Hum Reprod Vol. 15, 11-17.
- Wassarman PM (1999) “Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion” Cell Vol. 96, 175-83.
- Wassarman PM (1989) “The mammalian egg coat. Structure and fuction” Johannes Dietl (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 28.
- Wassarman PM (1988) “Zona pellucida glycoproteins” Ann Rev Biochem Vol. 57, 415-422.
- Wassarman PM (2008) “Zona Pellucida Glycoproteins” J Biol Chem Vol. 283, 24285–24289.

- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES (2001) "A profile of fertilization in mammals" Nat Cell Biol Vol. 3, E59-E64.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES (2005) “Recent aspects of mammalian fertilization research” Mol Cell Endoc Vol. 234, 95–103.
-Wassarman PM & Litscher ES (2008) “Mammalian fertilization: the egg’s multifunctional zona pellucida” Int J Dev Biol Vol. 52, 665-676.
- Weerachatyanukul, Xu H, Anupriwan A, Carmona E, Wade M, Hermo L, da Silva SM, Rippstein P, Sobón P, Sretarugsa P, Tanphaichitr N (2003) “Acquisition of Arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit” Biol Repro Vol. 69, 1182-1192.
- Weis WI, Nelson WJ (2006) “Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum“J
Biol Chem Vol. 281, 35593-355937.
- Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH (1987) "Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion" J Cell Biochem Vol. 34, 187-202.
- Whittard JD, Craig SE, Mould AP, Koch A, Pertz O, Engel J, Humphries MJ (2002) "E-cadherin is a ligand for integrin alpha2beta1" Matrix Biol Vol. 21, 525-532.
- Willert K & Jones KA (2006) “Wnt signaling: is the party in the nucleus?” Genes Dev Vol. 20, 1394–1404.
- Wilmut I & Hunter RH (1984) “Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus” Reprod Nutr Dev Vol. 24, 461-468.
- Wilson CL, Heppner KJ, Rudolph LA, Matrisian LM (1995) "The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse" Mol Biol Cell Vol. 6, 851-869.
- Wong EWP & Cheng CY (2009) “Polarity Proteins and Cell–Cell Interactions in the Testis” Int Rev Cell Mol Biol Vol. 278, 309–353.
- Wong PYD, Au CL, Nagi HK (1978) “Electrolyte and water transport in rat epididymis: its possible role in the sperm maturation” Int J Androl Vol. 2, 608-628.
- World Health Organization (1999) “WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction” Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- www.graphpad.com
- Xia W, Wong CH, Lee NP, Lee WM, Cheng CY (2005) "Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model" J Cell Physiol Vol. 205, 141-157.
- Yagi T & Takeichi M (2000) “Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity” Genes Dev Vol. 14, 1169-1180.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y (2002) “Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice” J Immunol Vol. 169, 2516-2523.
- Yamashita M, Yamagata K, Tsumura K, Nakanishi T, Baba T (2007) “Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucida” J Reprod Dev Vol. 53, 255-265.
- Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T (1998) “Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction” J Biol Chem Vol. 273, 10470-10474.

- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H (1985) “Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster” Am J Anat Vol. 172, 317-330.
- Yanagimachi R (1994) "Mammalian fertilization" En: "The Physiology of Reproduction" Knobil E, Neill JD (Eds) Raven Press, New York. US. pp. 189-317.
- Yap AS, Brieher WM, Pruschy M, Gumbiner BM (1997) "Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function" Curr Biol Vol. 7, 308-315.
- Yap AS & Kovacs EM (2003) “Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrana” J Cell Biol Vol. 160, 11-16.
- Ying X, Liu Y, Guo Q, Qu F, Guo W, Zhu Y, Ding Z (2010) “Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), a protein related to sperm maturation is involved in sperm-oocyte fusion in mouse” Reprod Biol Endoc Vol. 8, 10-19.
- Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M (1984) “Molecular nature of the calciumdependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic
cells studied with a monoclonal antibody” Dev Biol Vol. 101, 19-27.
- Yoshinaga K & Toshimori K (2003) “Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation” Microsc Res Tech Vol. 61, 39-45.
- Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R (2006) "The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38)" Dev Biol Vol. 290, 32-43.
- Yudin AI, Tollner TL, Li MW, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN (2003) “ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a macaque sperm surface-coating protein involved in the capacitation process” Biol Reprod Vol. 69, 1118-1128.
- Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH (2002) “Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts” J Reprod Immunol Vol. 54, 43-63.
- Zhang H, Martin-Deleon PA (2003) “Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor” J Androl Vol. 24, 51–8.
- Zhang H, Jones R, Martin-DeLeon PA (2004) “Expression and secretion of rat SPAM1 (2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors” Matrix Biol Vol. 22, 653–61.
- Zhang J, Wong CH, Xia W, Mruk DD, Lee NP, Lee WM, Cheng CY (2005) "Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model" Endocrinology Vol. 146, 1268-1284.
- Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW (2007) “Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs” FEBS Lett Vol. 22, 2140-2149.
- Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N (2008) "Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins" FEBS J Vol. 275, 1939-1948.
- Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, Zheng M, Leung KM, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY, Ho LS, Chung YW, Chan HC (2004) “An epididymis specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation” Nat Cell Biol Vol. 6, 458-464.

- Zhou Y, Zheng M, Shi Q, Zhang L, Zhen W, Chen W, Zhang Y (2008) “An epididymis-specific secretory protein HongrES1 critically regulates sperm capacitation and male fertility” PLoS ONE 3(12): e4106.
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM, Leckband D (2003) "Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion" Biophys J Vol. 84, 4033-4042.
- Ziv S, Rufas O, Shalgi R (2002) "Cadherins expression during gamete maturation and fertilization in the rat" Mol Reprod Dev Vol. 62, 547-556
- Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP (2006) “CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion” J Cell Sci Vol. 119, 416-424.