



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

## TESIS DE DOCTORADO

***“Fecundación en el anfibio *Bufo arenarum*:  
Rol de las Integrinas y Proteínas de Estrés Térmico”***

Presentada por Valeria Mouguelar  
Rosario-Argentina  
-2013-

**“Fecundación en el anfibio *Bufo arenarum*:  
Rol de las Integrinas y Proteínas de Estrés Térmico”**

Valeria S. Mouguelar  
Licenciada en Biotecnología, UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario y en la Cátedra de Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril del 2008 y Marzo del 2013, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Coux.

Dra. Gabriela Coux  
Dra. Mónica H. Vazquez-Levin  
Dra. Marcela A. Michaut  
Dr. Pablo Armas  
Defendida:

## AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento más profundo es para Gabriela. Por haber estado ahí a cada paso de este largo camino. Por su generosidad y dedicación. Por el tiempo que invirtió en mí, desde las charlas para discutir experimentos hasta la agotadora corrección de esta Tesis. Por haberme enseñado tanto. Porque cuando tuvimos todo en contra, supimos remar para el mismo lado.

A mis padres, por apoyarme y por darme la tranquilidad de saber que cuento con ellos de manera incondicional. A Tatita en particular, por enseñarme que esta vida es para los que la pelean!!! Que nunca hay que bajar los brazos, que podemos caer una y cien veces pero jamás rendirnos. A mi hermana Lorena por ser una persona tan especial y si bien la familia no se elige, a ella la elegiría una y mil veces. A Silvio, por ser tan buen cuñado, por tener un corazón noble y brindar siempre lo mejor de sí, sin esperar nada a cambio. A mis dos príncipes: Alejandro y Agustín, porque desde que están en este mundo me dan fuerza y razones para seguir adelante. Por provocarme tanta ternura. Porque es imposible mirarlos sin que te saquen una sonrisa. Por darme una misión en la vida: cuidarlos, mimarlos y asegurarme de que sean personas felices.

A Reinier, por su amistad, su contención, su paciencia, sus mil maneras de demostrar cariño. Por hacerme tanto bien en el día a día. Porque tenemos un camino por delante...un camino que recién empieza y muchos sueños por cumplir.

A mis amigas de toda la vida: Cecilia, Julieta P., Mariana, y Julieta B. Por ahorrarme el psicólogo con tantas charlas que funcionan de terapia. Por compartir conmigo alegrías y tristezas. Por estar ahí siempre, para brindarme consejos y críticas sanas. Por ayudarme a crecer.

A Gerardo por ser un excelente amigo ayer y siempre.

A mis amigos del laboratorio con los cuáles compartí tantas cosas lindas: Claudita, Luchy, Pablito y Rodri. Por ser tan lindas personas!!! Por ese LAB 3 que me permitió conocerlos. Porque hicieron que mi trabajo fuese mucho más placentero con su compañía.

A las "Mosquitas Muertas"!!! ese grupo de "apoyo espiritual" capaz de sacarme tantas carcajadas. Por las cenas compartidas. Por escucharme, por escucharlas. Por hacer que cada vez que volvía a mi casa, cerrara la puerta y pensase...qué bueno que fui!!!!

A toda la gente que alguna vez fue parte de "Biología"...y a pesar de que ahora estemos más dispersos sé que nos vamos a seguir viendo. En especial a Claudia Banchio por ayudarme siempre, desde lo académico hasta lo personal.

A Nora Calcaterra, por su sinceridad y su generosidad. Por haberme abierto las puertas de su laboratorio para que terminara esta Tesis y por haberme hecho sentir parte de su grupo de trabajo.

A Pablo Armas, por haber sido mi tutor de Tesis. Por haber escuchado con atención cada uno de mis seminarios y haber aportado preguntas e ideas enriquecedoras.

Al grupete “zebrafish”: Eze, Nico, Anto por ser tan buenos compañeros y haberme hecho más sencilla la transición LAB3 → LAB4.

A todos los docentes de Biología, desde la “A2A” hasta los profesores de Teoría. Porque junto a uds. pude aprender (y lo sigo haciendo) el arte de enseñar. Porque dando clases en esta cátedra he podido transmitir el amor que siento por la Biología.

## DIVULGACIÓN

**Parte de los resultados que se presentan en este Trabajo de Tesis han sido dados a conocer a través de las siguientes publicaciones internacionales:**

“The integrin-binding motif RGDS induces protein tyrosine phosphorylation without activation in *Bufo arenarum* (Amphibia) oocytes.”

**Mouguelar VS**, Cabada MO, Coux G.

Reproduction. Mayo del 2011; 141(5):581-93.

“Amphibian Oocytes Release Heat Shock Protein A During Spawning: Evidence for a Role in Fertilization.”

**Mouguelar VS**, Coux G.

Biology of Reproduction. Agosto del 2012; 87(2):33.

**Parte de los resultados que se describen en este Trabajo de Tesis han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:**

**Mouguelar, V.S.**; Coux, G. “Activación de la proteína Spleen Tyrosine Kinase (SYK) durante la fecundación de *Bufo arenarum*.” Reunión Anual 2012 de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS), que tuvo lugar en la ciudad de Rosario entre los días 3 y 5 de Octubre de 2012.

**Mouguelar, V.S.**; Coux, G. “Señalización intracelular mediada por integrinas en el proceso de fecundación del anfibio *B. arenarum*.” Congreso internacional sobre “Proteómica” que tuvo lugar en La Habana, Cuba, entre el día 5 y 10 de Diciembre de 2011.

Coux G.; **Mouguelar, V.S.** “Amphibian oocytes release HSP70 during spawning: possible role in fertilization.” XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), que tuvo lugar en Potrero de los Funes, San Luis, entre el 30 de Octubre y el 2 de Noviembre del 2011.

**Mouguelar, V.S.**; Coux, G. “Participación de integrinas presentes en el ovocito de *Bufo arenarum* en la cascada de señalización activada por la fecundación.” XII Jornada Multidisciplinaria de la Sociedad Argentina de Biología (SAB), que tuvo lugar en Capital Federal, Buenos Aires, entre el 1 y 3 de Diciembre del 2010.

Coux G.; **Mouguelar V.S.** “RGDS induces protein tyrosine phosphorylation without activation in *Bufo arenarum* (amphibia) oocytes.” “The First South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine”, que tuvo lugar en Los Cocos, Córdoba, entre el 24 y 28 de Octubre del 2010.

**Mouguelar, V.S.;** Cabada, M. O.; Coux, G. "Role of oocyte integrin in fertilization-induced signal transduction in *Bufo arenarum*." XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), que tuvo lugar en San Miguel de Tucumán, Tucumán, entre el 10 y 13 de Noviembre del **2009**.

**Mouguelar, V.S.;** Cabada, M. O.; Coux, G. "Presence and role of  $\beta$ 1 integrin in the gametes of the amphibian *Bufo arenarum*." XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), que tuvo lugar en Villa Carlos Paz, Córdoba, entre el 8 y 11 de Noviembre del **2008**.

Coux, G.; **Mouguelar, V.S.;** Cabada, M. O. "Hsp70 expression and protein tyrosine phosphorylation in *Bufo arenarum* oocytes during fertilization." XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), que tuvo lugar en Mar del Plata, Buenos Aires, entre el 17 y 20 de Noviembre del **2007**.

**Mouguelar, V.S.;** Cabada, M. O.; Coux, G. "Detección de integrina beta 1 en ovocitos y efecto de su péptido blanco RGDS en la fecundación del sapo criollo (*Bufo arenarum*)." VIII Congreso- XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, que tuvo lugar en Rosario los días 5, 6 y 7 de Diciembre del **2006**.

**Mouguelar, V.S.;** Cabada, M. O.; Coux, G. "Hsp70 and integrin beta 1 in *Bufo arenarum* oocytes: their role during fertilization." XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), que tuvo lugar en Rosario, Santa Fe, entre el 12 y 15 de Noviembre del **2006**.

## ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

Abs	Absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
aprox.	aproximadamente
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ATP	adenosina 5' trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	concentración de calcio intracelular
cél	células
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
COOH	carboxilo
csp	cantidad suficiente para
c/u	cada uno
dNTPs	2'-desoxinucleótidos 5'-trifosfato
DO	densidad óptica
DSP	ditiobis (propionato de succinimidilo)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico (del inglés "Epidermal Growth Factor")
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
EV	envoltura vitelina
EW	agua de huevo o difundido total (del inglés "Egg Water")
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	agua destilada
HRP	peroxidasa del rábano picante (del inglés "horseradish peroxidase")
IEF	isoelectroenfoque
Ig	inmunoglobulina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
λ	longitud de onda
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mA	miliampere
min	minutos
mpf	minutos post fecundación
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
nt	nucleótidos
O.N.	durante toda la noche (del inglés: "over night")

pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas (del inglés “ <u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”)
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
PIPES	ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico
poli(A)	poliadenina
p/v	peso en volumen
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RGDS	Arginina-Glicina-Aspártico-Serina
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
TPCK	tosil fenilalanil clorometil cetona
Tris	N-tris(hidroximetil) aminometano
v/v	volumen en volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactósido
ZP	zona pelúcida

## ANGLICISMOS

<i>Knock out</i>	Técnica genética que consiste en suprimir la expresión de un gen específico en un organismo. El gen original es sustituido por una versión modificada del mismo, la cual ha sido mutada para generar una versión no funcional, incapaz de producir la proteína que era codificada por el gen original.
Northern blot	Técnica de detección de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) de una secuencia dada dentro de una mezcla compleja. Las moléculas de ARN son separadas mediante electroforesis y transferidas a un soporte sólido. Finalmente, la secuencia de interés es detectada mediante la hibridación de la misma con una sonda molecular específica marcada radiactiva o químicamente.
Western blot	Técnica analítica usada para detectar proteínas (previamente separadas por electroforesis y transferidas a soporte sólido) mediante la utilización de anticuerpos específicos.

## INDICE GENERAL

Agradecimientos	i
Divulgación	iii
Abreviaturas y Símbolos	v
Anglicismos	vi
Índice General	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tablas	xv
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1 La generación de un nuevo ser vivo	4
I.1.1 Reproducción Sexual versus Reproducción Asexual	4
I.2 Fecundación	4
I.2.1 Etapas de la Fecundación	5
I.3 Las Gametas	5
I.3.1 Ovocito	6
I.3.1.1 Estructuras que recubren a los ovocitos	6
I.3.2 Espermatozoide	7
I.4 Descripción del modelo en estudio: <i>Bufo arenarum</i>	9
I.5 Características particulares de las etapas previas que llevan a la fusión de las gametas	10
I.5.1 Transporte de los ovocitos a través del oviducto	10
I.5.2 Interacción espermatozoide - Cubierta Gelatinosa	11
I.5.3 Interacción espermatozoide - Envoltura Vitelina (Inducción de la Reacción	12
Acrosómica)	
I.5.4 Activación del ovocito - Reacción Cortical - Bloqueo de la poliespermia - Inicio	13
del Desarrollo Embrionario	
I.6 Proteínas involucradas en la Interacción a nivel de membranas plasmáticas en distintos	18
modelos	
I.6.1 Tetraspaninas: CD9, CD81, CD151.	19
I.6.2 Izumo	20
I.6.3 Proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI)	21
I.6.4 Uroplaquina III	22
I.6.5 CRISP	22
I.6.6 Cadherinas	23

I.6.7 ADAM	24
I.6.8 Heat Shock Proteins (HSP)	26
I.6.9 Integrinas	27
I.6.10 Otras	31
I.6.10.1 En Espermatozoides	32
I.6.10.2 En Ovocitos	33
I.7 En el anfibio anuro <i>Bufo arenarum</i>	33
I.7.1 INTEGRINAS	33
I.7.2 HSPs	34
II. OBJETIVOS	36
II.1 Objetivo General	36
II.2 Objetivos Particulares	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
III.1 Obtención de Animales	37
III.2 Obtención de Gametas y Embriones	37
III.2.1 Ovocitos	37
III.2.2 Espermatozoides	37
III.2.3 Embriones: fecundación <i>in vitro</i>	38
III.3 Experimentos de entrecruzamiento de ovocitos enteros	38
III.4 Tratamiento de ovocitos con Genisteína	39
III.5 Tratamiento de ovocitos con el ionóforo de calcio A23187	39
III.6 Aislamiento de envoltura vitelina	39
III.7 Obtención de agua de huevo o difundido total	39
III. 8 Ensayos de inhibición de la fecundación en presencia de los anticuerpos anti $\beta$ 1 integrina (M-106) o anti HSPA (DNAK)	40
III.8.1 Ensayo de inhibición de la fecundación	40
III.8.2 Análisis Estadístico	40
III.9 Obtención de proteínas transgénicas en <i>Escherichia coli</i>	41
III.9.1 HSPA	41
III.9.1.1 Inducción de la expresión de proteínas fusionadas a poli-histidina	41
III.9.1.2 Purificación de la proteína HSPA Humana Recombinante	41
III.9.2 CNBP-Tiorredoxina	41
III.10 Ensayos de unión de la proteína HSPA recombinante a espermatozoides	41

III.10.1 Ensayos realizados con concentraciones variables de HSPAr	41
III.10.2 Ensayos de competencia con BSA	42
III.10.3 Ensayos de competencia con EW	42
III.11 Análisis de la viabilidad de los espermatozoides	42
III.11.1 Ensayo con Azul de Tripán	42
III.11.2 Ensayo de reducción de MTT	43
III.11.3 Análisis Estadístico	43
III.12 Extractos proteicos de espermatozoides	43
III.12.1 Extracción con el detergente SDS	43
III.12.2 Extracción con el detergente Tritón X-100	44
III.13 Fraccionamiento subcelular de ovocitos y embriones	44
III.13.1 Aislamiento de Membranas Totales y Citosol	44
III.13.2 Aislamiento de Membranas Plasmáticas	45
III.14 Determinación de la concentración de proteínas	45
III.15 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes:	46
SDS-PAGE	
III.15.1 Preparación de las muestras	46
III.15.2 Preparación de geles en una dimensión	46
III.16 Geles Bidimensionales	46
III.16.1 Preparación de muestras	46
III.16.2 Isoelectroenfoque	47
III.17 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	47
III.17.1 Tinción con Azul de Coomassie	47
III.17.2 Tinción con Plata	47
III.18 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa:	48
Western blot	
III.18.1 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	48
III.18.2 Tinción de proteínas en membrana	48
III.18.3 Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (Western blot)	48
III.18.3.1 Anticuerpos y reactivos utilizados en los ensayos de inmunodetección	48
III.18.3.2 Protocolo de Inmunodetección	49
III.18.4 “Stripping” de membranas de nitrocelulosa	50
III.19 Inmunofluorescencia Indirecta y Microscopía Confocal	50
III.19.1 Ovocitos	50

III.19.2 Espermatocitos	51
III.20 Obtención de ARN total de distintos tejidos/células	52
III.20.1 Extracción del ARN	52
III.20.2 Estimación de la pureza del ARN	52
III.20.3 Determinación de la concentración del ARN	52
III.20.4 Estimación de la integridad del ARN: Electroforesis de ARN en geles de agarosa	52
III.21 Síntesis de ADNc a partir de ARN: Reacción de Transcripción Reversa	53
III.22 Reacción en cadena de la polimerasa	54
III.23 Manipulación de moléculas de ADN	57
III.23.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	57
III.23.2 Visualización de bandas en geles de agarosa	57
III.23.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	57
III.23.4 Reacción de ligación de ADN	57
III.24 Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	58
III.24.1 Generación de células competentes	58
III.24.2 Transformación	59
III.24.3 Siembra	59
III.24.4 Selección de colonias que incorporaron el fragmento de interés	60
III.25 Análisis de colonias transformantes	60
III.25.1 Preparación de ADN plasmídico para secuenciación	60
III.25.2 Estimación de la concentración de ADN plasmídico	60
III.25.3 Secuenciación de ADN	61
III.26 Análisis, búsqueda y comparación de secuencias	61
III.27 Composición de Soluciones y Medios de Cultivo	63
IV. "Detección de integrinas en las gametas de <i>Bufo arenarum</i> "	67
IV.1 INTRODUCCION	67
IV.2 RESULTADOS	68
IV.2.1 Análisis de la expresión de subunidades integrina presentes en el ovocito mediante PCR	68
IV.2.2 Detección de subunidades integrina mediante Western blot en las gametas de <i>B. arenarum</i>	69
IV.2.3 Detección de la expresión de la integrina $\beta 1$ en la membrana plasmática de los ovocitos mediante inmunofluorescencia	74

IV.2.4 Efecto de la presencia de anticuerpos anti- $\beta$ 1 integrina en la fecundación de <i>B. arenarum</i>	76
IV.3 DISCUSIÓN	77
V. "Análisis de los eventos tempranos de fosforilación desencadenados por la fecundación"	82
V.1 INTRODUCCIÓN	82
V.2 RESULTADOS	83
V.2.1 Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación de la proteína p42 MAPK	83
V.2.2 Fosforilación/ desfosforilación de residuos tirosina en proteínas presentes en el ovocito de <i>B. arenarum</i>	87
V.2.2.1 Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS	87
V.2.2.2 Efecto de la pre-incubación con Genisteína	91
V.2.2.3 Efecto del tratamiento con Ionóforo de calcio (A23187)	93
V.2.3 Identificación y rol de la proteína de 70 kDa que se fosforila en residuos tirosina pocos minutos después de la fecundación	94
V.2.3.1 Análisis de la presencia de ARNm que codifican para las proteínas SYK, ZAP70 y TEC en ovocitos de <i>Bufo arenarum</i>	94
V.2.3.2 Spleen Tyrosine Kinase (SYK): breve reseña	100
V.2.3.3 Spleen Tyrosine Kinase: Estudio de su estado de fosforilación durante la fecundación en <i>Bufo arenarum</i>	103
V.3 DISCUSIÓN	105
VI. "Clonado y análisis molecular de la subunidad $\beta$ 1 integrina de <i>B. arenarum</i> "	113
VI.1 INTRODUCCIÓN	113
VI.1.1 Isoformas de la subunidad $\beta$ 1 integrina	114
VI.2 RESULTADOS	116
VI.2.1 Obtención de la secuencia codificante de la subunidad $\beta$ 1 de integrina que se expresa en ovocitos	116
VI.2.2 Comparación de la secuencia obtenida para <i>Bufo arenarum</i> con distintas secuencias $\beta$ 1A integrina informadas	119
VI.2.3 Análisis de la secuencia de la subunidad $\beta$ 1 integrina en <i>B. arenarum</i>	119
VI.2.3.1 Dominio extracelular	120
VI.2.3.2 Dominio transmembrana	122
VI.2.3.3 Dominio citoplasmático	123
VI.3 DISCUSIÓN	125

VII. “Detección de HSPA en las gametas de <i>Bufo arenarum</i> y análisis de su participación en el proceso de fecundación”	128
VII.1 INTRODUCCIÓN	128
VII.2 RESULTADOS	131
VII.2.1 Expresión de la proteína HSPA en ovocitos en ausencia de estrés	131
VII.2.2 Distribución subcelular de las proteínas HSPA	132
VII.2.3 Presencia de las proteínas HSPA en estructuras extracelulares	134
VII.2.4 Unión de la proteína HSPA recombinante a los espermatozoides	137
VII.2.5 Expresión de HSPA endógena en espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	140
VII.2.6 Efecto de la proteína HSPAr sobre viabilidad de los espermatozoides	142
VII.2.7 Fecundación en presencia de anticuerpos anti HSPA	143
VII.3 DISCUSIÓN	144
VIII. CONCLUSIONES	152
IX. ANEXO: Secuencias amplificadas por PCR en <i>Bufo arenarum</i>	158
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

## INDICE DE FIGURAS

Figura I.1: El ovocito.	7
Figura I.2: Espermatozoide de <i>Bufo arenarum</i> .	8
Figura I.3: Modelo en estudio. Hembra adulta del anfibio <i>Bufo arenarum</i> .	9
Figura I.4: Esquema del transporte de los ovocitos desde el ovario hasta su liberación al medio externo en anfibios anuros.	10
Figura I.5: Cambios morfológicos que se producen en los ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> luego de la activación (natural o artificial).	14
Figura I.6: Vías de transducción de señal que conllevan a la activación del ovocito.	18
Figura I.7: Familia de las integrinas.	28
Figura III.1: ADN adaptador.	54
Figura IV.1: Análisis por RT-PCR de la presencia de mensajeros que codifican para subunidades integrina en <i>Bufo arenarum</i> .	69
Figura IV.2: Análisis de la expresión de las subunidades $\beta 1$ , $\beta 3$ , $\alpha 5$ y $\alpha V$ integrina en ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> .	70
Figura IV.3: Análisis de la expresión de las subunidades $\beta 1$ , $\beta 3$ , $\alpha 5$ y $\alpha V$ integrina en espermatozoides de <i>Bufo arenarum</i> .	73
Figura IV.4: Detección por inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 1$ integrina en ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> .	75
Figura IV.5: Efecto del anticuerpo policlonal anti $\beta 1$ integrina (M-106) en la fecundación.	77
Figura V.1: Relación entre la actividad de MAPK y el arresto meiótico.	85
Figura V.2: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación de la proteína MAPK.	86
Figura V.3: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas en extractos totales de ovocitos de <i>B. arenarum</i> .	88
Figura V.4: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas presentes en muestras de membranas plasmáticas y citosólicas de ovocitos de <i>B. arenarum</i> .	90
Figura V.5: Efecto del tratamiento con genisteína en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas de ovocitos fecundados.	92

Figura V.6: Efecto del aumento artificial de la $[Ca^{2+}]_i$ en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas de ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> .	93
Figura V.7: Análisis de la presencia de ARNm que codifican para las proteínas SYK, ZAP70 y TEC mediante PCR.	95
Figura V.8: Secuencias de SYK y TEC amplificadas por RT-PCR a partir de cDNA de ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las mismas.	96
Figura V.9: Apilamiento de secuencias de SYK y TEC de distintas especies en la región que corresponde a los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de cDNA de ovocitos de <i>B. arenarum</i> .	98
Figura V.10: Estructura de la proteína Spleen Tyrosine Kinase.	101
Figura V.11: Análisis durante la fecundación del estado de fosforilación de la proteína SYK presente en el ovocito de <i>B. arenarum</i> .	104
Figura VI.1: Isoformas de la subunidad $\beta 1$ integrina humana.	114
Figura VI.2: Esquema de la estrategia utilizada para obtener la secuencia completa del ARNm que codifica para la subunidad $\beta 1$ integrina en el anfibio <i>Bufo arenarum</i> .	117
Figura VI.3: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida que corresponden a la subunidad $\beta 1$ integrina de <i>Bufo arenarum</i> .	118
Figura VI.4: Dendrograma que representa las relaciones filogenéticas entre subunidades $\beta 1A$ integrina de distintas especies.	119
Figura VI.5: Representación de los cuatro dominios ricos en cisteína presentes en la subunidad $\beta 1A$ integrina de <i>Bufo arenarum</i> .	121
Figura VI.6: Sitios potenciales de N-glicosilación en las subunidades $\beta 1A$ integrina de distintas especies.	122
Figura VI.7: Análisis comparativo del dominio transmembrana de la subunidad $\beta 1A$ integrina de distintos organismos vertebrados.	122
Figura VI.8: Comparación del dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1A$ integrina de distintos organismos vertebrados.	123
Figura VI.9: Sitios de unión de algunas de las proteínas adaptadoras que se han descrito hasta el momento dentro del dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1A$ integrina.	126
Figura VII.1: Representación lineal de los dominios presentes en las proteínas de la familia HSPA.	130
Figura VII.2: Detección de HSPA en ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> en ausencia de estrés.	131

Figura VII.3: Detección de distintas isoformas de HSPA en ovocitos de <i>Bufo arenarum</i> en ausencia de estrés.	132
Figura VII.4: Distribución subcelular de la proteína HSPA en ovocitos de <i>B. arenarum</i> .	133
Figura VII.5: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de la proteína HSPA en ovocitos de <i>B. arenarum</i> .	134
Figura VII.6: HSPA en muestras de envoltura vitelina.	135
Figura VII.7: HSPA en muestras de difundido total.	136
Figura VII.8: Unión de HSPAr a los espermatozoides de <i>B. arenarum</i> .	138
Figura VII.9: Ensayos de competencia de la unión de HSPAr a los espermatozoides de <i>B. arenarum</i> .	139
Figura VII.10: Detección por inmunofluorescencia de los sitios de unión de la proteína HSPAr a los espermatozoides de <i>B. arenarum</i> .	140
Figura VII.11: Expresión de HSPA en espermatozoides de <i>B. arenarum</i> .	141
Figura VII.12: Efecto de la proteína HSPAr sobre la viabilidad de los espermatozoides analizado mediante el ensayo de exclusión del colorante Azul de Tripán.	143
Figura VII.13: Ensayos de fecundación <i>in vitro</i> en presencia del anticuerpo anti-HSPA.	144
Figura VIII.1: Mecanismos de activación de ovocitos de anfibios.	154
Figura VIII.2: Presencia de HSPA en las gametas de <i>Bufo arenarum</i> .	156

## INDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Proteínas presentes en espermatozoides que participan en la etapa de unión con el oolema durante la fecundación.	32
Tabla I.2: Proteínas presentes en el oolema que cumplen un rol en la adhesión con la membrana del espermatozoide reaccionado.	33
Tabla III.1: Condiciones de amplificación utilizadas en las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) realizadas.	55
Tabla VI.1: Ligandos descritos para los distintos miembros de la subfamilia $\beta 1$ integrina.	113

## RESUMEN

La reproducción es un proceso biológico que permite la creación de nuevos organismos, siendo una característica común de todas las formas de vida conocidas. Las modalidades básicas de reproducción se agrupan en dos tipos: asexual o vegetativa y sexual o generativa. En todas las especies con reproducción sexual, el proceso de fecundación involucra varias etapas secuenciales en las cuales el espermatozoide debe interactuar con las distintas cubiertas que envuelven al ovocito. Múltiples estudios sugieren que las estrategias y moléculas que participan en el proceso de generación de un nuevo organismo a partir de dos células altamente diferenciadas, presentan un alto grado de conservación entre las distintas especies. Debido a esto, el análisis del proceso de fecundación en especies que se encuentran alejadas evolutivamente del humano puede brindar información no sólo de interés biológico, sino que permitirá, con el tiempo, conocer los detalles de cómo se da este proceso en nuestra especie.

El propósito de este Trabajo de Tesis fue contribuir al conocimiento actual de la biología de la reproducción en cuanto a las moléculas involucradas en la interacción que ocurre entre las gametas a nivel de las membranas plasmáticas, utilizando como modelo al anfibio anuro *Bufo arenarum*. En particular, el objetivo propuesto fue profundizar el estudio de la participación de las integrinas y de las proteínas de estrés térmico pertenecientes a la subfamilia HSPA durante la fecundación.

Las integrinas son heterodímeros formados por la unión no covalente entre dos tipos de subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . El estudio de la participación de estas proteínas durante la fecundación comenzó con el análisis de la expresión de diversas subunidades integrina tanto en ovocitos como en espermatozoides de *Bufo arenarum*. Experimentos de PCR e inmunodetección pusieron de manifiesto la presencia de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$  y  $\beta 1$  integrina en el ovocito y de la subunidad  $\alpha V$  integrina en el espermatozoide. Posteriormente, mediante ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de un anticuerpo policlonal diseñado contra el dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrina, se pudo determinar la participación de dicha subunidad  $\beta$  en el proceso. Previamente, mediante inmunofluorescencia se había detectado la presencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la membrana plasmática de cortes citológicos de ovocitos.

Sin embargo, los resultados de inhibición de la fecundación debido a la presencia del anticuerpo anti  $\beta 1$  integrina no permitían determinar si dicha subunidad cumplía un rol meramente de adhesión o si también estaba involucrada en la cascada de transducción de señales propia de la fecundación.

La comparación del patrón de fosforilación en residuos tirosina de muestras obtenidas a distintos tiempos (minutos) post-fecundación con la de ovocitos tratados con el péptido RGDS (motivo reconocido por numerosas integrinas) permitió inferir que las integrinas median eventos de transducción de señales desde la membrana plasmática del ovocito hacia el interior celular luego de la interacción con el espermatozoide. Sin embargo, no todos los cambios observados luego de la fecundación pudieron ser mimetizados mediante el tratamiento de los ovocitos con el péptido. Este resultado, junto con los obtenidos en experimentos anteriores realizados por nuestro grupo, nos permitió concluir que el péptido RGDS no sería capaz de provocar la activación de los ovocitos de *Bufo arenarum*. Sin embargo, nos sugirió que algunas señales, aunque no suficientes para activar el metabolismo del ovocito, sí podrían provenir de la señalización mediada por integrinas.

El patrón de fosforilación en restos tirosina común a ambas condiciones (minutos post-fecundación y tratamiento con RGDS) incluyó tres proteínas con pesos moleculares aparentes de 30, 60 y 70 kDa. En el contexto de la bibliografía existente, decidimos analizar la posible identidad de la proteína que presentaba un peso aparente de 70 kDa. Mediante experimentos de PCR realizados sobre ADNc obtenido de ovocitos detectamos la presencia de ARNm que codifican para la proteína Spleen Tyrosine Kinase (SYK), lo que hasta el momento no había sido descrito en ovocitos de vertebrados. Posteriormente, se analizaron muestras obtenidas a distintos tiempos post-fecundación con anticuerpos capaces de reconocer formas fosforiladas en residuos tirosina de la proteína SYK. Se pudo comprobar así, que esta proteína no sólo estaría presente en el ovocito de *B. arenarum* sino que también se activaría pocos minutos después de la fecundación. En conjunto nuestras evidencias nos permitirían sugerir que la proteína SYK sería parte de la cascada de señalización que se desencadena luego de la interacción que ocurre entre las membranas plasmáticas de las gametas.

En cuanto a las proteínas de estrés térmico de la subfamilia HSPA, se determinó la expresión de dichas proteínas en ambas gametas de *B. arenarum*, hallándose de manera

ubicua en el ovocito, y en una ubicación más acotada (acrosoma y pieza media) en el espermatozoide. Mediante ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de un anticuerpo policlonal diseñado contra HSPA se pudo demostrar la participación de esta proteína en la fecundación de *B. arenarum*.

Quizás el resultado más novedoso fue que por primera vez se obtuvieron evidencias acerca de la difusión de la proteína de estrés térmico HSPA desde la membrana plasmática del ovocito y/o alguna de sus cubiertas hacia el medio externo durante la deposición de las gametas. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran, a su vez, la unión de esta chaperona liberada con los espermatozoides de *B. arenarum*. También se determinó que como consecuencia de esta unión se produce un aumento en la viabilidad de los mismos (usando como indicador la integridad de la membrana plasmática). Esta estrategia le permitiría a un mayor número de espermatozoides llegar a encontrarse con los miles de ovocitos que son liberados por la hembra, y de esta manera generar un gran número de embriones. Debido a las condiciones adversas que enfrenta la descendencia de los organismos que presentan fecundación externa, la maximización del número inicial de embriones es central para la supervivencia de la especie, ya que sólo algunos llegan al estadio adulto.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 La generación de un nuevo ser vivo

Todo ser vivo proviene de un organismo pre-existente. Si existe alguna característica que pueda destacarse como esencia misma de la vida, ésta es la capacidad de los seres vivos de generar descendencia. Las modalidades básicas de reproducción se agrupan en dos tipos: asexual y sexual.

#### I.1.1 Reproducción Sexual vs. Reproducción Asexual

Los organismos más sencillos generan descendencia por reproducción asexual, en la que el individuo es genéticamente idéntico a su progenitor. Así, las bacterias se dividen por fisión binaria, las hidras por gemación, las estrellas marinas y algunos gusanos por regeneración, y las plantas pueden propagarse de forma vegetativa (Alberts y col., 1994). Aún cuando un organismo sea capaz de generar células haploides a través de divisiones meióticas, la reproducción puede no implicar sexo. Tal es el caso de la partenogénesis, el desarrollo de un adulto a partir de un ovocito no fecundado, común en algunos artrópodos, reptiles y anfibios.

La reproducción sexual presenta con respecto a la reproducción asexual ciertas desventajas, entre las que destacan: un mayor gasto energético en la búsqueda y lucha por conseguir pareja, una menor rapidez en la reproducción y un menor número de descendientes, entre otras. Sin embargo, tiene la ventaja biológica de promover la variación genética entre los miembros de una especie, ya que la descendencia es el producto de los genes aportados por ambos progenitores, en vez de ser una copia genética. Cuanto mayor es la variabilidad genética de una población, mayor es su tasa de evolución: cada generación expone nuevas combinaciones alélicas a la selección natural. Una población que presenta variabilidad genética puede protegerse frente a futuros cambios ambientales, ya que si éste cambia puede existir una forma minoritaria que salga favorecida con ello (Crow, 1994).

### I.2 Fecundación

La **fecundación**, también llamada **singamia**, es el proceso por el cual los gametos (masculino y femenino) se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma

derivado de ambos progenitores (Gilbert, 2000). La fecundación puede darse en el medio ambiente (fecundación externa) o dentro del sistema reproductor de la hembra (fecundación interna). La fecundación externa es propia de los animales acuáticos como los peces y anfibios.

### **I.2.1 Etapas de la Fecundación**

Existen diferencias claramente establecidas entre las distintas especies animales, determinadas principalmente por el lugar donde ocurre la fecundación. Sin embargo, hay cuatro etapas comunes a todas las especies animales (Gilbert, 2000):

1. **Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino**, incluyendo el pasaje y la interacción del espermatozoide con las diferentes matrices extracelulares del ovocito, la unión de receptores de uno a ligandos específicos del otro, el accionar de mecanismos que aseguran la especificidad de especie y la reacción acrosómica con liberación de enzimas hidrolíticas.
2. **Regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino**, que incluye la penetración de las cubiertas del ovocito, la fusión de las membranas y la puesta en marcha de mecanismos de bloqueo de la polispermia (despolarización de membrana plasmática, reacción cortical).
3. **Fusión del material genético de ambos gametos**, regenerando un genoma diploide funcional.
4. **Activación del metabolismo del cigoto para dar comienzo al desarrollo**, a través de las primeras divisiones mitóticas y la expresión de genes maternos y posteriormente cigóticos.

### **I.3 Las Gametas**

Estudiando los cromosomas de áscaris, el citólogo belga Pierre-Joseph van Beneden encontró que no todas las células contenían la misma cantidad de cromosomas. Existen en los organismos de reproducción sexual ciertas células altamente especializadas cuya dotación cromosómica está reducida a la mitad de la de una célula somática: las gametas (Gilbert, 2000).

### I.3.1 Ovocito

Los ovocitos son células altamente especializadas para la fecundación y el desarrollo de un nuevo individuo (Alberts y col., 1994). En la mayoría de los animales, son células mucho más grandes que las células somáticas. Los ovocitos se encuentran equipados con todo el material necesario para el desarrollo del embrión hasta que el nuevo individuo pueda alimentarse por sí mismo. Son por lo general esféricos u ovoides, con un diámetro que varía desde 100  $\mu\text{m}$  (mamíferos) hasta varios centímetros (aves). Los ovocitos contienen en general grandes cantidades de material de reserva: "vitelo", rico en fosfato, lípidos, proteínas y polisacáridos destinado a la nutrición del futuro embrión. La cantidad de vitelo, y consecuentemente el tamaño del ovocito, están relacionados con el tiempo de desarrollo requerido antes que el embrión pueda alimentarse a partir de sustancias presentes en el medio o de su madre.

El término ovocito se emplea para aquellas células que no han terminado aún la división meiótica. La gameta femenina que ha completado la meiosis, se denomina óvulo. Según la especie, la fecundación puede ocurrir antes o después que la meiosis se haya completado (Stricker, 1999; Miyazaki, 2006). En anfibios en particular, las gametas femeninas liberadas (durante el acoplamiento sexual o por inducción en el laboratorio) se encuentran detenidas en la segunda división meiótica, y la meiosis sólo se completa después de la fecundación.

#### I.3.1.1 Estructuras que recubren a los ovocitos

Los ovocitos de todas las especies de vertebrados están rodeados por una cubierta constituida principalmente por glicoproteínas. Esta cubierta recibe diferentes nombres en distintas especies: **envoltura vitelina** (EV) en anfibios y erizos de mar (Dumont, 1972; Hedrick & Hardy, 1991), **membrana perivitelina** en aves (Bain & Hall, 1969; Bausek y col., 2000) y **zona pelúcida** (ZP) en mamíferos (Bleil & Wassarman, 1980). Estas estructuras son homólogas en cuanto a su rol en la fecundación, y notablemente similares en cuanto a su composición. En el caso de peces recibe el nombre de **corion** (Anderson, 1967), y se lo menciona de forma separada debido a que su rol en la fecundación no coincide plenamente con el rol de los primeros. Esto se debe a que los espermatozoides de peces teleósteos no poseen acrosoma y atraviesan el corion a través de un orificio denominado micrópilo (Coward y col., 2002).

Además, en la mayoría de los ovocitos existen cubiertas adicionales a la recién mencionada (Figura I.1). En mamíferos, los ovocitos son liberados del ovario rodeados de un grupo de células foliculares denominado cúmulo oófero. Los ovocitos de vertebrados no mamíferos y de muchos invertebrados tienen cubiertas acelulares adicionales (Mengerink & Vacquier, 2001). En anfibios y equinodermos, una vez liberados del ovario y durante su tránsito por el oviducto, los ovocitos son recubiertos por una cubierta gelatinosa (ganga). Los huevos de aves, en su trayecto por el oviducto son recubiertos por albúmina y por una cubierta calcárea.

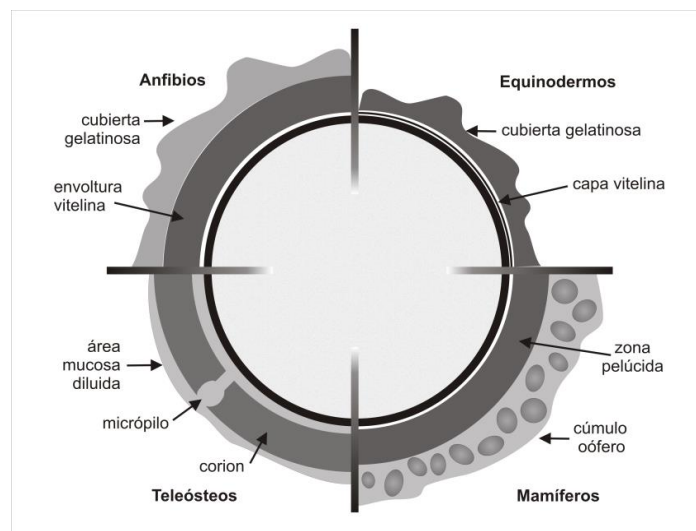


Figura I.1: El ovocito. Diagrama indicando distintos tipos de matrices extracelulares que recubren los ovocitos de algunos deuteróstomos (Adaptado de Mengerink & Vacquier, 2001).

### I.3.2 Espermatozoide

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas y presentan estructuras especializadas para lograr la función principal del espermatozoide: transportar el material nuclear presente en la cabeza del espermatozoide hasta el citoplasma del ovocito. La mayoría de los espermatozoides están formados por una cabeza y un flagelo, ambos unidos por una pieza media. La cabeza contiene al núcleo, el acrosoma y un reducido citoplasma. El volumen citoplasmático de espermatozoides de erizos de mar y humanos es de 35 y 15 fl, respectivamente (Schackmann y col., 1984; Kleinhans y col., 1992). El núcleo es haploide y presenta su cromatina altamente condensada. Por delante se aloja el

acrosoma, una vesícula membranosa que contiene enzimas hidrolíticas (ausente en la mayoría de los espermatozoides de los peces que pertenecen a la subclase *Neopterygii*).

El flagelo está compuesto por un aparato motriz constituido por el axonema, mitocondrias y estructuras citoesqueléticas. El flagelo se divide en 3 regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. En la pieza media se encuentran las mitocondrias, las cuales otorgan la energía necesaria para la motilidad flagelar (Eddy & O'Brien, 1994). El movimiento del espermatozoide está gobernado por el axonema. El axonema consiste en 9 pares de microtúbulos y 1 par central. Las dineínas son las proteínas motoras de los microtúbulos que convierten la energía química contenida en el ATP en la energía mecánica del movimiento a través de su actividad ATPasa (Gibbons, 1981).

Como se ha descrito, el espermatozoide es una célula completamente polarizada y su diversidad morfológica dentro del reino animal asombra. El espermatozoide de *Bufo arenarum* en particular, presenta una cabeza alargada con aspecto de flecha y un único flagelo (Figura I.2). La cabeza contiene al núcleo que la ocupa casi en su totalidad y por delante, como si fuera la punta de la flecha, se encuentra el acrosoma. La cola presenta una “membrana ondulante” como estructura accesoria y una fibra axial que corre paralela al axonema. La fibra axial proporcionaría mayor rigidez al flagelo, facilitando su batido.

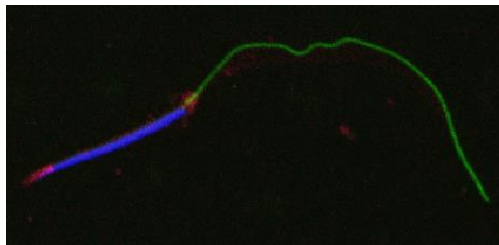


Figura I.2: Espermatozoide de *Bufo arenarum*. Inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti matriz acrosomal (tiñe acrosoma de rojo), anti tubulina (tiñe flagelo de verde) y colorante de ADN Hoechst (tiñe núcleo de azul). Foto cedida gentilmente por Emma O'Brien.

En animales de fecundación externa, como anfibios anuros, erizos de mar y peces teleósteos, los espermatozoides desarrollan el potencial para la motilidad flagelar luego de abandonar los testículos (éstas especies carecen de epidídimo).

#### I.4 Descripción del modelo en estudio: *Bufo arenarum*

En este Trabajo de Tesis se propone como modelo de estudio al anfibio anuro *Bufo arenarum* (Figura I.3), el cual se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país. Los anfibios son vertebrados primitivos, y comprenden los primeros vertebrados en vivir fuera del agua (Duellman & Trueb, 1986). Por lo que, teniendo en cuenta la ubicación taxonómica, el estudio del proceso de fecundación en estos organismos permite obtener datos importantes para la comprensión y análisis evolutivo de dicho proceso.

Los ejemplares adultos de *Bufo arenarum* varían entre 10 y 14 cm de longitud, y su peso oscila entre 120 y 180 gramos, siendo las hembras por lo general de mayor tamaño que los machos. Su piel es gruesa, cornificada, glandular, con aspecto verrugoso. Presentan coloración marrón verdoso con manchas claras y ventralmente son amarillo-grisáceos. Los miembros anteriores y posteriores poseen 4 y 5 dedos respectivamente. Los machos son reconocidos por los callos nupciales en sus dedos anteriores, siendo esta una característica sencilla para su reconocimiento (Duellman & Trueb, 1986).



Figura I.3: Modelo en estudio. Hembra adulta del anfibio *Bufo arenarum*.

Los anfibios son animales poiquiloterms y su actividad reproductora se encuentra adaptada fundamentalmente a las condiciones ambientales del medio en el que se encuentran. Los factores más influyentes en el comportamiento sexual están representados por la temperatura, el fotoperíodo, la humedad e incluso la disponibilidad de alimentos (Paniagua y col., 1990). El éxito de la reproducción en estos animales requiere de una perfecta sincronización de procesos fisiológicos y patrones de comportamiento en respuesta a una amplia variedad de estímulos ambientales. En época reproductiva (septiembre a noviembre, en el hemisferio sur) el macho y la hembra se encuentran en cuerpos de agua estancada de baja profundidad. Durante el *amplexus* (abrazo dorsal del

macho sobre la hembra) ambos deponen sus gametas simultáneamente (Duellman & Trueb, 1986). Y es en éste cuerpo de agua en donde ocurren los primeros estadios del desarrollo del embrión.

## I.5 Características particulares de las etapas previas que llevan a la fusión de las gametas

La descripción de las siguientes etapas estará centrada fundamentalmente en lo que se conoce hasta el momento en diversos modelos de anfibios y particularmente en la especie *Bufo arenarum*.

### I.5.1 Transporte de los ovocitos a través del oviducto

En *Bufo arenarum*, los ovocitos maduran y son liberados del ovario mediante inducción hormonal, cayendo en la cavidad pleuroperitoneal. Allí permanecen por un período variable de tiempo hasta ser conducidos por movimiento ciliar que presentan las células superficiales de dicha cavidad hacia la apertura del oviducto (ostium). Entonces comienza el transporte de los ovocitos a través del oviducto mediado por el movimiento ciliar y acompañado por movimientos peristálticos. El oviducto de *Bufo arenarum* es un conducto de aprox. 40 cm, que puede ser dividido morfológica y fisiológicamente en 4 porciones: *pars recta*, *pars preconvoluta*, *pars convoluta* y *ovisaco*. La función principal del oviducto en *Bufo arenarum* es la de transportar los ovocitos hacia el medio externo, así como convertir la envoltura celómica en envoltura vitelina y recubrir a los mismos con la matriz extracelular más externa, denominada cubierta gelatinosa (Figura I.4).

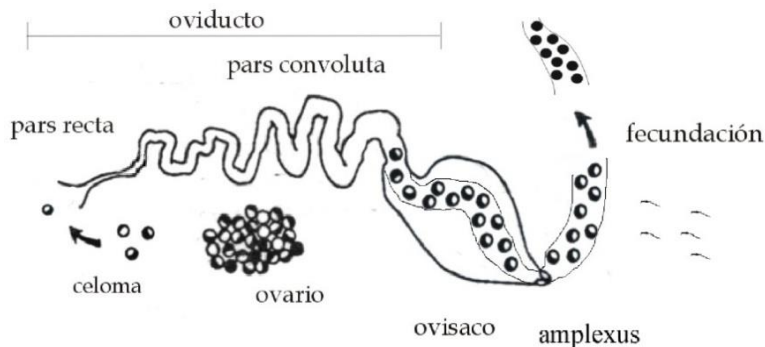


Figura I.4: Esquema del transporte de los ovocitos desde el ovario hasta su liberación al medio externo en anfibios anuros. Adaptado de Hedrick & Nishihara, 1991.

La envoltura vitelina (EV) de *Bufo arenarum* está formada por cuatro componentes mayoritarios de 120, 75, 41 y 38 kDa. La conversión de envoltura celómica a envoltura vitelina involucra la conversión hidrolítica de glicoproteínas que presentan un peso molecular de entre 45 y 55 kDa en una glicoproteína de 41 kDa (Barisone y col., 2003). La unión de espermatozoides a la EV ha sido atribuida a este componente (gp41, proteína homóloga a ZPC de *X. laevis*) tanto en *Xenopus laevis* como en *Bufo japonicus* (Omata & Katagiri, 1996; Vo & Hedrick, 2000).

La cubierta gelatinosa que adquieren los ovocitos de anfibios durante su tránsito por el oviducto se organiza en capas. En *Bufo arenarum* se han descrito hasta el momento cuatro capas, denominadas: J1, J2, J3, y J4 (Cajal, 1972). Las capas J1 y J2 son concéntricas respecto al ovocito, mientras que las capas J3 y J4 presentan una disposición longitudinal, lo que hace que las tiras de ovocitos en *Bufo arenarum* presenten una apariencia tipo “collar” (Cajal, 1972).

### **I.5.2 Interacción espermatozoide - Cubierta Gelatinosa**

En animales de fecundación externa, como los anuros, la primera interacción entre gametas se establece entre el espermatozoide y moléculas que difunden de la cubierta gelatinosa (Barbieri & Cabada, 1969). La cubierta gelatinosa libera una serie de factores en el momento de la ovodeposición que acondicionan el medio de fecundación (Fonovich de Schroeder y col., 1993). El pasaje de los espermatozoides a través de esta cubierta es considerado un requisito indispensable (Shivers & James, 1970), asociándolo con la “capacitación” del espermatozoide, en analogía con el concepto desarrollado en mamíferos. Distintos trabajos le han adjudicado al difundido total (también conocido como “Egg Water: EW”) el rol “activador” de espermatozoides de *Bufo arenarum*, aun antes de la penetración de la cubierta gelatinosa (Barbieri & Raisman, 1969; Barbieri & Cabada, 1969; Barbieri & del Pino, 1975). De hecho, ovocitos desprovistos de la misma pueden ser fecundados si se adiciona cubierta gelatinosa solubilizada o sus componentes difusibles al medio de inseminación (Barbieri & Villecco, 1966; Elinson, 1971; Barbieri & Oterino, 1972; Katagiri, 1973; Barbieri, 1976).

A diferencia de los mamíferos, la liberación equitemporal de los gametos es un requisito en anuros. Si éste no fuera el caso, el espermatozoide se tornaría infértil

rápido debido al estrés osmótico que debe soportar, lo que produce la ruptura espontánea del acrosoma. Sin embargo, ante la liberación, el espermatozoide encuentra factores difusibles de la cubierta gelatinosa y gracias a esto, su acrosoma sería capaz de resistir al estrés hipotónico. Sin embargo, poco es lo que se conoce en cuanto a la identidad de estos factores difusibles. Hasta el momento sólo se ha descrito la participación de la proteína L-HGP purificada a partir de EW de *Bufo arenarum*, la cual ha mostrado tener capacidad estabilizante del acrosoma (Arranz & Cabada, 2000; Krapf y col., 2006). A su vez, se ha comprobado que estos factores difusibles disparan eventos que llevan a que el espermatozoide adquiera capacidad fecundante (Krapf y col., 2007). Además, recientemente se ha comprobado que la señal de iniciación de la activación flagelar está dada por la hipotonicidad del medio de fecundación pero, la modulación de dicha activación está mediada por los factores difusibles que se encuentran en el EW (O'Brien y col., 2011).

La cubierta gelatinosa a su vez también cumple un rol de protección mecánica del embrión y también de protección frente a microorganismos (Katagiri, 1987). Además, ésta cubierta participa en la prevención de la fecundación cruzada entre especies y en el bloqueo de la poliespermia. Con respecto al bloqueo de la poliespermia, se ha visto que tan pronto como los ovocitos de *Bufo arenarum* alcanzan el medio acuoso, la cubierta gelatinosa se hidrata y previene la fecundación en un lapso de entre 15 y 60 min posteriores a la deposición (Cabada, 1975).

### **I.5.3 Interacción espermatozoide - Envoltura Vitelina (Inducción de la Reacción Acrosómica)**

La envoltura vitelina de anfibios anuros ha sido implicada en la unión del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica y el bloqueo de la poliespermia. Además, constituye la barrera fundamental para espermatozoides heterólogos, ocupando un rol central en los mecanismos que aseguran la especificidad de especie de la fecundación.

El rol de la envoltura vitelina en la interacción con el espermatozoide ha sido bien documentado en *X. laevis*. El grupo de Lennarz registró por primera vez, de manera cuantitativa la unión de espermatozoides a la envoltura vitelina y demostró que ocurre a

través de un mecanismo de tipo ligando-receptor que implica uno o más componentes de la cubierta (Tian y col., 1997).

La exocitosis del acrosoma tiene dos funciones principales: a) liberar el contenido del acrosoma, el cual le facilita al espermatozoide su llegada al espacio perivitelino, y b) la exposición y/o la modificación de regiones de la cabeza del espermatozoide que participan en la unión de las gametas y en la fusión de las membranas. Con lo cual, la reacción acrosómica representa un pre-requisito para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. El control espacio-temporal de este proceso es sumamente importante ya que espermatozoides no reaccionados son incapaces de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, y por otro lado, los espermatozoides reaccionados antes de tiempo son incapaces de atravesar las envolturas del mismo. Debido a esto, para que se produzca una fecundación exitosa la reacción acrosómica debe ocurrir en el momento y en el lugar adecuado (Tesarik, 1989). El lugar preciso de la reacción acrosómica, así como su inductor fisiológico varía según la especie. En ratón (y aparentemente en todos los mamíferos) la reacción es inducida por ZP3 en la zona pelúcida (Brewis y col., 1998). En anfibios, en cambio el mecanismo no está del todo dilucidado. En algunas especies (*Discoglossus pictus* y *Cynops pyrrhogaster*) se ha informado que la reacción acrosómica ocurre en la cubierta gelatinosa (Campanella y col., 1997; Onitake y col., 2000) mientras que en otras (*B. japonicus*) ocurre en la envoltura vitelina (Yoshizaki & Katagiri, 1982). En *B. arenarum*, se demostró que la reacción acrosómica es inducida por componentes de la envoltura vitelina (Barisone y col., 2002).

#### **I.5.4 Activación del ovocito - Reacción Cortical - Bloqueo de la poliespermia - Inicio del Desarrollo Embrionario**

La activación del ovocito se refiere a los eventos moleculares y celulares durante la fecundación que median la transición desde la gameta haploide al cigoto diploide (Machaca, 2007). Se inicia por un aumento de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Stricker, 1999; Miyazaki, 2006), el cual activa el metabolismo del ovocito, que previamente se encontraba en estado quiescente, comenzando así el desarrollo embrionario. Este aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  provoca la reacción cortical (exocitosis de los gránulos corticales) en la superficie del ovocito, lo cual ocasiona cambios químicos y físicos en las cubiertas del ovocito (la EV se convierte en envoltura de fecundación). Dicha

envoltura se eleva y separa de la membrana plasmática, aumentando así el espacio perivitelino. Estos mecanismos permiten evitar la poliespermia. En particular, en *Bufo arenarum*, el producto de los gránulos corticales hidroliza la región N-terminal del homólogo de ZPA (gp75), sin embargo este péptido permanece unido a la proteína mediante enlace disulfuro (Scarpeci y col., 2008). Como resultado de este ataque enzimático, la envoltura vitelina pierde capacidad de unión, probablemente debido a una modificación de la estructura tridimensional de la misma, como ha sido sugerido en mamíferos (Kiefer & Saling, 2002; Jovine y col., 2004).



Figura 1.5: Cambios morfológicos que se producen en los ovocitos de *Bufo arenarum* luego de la activación (natural o artificial). Se observa: pérdida del hendimiento, aumento del espacio perivitelino, rotación cortical, movimiento de pigmentos.

Otra consecuencia de la activación del ovocito, es que se produce la liberación del arresto meiótico lo cual permite que la división celular se complete, formándose así el pronúcleo haploide femenino. Éste, posteriormente se combinará con el pronúcleo masculino derivado del espermatozoide. La población de ARN mensajeros y proteínas maternas sufren cambios dinámicos, que incluyen la degradación, traducción o modificaciones post-traduccionales (Horner & Wolfner, 2008). Finalmente, el ADN del cigoto se duplica y comienza la primera división mitótica del embrión, iniciándose de esta manera el programa de desarrollo embrionario (Schultz & Kopf, 1995; Ducibella, 1996; Ducibella & Fissore, 2008).

Como mencionamos anteriormente, todos estos eventos se desencadenan luego de aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular. La amplitud y duración de estos picos de calcio es específico de cada especie (Stricker, 1999). En ovocitos de equinodermos y *Xenopus*, por ejemplo, el ingreso del espermatozoide genera una única onda de calcio, la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático (RE) seguido de su re-absorción demora aproximadamente 15 min (Runft y col., 2002). En ovocitos de ascidias y mamíferos, en cambio, se observa un aumento de calcio inicial que dura 3-5 min,

seguido por una serie de picos de calcio, que presentan intervalos que pueden durar varios minutos, demorando el proceso completo entre 4 a 6 horas (Jaffe, 1991; Runft & Jaffe, 2000; Jones, 2007).

Pero, ¿qué es lo que provoca ese aumento del calcio intracelular?

Hasta el momento dos son las hipótesis más aceptadas, la primera hipótesis plantea que previo a la fusión de las gametas, la interacción de un ligando presente en el espermatozoide con una proteína receptora localizada en la membrana plasmática del ovocito activaría una cascada de transducción de señal que provocaría finalmente el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en el ovocito. Dentro de esta hipótesis, los principales candidatos son a) las integrinas (sobre las que discutiremos extensamente más adelante), b) las proteínas receptoras tirosina quinasas y c) las proteínas acopladas a GTP (Figura I.6 a).

Las integrinas han sido descritas en las membranas plasmáticas de la mayoría de los ovocitos analizados; pero, sin embargo, sólo en dos modelos (*Xenopus laevis* y bovinos) se ha demostrado que la activación de dichos receptores desencadena la activación de los ovocitos (Iwao & Fujimura, 1996; Shilling y col., 1998; Campbell y col., 2000). En el caso particular de *Xenopus laevis*, el agregado externo de péptidos conteniendo la secuencia RGD provocó la liberación de  $Ca^{2+}_i$  (Iwao & Fujimura, 1996). El tratamiento con el péptido RGDS también provocó la fosforilación de una proteína de la familia Src, resultado que no pudo ser mimetizado por la activación partenogénica mediada por el ionóforo de calcio A23187, ni mediante shock eléctrico (Sato y col., 1999). Posteriormente también se comprobó que péptidos derivados de proteínas ADAM presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides de *Xenopus laevis*, son capaces de activar a los ovocitos (Shilling y col., 1998).

En el modelo bovino, la incubación de los ovocitos en soluciones que contenían péptidos del tipo RGD también provocaron la activación de los mismos, pero en este caso vale aclarar, que posteriormente, los ovocitos fueron incubados con otras sustancias que posibilitaron (en conjunto con el péptido) la activación: 6-DMAP (Campbell y col., 2000) o ciclohexamida (Sessions y col., 2006).

Las evidencias que sugieren la participación de receptores que presentan actividad Tirosina Quinasas en el proceso de activación de los ovocitos se basan fundamentalmente en la expresión artificial de dichos receptores (mediante la inyección de ARNm que codifican para estas proteínas) en ovocitos y la posterior aplicación de sus respectivos

ligandos. La unión de estos ligandos (ej.: PDGF, EGF) a sus proteínas blanco (ej.: PDGFR, EGFR) permitió mimetizar los eventos de la fecundación (cambio en el potencial de membrana, aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , exocitosis de los gránulos corticales, formación de la envoltura de fecundación, síntesis de ADN) (Shilling y col., 1994; Yim y col., 1994). Sin embargo, cabe aclarar que este tipo de experimentos sólo corroboran la presencia de distintas cascadas de transducción de señal en los ovocitos, sin que esto signifique que *in vivo*, la señalización luego de la interacción con el espermatozoide curse a través de estos receptores.

Las evidencias que avalan la participación de proteínas asociadas a GTP provienen de experimentos de activación de ovocitos debido a: 1) La utilización de un activador de proteínas G,  $GTP\gamma S$  (guanosina 5'-O-( $\gamma$ -tio) trifosfato) (Jaffe, 1990; Kline y col., 1991; Macháty y col., 1995); 2) La incubación de los mismos con ligandos (serotonina, acetilcolina) para receptores que se expresaron de manera experimental en la membrana de estas gametas (Williams y col., 1992; Shilling y col., 1994; Kim y col., 1998). Por otra parte, hay evidencias que indican que la activación de los ovocitos luego de la fecundación puede ser bloqueada por inhibidores de proteína G, como ser el compuesto  $GDP\beta S$  (análogo no hidrolizable de GDP) o la toxina pertussis (Miyazaki, 1988; Moore y col., 1994; Fissore & Robl, 1994).

La segunda hipótesis propone que, luego de la fusión de las membranas plasmáticas de ambas gametas, un factor presente en el espermatozoide sería liberado dentro del citosol del ovocito; y que, mediante su interacción con blancos citosólicos, hasta el momento desconocidos, generaría el aumento en la concentración de calcio (Figura I.6 b). Las evidencias que avalan esta teoría son: a) la inyección de extractos obtenidos de espermatozoides dentro de ovocitos de hámster y ratón causan oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  similares a las observadas durante la fecundación (Swann, 1990; Homa & Swann, 1994; Wu y col., 1997; Fissore y col., 1998); b) en la mayoría de las especies, la fusión entre el espermatozoide y el ovocito parece preceder el inicio de las oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Lawrence y col., 1997; Jones y col., 1998); c) la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, de sus siglas en inglés “*intracytoplasmic sperm injection*”) en ovocitos humanos provocó el inicio de las oscilaciones de calcio y el subsecuente desarrollo embrionario (Tesarik & Sousa, 1994; Tesarik y col., 1994). Esta técnica de

reproducción asistida fue también utilizada con éxito en otros modelos como ratón (Kimura & Yanagimachi, 1995; Nakano y col., 1997) y hámster (Horiuchi, 2006).

Un caso particular dentro de los mamíferos es el que se observa en los bovinos ya que contrariamente a los resultados observados en ovocitos humanos y de ratón luego de aplicar la técnica de ICSI, los ovocitos bovinos no progresan en el desarrollo embrionario al menos que en simultáneo se apliquen otros agentes activadores (Chung y col., 2000; Suttner y col., 2000; Oikawa y col., 2005; Malcuit y col., 2006; Abdalla y col., 2009).

Se han propuesto varios “posibles” factores espermáticos: Oscillin (Parrington y col., 1996); la forma truncada de c-kit (tr-kit) (Sette y col., 1997); PAWP (Wu y col., 2007; Aarabi y col., 2010), sin embargo, hasta el momento el candidato más aceptado es PLC $\zeta$ . La proteína fosfolipasa C zeta (PLC $\zeta$ ) ha sido propuesta como el factor espermático que estaría involucrado en la activación de ovocitos murinos, ya que su microinyección ha provocado el inicio de las oscilaciones de calcio y del desarrollo partenogénico hasta el estadio de blastocisto (Saunders y col., 2002). Posteriormente, se ha comprobado que la participación de PLC $\zeta$  en la activación sería una característica general de los mamíferos (Kashir y col., 2012). Finalmente, si bien hasta el momento todos los tipos de activación descritos se han basado en el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  previa apertura de los canales de calcio dependientes de IP<sub>3</sub>, también se ha planteado que dicho cambio en la concentración intracelular del catión podría deberse a la apertura de canales de calcio dependientes de NAADP (de sus siglas en inglés: “Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate”), como se demostró que ocurre en ovocitos de erizo de mar (Aarhus y col., 1996).

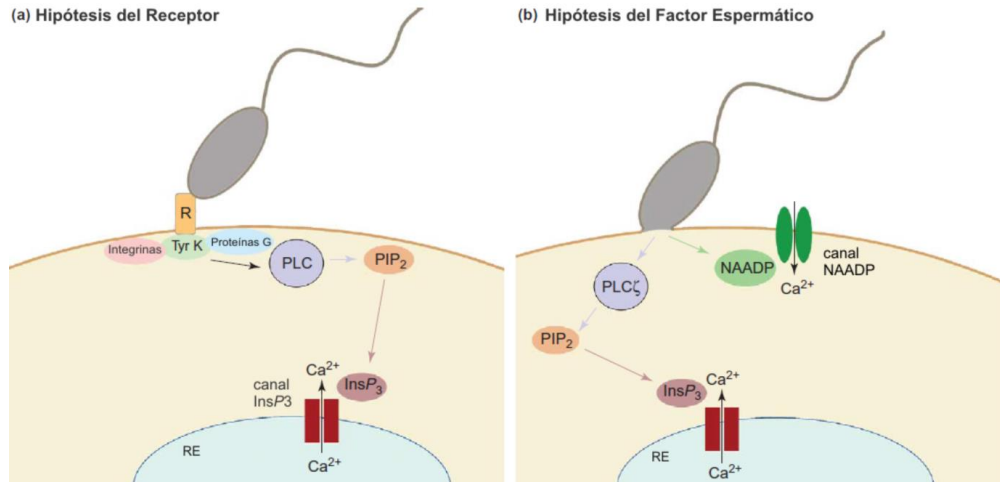


Figura I.6: Vías de transducción de señal que conllevan a la activación del ovocito. a) *Hipótesis del Receptor*: El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se debería a un aumento en la actividad de la enzima fosfolipasa C (PCL) y a su vez, este cambio estaría modulado por cascadas de señalización que involucran receptores (R) presentes en la membrana plasmática del ovocito: Integrinas, Tirosina Quinasas (Tyr K, de sus siglas en inglés “Tirosine Kinases”) ó Proteínas de unión a GTP (Proteínas G). En este modelo, la PLC que escinde al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) formando inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>) sería propia del ovocito. Posteriormente el InsP<sub>3</sub> se uniría a su receptor presente en el retículo endoplasmático (RE) y de esta forma se liberaría calcio hacia el citosol; b) *Hipótesis del Factor Espermático*: Propone que la proteína PLC $\zeta$ , encargada de aumentar la concentración de InsP<sub>3</sub> en el ovocito, proviene del espermatozoide y por lo tanto, ingresa al ovocito luego de la fusión de ambas gametas. En equinodermos se ha descrito que alternativamente, el aumento inicial en la  $[Ca^{2+}]_i$  durante la fecundación podría deberse al ingreso del compuesto ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) por medio del espermatozoide durante la fusión de las membranas. Figura adaptada de Santella y col., 2004.

Cabe aclarar, que independientemente de la vía de activación que esté cursando en una determinada especie, es requisito *sine qua non* que previamente se produzca el reconocimiento y la adhesión de las membranas plasmáticas de ambas gametas. Esto demuestra la importancia de las proteínas que participan en esta etapa, las cuales serán descritas a continuación.

### I.6 Proteínas involucradas en la Interacción a nivel de membranas plasmáticas en distintos modelos

De las distintas etapas que participan en el proceso de reconocimiento entre gametas, quizás la interacción que se da entre la membrana plasmática del ovocito y la membrana del espermatozoide luego de la reacción acrosómica, sea la etapa que presenta mayores controversias en cuanto a las moléculas que estarían involucradas. Esto se debe a

que si bien hasta la fecha se han descrito numerosas moléculas que estarían participando en esta etapa, no hay un acuerdo en cuanto a si dichas proteínas estarían cumpliendo un rol fundamental o accesorio en el proceso. La mayoría de los datos contradictorios provienen de ensayos de *knock out*. En muchos de estos casos, se ha obviado la posible compensación de proteínas de características similares, es decir, la posibilidad de que el sistema esté formado por proteínas que actúen de manera redundante.

En esta sección se hará una descripción de aquellas moléculas presentes en las membranas plasmáticas de una o ambas gametas, que se han sido involucradas en la adhesión que se da entre las mismas y en algunos casos, en la fusión de las gametas. Finalmente se profundizarán las características de aquellas proteínas que se estudiarán en este Trabajo de Tesis: INTEGRINAS y PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO.

#### **I.6.1 Tetraspaninas: CD9, CD81, CD151.**

Las tetraspaninas son proteínas integrales de membrana que presentan cuatro dominios transmembrana (Hemler, 2005; Rubinstein, 2011). CD9 es un miembro de esta familia que se expresa en numerosos tejidos de ratón. Sin embargo, el *knock out* de este gen afecta exclusivamente la reproducción de las hembras (Kaji y col., 2000; Le Naour y col., 2000; Miyado y col., 2000). Sólo el 60% de las hembras *Cd9<sup>-/-</sup>* quedan preñadas, y el tiempo que este subgrupo de animales demora en quedar preñados es mayor (Le Naour y col., 2000). Otra consecuencia de la deficiencia de la proteína CD9 es que el tamaño de la camada en las hembras *Cd9<sup>-/-</sup>* es un 25% del valor normalmente obtenido con hembras control (Le Naour y col., 2000). Además, los ovocitos *Cd9<sup>-/-</sup>* presentan una fusión espermatozoide-ovocito defectuosa (Kaji y col., 2000; Miyado y col., 2000) y una estructura anormal de las microvelocidades presentes en la superficie del ovocito (Runge y col., 2007).

Un estudio reciente, también realizado en ratón, demuestra que la proteína CD9 sería la responsable de generar sitios de adhesión responsables de la interacción más fuerte que se da entre las gametas durante la fecundación. Estos sitios de fuerte adhesión provocarían una estrecha proximidad entre las membranas ambas gametas, y por lo tanto, la fusión entre el espermatozoide y el ovocito sería una consecuencia directa de las propiedades adhesivas de la proteína CD9 presente en la membrana plasmática del ovocito murino (Jégou y col., 2011).

Cabe remarcar que si bien en el ovocito murino se expresan varios miembros de la familia de las tetraspaninas, los efectos del *knock out* de *Cd9* son severos, lo cual estaría indicando que las demás tetraspaninas presentes en el ovocito no serían capaces de compensar la ausencia de CD9. Anticuerpos anti CD9 presentan efectos inhibitorios en la unión y fusión de espermatozoides con ovocitos libres de zona pelúcida de ratones y cerdos (Chen y col., 1999; Miller y col., 2000; Li y col., 2004; Glazar & Evans, 2009). Ensayos similares realizados con gametas humanas no tuvieron efecto. Sin embargo, la fusión de espermatozoides humanos a ovocitos homólogos se ve parcialmente inhibida en presencia de anticuerpos anti CD151 (Ziyyat y col., 2006).

Contrario a los efectos contundentes observados cuando se analizaron ovocitos *knock out* para CD9 o anticuerpos anti-CD9, la alteración de otros miembros de la familia de las tetraspaninas presentes en el ovocito murino tiene efectos más sutiles. Hembras *Cd81*<sup>-/-</sup> presentan efectos modestos en la fecundación, y anticuerpos anti-CD81 tienen efectos moderados o nulos en ensayos de fecundación *in vitro*. Sin embargo, hembras *Cd9*<sup>-/-</sup>/*Cd81*<sup>-/-</sup> son completamente infértiles (Rubinstein y col., 2006).

### **I.6.2 Izumo**

Izumo es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que presenta un peso molecular de alrededor de 56 kDa en ratón y parece ser específico de testículo (Inoue y col., 2005). Esta proteína fue hallada cuando se ensayaban distintos anticuerpos monoclonales anti-espermatozoides que tuviesen un efecto en la fecundación. Izumo resultó ser el antígeno del anticuerpo OBF13, el cual es capaz de inhibir la unión espermatozoide-ovocito en ratón (Okabe y col., 1988). En humano parece haber un ortólogo de la proteína Izumo, ya que anticuerpos contra la putativa proteína Izumo humana reconocen una proteína de alrededor de 37 kDa en lisados de espermatozoides humanos e inhiben la fusión entre los espermatozoides humanos y ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (Inoue y col., 2005).

Los datos más significativos de Izumo provienen de ratones *knock out* para dicho gen. Estos ratones parecen saludables y las hembras presentan una fertilidad normal. Sin embargo, los machos *Izumo*<sup>-/-</sup> son infértiles, a pesar de que estos animales tienen comportamientos de apareamiento normales y presentan eyaculación, motilidad de los espermatozoides y migración a través del oviducto también normales (Inoue y col., 2005).

Ensayos de fecundación *in vitro* con espermatozoides deficientes en Izumo muestran que los mismos son capaces de atravesar la zona pelúcida, pero luego se acumulan en el espacio perivitelino. Este comportamiento sería un indicio de una interacción defectuosa con la membrana plasmática del ovocito.

Recientemente, la generación de una línea de ratones doble transgénica (cuyos espermatozoides expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en el acrosoma y la proteína Izumo como proteína de fusión a la proteína fluorescente roja “Cherry”) permitió evaluar mediante microscopía de fluorescencia los cambios en la localización de la proteína Izumo, a la vez que se monitoreaba el estado del acrosoma. De esta forma se pudo comprobar que si bien los espermatozoides recién eyaculados no expresan Izumo en la superficie, dicha proteína sufre un proceso de translocación desde la membrana acrosomal externa hacia la membrana plasmática a medida que dichas membranas se fusionan durante la reacción acrosómica (Satouh y col., 2012).

### **I.6.3 Proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI)**

El tratamiento de ovocitos de ratón con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (la cual libera de la superficie a aquellas proteínas que se encuentran ancladas a la membrana plasmática mediante el motivo GPI (Low & Finean, 1978)) inhibe la unión y la fusión entre los espermatozoides y los ovocitos (Coonrod y col., 1999). Por el contrario, cuando se trataron espermatozoides con dicha enzima, no se observó un efecto negativo en la fecundación (Coonrod y col., 1999). Además, ratones que no pueden expresar proteínas ancladas a la membrana mediante GPI en la superficie de los ovocitos (debido a un *knock out* condicional específico para ovocitos en el gen *Pig-a*, el cual codifica para una enzima involucrada en los primeros pasos de la ruta biosintética de GPI) son infértiles (Alfieri y col., 2003). Y aunque los ovocitos son ovulados y parecen normales, no pueden ser fecundados *in vitro* (se observaron espermatozoides en el espacio perivitelino y muy pocos embriones de dos células) (Alfieri y col., 2003). Estos resultados sugieren que la correcta interacción entre gametas depende de la presencia de proteínas unidas a la membrana plasmática del ovocito a través de glicosilfosfatidilinositol. Cabe aclarar que la ausencia de proteínas ancladas a través de GPI puede alterar la composición, la organización y/o la estructura de microdominios de la membrana plasmática del ovocito

(que se encuentran enriquecidos en estas proteínas), lo cual desfavorecería la interacción con los espermatozoides (Levental y col., 2010).

#### **I.6.4 Uroplaquina III**

En el 2005, el grupo del Dr. Fukami identificó una proteína transmembrana asociada a los microdominios de membrana (“rafts lipídicos”) de los ovocitos de *Xenopus laevis* que era rápidamente fosforilada en residuos tirosina luego de la fecundación. Dicha proteína presentaba un peso molecular de 30 kDa y fue identificada como un miembro de la familia de las uroplaquinas. Debido a su alta homología con la Uroplaquina III de mamíferos, se la denominó xUPIII. Además, se comprobó que la presencia de un anticuerpo generado contra el dominio extracelular de la proteína era capaz de bloquear la interacción de las gametas en ensayos de fecundación *in vitro*, de una manera dosis dependiente (Sakakibara y col., 2005). Como en el caso de la proteína de mamíferos UPIII, xUPIII forma un heterocomplejo con la Uroplaquina Ib (xUPIb), la cual es un miembro de la familia de las tetraspaninas (Mahbub Hasan y col., 2005).

#### **I.6.5 CRISP**

El primer rol funcional para miembros de la familia CRISP (de sus siglas en inglés: “Cysteine-rich secretory protein”) se describió para la proteína de rata CRISP1 (también conocida como DE). Originalmente localizada en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide, CRISP1 migra hacia el segmento ecuatorial luego de la reacción acrosómica (Rochwerger & Cuasnicú, 1992). Estudios de fecundación *in vitro* (en donde se usaron ovocitos de rata libres de zona pelúcida) demostraron que la presencia de tanto anticuerpos específicos contra la proteína CRISP1, como la propia proteína CRISP1 purificada, provocaban una disminución significativa en el porcentaje de penetración del ovocito. En estas condiciones, la unión entre las gametas no fue afectada lo cual fue un indicio de la participación de esta proteína en la etapa de fusión (Rochwerger y col., 1992). Los sitios complementarios para CRISP1 fueron localizados en casi toda la membrana plasmática del ovocito, con excepción de la región que se encuentra por encima del huso meiótico (Rochwerger y col., 1992). Estudios funcionales usando fragmentos recombinantes de CRISP1 y posteriormente péptidos sintéticos demostraron que la actividad biológica de unión a los ovocitos de la proteína reside en una región específica

que comprende 12 aminoácidos (denominada región S2) (Ellerman y col., 2002; Ellerman y col., 2006a). Estos aminoácidos se encuentran altamente conservados en todos los miembros de la familia CRISP. A su vez, hay evidencias que avalan la participación de proteínas homólogas a CRISP1 de rata en la fusión de las gametas de otras especies como humano y ratón (Cohen y col., 2000; Cohen y col., 2001).

Posteriormente en humanos se determinó la participación en la fusión de las gametas de otro miembro de la familia CRISP, la proteína CRISP2, mediante técnicas similares a las descritas (Busso y col., 2005). La comparación de las regiones S2 de ambas proteínas indica que las mismas difieren en sólo 2 aminoácidos con lo cual es altamente probable que ambas proteínas interactúen con los mismos sitios de unión presentes en los ovocitos. Esto a su vez, avala la idea de una cooperación funcional entre diferentes proteínas CRISP durante la fecundación.

#### **I.6.6 Cadherinas**

Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana que median funciones de adhesión dependientes de calcio (Alberts y col., 2006). Están formadas por cinco dominios extracelulares de aprox. 110 aminoácidos cada uno, un dominio transmembrana y una región citoplasmática que se encuentra altamente conservada en el carboxilo terminal de la proteína (Blaschuk & Rowlands, 2002). Dentro de esta familia se encuentran las cadherinas del tipo: E (epiteliales), N (neurales), P (de la placenta), etc. Las cadherinas E y N fueron descritas tanto en las gametas humanas (Rufas y col., 2000; Purohit y col., 2004) como de ratas (Ziv y col., 2002). Recientemente, se ha demostrado que las Cadherinas E y N estarían presentes en ambas gametas humanas y de hámster (Marín-Briggiler y col., 2008; Marín-Briggiler y col., 2010a). A su vez, existen indicios de la participación de estas proteínas en la interacción que se da entre el espermatozoide y el oolema. Mediante ensayos de fecundación *in vitro* realizados con espermatozoides humanos y ovocitos de hámster desprovistos de zona pelúcida, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos específicos anti cadherinas provoca una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fecundados (Marín-Briggiler y col., 2008; Marín-Briggiler y col., 2010a).

### I.6.7 ADAM

Las ADAM (de sus siglas en inglés: “A Disintegrin And Metalloprotease”) son proteínas transmembrana, de aproximadamente 750 aminoácidos. La mayoría presenta los siguientes dominios en su estructura: pro-dominio, metaloproteasa, desintegrina, rico en cisteínas, similar al factor de crecimiento epidérmico, transmembrana y citosólico. Hasta ahora se han descrito aproximadamente 40 miembros que pertenecen a esta familia, muchos de los cuales se expresan de manera exclusiva en testículo (Vjugina & Evans, 2008).

La proteína fertilina fue originalmente identificada mientras se analizaba una batería de anticuerpos monoclonales generados contra la superficie de espermatozoides de cobayos. Uno de estos anticuerpos (PH30) era capaz de inhibir la unión entre los espermatozoides y los ovocitos de cobayo libres de zona pelúcida (Primakoff y col., 1987). El antígeno de este anticuerpo fue posteriormente denominado fertilina, debido a su rol durante la fecundación (Myles y col., 1994). Fertilina es un heterodímero formado por la unión de las subunidades fertilina  $\alpha/\beta$  (ADAM1/ADAM2) y es el miembro de la familia ADAM que ha sido más estudiado. Ambas subunidades son procesadas proteolíticamente durante el desarrollo del espermatozoide, perdiéndose el prodominio y el dominio metaloproteasa (Blobel y col., 1990). Diferentes estudios sugieren que las proteínas ADAM tendrían un rol importante durante la fecundación, especialmente en la unión del espermatozoide con el ovocito (Myles y col., 1994; Evans y col., 1995; Cho y col., 1998; Chen y col., 1999).

Se ha descrito que dentro de la estructura de las ADAM, péptidos presentes en el dominio desintegrina serían fundamentales en la función de estas proteínas. Esferas cubiertas con péptidos sintéticos que corresponden a las secuencias del dominio desintegrina de la proteína ADAM2 se adhieren a ovocitos de cobayo (Myles y col., 1994). Además estos péptidos son capaces de inhibir la interacción entre las gametas en sistemas homólogos (cobayo (Myles y col., 1994) y ratón (Almeida y col., 1995; Yuan y col., 1997)) y heterólogos (espermatozoides humanos y ovocitos de hámster (Gichuhi y col., 1997)). Se ha demostrado que a través de este dominio desintegrina las proteínas ADAM serían capaces de interactuar con moléculas integrinas que actuarían como co-receptores en células adyacentes (integrinas presentes en la membrana plasmática del ovocito en el caso

particular del proceso de fecundación) (Almeida y col., 1995; Evans y col., 1997; Evans, 2001; Zhu & Evans, 2002; Bridges & Bowditch, 2005).

Hasta el momento se han evaluado los efectos en ratón del *knock out* de tres miembros de esta familia (*adam1*, *adam2* y *adam3*), estos *knock outs* dieron lugar a un fenotipo de ratones infértiles (Cho y col., 1998; Shamsadin y col., 1999; Nishimura y col., 2004). Sin embargo, cabe aclarar que esta infertilidad se debió a que varias de las funciones del espermatozoide fueron afectadas: reducción de la migración de los espermatozoides a través del oviducto, reducida interacción con la zona pelúcida, y/o reducida interacción con la membrana plasmática del ovocito (Cho y col., 1998; Shamsadin y col., 1999; Nishimura y col., 2001; Nishimura y col., 2004). Además, al analizarse el efecto de estos *knock outs*, se pudo comprobar que la disminución en la expresión de uno de estos miembros afectaba la expresión en la superficie del espermatozoide de otros miembros de la familia ADAM (Nishimura y col., 2004; Kim y col., 2006; Han y col., 2009).

La participación de las proteínas ADAM en el proceso de fecundación también ha sido estudiado en una especie de anfibio, la rana *Xenopus laevis*. A partir de ADNc de testículo se lograron amplificar las secuencias de cinco ADAMs diferentes. Posteriormente mediante Northern blot se determinó que una de ellas (ADAM16) era específica de testículo. Mediante ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de péptidos que correspondían al dominio desintegrina de cada una de estas proteínas ADAM se pudo observar que tres de los cinco péptidos fueron capaces de inhibir la fecundación (Shilling y col., 1997). Al año siguiente, el mismo grupo publicó un trabajo en el que demostraban que los ovocitos de *Xenopus laevis* podían ser activados mediante la aplicación de pequeños volúmenes de una solución del péptido correspondiente al dominio desintegrina de la proteína ADAM16. La aplicación de este pequeño volumen en un lugar específico, cerca de la superficie del ovocito fue capaz de mimetizar el efecto de la unión del espermatozoide al ovocito, y de esta forma provocó un aumento de la concentración de calcio intracelular que comenzó en el punto de aplicación del péptido y posteriormente se propagó como una onda a través de toda la gameta. La activación de los ovocitos a su vez, resultó depender del voltaje de la membrana plasmática al momento del agregado del péptido. La activación sólo fue exitosa si la membrana plasmática se encontraba con un potencial negativo o neutro, pero no positivo (Shilling y col., 1998). En un trabajo publicado en el 2003, se analizó en mayor detalle el dominio desintegrina de la proteína

ADAM16 de *Xenopus laevis*. Dicho péptido de 13 aminoácidos fue dividido en dos partes (amino y carboxilo terminal) y se analizó el efecto que cada uno de ellas causaba en los ovocitos. De esta forma se determinó que la región activa del dominio desintegrina estaría ubicada en el extremo amino terminal y que dicha secuencia sería capaz de adoptar una conformación de giro  $\beta$ , que sería fundamental para el efecto biológico de la proteína. La secuencia KTE presente en este dominio por lo tanto, sería la secuencia homóloga al péptido RGD presente en proteínas como el Fibrinógeno y la Fibronectina (Norris y col., 2003).

### **I.6.8 Heat Shock Proteins (HSP)**

En el 2003 se publicó un trabajo que describía la presencia de una gran variedad de proteínas de estrés térmico (HSP70, HSP90, GRP94, GRP78 y ORP150) en ovocitos murinos (Calvert y col., 2003). Previamente, sin embargo, ya se había descrito la presencia de proteínas de estrés térmico en ovocitos de bovinos (Kawarsky & King, 2001) y del anfibio *Xenopus laevis* (Bienz, 1984). A su vez, cabe remarcar que proteínas que pertenecen a esta familia, como ser HSP60, HSP70 y HSP90, no han sido sólo descritas en las gametas femeninas sino que hay reportes que indican su expresión en espermatozoides de diversas especies (Volpe y col., 2008; Kamaruddin y col., 2004; Spinaci y col., 2005; Naaby-Hansen & Herr, 2010; Asquith y col., 2004).

De esta gran familia de chaperonas se ha sugerido que las proteínas que pertenecen a la subfamilia HSP70 tendrían un rol en el reconocimiento entre gametas. Este rol durante la fecundación ha sido propuesto al analizar los resultados de ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de anticuerpos específicos contra proteínas HSP70 en bovinos (Matwee y col., 2001) y en cerdo (Spinaci y col., 2005).

En el caso particular de humanos, dos miembros de la familia HSP70: HSPA1L y HSPA2 presentan una muy alta expresión en testículo. Los niveles más altos de expresión de la proteína HSPA2 se detectaron en espermatoцитos, espermátides y en espermatozoides maduros (Son y col., 1999; Huszar y col., 2000). Recientemente se ha postulado que esta proteína tendría un papel fundamental en la regulación de la expresión de distintos complejos proteicos en la membrana plasmática del espermatozoide, los cuales mediarían el reconocimiento de esta gameta con el ovocito (Redgrove y col., 2012). En particular, en otro trabajo publicado por el mismo grupo de investigadores se plantea que HSPA2 estaría

participando en la translocación de las proteínas ARSA (arylsulfatasa A) y SPAM1 (de sus siglas en inglés: “sperm adhesión molecule 1”) durante la capacitación del espermatozoide humano y que esta re-orientación del complejo dentro de la membrana plasmática del espermatozoide sería esencial para lograr una fecundación exitosa (Redgrove y col., 2013).

A su vez, en el hombre se sabe que la presencia en suero de anticuerpos anti espermatozoides (ASA, de sus siglas en inglés: “anti sperm antibodies”) causa una enfermedad autoinmune denominada “infertilidad inmune” ya que estos anticuerpos imposibilitan la función del espermatozoide mediante su unión a la membrana plasmática de dicha gameta. En un estudio realizado en el 2001 se identificaron seis proteínas que serían reconocidas por dichos anticuerpos, y se comprobó que dos de estas proteínas (HSPA1A y HSPA1B) pertenecen a la subfamilia HSP70 (Bohring y col., 2001). Estos resultados indicarían que así como se ha visto en estudios realizados en bovinos y cerdos, la presencia de anticuerpos anti-HSP70 en humanos también afectaría de manera negativa la unión de las gametas.

Por otra parte, se ha demostrado que hay una estrecha relación entre infecciones en humanos con la bacteria *Chlamydia trachomatis* y problemas de infertilidad. Debido a la alta homología entre las proteínas de la familia HSP de bacterias y eucariotas, una infección del tracto genital prolongada y asintomática puede generar inmunidad hacia los epítopes HSP microbianos, algunos de los cuales también están presentes en las gametas humanas (Naaby-Hansen & Herr, 2010). En concordancia con esto, se ha visto que la presencia de anticuerpos IgG contra *Chlamydia trachomatis* en suero de hombres afectaría de manera negativa la tasa de embarazo (Idahl y col., 2004; Idahl y col., 2007).

### **I.6.9 Integrinas**

Las integrinas son heterodímeros constituidos por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , las cuales se encuentran asociadas de manera no covalente. Hasta la fecha en mamíferos se han identificado 18 subunidades  $\alpha$  (120-180 kDa) y 8 subunidades  $\beta$  (90-110 kDa) (Leitinger y col., 2000; Barczyk y col., 2010). Sin embargo, sólo se han hallado 24 heterodímeros diferentes, lo que demuestra que no todas las posibles combinaciones de subunidades se encuentran en la naturaleza (Hynes, 2002; Barczyk y col., 2010).

La combinación de una determinada subunidad  $\alpha$  con una dada subunidad  $\beta$ , determina el ligando al cual la proteína va a ser capaz de unirse (Hynes, 2002). De acuerdo

a los ligandos con los cuáles interactúan, las 24 integrinas pueden agruparse en 4 subfamilias (Figura I.7).

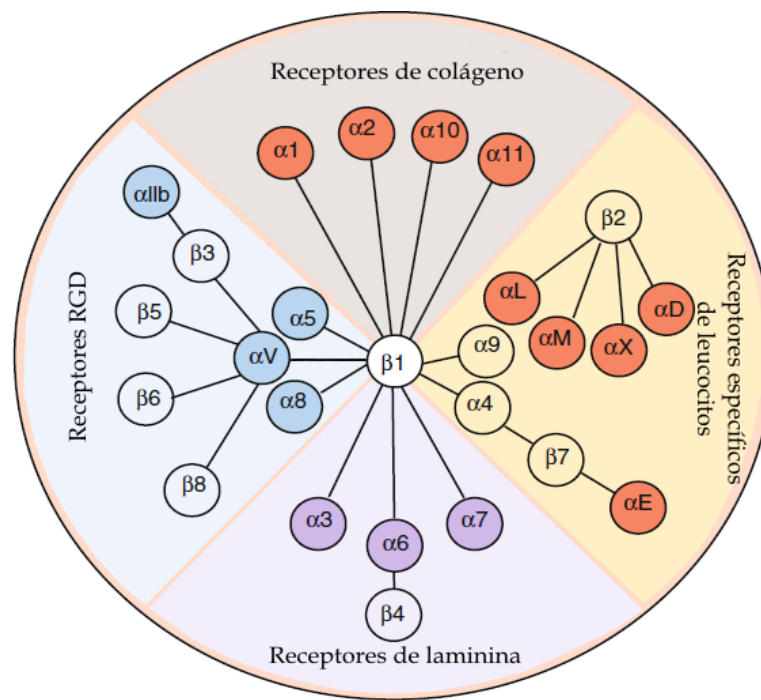


Figura I.7: Familia de las integrinas. Las integrinas son heterodímeros  $\alpha\beta$ , hasta la fecha en mamíferos se han descrito 8 subunidades  $\beta$  y 18 subunidades  $\alpha$  que se combinan generando 24 heterodímeros diferentes. En este esquema se representan las 4 subfamilias en las que se clasifican las 24 combinaciones de subunidades integrina de acuerdo al tipo de ligandos con los cuales cada una de ellas interactúa (Adaptado de Barczyk y col., 2010).

Ocho miembros de la familia de las integrinas (sector izquierdo de la Figura I.7) reconocen el motivo Arg-Gly-Asp (RGD) dentro de la secuencia de los ligandos con los cuales interactúan (Hynes, 2002). La secuencia RGD es el sitio de reconocimiento de una gran cantidad de proteínas de matriz extracelular como ser la Fibronectina, el Fibrinógeno, la Vitronectina, el Colágeno Tipo I, la Osteopontina, la Trombospondina, el Factor de von Willebrand, etc. Los dominios desintegrina (presentes en las proteínas ADAM y también en las proteínas del veneno de serpiente) también contienen la secuencia RGD o secuencias similares en su sitio activo de unión (Calvete y col., 2005; Edwards y col., 2008). Los análisis estructurales han mostrado que la secuencia RGD en los dominios desintegrina se encuentran en una localización tridimensional similar a la encontrada en la proteína Fibrinógeno (Evans, 2001).

Las integrinas han sido involucradas en el proceso de fecundación en muchos modelos animales (Iwao & Fujimura, 1996; Linfor & Berger 2000; Barraud-Lange y col., 2007; Thys y col., 2009; Boissonnas y col., 2010). Sin embargo, de las 26 subunidades sólo las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  han sido alguna vez descritas en la literatura, participando o mediando el proceso de fecundación.

Cinco de estas subunidades ( $\alpha V$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$ ) son capaces de formar heterodímeros de la subfamilia RGD:  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$  (ver Figura I.7). En 1990, Bronson y Fusi realizaron ensayos de co-incubación con péptidos que contenían secuencias RGD (RGDV y GRGDTP) en sistemas homólogos (ambas gametas de hámster) y heterólogos (ovocitos de hámster y espermatozoides humanos), y en ambos casos observaron una disminución significativa del porcentaje de fecundación cuando el péptido estaba presente. También comprobaron que esferas fluorescentes recubiertas con estos péptidos eran capaces de unirse a la membrana plasmática de los ovocitos, y que dicha unión podía revertirse mediante el agregado de péptido libre (Bronson y Fusi, 1990). Años más tarde experimentos similares (utilizando el péptido GRGDSPK) fueron realizados en ovocitos bovinos con resultados similares (Campbell y col., 2000). En una especie de anfibio como es *X. laevis*, ensayos realizados incubando el péptido RGDs con ovocitos provocaron la activación de los mismos (elevación de la concentración de calcio intracelular, rotación cortical, etc.) (Iwao & Fujimura, 1996).

En el año 1995, Almeida y colaboradores obtuvieron el primer indicio de que integrinas del tipo  $\alpha 6\beta 1$  estarían involucradas en el proceso de fecundación en ratón. En dicho trabajo anticuerpos monoclonales contra la subunidad  $\alpha 6$  integrina (GoH3) bloquearon la unión ovocito/espermatozoide de manera dosis dependiente (Almeida y col., 1995). Posteriormente se determinó que el agregado del anticuerpo monoclonal GoH3 era capaz de inhibir la unión de esferas fluorescentes recubiertas con la proteína ADAM 3 murina a los ovocitos de ratón (Takahashi y col., 2001). Análisis similares se realizaron con la proteína ADAM 2, indicando ambos trabajos que integrinas del tipo  $\alpha 6\beta 1$  serían capaces de interactuar con dos proteínas anteriormente descritas en la membrana de los espermatozoides: ADAM 2 y ADAM 3 (Bigler y col., 2000).

Sin embargo, paralelamente se publicaron trabajos en los que mediante el análisis de ratones *knock out* para distintas subunidades integrina se proponía que las mismas no

tendrían un rol en el proceso de fecundación en el modelo murino ya que los ratones seguían siendo fértiles ( $\alpha 7$  integrina: Mayer y col., 1997;  $\beta 3$  integrina: Hodivala-Dilke y col., 1999;  $\beta 5$  integrina: Huang y col., 2000; y  $\alpha 6$  integrina: Miller y col., 2000). De todas maneras, en estos trabajos se dejaba entrever que quizás otras subunidades integrinas podrían estar compensando la función que la subunidad “knockeada” no podía realizar. Posteriormente, el grupo de Myles intentó descartar este posible “rol redundante” entre las distintas subunidades integrina, realizando ensayos de fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos de ratones *knock out*, los cuales eran incubados con diversos anticuerpos anti integrinas (He y col., 2003). En este trabajo se llegó a la conclusión que ninguna integrina presente en el oolema murino participaba en la etapa de interacción con el espermatozoide. Al año siguiente, un trabajo realizado esta vez con gametas humanas, demostró que ninguna de las integrinas presentes en la membrana plasmática del ovocito tendría un rol en la fusión de las gametas (Sengoku y col., 2004). Sin embargo, se dejaba en claro que la pequeña pero significativa disminución en la unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito debido a la presencia de anticuerpos contra diversas integrinas ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\alpha M$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ) implicaba que las mismas sí estaban involucradas en esta etapa del proceso de fecundación.

Finalmente y con la intención de terminar con tanta controversia, Baessler y colaboradores realizaron estudios cinéticos con ovocitos obtenidos de ratones *knock out* para la subunidad  $\beta 1$  integrina. Mediante este tipo de análisis se pudo demostrar que la subunidad  $\beta 1$  integrina facilita la adhesión entre el espermatozoide y la superficie del ovocito, lo cual representa una ventaja reproductiva; y que si bien no es esencial, si es beneficiosa y por lo tanto ha sido mantenida durante la evolución (Baessler y col., 2009).

Las integrinas de la sub-familia  $\alpha 4/\alpha 9$  ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$ ) reconocen pequeñas secuencias peptídicas que incluyen el aminoácido Aspartato (**D**) dentro de los ligandos con los cuales interactúan (ej.: Fibronectina, **LDV**P; VCAM-1, **ID**SP; MadCAM-1, **LD**T**S**; Tenascina-C, **AEID**G**I**EL). En estos ligandos el residuo de aspártico se encuentra protruyendo en una especie de bucle o “loop”. En un trabajo del 2002 (Zhu & Evans, 2002) se evaluó la capacidad del péptido **MLD**G de afectar la unión entre ovocitos de ratón y la proteína ADAM 2. Estos resultados sugirieron que miembros de la familia  $\alpha 4/\alpha 9$  integrina

estarían involucrados en la interacción que se da entre la proteína ADAM 2 y la membrana plasmática del ovocito de ratón.

En el 2009 el grupo de J. Evans evaluó el efecto del *knock down* para la proteína  $\alpha 9$  integrina en la fecundación murina. Mediante la microinyección de ARN de interferencia para  $\alpha 9$  integrina lograron disminuir la expresión de esta proteína en la membrana plasmática de los ovocitos de ratón, y en estas condiciones se evaluó el número de espermatozoides que eran capaces de unirse y fusionarse con los ovocitos. A relaciones espermatozoides:ovocitos bajas (25:1 ó 100:1) se observaron diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos/fusionados respecto a la situación control (ovocitos no inyectados) indicando estos resultados un rol de la subunidad  $\alpha 9$  integrina en la fecundación murina (Vjugina y col., 2009). Con respecto a la subunidad  $\alpha 4$  integrina, si bien hasta el momento son pocas las especies en las que se ha demostrado la presencia de esta subunidad en ovocitos (Pate y col., 2007), en el 2010 el grupo de Janice Evans, utilizando distintas líneas celulares halló evidencias que indican la interacción entre heterodímeros formados por la subunidad  $\alpha 4$  integrina ( $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$ ) y la proteína ADAM 2 (Desiderio y col., 2010), sugiriendo que en aquellas especies que expresan la subunidad  $\alpha 4$  integrina en la membrana plasmática del ovocito, la misma podría llegar a estar cumpliendo un rol durante la fecundación.

#### **I.6.10 Otras**

Además de las comentadas en las secciones anteriores, numerosas otras candidatas han sido propuestas para mediar el proceso de unión oolema-espermatozoide. En general son datos obtenidos trabajando con gametas de ratón o humanas y en donde la estrategia experimental central descansa sobre el efecto de anticuerpos específicos sobre la fecundación. En esta sección se presenta una síntesis de ellas en forma de tablas.

### I.6.10.1 En Espermatozoides

Proteína	Especie	Ensayo utilizado	Cita
<b>Equatorin</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en presencia de Ac	Toshimori y col., 1998 Yoshinaga y col., 2001
<b>SPEP1</b>	<i>Mus musculus</i>	Ratones transgénicos: <i>Spesp1</i> <sup>+/-</sup> , <i>Spesp1</i> <sup>-/-</sup> Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Fujihara y col., 2010 Lv y col., 2010
<b>SLLP1</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac ó de la proteína SLLP1 recombinante	Herrero y col., 2005
<b>ERp57</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac ó de inhibidores de la proteína	Ellerman y col., 2006b
<b>ERp29</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Ying y col., 2010
<b>PSG17</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de la proteína PSG17 recombinante	Ellerman y col., 2003
<b>ESP</b>	<i>Homo sapiens</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Wolkowicz y col., 2008
<b>SAMP14</b>	<i>Homo sapiens</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Shetty y col., 2003
<b>SAMP32</b>	<i>Homo sapiens</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Hao y col., 2002
<b>hGC-G</b>	<i>Homo sapiens</i>	Fecundación <i>in vitro</i> con ovocitos preincubados con el péptido <b>RKGRGDEGFWKQ</b>	Yang y col., 2010
<b>OPN</b>	<i>Bos taurus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Erikson y col., 2007
<b>SGP</b>	<i>Xenopus laevis</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Nagai y col., 2009

Tabla I.1: Proteínas presentes en espermatozoides que participan en la etapa de unión con el oolema durante la fecundación. Las proteínas descritas en ratón y la proteína humana ESP (ortóloga a SPEP1 murina) tienen en común su ubicación en el segmento ecuatorial del espermatozoide luego de la reacción acrosómica. Las proteínas humanas SAMP se localizan en la membrana interna del acrosoma, mientras que hGC-G se encuentra tanto en el acrosoma como en el segmento ecuatorial. Osteopontina (OPN) se ubica en la región post-acrosomal de la gameta bovina. La proteína SGP se distribuye sobre toda la superficie del espermatozoide de *Xenopus laevis*. Ac: Anticuerpo

### I.6.10.2 En Ovocitos

Proteína	Especie	Ensayo utilizado	Cita
<b>EW1-2</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac	Glazar & Evans, 2009
<b>SAS1B</b>	<i>Mus musculus</i>	Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de Ac Ratones <i>knock out</i> SAS1B -/-	Sachdev y col., 2012

Tabla I.2: Proteínas presentes en el oolema que cumplen un rol en la adhesión con la membrana del espermatozoide reaccionado. Ac: Anticuerpo

## I.7 En el anfibio anuro *Bufo arenarum*

### I.7.1 INTEGRINAS

Con respecto a la participación de las integrinas en el proceso de fecundación de *Bufo arenarum*, hasta hace poco en la bibliografía sólo había dos publicaciones que indicaban dicha posibilidad. El primer trabajo fue publicado en el año 2000, en el cual se demostraba la presencia en la membrana plasmática de los ovocitos de *B. arenarum* del heterodímero  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrina, también conocido como CR3 (de sus siglas en inglés: “Complement Receptor 3”) (Llanos y col., 2000). Este heterodímero ha sido ampliamente relacionado con la capacidad de fagocitar células que resultan extrañas para el organismo por las células de defensa: células NK, macrófagos y neutrófilos (Ross & Vetckicka, 1993).

En el caso particular de los ovocitos de *B. arenarum* se pudo adjudicar un rol en el proceso de fecundación mediante ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de azul de tripán. Esta estrategia se basó en trabajos previos en donde se utilizó al azul de tripán para inactivar al heterodímero  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrina presente en la membrana plasmática de las células polimorfonucleares, inhibiéndose así la fagocitosis mediada por el sistema del complemento (Guckian y col., 1978). La incubación de los ovocitos con azul de tripán, provocó la inhibición de la fecundación de manera dosis dependiente (Llanos y col., 2000).

Posteriormente, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, con el objetivo de detectar y caracterizar aquellas proteínas del ovocito que tuviesen afinidad por proteínas presentes en la gameta masculina, se hicieron ensayos en los cuales se inmovilizaron químicamente a una matriz de Sepharose® muestras de membranas plasmáticas obtenidas de espermatozoides reaccionados. Una de las proteínas de membrana plasmática del ovocito que quedaba retenida en la columna cromatográfica presentaba un peso molecular similar al observado para las integrinas (100 kDa). Para evaluar esta posibilidad, se agregó

el péptido RGDS al buffer utilizado en la columna. La proteína de 100 kDa fue competida de manera exitosa por el péptido RGDS, siendo este un indicio de que dicha proteína correspondía a una integrina de la sub-familia RGD. Teniendo en cuenta estos resultados, se postuló que integrinas de la sub-familia RGD estarían involucradas en la interacción con los espermatozoides de *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006), así como había sido sugerido previamente para el caso de otro anfibio como es *X. laevis* (Iwao & Fujimura, 1996; Sato y col., 1999)

Posteriormente se evaluó la posibilidad de que el péptido RGDS fuese capaz de activar los ovocitos de *B. arenarum*. La incubación de los mismos con el péptido RGDS (a una concentración final de 1 mM) no fue capaz de desencadenar los cambios morfológicos que son indicio de la activación de los mismos (pérdida de la hendidura, elevación de la envoltura vitelina, rotación cortical, movimiento de pigmentos, etc.) (Mouguelar, 2007). Se analizó también, si la presencia del péptido era capaz de impedir la capacidad de los espermatozoides de fecundar a los ovocitos. A todas las concentraciones de espermatozoides ensayadas, la presencia del péptido RGDS provocó una tasa menor de fecundación, alcanzando una diferencia estadísticamente significativa a una concentración de espermatozoides de  $3,3 \cdot 10^5$  cél/ml, a la cual el péptido fue capaz de disminuir el porcentaje de fecundación a aproximadamente la mitad. Estos resultados en su conjunto, sugirieron un rol para integrinas de la sub-familia RGD presente en la membrana plasmática de los ovocitos durante la fecundación en el anfibio *B. arenarum* (Mouguelar, 2007).

### **I.7.2 HSPs**

Las evidencias previas que sugerían la participación de proteínas de la familia HSP en la fecundación *B. arenarum* también fueron obtenidas en nuestro laboratorio. Otras de las proteínas que quedaron retenidas en la columna cromatográfica mencionada en el ítem anterior presentaban un peso molecular de aproximadamente 70 kDa. En un intento de determinar la posible identidad de dichas proteínas se realizaron Western blots utilizando un anticuerpo policlonal generado contra la proteína DNAK (una de las HSP70 de *E. coli*). De esta forma pudo determinarse que efectivamente una de las proteínas retenidas en la columna de afinidad correspondía a un miembro de la familia de las “Heat Shock Proteins” (HSPs) (Coux & Cabada, 2006).

Como se puede apreciar, aunque existían evidencias que sugerían la participación de las integrinas y de proteínas de la familia HSPA (anteriormente denominadas HSP70) durante la fecundación en *Bufo arenarum*, restaba esclarecer el rol que las mismas tenían. Si bien los resultados preliminares indicaban que las integrinas de la familia RGD presentes en el oolema no serían las responsables de la activación del ovocito (con lo cual se podría descartar un mecanismo de activación mediado por receptores del tipo Integrina (ver sección I.5.4)), eran necesarios estudios más detallados de la cascada de transducción de señal que se desencadena en el ovocito durante la fecundación para intentar dilucidar detalles de este proceso tan complejo.

En relación a las proteínas de estrés térmico, y de manera análoga a lo planteado para integrinas en el párrafo anterior, si bien los resultados descriptos por Coux & Cabada (2006), apuntaban a su participación durante el proceso, no se disponían de indicios sobre la/s función/es que dichas proteínas estarían cumpliendo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nuestra **Hipótesis de Trabajo** propone que durante el proceso de fecundación en el anfibio *Bufo arenarum*, la interacción de las gametas a nivel de membranas plasmáticas estaría mediada por proteínas integrinas y proteínas de la familia HSPA. Y que alguna de estas proteínas, a su vez, participaría en la vía de transducción de señal que conduce a la activación del ovocito. Para intentar corroborar o refutar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos a desarrollar en este Trabajo de Tesis.

## II. OBJETIVOS

### II.1 Objetivo General

El propósito general de este Trabajo de Tesis es contribuir al conocimiento actual de la biología de la reproducción en cuanto a las moléculas involucradas en el reconocimiento entre gametas. En particular en nuestro modelo de estudio, el anfibio *Bufo arenarum*, nos interesa describir la etapa final de la interacción espermatozoide-ovocito (interacción entre las membranas plasmáticas): identificar los receptores a espermatozoides presentes en la membrana plasmática del ovocito y las señales tempranas de fosforilación que conducen a la activación del programa de desarrollo embrionario.

### II.2 Objetivos Particulares:

1. Analizar la presencia de mensajeros que codifican para distintas subunidades  $\alpha/\beta$  integrinas y la expresión de algunas de estas subunidades integrina en las gametas de *Bufo arenarum*.
2. Analizar en el ovocito los eventos tempranos de señalización causados por la activación de cascadas como consecuencia de la interacción con el espermatozoide (en particular cambios en el patrón de fosforilación en restos tirosina de proteínas) y evaluar la posible participación de integrinas y de sus proteínas asociadas en dichas vías de transducción.
3. Caracterizar molecular y bioquímicamente la subunidad  $\beta 1$  integrina presente en el ovocito.
4. Analizar la expresión de proteínas de estrés térmico de la familia HSPA en las gametas de *Bufo arenarum*. Evaluar el posible rol de las mismas en el proceso de fecundación.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Obtención de Animales

El material biológico utilizado en este trabajo fue obtenido a partir de una especie de anfibio que es común en la zona: *Bufo arenarum*. Ejemplares sexualmente maduros fueron recolectados en los alrededores de la ciudad de Rosario, entre los meses de marzo y octubre. Los mismos se mantuvieron en oscuridad, a 15°-17°C en una cámara húmeda hasta el momento de su uso.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a normas éticas internacionales contenidas en la Guía para el Uso y Mantenimiento de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

#### III.2 Obtención de Gametas y Embriones

##### III.2.1 Ovocitos

Hembras sexualmente maduras fueron mantenidas a 20-22°C (aclimatación) en condiciones adecuadas de humedad durante dos o tres días (de acuerdo a la estación del año) antes de la estimulación por inyección en el saco linfático dorsal de un macerado de hipófisis homóloga en agua destilada (Houssay y col., 1929). Después de 10-12 horas a 20-22°C, los animales fueron sacrificados por disrupción medular y los ovocitos recogidos de los ovisacos (Barisone y col., 2002).

##### III.2.2 Espermatozoides

La suspensión de espermatozoides fue preparada por dilaceración testicular (Valz-Gianinet y col., 1991). Se extrajeron los testículos de un macho adulto de *B. arenarum* previamente sacrificado por disrupción medular y se los dilaceró en una cápsula de Petri mantenida en hielo, con una solución de Ringer estándar. La suspensión se filtró a través de 2-3 capas de gasa y luego se centrifugó a 130 g (*Sorvall Instruments RC5C, Dupont, rotor HB-4*) durante 10 minutos a 4°C para descartar glóbulos rojos y restos tisulares. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 660 g, en el mismo rotor, durante 10 minutos a 4°C y el sedimento, conteniendo los espermatozoides, se resuspendió en Ringer estándar. La motilidad de los espermatozoides se verificó bajo microscopio diluyendo una alícuota de la suspensión diez veces con agua destilada. La concentración de espermatozoides se

determinó espectrofotométricamente (*espectrofotómetro UV-Vis Metrolab, Junior II*), teniendo en cuenta que un valor de densidad óptica de 0,55 a  $\lambda=410$  nm corresponde a una concentración de  $5 \cdot 10^6$  espermatozoides/ml.

La suspensión se mantuvo en medio isotónico (Ringer estándar) a 4°C, siendo diluida a la concentración de células deseada justo antes de su uso. Las diluciones se realizaron de modo que el medio final resultara hipotónico (Ringer-Tris 10%). La estructura de los espermatozoides preservados en medio isotónico (Ringer estándar) no presenta modificaciones dentro de las 4 horas posteriores a la obtención de los mismos (Diaz Fontdevila y col., 1988).

### **III.2.3 Embriones: fecundación *in vitro***

Los embriones para los subsiguientes procedimientos bioquímicos (purificación de membranas, extracción de ácidos nucleicos, etc.) se lograron por fecundación *in vitro*. La fecundación se realizó mediante el agregado de una suspensión de espermatozoides a una monocapa de ovocitos colocados en placas de Petri, seguido del agregado de solución Ringer 0,1X. Este medio se encontraba a temperatura ambiente para favorecer la activa motilidad de los espermatozoides. Una concentración final de espermatozoides de al menos  $5 \cdot 10^5$  cél/ml se utilizó para fecundar 600-800 ovocitos por placa. La fecundación fue detenida al tiempo deseado mediante el agregado de un exceso de Ringer 1X a 0°C. El degangado de los ovocitos se realizó mediante una corta exposición de los mismos a una solución de Tioglicolato 1% v/v pH 8. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados de manera exhaustiva con solución Ringer 1X y mantenidos congelados hasta su uso. Bajo estas condiciones, el 4, 43, 93,5 y 100% de los cigotos sufrió contracción cortical a los 1, 5, 10 y 30 min post-inseminación, respectivamente. Como era de esperar, en los controles en donde no se agregaron espermatozoides, el porcentaje de fecundación obtenido fue del 0%.

### **III.3 Experimentos de entrecruzamiento de ovocitos enteros**

El procedimiento de entrecruzamiento se realizó como sugiere el proveedor en la hoja técnica del agente entrecruzante *ditiobis (propionato de succinimidilo)* (DSP) (*Pierce Biotechnology, Inc.*): (<http://www.piercenet.com/instructions/2160544.pdf>). Brevemente, tiras de ovocitos recientemente depuestas fueron lavadas con una solución Ringer 1X (sin

Tris) y se las colocó en una placa de Petri. Se agregó el agente entrecruzante DSP a una concentración final de 2 mM y se incubó durante 30 min a 20-22°C con agitación moderada. La reacción se detuvo mediante el agregado de Tris pH 7,5 a una concentración final de 20 mM. Las tiras fueron incubadas 15 min en esta solución y luego degangadas como se describió anteriormente. Los ovocitos entrecruzados fueron posteriormente guardados a -70°C hasta su uso.

#### **III.4 Tratamiento de ovocitos con Genisteína**

Ovocitos recién depuestos fueron pre-incubados con el reactivo Genisteína a una concentración final de 100 µM durante 1 hora. Transcurrido ese lapso de tiempo los mismos fueron lavados con Ringer 0,1X. Posteriormente se llevó a cabo la fecundación *in vitro* como se describió en la sección III.2.3. La fecundación se detuvo a los 5 min y 10 min luego del agregado de los espermatozoides. Finalmente los ovocitos fueron degangados y mantenidos congelados hasta su uso.

#### **III.5 Tratamiento de ovocitos con el ionóforo de calcio A23187**

Ovocitos recién depuestos fueron incubados con el reactivo ionóforo de calcio A23187 (*Sigma Aldrich*) a una concentración final de 2,5 µM durante 10 min. Transcurrido ese lapso de tiempo los mismos fueron lavados con Ringer 1X. Finalmente los ovocitos fueron degangados y mantenidos congelados hasta su uso.

#### **III.6 Aislamiento de envoltura vitelina**

Los ovocitos degangados entrecruzados o no fueron homogenizados en Ringer-Tris (libre de calcio) conteniendo 10 mM EDTA (para minimizar la activación espontánea de los ovocitos) en un homogenizador Potter-Elvehjem (*Thomas Scientific, Swedesboro, NJ*). Las envolturas vitelinas (EV) se recuperaron mediante el filtrado del homogenado a través de una doble malla metálica y fueron exhaustivamente lavadas con el buffer previamente mencionado. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C (Barisone y col., 2002).

#### **III.7 Obtención de agua de huevo o difundido total**

El difundido total fue obtenido como se describió previamente (Diaz Fontdevila y col., 1991). Brevemente, tiras de ovocitos de *B. arenarum* fueron transferidas desde los

ovisacos a vasos de precipitado conteniendo agua destilada en una proporción 1:1. La incubación se realizó a temperatura ambiente, con agitación ocasional durante 10 min. Los factores difusibles presentes en la cubierta gelatinosa difundieron hacia el agua destilada durante ese lapso de tiempo. El agua de huevo fue posteriormente concentrada por liofilización.

### **III.8 Ensayos de inhibición de la fecundación en presencia de los anticuerpos anti $\beta$ 1 integrina (M-106) o anti HSPA (DNAK)**

#### **III.8.1 Ensayo de inhibición de la fecundación**

Grupos de 4-6 ovocitos con ganga se colocaron en pocillos que contenían 100  $\mu$ l del anticuerpo policlonal (M-106, *Santa Cruz*) a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml o DNAK (cedido gentilmente por el Dr. Alejandro Viale, IBR-CONICET, Argentina), en una dilución final 1/15 en SB 50% (ver sección III.27). Luego de 20 min, los ovocitos fueron fecundados. Para esto, se suplementó con agua de huevo para eliminar una posible dilución de los factores que son necesarios para una fecundación exitosa (Arranz & Cabada, 2000). Se agregaron 5  $\mu$ l de una suspensión de espermatozoides de una concentración adecuada para llegar a la concentración final deseada ( $3,3 \cdot 10^5$  cél/ml para M-106 y  $0,5 \cdot 10^5$ ,  $1,0 \cdot 10^5$  y  $3,3 \cdot 10^5$  cél/ml para DNAK). Luego de 25 min, los cigotos tempranos fueron lavados 3 veces con 100  $\mu$ l de SB 50%. La fecundación se determinó mediante la observación de la aparición de la primera división, debido a que ésta es el indicador más confiable para computar fecundación. En los controles para el anticuerpo anti  $\beta$ 1 integrina, se utilizó IgG normal de conejo o el anticuerpo anti subunidad  $\alpha$  de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (*Calbiochem*) a la misma concentración final que la utilizada para el anticuerpo M-106. En los controles para el anticuerpo anti HSPA se utilizó suero pre-inmune en lugar del anticuerpo DNAK, a la misma concentración que éste (dilución 1/15).

#### **III.8.2 Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido por el método de Holm-Sidak. Como criterio de significancia se utilizó el nivel de probabilidad 0,01 para los ensayos realizados con el anticuerpo M-106 y 0,05 cuando se utilizó el anticuerpo DNAK.

### **III. 9 Obtención de proteínas transgénicas en *Escherichia coli***

#### **III.9.1 HSPA**

##### **III.9.1.1 Inducción de la expresión de proteínas fusionadas a poli-histidina**

La proteína HSPA Humana Recombinante (HSPAr) conteniendo una etiqueta de histidina en el extremo amino terminal de la proteína (plásmido pET28-hHSP70A1B generosamente cedido por el Dr. S. E. Severin, Moscú, Rusia) fue producida en un sistema procariota. Brevemente, la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) plys transformadas con el plásmido pET28-hHSP70A1B fue crecida durante toda la noche a 37°C con agitación constante en medio LB líquido suplementado con 0,1 mg/ml ampicilina y 25 µg/ml kanamicina. Al día siguiente se inoculó LB (suplementado con los respectivos antibióticos) con el cultivo O.N. (dilución 1/100). Se permitió el crecimiento celular a 37°C con agitación constante hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ . Posteriormente se indujo la expresión de la proteína de fusión mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se creció durante 3 h a 37°C después del agregado de IPTG. Finalmente, las células se centrifugaron por 5 min a 5000 g. El sedimento celular se lavó dos veces con Tris-HCl 25 mM (pH=8) y fue guardado a -20°C para su posterior procesamiento.

##### **III.9.1.2 Purificación de la proteína HSPA Humana Recombinante**

La proteína HSPAr fue purificada mediante cromatografía de afinidad con matrices de níquel, como se indica en el manual (*The QIAexpressionist, Qiagen, California, USA*). La proteína fue dializada y concentrada en solución Ringer-Tris mediante filtros que presentaban un corte de 10 kDa (*Amicon, Millipore, Massachussets, USA*).

#### **III.9.2 CNBP-Tiorredoxina**

La proteína CNBP-Tiorredoxina Recombinante expresada en el mismo sistema bacteriano (generosamente cedido por la Dra. Nora Calcaterra, IBR-CONICET, Argentina) fue utilizada como control de especificidad en los ensayos de unión.

### **III.10 Ensayos de unión de la proteína HSPA recombinante a espermatozoides**

#### **III.10.1 Ensayos realizados con concentraciones variables de HSPAr**

Muestras conteniendo  $3 \cdot 10^6$  espermatozoides fueron expuestos a distintas concentraciones de la proteína HSPAr (0-80 µg/ml) diluida en Ringer-Tris (durante 30 min

en medio isotónico) o en solución de fecundación (durante 10 min en medio hipotónico, definido de acuerdo a las medidas realizadas en difundido total (EW): 0,047 M NaCl; 0,84 mM KCl; 0,28 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 8) (O' Brien y col., 2011) y suplementados con BSA (40 µg/ml). Posteriormente se realizaron tres lavados para eliminar aquellas proteínas que no se encontraban unidas a los espermatozoides, y finalmente los mismos fueron lisados con buffer de electroforesis o procesados para estudios inmunocitoquímicos utilizando un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la etiqueta de histidina. La unión de la proteína recombinante se determinó mediante Western blot o microscopía de fluorescencia (ver secciones III.18.3 y III.19.2).

### **III.10.2 Ensayos de competencia con BSA**

El ensayo se realizó de manera similar a la descrita en el ítem anterior, pero en este caso se mantuvo constante la concentración de la proteína HSPAr (40 µg/ml) y se varió la concentración de la proteína BSA (20, 40 y 80 µg/ml). Transcurridos los 30 min de incubación en medio isotónico, los espermatozoides fueron lavados y analizados como se describió anteriormente.

### **III.10.3 Ensayos de competencia con EW**

En este ensayo, los 3 millones de espermatozoides fueron incubados durante 30 min en un medio isotónico que contenía una concentración constante de la proteína HSPAr (20 µg/ml) y concentraciones variables de difundido total (EW) (20, 40 y 80 µg/ml). El análisis de la interacción entre los espermatozoides y la proteína HSPAr en estos ensayos se evaluó también mediante Western blot y microscopía de fluorescencia.

## **III.11 Análisis de la viabilidad de los espermatozoides**

### **III.11.1 Ensayo con Azul de Tripán**

La viabilidad de los espermatozoides (usando como indicador la integridad de la membrana plasmática) fue determinada utilizando el colorante Azul de Tripán. Los espermatozoides fueron incubados en solución de fecundación (con o sin HSPA recombinante) durante 10 min a 25°C y luego fueron diluidos a la mitad con solución 4% p/v del colorante Azul de Tripán preparado en Ringer-Tris. Luego de 3 min se contaron al menos 200 células y las mismas fueron clasificadas en vivas (membrana plasmática intacta;

incoloras) o muertas (membrana plasmática dañada; azules). Los datos fueron expresados como índice de viabilidad medio  $\pm$  error estándar de la media. El índice de viabilidad se definió como la relación entre los espermatozoides viables a los 10 min/los espermatozoides viables a tiempo cero.

### **III.11.2 Ensayo de reducción de MTT**

La viabilidad de los espermatozoides también se analizó mediante la conversión del compuesto MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) utilizando el kit *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* de Promega (Madison, Wisconsin, USA). El MTT es un ensayo colorimétrico que permite medir la actividad de las enzimas que reducen el MTT a sales de formazán. Estas reducciones sólo se producen cuando las enzimas reductasas están activas, y por lo tanto la conversión se suele utilizar como medida de viabilidad celular. Brevemente, se colocaron  $1.10^6$  espermatozoides por pocillo. Los espermatozoides se incubaron durante 10 min con el medio que se quería analizar. Transcurrido dicho lapso de tiempo se agregó la solución de tinción provista por el kit. Los demás pasos se realizaron como indica el proveedor. Los datos se expresaron como porcentajes relativos al valor control.

### **III.11.3 Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. Los datos fueron analizados usando la Tabla de distribución t de Student. Como criterio de significancia se utilizó el nivel de probabilidad 0,05.

## **III.12 Extractos proteicos de espermatozoides**

### **III.12.1 Extracción con el detergente SDS**

Los espermatozoides (obtenidos como se describió en el punto III.2.2) fueron liofilizados y resuspendidos en 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% p/v SDS, pH 7,5; suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas 5% v/v (*Sigma*), en una relación 1  $\mu$ l de buffer por cada  $3.10^5$  espermatozoides. La mezcla fue incubada a 37°C durante 2 horas, con agitación con vórtex ocasional. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a máxima velocidad durante 10 min y finalmente, el sobrenadante fue hervido con buffer de siembra para electroforesis de proteínas.

### **III.12.2 Extracción con el detergente Tritón X-100**

Los espermatozoides (obtenidos como se describió en el punto III.2.2) fueron resuspendidos en Solución de extracción (Ringer Tris suplementado con 1 mM EDTA, 1% v/v cóctel de inhibidores de proteasas (*Sigma*), 2 mM PMSF y 0,1% v/v Tritón X-100), en una relación 1  $\mu$ l de buffer por cada  $3.10^5$  espermatozoides. La mezcla fue luego incubada con agitación durante 10 min a 4°C, congeladas y descongeladas 3 veces. Se guardó una muestra denominada “Células Enteras: CE” para los ensayos de Western blot, y el resto fue centrifugado a 17.000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante (denominado “sol” por corresponder a la fracción que se solubilizó luego del tratamiento con el detergente Tritón) fue cuidadosamente separado del sedimento. El sedimento de esta centrifugación fue posteriormente resuspendido en un volumen equivalente de Solución de extracción. Esta fracción se denominó “insol” por contener proteínas que no pudieron ser solubilizadas luego del tratamiento con Tritón X-100.

### **III.13 Fraccionamiento subcelular de ovocitos y embriones**

#### **III.13.1 Aislamiento de Membranas Totales y Citosol**

El fraccionamiento subcelular se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por (Sato y col., 1999) con algunas modificaciones. Todos los procedimientos fueron realizados a 0-4°C. Ovocitos/embriones degangados (1 ml de volumen) fueron mezclados con 8 ml de Solución A (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) suplementado con 1% v/v cóctel inhibidor de proteasas (*Sigma*), 1 mM PMSF, 14  $\mu$ g/ml TPCK, 10 mM NaF y homogenizados en un potter de Teflón-vidrio. El homogeneizado fue centrifugado a 1000 g durante 10 min para remover detritos celulares y plaquetas vitelinas (a esta fracción se la denominó “Extracto Total”). El sobrenadante fue separado y vuelto a centrifugar a 150.000 g durante 1 h. El sobrenadante de esta centrifugación fue separado y a esta fracción se la denominó “Citosol”. El sedimento de esta centrifugación fue re-disuelto en Solución A y re-centrifugado a 150.000 g durante 30 min. El sedimento de esta centrifugación fue resuspendido en 1 ml de Solución A suplementada con 1% v/v de Tritón X-100. Finalmente esta muestra fue sonicada durante 1 min (4 pulsos de 15 seg c/u) con un amplitud del 5%. A esta fracción se la denominó “Membranas Totales”. Mediante

este procedimiento, 1 ml de ovocitos o embriones rindieron 12-13 mg de proteínas citosólicas y 3-4 mg de proteínas de membrana.

### **III.13.2 Aislamiento de Membranas Plasmáticas**

Las membranas plasmáticas de ovocitos/embriones fueron separadas por ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. El procedimiento empleado fue descrito para aislar membranas plasmáticas livianas y pesadas de ovocitos de *X. laevis* (Luria y col., 2002) y fue adaptado para su empleo en ovocitos/embriones de *B. arenarum* por nuestro laboratorio (Coux & Cabada, 2006). Brevemente, 300 ovocitos/embriones fueron lisados de forma mecánica mediante pipeteo repetido en buffer TNE 2X (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; pH 7,4) suplementado con 1 mM PMSF, 1% v/v cóctel inhibidor de proteasas (*Sigma*), 10 µg/ml TPCK, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 15 mM NaF, a 0°C. El lisado de los ovocitos fue sonificado durante 1 minuto en un baño frío utilizando una amplitud del 13% (*Vibra Cell; Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, EE.UU.*). El lisado posteriormente se mezcló con un volumen igual de sacarosa al 80% p/v para dar una concentración final de 40% p/v de sacarosa. Por encima de esta capa se colocaron posteriormente 3 ml de concentraciones decrecientes de sacarosa (35, 22,5 y 10% p/v). El gradiente de sacarosa fue centrifugado durante 3 h a 100.000 g (*SW40 rotor; Beckman Instruments, Fullertown, CA, EE.UU.*). Las membranas plasmáticas se aislaron de las interfases que se formaron entre las capas de 10-22,5% y 22,5-35% sacarosa. Las mismas fueron luego diluidas con 20 mM Tris suplementado con 1 mM PMSF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, y centrifugadas durante 1 h a 150.000 g (*Ti80 rotor, Beckman Instruments*). Los pellets fueron resuspendidos en Solución A suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y finalmente fueron sonificados durante 20 seg utilizando una amplitud del 6%.

### **III.14 Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método colorimétrico de Sedmak & Grossberg (1977). Se construyó una curva de calibración entre 0 y 20 µg usando como estándar albúmina sérica bovina dosada espectrofotométricamente a  $\lambda=279$  nm ( $\epsilon^{1\%}_{279}= 6,67$ ). La concentración proteica de las muestras se determinó por interpolación en dicha curva de calibración.

### **III.15 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes: SDS-PAGE**

#### **III.15.1 Preparación de las muestras**

Las muestras de proteínas para electroforesis se mezclaron con Solución de siembra 6X, en proporción 5:1 v/v. Posteriormente, las muestras se desnaturalizaron por calentamiento en baño de agua hirviendo, durante 5 minutos y fueron centrifugadas a 12.000 g (*Biofuge Pico, Heraeus Instruments*) antes de la siembra.

Para electroforesis en condiciones reductoras a la Solución de siembra se le agregó un agente reductor como ser  $\beta$ -mercaptoetanol 10% v/v o DTT 0,1 M.

#### **III.15.2 Preparación de geles en una dimensión**

Se utilizaron minigeles verticales del sistema Miniprotean III Gel System (*BioRad, Hercules, CA, EE.UU.*) de 0,75 o 1 mm de espesor.

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo según el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles de concentración se prepararon al 5% de acrilamida y los de separación al 10% o al 12%, según el caso. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando una corriente constante de 20 mA por gel en Buffer de Corrida 1X.

### **III.16 Geles Bidimensionales**

#### **III.16.1 Preparación de muestras**

Las muestras de ovocitos clarificadas para vitelogeninas (previa centrifugación a 1000 g) se mezclaron con un volumen equivalente de Buffer de Rehidratación (9,8 M urea, 4% CHAPS, 0,2% v/v anfolitos pH 3-10 (*BioLyte*), 50 mM DTT, 0,0002% p/v azul de Bromofenol e inhibidores de proteasas), mezcladas mediante la utilización de vórtex durante 2 min e incubadas en hielo por 30 min. Luego de una centrifugación a 12.000 g durante 5 min, la muestra de proteínas así extraídas fueron cargadas de manera pasiva en tiras ("strips") de 7 cm de longitud de rango lineal de pH 3-10 (*ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad, Tecnolab, Argentina*) (100  $\mu$ g por strip) durante toda la noche a temperatura ambiente.

### **III.16.2 Isoelectroenfoque**

El Isoelectroenfoque (IEF) se realizó utilizando el equipo Protean IEF Cell (*Bio-Rad, Richmond, CA*) comenzando con 15 min a 250 V y aumentando rápidamente el voltaje hasta llegar a 4000 V, quedando a este voltaje hasta acumular 20.000 Vh. Finalizado el IEF, las tiras fueron equilibradas mediante la incubación durante 10 min en el Buffer I (6M urea, 2% p/v SDS, 0,05 M Tris/HCl, 2% DTT, 20% glicerol) a temperatura ambiente y luego incubadas por otros 10 min en el Buffer II en el cual el DTT del Buffer I fue reemplazado por 2,5% iodoacetamida. La segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas por Western blot o reveladas utilizando la Tinción con Plata (ver sección III.17.2).

Los puntos isoelectrónicos de las proteínas de interés fueron estimados mediante interpolación, considerando la característica lineal de los "strips" (rango de pH utilizado 3-10). También se verificaron detectando en la misma membrana a la proteína Actina (que presenta un elevado grado de homología entre distintas especies y también un punto isoelectrónico que se encuentra altamente conservado de aproximadamente 5,3-5,4).

## **III.17 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida**

### **III.17.1 Tinción con Azul de Coomassie**

A fin de visualizar el patrón de proteínas obtenido, una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se sometieron a tinción con Azul de Coomassie. Para esto, los mismos se incubaron en solución de tinción durante 1 hora como mínimo, a temperatura ambiente. La posterior decoloración se llevó a cabo mediante sucesivos cambios de la solución decolorante. La decoloración se realizó hasta que no se observó coloración de fondo en el gel (Sambrook y col., 1989).

### **III.17.2 Tinción con Plata**

Este procedimiento se realizó según la técnica descrita por Shevchenko y col. (1996). El gel de poliacrilamida fue fijado durante 20 min en una mezcla de MeOH 50% y HAc 5%. Posteriormente fue lavado con MeOH 50% durante 10 min seguido de 3 lavados de 5 min c/u con H<sub>2</sub>O ultrapura. El gel fue sensibilizado mediante una breve inmersión en tiosulfato de sodio pentahidrato 0,02%. Luego, se hicieron 2 lavados rápidos de 1 min c/u

con H<sub>2</sub>O ultrapura. A continuación, el gel fue sumergido en una solución de AgNO<sub>3</sub> 0,1% durante 20 min. Pasado este lapso de tiempo se eliminó el nitrato de plata y se hicieron 2 lavados rápidos de 1 min c/u con H<sub>2</sub>O ultrapura. Finalmente se desarrolló el color mediante la incubación del gel con una solución de formalina 0,05%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, y tiosulfafo de sodio pentahidrato 0,0004%. Una vez que se llegó a la coloración deseada se eliminó la solución que permite el desarrollo de color, y la reacción se detuvo mediante la inmersión del gel en HAc 5%.

### **III.18 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa: Western blot**

#### **III.18.1 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas por SDS/PAGE o geles bidimensionales fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa con poro 0,2  $\mu$ m (*Hybond, Amersham Biosciences, San Francisco, CA, EE.UU*) según el procedimiento descrito por Towbin y col. (1979). Previamente, tanto el gel de poliacrilamida como la membrana de nitrocelulosa fueron equilibrados con solución de transferencia (metanol 20%, glicina 192 mM, Tris 25 mM) durante 10 min. A su vez, este fue el buffer utilizado para llenar la cuba de transferencia (*BioRad, Hercules, CA, EE.UU.*). La transferencia se llevó a utilizando intensidad constante (250 mA) durante 2 h o durante toda la noche a 40 mA. En ambos casos la cuba de transferencia estuvo refrigerada en heladera a 4°C.

#### **III.18.2 Tinción de proteínas en membrana**

Para verificar que la transferencia fue exitosa, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau. El colorante fue posteriormente eliminado mediante sucesivos lavados con agua destilada.

#### **III.18.3 Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (Western blot)**

##### **III.18.3.1 Anticuerpos y reactivos utilizados en los ensayos de inmunodetección**

Los siguientes anticuerpos: anti- $\beta$ 1-integrina humana (M-106, sc-8978), anti- $\beta$ 3-integrina humana (H-96, sc-14009), anti- $\alpha$ V humana (H-75, sc-10719), antifosfotirosina (PY-350, cat. sc-18182), antifosfo-Extracelular Regulated Kinase (p-ERK 1/2 Thr202/Tyr204, sc-16982) y anti-actina (sc-1616) son de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo policlonal

contra la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de riñón de conejo (cat. 119115) es de Calbiochem-Novabiochem Corporation (*La Jolla, CA, EE.UU.*). El anticuerpo monoclonal anti-HSPA (BRM22, denominado anti-HSP70 por el proveedor), y el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina (T5168) son de Sigma-Aldrich. El anticuerpo anti-His tag (27471001) es de GE Healthcare (*Buckinghamshire, Reino Unido*). El anticuerpo policlonal anti-DNAK (proteína de *E. coli*) y el correspondiente suero pre-inmune fueron un regalo del Dr. Alejandro Viale (IBR-CONICET, Argentina). El anticuerpo monoclonal 8C8 contra la subunidad  $\beta 1$  integrina de *X. laevis* fue desarrollado por Gawantka y col. (1992), mientras que el anticuerpo D71E2 contra la subunidad  $\alpha 5$  integrina de pollo fue desarrollado por Muschler & Horwitz (1991). Estos anticuerpos fueron obtenidos del Banco de Hibridomas para Estudios del Desarrollo (*Universidad de Iowa, EE.UU.*). El anticuerpo IgG anti-ratón generado en cabra y conjugado a HRP y los marcadores pre-teñidos utilizados son de Bio-Rad. El anticuerpo  $\text{F(ab)}_2$  anti conejo generado en burro y conjugado a HRP es de Amersham. El reactivo de quimioluminiscencia *Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate* es de Pierce (*Rockford, IL, USA*). Las membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL Nitrocellulose* fueron compradas a Amersham, GE Healthcare (*Buckinghamshire, UK*). Las placas radiográficas de alta sensibilidad *Hyperfilm ECL High Performance chemiluminescence film* fueron compradas a Amersham, mientras que las de baja sensibilidad *AGFA ortho CP-G PLUS* a AGFA (*Gevaert Argentina S.A.*).

### **III.18.3.2 Protocolo de Inmunodetección**

Las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas 2 veces con TBS 1X-0,1% v/v Tween 20 y luego bloqueadas con buffer TBS 1X suplementado con el agente bloqueante apropiado (5% p/v de leche descremada para 8C8, M-106, H-96, D71E2, H-75, DNAK, BRM22, His-tag, Tubulina y Actina; 1% p/v de gelatina para PY350 y p-ERK  $\frac{1}{2}$ ). Las membranas fueron lavadas con TBS 1X-0,1% v/v Tween 20 e incubadas con la dilución del anticuerpo primario correspondiente (8C8: 1/1000, M-106: 1/500, H-96: 1/750, H-75: 1/750, D71E2: 1/250, DNAK: 1/1000, BRM22: 1/5000, Actina: 1/600, Tubulina: 1/5000, His-tag: 1/3000, PY350: 1/500). El tiempo de incubación varió de acuerdo al anticuerpo primario utilizado, siendo generalmente incubaciones de 1 hora para las proteínas Actina, Tubulina o proteínas fusionadas a etiquetas de histidinas (His-tag) e incubaciones durante toda la noche en los otros casos. Finalizado este paso se realizaron 4 lavados de 10 min

cada uno con TBS 1X-0,1% v/v Tween 20. Después de los lavados, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos conjugados a HRP apropiados (dilución 1/8000-1/10000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno con TBS 1X-0,1% v/v Tween 20 y se procedió al revelado de las membranas utilizando el kit de quimioluminiscencia de Pierce y placas radiográficas.

#### **III.18.4 "Stripping" de membranas de nitrocelulosa**

Cuando fue necesario re-probar las membranas, las mismas pasaron por un proceso previo de "stripping", que consistió en una rápida incubación de 5 min con una solución 0,2 M NaOH a temperatura ambiente, seguida de 2 lavados con agua destilada. Posteriormente se continuó con el protocolo de inmunodetección como se describió anteriormente desde el paso de bloqueo de la membrana.

### **III.19 Inmunofluorescencia Indirecta y Microscopía Confocal**

#### **III.19.1 Ovocitos**

Los ovocitos fueron fijados mediante incubación durante toda la noche en 4% v/v formaldehído en Ringer 10%. Luego los mismos fueron deshidratados y clarificados antes de ser embebidos en parafina. Secciones de ovocitos embebidos en parafina fueron tratadas como fue descrito por Cabada y col. (1996). Las muestras fueron bloqueadas con TBS 1X, 0,025% v/v Tritón X-100, 5% p/v BSA, (suplementado con 10% v/v suero fetal bovino y 10% v/v suero de carnero sólo para la detección de la subunidad  $\beta$ 1 integrina) durante 2 horas.

El anticuerpo primario (M-106, anti  $\beta$ 1 integrina) fue agregado en una dilución 1:50 en TBS 1X con 0,025% v/v Tritón X-100 y 1% p/v BSA, mientras que los anticuerpos anti Actina y anti HSPA se utilizaron en una dilución 1:250 en TBS 1X. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente luego de una serie de lavados con TBS 1X, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (*Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.*). Para  $\beta$ 1 integrina: anti-conejo conjugado a Cy3 en una dilución 1:1000 hecha en TBS 1X suplementada con 3% p/v BSA. Para HSPA: anti-mouse conjugado a Cy3, dilución 1:800 en TBS 1X. Para Actina: anti-conejo conjugado a Alexa 488, dilución 1:800 en TBS 1X. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 1 hora a temperatura

ambiente. Finalmente, los portaobjetos fueron lavados y montados con el reactivo comercial ProLong (*Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.*).

La localización de la señal de fluorescencia fue detectada con un microscopio confocal de barrido por láser (*Nikon Eclipse TE-2000-E2*). Las imágenes fueron registradas manteniendo fijos los parámetros del equipo en cada uno de los experimentos. Para la adquisición de los datos y la superposición de las imágenes digitales se utilizó un software provisto por Nikon. Los controles se realizaron en ausencia del anticuerpo primario. Los ajustes de contraste y brillo se realizaron de manera pareja a la imagen completa mediante la utilización del software Nikon.

### **III.19.2 Espermatozoides**

La inmunolocalización de la proteína HSPA endógena en espermatozoides fijados (tratamiento durante 20 min con 3% v/v formaldehído en Ringer-Tris) se realizó como fue descrito por Martínez & Cabada (1996). Brevemente, luego de la fijación se realizaron 2 lavados con TBS 1X y se procedió a la permeabilización de las gametas con una solución de TBS 1X- 2% Tritón X-100 durante 4 min. Se realizaron 4 lavados de 5 min c/u con TBS 1X y finalmente se colocó el anticuerpo primario, utilizando en este caso una dilución 1:100 del anticuerpo anti HSPA (BRM22) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 5 min c/u con TBS 1X y se agregó el anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Cy3 en una dilución 1:800. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 h 30 min. Se realizó un lavado con TBS 1X y se colocó el colorante Hoescht, el cual se dejó actuar por 8 min. Finalmente se hicieron 4 lavados más con TBS 1X. La tinción con Hoechst 33258 se realizó para visualizar los núcleos de los espermatozoides. Finalmente, los portaobjetos fueron montados con el reactivo comercial ProLong (*Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.*).

Los espermatozoides utilizados en los ensayos de unión, luego de la incubación de los mismos con las distintas proteínas utilizadas (HSPAr, proteína control etiquetada con Histidina, BSA) fueron lavados para eliminar aquellas proteínas que nos se encontraban unidas a las gametas y posteriormente, los mismos fueron fijados. El protocolo de inmunofluorescencia utilizado fue similar al descrito anteriormente, sólo que en este caso, la detección de la etiqueta de histidina se realizó utilizando una dilución 1:100 del

anticuerpo anti His tag. Como secundario se utilizó un anticuerpo anti ratón acoplado a Cy3 en una dilución 1:800, de forma similar a la ya descrita.

### **III.20 Obtención de ARN total de distintos tejidos/células**

#### **III.20.1 Extracción del ARN**

La extracción del ARN total se llevó a cabo según el procedimiento especificado para el Reactivo de Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, California*), partiendo de 50-100 mg del respectivo tejidos/células de *B. arenarum* (ovocitos, ovario, bazo, testículo, músculo). En algunos de los casos (ovocitos y ovario), luego de la homogeneización, se realizó un paso de centrifugación adicional a 12.000 g durante 10 min a 4°C, recomendada por el proveedor en casos en que el material presentase una gran cantidad de lípidos. Con el sedimento se eliminaron membranas, polisacáridos y ADN, biomoléculas todas de alto peso molecular, mientras que sobre el sobrenadante (que contiene el ARN) se formó una película de grasa que se intentó evitar tocar al extraer la fracción de interés.

#### **III.20.2 Estimación de la pureza del ARN**

El grado de pureza se estimó mediante la medición espectrofotométrica a las  $\lambda=260$  y 280 nm de una dilución 1:200 de las muestras de ARN obtenidas (5  $\mu$ l en 1 ml H<sub>2</sub>O ultrapura). Se consideraron aceptables las muestras que presentaron una relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  dentro del rango 1,7 - 2,1.

#### **III.20.3 Determinación de la concentración del ARN**

La concentración del ARN fue determinada espectrofotométricamente (Sambrook y col., 1989). Para dosar la cantidad de ARN se hizo una dilución 1:200 de las muestras de ARN obtenidas (5  $\mu$ l en 1 ml H<sub>2</sub>O ultrapura) y se midió la absorbancia a  $\lambda=260$  nm. El cálculo de la concentración de las muestras se hizo teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a  $\lambda=260$  corresponde a 40  $\mu$ g/ml de ARN.

#### **III.20.4 Estimación de la integridad del ARN: Electroforesis de ARN en geles de agarosa**

La integridad del ARN se verificó por análisis en gel de agarosa al 1% p/v en TBE, utilizando el sistema tipo submarino. Para eliminar la presencia de RNAsas que pudiesen

degradar la muestra, la cuba de corrida fue previamente incubada en una solución de 0,1 N NaOH durante 30 min y luego lavada exhaustivamente con H<sub>2</sub>O libre de RNasas. La cantidad de ARN sembrada en todos los casos fue 5 µg. Las bandas de ARN ribosomal se visualizaron por tinción con el colorante SYBR Safe. Como estrategia para evaluar de integridad del ARN extraído se utilizó la observación de bandas definidas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S. Se consideró que el ARN estaba íntegro cuando la relación entre las intensidades de las bandas de ARNr (28S/18S) fue de aproximadamente 2 (Sambrook y col. 1989). El ARN fue mantenido hasta su uso a -70° C.

### **III.21 Síntesis de ADNc a partir de ARN: Reacción de Transcripción Reversa**

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor de la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript™ II (*Invitrogen*). Se utilizaron 5 µg de ARN total, 1 µl del cebador Oligo dT<sub>(16)</sub> (500 µg/ml), 1 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM cada uno) y agua destilada estéril hasta completar un volumen de 12 µl. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C y luego se la enfrió rápidamente en hielo. Los tubos se centrifugaron y posteriormente se agregaron 4 µl del Buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl; pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl del inhibidor de Ribonucleasas RNaseOUT (40 Unidades/µl). Esta mezcla de reactivos se incubó a 42°C durante 2 min. Finalmente se agregó 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript II (200 Unidades/µl) y se mezcló mediante pipeteo suave. De esta forma el volumen final de la reacción fue de 20 µl. La reacción de síntesis de ADNc cursó durante 50 min a 42 °C y la misma se detuvo mediante la inactivación de la enzima por calentamiento a 70 °C durante 15 minutos.

En algunas ocasiones durante la síntesis del ADNc el cebador Oligo dT<sub>(16)</sub> fue reemplazado por el cebador R1. Mediante esta estrategia, el ADNc generado incorpora una secuencia específica para la unión del cebador R2 en el extremo 3' de la molécula. Este ADNc fue utilizado como molde en aquellas PCRs en donde se utilizó el cebador R2 como cebador reverso (ver listado de cebadores en la siguiente sección).

### III.22 Reacción en cadena de la polimerasa

Todas las reacciones de PCR (de sus siglas en inglés: “Polymerase Chain Reaction”) se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para cada reacción de utilizaron 5  $\mu$ l del buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) (*Invitrogen*), 1 U de la enzima Taq polimerasa (5 Unidades/ $\mu$ l) (*Invitrogen*), 200  $\mu$ M dNTPs, 20 pmoles de cada uno de los cebadores. La concentración de magnesio y la cantidad de molde utilizado fue específica para cada reacción. En todos los casos se realizaron controles negativos en donde se omitió el agregado de molde. También se realizaron como control PCRs en donde se utilizó como molde ARN en lugar de ADNc para descartar la posible contaminación de dicho molde con ADN de las células. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler personal (*Eppendorf*).

En algunas de las reacciones de PCR diseñadas para obtener la secuencia completa del ARNm que codifica para la subunidad  $\beta$ 1 integrina de *Bufo arenarum*, se utilizó como molde ADNc presente en la biblioteca no clonada de ovario de *B. arenarum* (ver Figura VI.2 en la sección de resultados VI.2.1). Esta biblioteca fue construida anteriormente en nuestro laboratorio a partir de ARNm de ovario utilizando el sistema comercial Marathon-Ready (*Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*).

En esta biblioteca, los extremos 5' y 3' de los ADNc generados están ligados a un fragmento de “ADN adaptador” (doble hebra, con una región 5' monohebra) (ver Figura III.1).

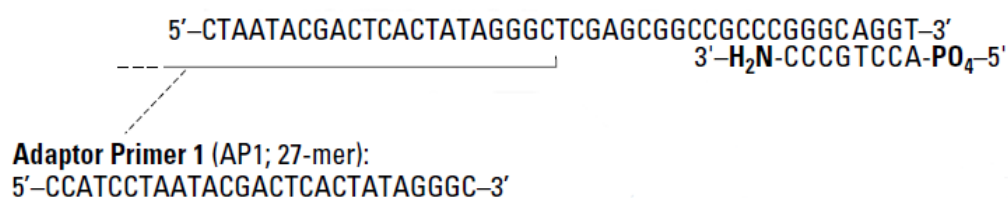


Figura III.1: ADN adaptador. Esquema de la secuencia de “ADN adaptador” que se encuentra acoplada a cada molécula de ADNc (en ambos extremos) de la biblioteca generada por el sistema comercial Marathon-Ready. Se señala el sitio de unión del cebador AP1 dentro de dicha secuencia.

De esta manera cada ARN poli(A) de ovario está representado por una molécula de ADNc con fragmentos “extra” en sus extremos. La presencia de estas secuencias adaptadoras permite la amplificación del ADNc deseado mediante técnicas de RACE 3' y 5' usando una combinación de un cebador específico para la secuencia de interés y otro

que hibrida específicamente con el “ADN adaptador” (cebador AP1). Este cebador está diseñado de manera que su secuencia es idéntica al extremo 5' monohebra del fragmento adaptador.

A continuación se presenta una tabla en donde se esquematizan las condiciones utilizadas en las distintas amplificaciones y un listado con las secuencias de los cebadores empleados en cada caso.

	Cebadores	T anillado	N° ciclos	[ MgCl <sub>2</sub> ]	Tamaño fragmento
<b>β1 integrina</b>	ForwB1 RevB1	58°C	35	1,5 mM	235 pb
<b>β3 integrina</b>	ITGB3F ITGB3R	56°C	35	1,5 mM	494 pb
<b>α4 integrina</b>	ITGA4F ITGA4R	54°C	35	1,5 mM	273 pb
<b>α5 integrina</b>	ITGA5F ITGA5R	60°C	35	2 mM	317 pb
<b>α6 integrina</b>	ITGA6F ITGA6R	56°C	40	1,5 mM	628 pb
<b>α8 integrina</b>	ITGA8F ITGA8R	58°C	35	1,5 mM	311 pb
<b>α9 integrina</b>	ITGA9F ITGA9R	54°C	35	1,5 mM	505 pb
<b>αV integrina</b>	ITGAVF ITGAVR	48°C	35	2 mM	512 pb
<b>SYK</b>	SYKF SYKR	50°C	35	2,5 mM	266 pb
<b>ZAP-70</b>	ZAP70F ZAP70R	50°C	35	2,5 mM	295 pb
<b>TEC</b>	TECF TECR	58°C	35	2,5 mM	283 pb
<b>β actina</b>	β-Actina F β-Actina R	55°C	35	1,5 mM	296 pb

Tabla III.1: Condiciones de amplificación utilizadas en las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) realizadas.

## LISTADO DE CEBADORES UTILIZADOS

Oligo dT <sub>(16)</sub> :	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
AP1:	5' CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
R1:	5' GAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
R2:	5' GAGGACTCGAGCTCAAGC 3'
β-Actina F:	5' GATGGTGTAACCCACACTGTGCC 3'
β-Actina R:	5' AAACGCTCGTTACCAATGGTGATGAC 3'
ForwB1:	5' GATCCAATGGYYTRATTTGTGGAGG 3'
RevB1:	5' CARACACCAASRCARGTCTGACACA 3'
CHECKFB1:	5' CCCCAAYTACWCCGGCAGTGC 3'
Beta13:	5' GCTCGGAGGATAAGTCAACGTGTATGG 3'
Beta15:	5' CCTCCGAGCAATCACATGCACTTCCAG 3'
Newrace 13:	5' GTTCTCATTGGACTGGCGCTGCTGC 3'
Newrace 15:	5' GACGACAGAGTACCTACGGCTGAC 3'
FT800:	5' CCGGAGATTTGCTGTTTGCCTACGAGC 3'
635:	5' GCMAAATCATGTGGRGAATGTAT 3'
3DE8:	5' GACCTSTACTAYCTYATGGACCT 3'
UB1:	5' GCACCACCCGCAGTTTGGTCCGGCC 3'
ITGB3F:	5' TGYGAYGARAARATTGGCTGGAG 3'
ITGB3R:	5' CTYACYGTRTCTCCAATCTTGAG 3'
ITGA4F:	5' TGAAGYCRGAGGTAAAAAGCTTGG 3'
ITGA4R:	5' GCMACATCTTCAAAGCCATCATT 3'
ITGA5F:	5' GGACCDGGMAGCTAYTTCTGGCAAGG 3'
ITGA5R:	5' TASCRAARTAGGAGGCCATCTGTTC 3'
ITGA6F:	5' TGRAYATYCAGTGGCCAAAAGAAAT 3'
ITGA6R:	5' ATCTCAGCCTTGTGATATGTGGCATC 3'
ITGA8F:	5' CTIGGSAACCCTATGGTGKCTGG 3'
ITGA8R:	5' GKKCCAATRTTGTGCAGCTCATA 3'
ITGA9F:	5' TGGCYTGTGCHCAYCGCTGGAAG 3'
ITGA9R:	5' AAGGAGGAGCCRAAGTAAGAGCCCA 3'
ITGAVF:	5' AATCARGGDGAAGGWGCCTATGAAGC 3'
ITGAVR:	5' TTDTRTATYTGTAAGGCCACTG 3'

SYKF: 5' CATCAGGTYTCCATGGGMATGAA 3'  
SYKR: 5' TCCCACATYTRAAYTCCAAAGCTCCA 3'  
ZAP70F: 5' TGGARCAGGCMATMATYAGCCAGGC 3'  
ZAP70R: 5' ACMAGYTGCCAKAGSGTGTCAAA 3'  
TECF: 5' GBATGTGYCWRGATGTRTGTGA 3'  
TECR: 5' CCYTCASTRACACYTCCCACA 3'

### **III.23 Manipulación de moléculas de ADN**

#### **III.23.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La separación de moléculas de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino (Sambrook y col., 1989). La concentración de agarosa utilizada fue del 2% p/v en TAE 1X en presencia del colorante SYBR Safe. Las muestras se sembraron mezcladas en una proporción 5:1 v/v con Solución de Siembra 6X para ADN. La corrida se llevó a cabo en Solución TAE 1X a una intensidad de corriente de 50-75 mA.

#### **III.23.2 Visualización de bandas en geles de agarosa**

Las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador de luz azul ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) (*Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator, Invitrogen*). Las imágenes de los geles se obtuvieron con una cámara digital Olympus C-60 zoom.

#### **III.23.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

Las bandas de interés se cortaron mediante la utilización de hojas de bisturí estériles y las mismas se colocaron en tubos eppendorf también estériles.

La extracción del ADN a partir de geles de agarosa se ejecutó mediante un protocolo de adsorción a resinas utilizando el kit comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN)*, siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **III.23.4 Reacción de ligación de ADN**

Los fragmentos de ADN amplificados en las reacciones de PCR fueron posteriormente ligados al plásmido pGEM-T-Easy Vector System I (*Promega Corporation*,

Madison, WI, EE.UU.). En este vector el clonado es del tipo no direccional, utilizando los residuos desapareados en los extremos del vector (T) y del fragmento a clonar (A).

Las reacciones fueron realizadas utilizando la enzima ADN Ligasa del fago T4 (*Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.*) siguiendo las indicaciones del proveedor de la enzima. Se utilizó para cada reacción un volumen final de 10  $\mu$ l, de los cuales 3  $\mu$ l correspondían al producto de amplificación purificado de los geles de agarosa. La mezcla de ligación estuvo formada por los siguientes componentes: 5  $\mu$ l de Buffer de Ligación 2X (60 mM Tris-HCl pH: 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG), 50 ng del vector pGEM-T-Easy (1  $\mu$ l), 3  $\mu$ l del ADN eluido y 3 Unidades de la enzima T4 ADN Ligasa (3U/ $\mu$ l). Las reacciones se llevaron a cabo durante 4 horas a temperatura ambiente y luego durante toda la noche a 4°C.

### **III.24 Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico**

La transformación de células de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó por choque térmico en presencia de CaCl<sub>2</sub>. La cepa de *Escherichia coli* elegida para llevar a cabo las transformaciones fue la DH5 $\alpha$  (*F- supE44  $\Delta$ lacV169 ( $\phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15) hsdR17 (*r<sub>k</sub> m<sub>k</sub>*) recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1 deoR  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169  $\lambda$* ).

#### **III.24.1 Generación de células competentes**

Para la generación de células competentes se partió de un cultivo de 50 ml de la cepa DH5 $\alpha$  crecido durante toda la noche con agitación a 37°C. De este cultivo se utilizaron 4 ml para inocular 400 ml de LB. Este nuevo cultivo se creció a 37 °C con agitación vigorosa. El crecimiento del mismo se chequeó cada 30 minutos mediante la medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 590 nm.

En el momento en que la densidad óptica a 590 nm llegó a 0,395, se alicuotó el cultivo en ocho tubos de centrífuga de 50 ml previamente enfriados. Estos tubos se mantuvieron en hielo durante 5-10 minutos. Posteriormente se procedió a la sedimentación de las células mediante centrifugación a 3000 rpm durante 7 minutos en centrífuga refrigerada (4°C). Se descartó el sobrenadante y luego cada uno de los pellets fue cuidadosamente resuspendido en 10 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, 10 mM PIPES, pH 7,0 previamente autoclavada).

Las células se volvieron a sedimentar mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos en centrífuga refrigerada (4°C). El sobrenadante se descartó y los pellets volvieron a resuspenderse en 10 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría.

Los 8 tubos se incubaron en hielo durante 10 minutos. Luego se realizó la última centrifugación, en la cual las células se sedimentaron a 2500 rpm durante 5 minutos en centrífuga refrigerada (4°C). El sobrenadante se descartó, y cada uno de los pellets fue resuspendido en 2 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría. Finalmente se realizaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf estériles pre-enfriados que se guardaron inmediatamente a -70°C hasta su uso.

### **III.24.2 Transformación**

A 100 µl de células competentes se les agregó 5 µl de la reacción de ligación. Se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo durante 1 hora. Luego, las células fueron sometidas a un choque térmico de 90 seg a 42°C, con una incubación posterior de 2 min en hielo. Posteriormente, se agregó 1 ml de LB suplementado con glucosa 1% a las células, para ayudar al crecimiento/recuperación de las mismas. Las células se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37°C (invirtiendo el tubo cada 20 minutos)

La transformación se llevó a cabo con la construcción de interés y como control negativo se realizó la transformación en ausencia de ADN.

### **III.24.3 Siembra**

Las células transformadas se sembraron con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico ampicilina (0,1 mg/ml) y se crecieron durante toda una noche a 37°C. Debido a que sólo aquellas células que incorporaron el plásmido pGEM-T-Easy adquirieron la resistencia al antibiótico ampicilina, la utilización de dicho antibiótico en las placas permitió seleccionar exclusivamente aquellas células que recibieron el plásmido (con o sin inserto).

Como el objetivo final es poder analizar colonias aisladas, durante la siembra se utilizaron dos concentraciones de células. En uno de las placas se sembraron 100 µl del tubo en el cual estuvieron creciendo las células. Posteriormente ese mismo tubo fue concentrado por centrifugación: los tubos eppendorf fueron centrifugados durante 2 minutos a 5000 rpm, se descartaron 800 µl del sobrenadante y el pellet se resuspendió en el

sobrenadante remanente (aproximadamente 100  $\mu$ l), los cuales fueron sembrados en una segunda placa de Petri.

#### **III.24.4 Selección de colonias que incorporaron el fragmento de interés**

El vector pGEM-T-Easy contiene la secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Por lo tanto, en presencia del sustrato de esta enzima (X-Gal) junto con el inductor de la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa (IPTG) se puede analizar la actividad de dicha enzima observando la coloración que adquiere la colonia. De estar activa la enzima, el X-Gal es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol y este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Sin embargo, si la secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa se encuentra interrumpida por la inserción del fragmento clonado, la enzima ya no es activa y por lo tanto las colonias son blancas. Es por este motivo que la siembra se realizó en medio LB-agar-X-Gal-IPTG para diferenciar las colonias transformantes que poseían el inserto (blancas) de las que habían sido transformadas pero que no contenían el inserto, es decir, contenían el vector pGEM-T-Easy vacío y re-ligado (azules).

### **III.25 Análisis de colonias transformantes**

#### **III.25.1 Preparación de ADN plasmídico para secuenciación**

El ADN plasmídico se obtuvo utilizando un kit de purificación comercial, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega, Madison, WI, USA*), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para esto se utilizaron 4 ml de un cultivo líquido saturado de células crecidas durante una noche a 37°C, con agitación constante en presencia del antibiótico ampicilina (0,1 mg/ml). El ADN plasmídico obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

#### **III.25.2 Estimación de la concentración de ADN plasmídico**

La concentración del ADN plasmídico obtenido fue determinada de manera espectrofotométrica. Para determinar la cantidad de ADN se hicieron diluciones adecuadas de las muestras y se midió la absorbancia a  $\lambda = 260$  nm considerando que una

unidad de absorbancia a  $\lambda = 260$  nm corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN (Sambrook y col., 1989).

### III.25.3 Secuenciación de ADN

Los ADNc clonados fueron secuenciados usando métodos automáticos (basados en el método enzimático de terminación de cadena mediante el agregado de dideoxinucleótidos (Sanger y col., 1977)) brindado por el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (*Maine, EE.UU.*) <http://www2.umaine.edu/dnaseq>.

La secuenciación se realizó a partir de los plásmidos purificados, utilizando cebadores para secuencias flanqueantes del vector pGEM-T-Easy (T7 Sequencing, SP6 Sequencing) provistos por el servicio de secuenciación.

### III.26 Análisis, búsqueda y comparación de secuencias

Los resultados de secuenciación enviados por Maine fueron procesados por el programa gratuito Chromas Lite Versión 2.1 disponible en el sitio:

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>.

El análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizó usando los programas: EditSeq, SeqMan y MapDraw del DNASTAR (Lasergene 7- *DNASTAR Inc.*-Software for Molecular Biology).

Las búsquedas en base de datos por homología de secuencia de nucleótidos y aminoácidos se realizaron utilizando el algoritmo BLAST (de sus siglas en inglés: “Basic Local Alignment Search Tool”) que provee el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> del Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI (de sus siglas en inglés: “National Center for Biotechnology Information”). La base de datos de secuencias genéticas utilizada por la herramienta BLAST fue el *GenBank*, brindado por el NIH (de su siglas en inglés: “National Institutes of Health”) de Estados Unidos, la cual se encuentra disponible en el mismo sitio.

Los alineamientos múltiples de secuencias se llevaron a cabo mediante el programa ClustalW disponible en el sitio del Centro Médico de la ciudad de Georgetown, EE.UU., <http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/multialn.shtml>.

Para la generación del árbol filogenético que esquematiza las relaciones evolutivas entre las secuencias  $\beta 1$  integrina de distintas especies, se empleó una herramienta

brindada por la versión M 5.05 del programa MEGA (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis”) disponible de forma gratuita en el sitio [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net).

### III.27 COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### Soluciones utilizadas en Ensayos Biológicos

<b>Ringer 10X</b>	NaCl	66 g
NaCl 1,1 M	KCl	1,5 g
KCl 20 mM	CaCl <sub>2</sub>	1,5 g
CaCl <sub>2</sub> 14mM	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

<b>Ringer Estándar o Ringer-Tris</b>	Ringer 10X	100 ml
Ringer 1X	Tris 1M, pH = 7,2	10 ml
Tris 10 mM, pH=7,2	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

<b>Ringer 10%</b>	Ringer 10 X	10 ml
Ringer 0,1X	Tris 1M, pH = 7,2	10 ml
Tris 10 mM, pH=7,2	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

#### **Steinberg's Solution (SB)**

NaCl 58 mM
KCl 0,67 mM
CaCl <sub>2</sub> 0,34 mM
MgSO <sub>4</sub> 0,85 mM
Tris-HCl 4,6 mM, pH = 7,4

#### Soluciones para Electroforesis y Transferencia de proteínas

<b>Solución de Siembra de Proteínas 6X</b>	Tris-HCl 1M pH = 6,8	3,6 ml
	Glicerol	6 ml
	SDS	1,2 g
	Azul de bromofenol	1,2 mg
	H <sub>2</sub> Od	csp 10 ml

<b>Buffer de Corrida 10 X</b>	Glicina	144,2 g
Glicina 2 M	Tris-base	30,3 g
Tris 250 mM	SDS	10 g
SDS 1%	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

<b>Buffer de Transferencia</b>	Glicina	14,41 g
Glicina 192 mM	Tris-base	3,02 g
Tris 25 mM	Metanol	200 ml
Metanol 20%	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

### Soluciones para Tinción de geles de poliacrilamida

<b>Solución de Tinción Coomassie</b>	Azul de Coomassie R-250	0,25g
Azul de Coomassie R-250 0,025%	HAc	100 ml
HAc 10%	Metanol	500 ml
Metanol 50%	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

<b>Solución Decolorante</b>	HAc	100 ml
HAc 10%	Metanol	400 ml
Metanol 40%	H <sub>2</sub> Od	csp 1 litro

### Soluciones para Western blot

<b>TBS 10X</b>	Tris 1M	50 ml
	NaCl	29,22 g
	H <sub>2</sub> Od	csp 500 ml

### Soluciones para tinción de membranas de Nitrocelulosa

<b>Rojo Ponceau</b>	Rojo Ponceau	0,1 g
Rojo Ponceau 0,1 %	HAc glacial	1 ml
HAc 1%	H <sub>2</sub> Od	100 ml

### Soluciones para corridas electroforéticas de ADN y ARN

<b>TBE 10X</b>	Tris base	10,8 g
	Acido Bórico	5,5 g
	EDTA 0,5 M pH=8	4 ml
	H <sub>2</sub> Od	100 ml

<b>TAE 50X</b>	Tris base	60,5 g
	HAc glacial	14,28 ml
	EDTA 0,5 M pH = 8	25 ml
	H <sub>2</sub> Od	csp 250 ml

<b>Solución de Siembra de Ácidos Nucleicos 6X</b>	Sacarosa	2 g
	Azul de Bromofenol	0,0015 g
	Xylene cyanol	0,0015 g
	Tris-HCl 1M pH = 8	50 µl
	EDTA 0,5 M pH = 8	10 µl
	H <sub>2</sub> Od	csp 5 ml

## Medios de cultivo

<b>LB</b>	Extracto de levadura	5 g
	Peptona de caseína	10 g
	NaCl	10g
	Disolver en 950 ml de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	pH = 7
	H <sub>2</sub> O destilada	csp 1 litro
	Esterilizar durante 20 minutos	
<b>LB Agar</b>	Peptona	10 g
	Extracto de Levadura	5 g
	NaCl	10
	Agar	15
	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	csp 1 litro
<b>LB-Agar-X Gal-IPTG</b>	LB-agar	15 ml
	X Gal 2%	50 µl
	IPTG 0,1 M	100 µl

## IV. "Detección de integrinas en las gametas de *Bufo arenarum*"

### IV.1 INTRODUCCION

Como mencionamos en la Introducción, la fecundación puede ser dividida en etapas para su mejor comprensión. Cada una de estas etapas ha sido foco de numerosos estudios (Primakoff & Myles, 2002; Talbot y col., 2003; Vjugina & Evans, 2008; Cánovas & Coy, 2008; Ikawa y col., 2010). Sin embargo, múltiples controversias subsisten en cuanto a cuáles son las moléculas indispensables y a cuál es el mecanismo por el cual están cursando fundamentalmente dos eventos centrales: i) la unión de las gametas a nivel del oolema y la membrana del espermatozoide post-reacción acrosómica, y ii) el mecanismo por el cual se da el aumento del calcio intracelular en el ovocito. En particular, de este último tópico se hablará con mayor detalle en el segundo capítulo de la sección de Resultados de este Trabajo de Tesis.

En cuanto a las proteínas que participarían en la unión de ambas gametas a nivel de membranas plasmáticas, se han descrito un gran número de posibles candidatos (ver Introducción). Esencialmente, en muchos organismos se ha planteado la participación de las proteínas INTEGRINAS durante esta etapa (Bronson & Fusi, 1990; Iwao & Fujimura, 1996; Linfor & Berger, 2000; Campbell y col., 2000). Avalando este posible rol, en innumerables trabajos se ha descrito la presencia de dichas proteínas tanto en espermatozoides como en ovocitos (Linfor & Berger, 2000; Barraud-Lange y col., 2007; Thys y col., 2009; Boissonnas y col., 2010). En estos estudios, sin embargo, de las 26 subunidades descritas hasta el momento sólo  $\alpha V$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  han sido alguna vez involucradas en la literatura participando o mediando el proceso de fecundación.

Las evidencias bioquímicas obtenidas en nuestro laboratorio indicaban que miembros de la subfamilia de integrinas RGD del ovocito tendrían un rol en la interacción ovocito-espermatozoide en *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006). Aún más, los ensayos funcionales utilizando el péptido RGDS en experimentos de fecundación *in vitro* sugirieron un rol para esta subfamilia en la fecundación de este anfibio. Todas estas razones nos impulsaron a comenzar nuestro estudio analizando la presencia de mensajeros que codifican para dichas subunidades integrina en ovocitos de *B. arenarum* y luego, la expresión proteica de los mismos. De esta manera, una vez delimitado el grupo

de subunidades integrina presentes en el ovocito, estaríamos en condiciones de seleccionar y validar funcionalmente la participación en el proceso de fecundación de alguna de ellas.

## IV.2 RESULTADOS

### IV.2.1 Análisis de la expresión de subunidades integrina presentes en el ovocito mediante PCR

Teniendo en cuenta los datos presentes en la bibliografía, nos propusimos detectar las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha V$  integrina en ovocitos de *B. arenarum* mediante PCR. Con este objetivo se aisló ARN total de ovocitos y se sintetizó ADNc a partir de él. Este ADNc se empleó como molde en experimentos de PCR utilizando cebadores degenerados diseñados para cada una de las subunidades mencionadas. Las secuencias de los cebadores utilizados y las condiciones de PCR se detallan en la sección III.22 de Materiales y Métodos.

En los ovocitos de *B. arenarum* detectamos la presencia de ARN mensajeros correspondientes a las subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha V$  integrina (Figura IV.1 A). En aquellos casos en donde no hubo amplificación, se analizó la expresión de dichas subunidades en ADNc obtenido a partir de tejidos de *B. arenarum* que, según la bibliografía, servirían de controles positivos ya que debido a su función las expresarían de manera constitutiva. De esta manera se pudo descartar la posibilidad de que los cebadores diseñados no fuesen capaces de hibridar con las secuencias de *B. arenarum*. Para la subunidad  $\beta 3$  integrina se utilizó como control positivo ADNc de ovario, para  $\alpha 4$  integrina: ADNc de músculo, para  $\alpha 8$  integrina: ADNc de testículo y para  $\alpha 9$  integrina: ADNc de bazo (Figura IV.1 B). A su vez, las distintas reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde ARN de la célula/tejido sin haber realizado la reacción de retro transcripción (calles -, en la Figura IV.1). De esta manera se pudo confirmar que los fragmentos de amplificación obtenidos no se debían a una contaminación del ADNc con ADN genómico del tejido en cuestión.

Los fragmentos obtenidos tuvieron el tamaño esperado. De todas maneras para asegurar la identidad de los mismos, cada una de las bandas obtenidas fue escindida del gel, purificada, clonada y enviada a secuenciar. Las secuencias obtenidas (ver anexo de secuencias) fueron posteriormente enfrentadas contra la base de datos del *GenBank*, lo que permitió corroborar la identidad de cada una de ellas.

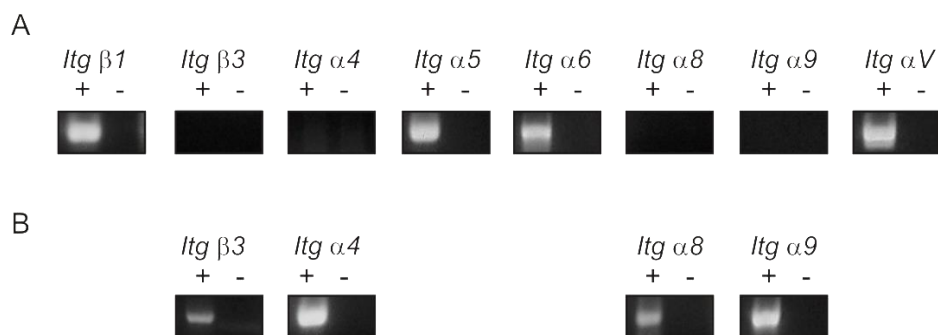


Figura IV.1: Análisis por RT-PCR de la presencia de mensajeros que codifican para subunidades integrina en *Bufo arenarum*. Se realizaron ampliaciones por RT-PCR a partir ARN mensajeros presentes en ovocitos de *Bufo arenarum* (Panel A) o tejidos control (Panel B). Calles +: PCRs en donde se utilizó ADNc como molde, calles -: ARN sin retro transcripción como control negativo. Como controles se utilizaron los siguientes tejidos de *B. arenarum* para obtener los ADNc: para  $\beta 3$  integrina: ovario, para  $\alpha 4$  integrina: músculo, para  $\alpha 8$  integrina: de testículo y para  $\alpha 9$  integrina: bazo.

Habiendo determinado la presencia de ARN mensajeros que codifican para las subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina, nos propusimos evaluar la presencia de las proteínas que estos ARN mensajeros codifican en las gametas de *Bufo arenarum* mediante la técnica de Western blot. A pesar de que la subunidad  $\beta 3$  integrina no pudo ser detectada a nivel de ARNm en el ovocito de *B. arenarum*, pero teniendo en cuenta que dicha subunidad había sido detectada en ovocitos de numerosas especies: humano (Fusi y col., 1996), ratón (Almeida y col., 1995) y bovinos (Pate y col., 2007), y que también resultaba interesante disponer de un control negativo, se decidió de todas maneras analizar su expresión en las membranas del ovocito.

#### IV.2.2 Detección de subunidades integrina mediante Western blot en las gametas de *B. arenarum*

Se prepararon extractos citosólicos y de membranas totales de ovocitos, mediante técnicas de centrifugación diferencial como se describe en Materiales y Métodos (sección III.13.1). La presencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina se analizó mediante la utilización de dos anticuerpos diferentes: el anticuerpo monoclonal 8C8 diseñado contra la proteína homóloga de *Xenopus laevis* y el anticuerpo policlonal M-106 generado contra la proteína humana. La subunidad  $\beta 3$  integrina fue analizada utilizando un anticuerpo policlonal generado contra la subunidad  $\beta 3$  integrina humana (H-96). La expresión de la subunidad

$\alpha 5$  integrina fue analizada utilizando el anticuerpo policlonal D71E2, generado contra la proteína homóloga de pollo. La subunidad  $\alpha V$  integrina fue investigada utilizando un anticuerpo policlonal generado contra la proteína homóloga de humano (H75).

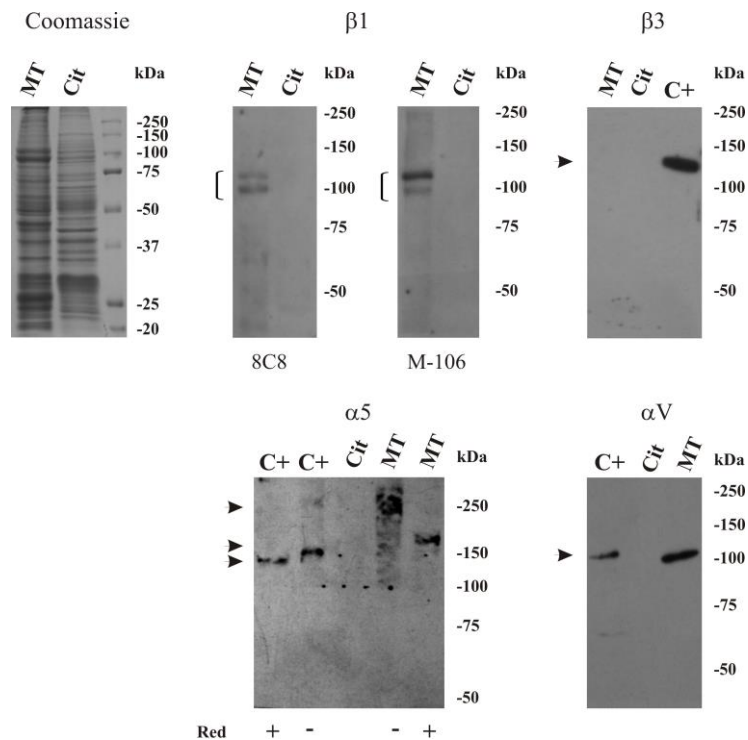


Figura IV.2: Análisis de la expresión de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina en ovocitos de *Bufo arenarum*. La expresión de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina fue analizada por Western blot en muestras de ovocitos. Se separaron por SDS-PAGE extractos proteicos de membranas totales (MT) y fracciones citosólicas (Cit). Las mismas fueron posteriormente teñidas con el colorante Azul de Coomassie (Coomassie) o analizadas con un anticuerpo anti  $\beta 1$  integrina de *Xenopus laevis* (8C8) o de humano (M-106). El corchete indica la ubicación del doblete que corresponde a las dos formas (madura e inmadura) que son detectadas por ambos anticuerpos. La subunidad  $\beta 3$  integrina fue analizada utilizando un anticuerpo H-96. Como control positivo se utilizó un lisado de plaquetas humanas. La expresión de la subunidad  $\alpha 5$  integrina fue analizada utilizando el anticuerpo D71E2. Como control positivo se utilizó un extracto de músculo de pollo. La presencia (+) o ausencia (-) de reductor Ditiotreitól (Red) se indica debajo de cada panel. La subunidad  $\alpha V$  integrina fue detectada utilizando el anticuerpo H-75 y como control positivo se utilizó un extracto de células HeLa. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha de cada panel. Las bandas inmunoreactivas se indican con flechas o corchetes (doblete  $\beta 1$  integrina).

En el extremo izquierdo superior de la Figura IV.2 se muestra un gel representativo de membranas totales y proteínas citosólicas teñidos con Azul de Coomassie. En el panel correspondiente a la detección de  $\beta 1$  integrina, se observa que ambos anticuerpos fueron capaces de detectar la presencia de esta proteína en membranas totales como un doblete cercano a los 100 kDa. Este doblete corresponde a formas de la proteína que difieren en el

grado de glicosilación que presentan (forma inmadura = menor glicosilación = mayor movilidad) (Gawantka y col., 1992). Como puede observarse, tanto el anticuerpo 8C8 como el anticuerpo M-106 son capaces de detectar tanto a la proteína precursora como a la forma madura de la subunidad  $\beta 1$  integrina. La subunidad  $\beta 3$  integrina no pudo detectarse en la muestra de membranas de *B. arenarum*, mientras que el anticuerpo si fue capaz de reconocer a la proteína homóloga humana (calle correspondiente a un lisado de plaquetas humanas). En la calle en donde se sembraron proteínas correspondientes a plaquetas humanas el anticuerpo pudo detectar una banda a la altura del peso molecular esperado para esta subunidad (135 kDa). Una posible explicación de este resultado es que el anticuerpo H-96 al haber sido generado contra la proteína humana sea capaz de reconocer dicho antígeno en muestras humanas pero no tenga la capacidad de reconocer la proteína homóloga de *B. arenarum*, aunque la misma sí se encuentre presente. Sin embargo, esta posibilidad resulta poco probable si se tiene en cuenta que la subunidad  $\beta 3$  integrina tampoco pudo detectarse a nivel de ARNm en ovocitos de *Bufo arenarum* (Figura IV.1).

En el panel correspondiente a la subunidad  $\alpha 5$  integrina, las dos primeras calles corresponden al control positivo utilizado (músculo de pollo) en presencia o ausencia de un agente reductor como es el DTT. En presencia de DTT se observa una banda ligeramente menor al marcador de 150 kDa, mientras que en la muestra que no posee agente reductor se observan dos bandas, una a aproximadamente 150 kDa y la otra un poco más arriba del marcador de 250 kDa, la cual es menos intensa que la de 150 kDa. Cabe aclarar que la subunidad  $\alpha 5$  integrina (así como las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha V$  y  $\alpha IIb$  integrina) es post-traduccionalmente escindida en dos cadenas: pesada y liviana (teniendo la subunidad liviana un peso de aprox. 25-30 kDa). Luego de la escisión ambas subunidades permanecen unidas de forma covalente mediante un enlace disulfuro (Hynes, 1992). Esta modificación post-traducciona l permite explicar la ligera diferencia entre el peso molecular observado en condiciones no reductoras, respecto del peso molecular observado para la banda en condiciones reductoras de la muestra de músculo de pollo. La calle que corresponde a las membranas totales de *B. arenarum* sin agente reductor muestra una banda de aproximadamente 250 kDa, mientras que en condiciones reductoras se observa una banda más definida que migra por arriba del marcador de 150 kDa. Una posible explicación de este resultado es que quizás en condiciones no reductoras,

el tratamiento de las muestras con el detergente SDS, presente en el buffer de siembra, no sea suficiente para eliminar las interacciones que mantienen unidas a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , en el heterodímero y que sean heterodímeros del tipo  $\alpha 5\beta 1$  (ya que esta es la única combinación posible para  $\alpha 5$  integrina), los que también están siendo detectados por el anticuerpo D71E2 tanto en las muestras de pollo como en las de *B. arenarum*.

Cuando se analizó la expresión de la subunidad  $\alpha V$  integrina (anticuerpo H-75) pudo detectarse una banda específica a 120 kDa tanto en las muestras de membranas totales de ovocitos como en la muestra utilizada como control positivo de este Western blot (lisado de células HeLa).

En ninguno de los Westerns hubo señal positiva en las calles correspondientes a los extractos citosólicos, lo cual concuerda con la ubicación subcelular de estas proteínas (las integrinas son proteínas de simple paso insertas en la membrana plasmática).

Desde mediados de los '90 también se ha evaluado la presencia de proteínas del tipo integrina en las gametas masculinas de distintas especies como ser: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* y *Sus scrofa* (Fusi y col., 1996; Barboni y col., 2001; Barraud-Lange y col., 2007; Thys y col., 2009; Boissonnas y col., 2010). Sin embargo, hasta este momento no existían reportes del análisis de la expresión de integrinas en espermatozoides de ningún anfibio. Por este motivo, se decidió analizar la presencia de estas subunidades integrina en espermatozoides de *B. arenarum* (Figura IV.3). Para esto se obtuvieron extractos proteicos a partir del tratamiento de suspensiones de espermatozoides con una solución que contenía el detergente SDS a una concentración final de 0,5% p/v. En los geles se sembró el extracto proteico obtenido de la lisis de 4 y 8 millones de espermatozoides (para evitar problemas de detección por una posible escasa abundancia de las correspondientes subunidades integrina) y como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tubulina.

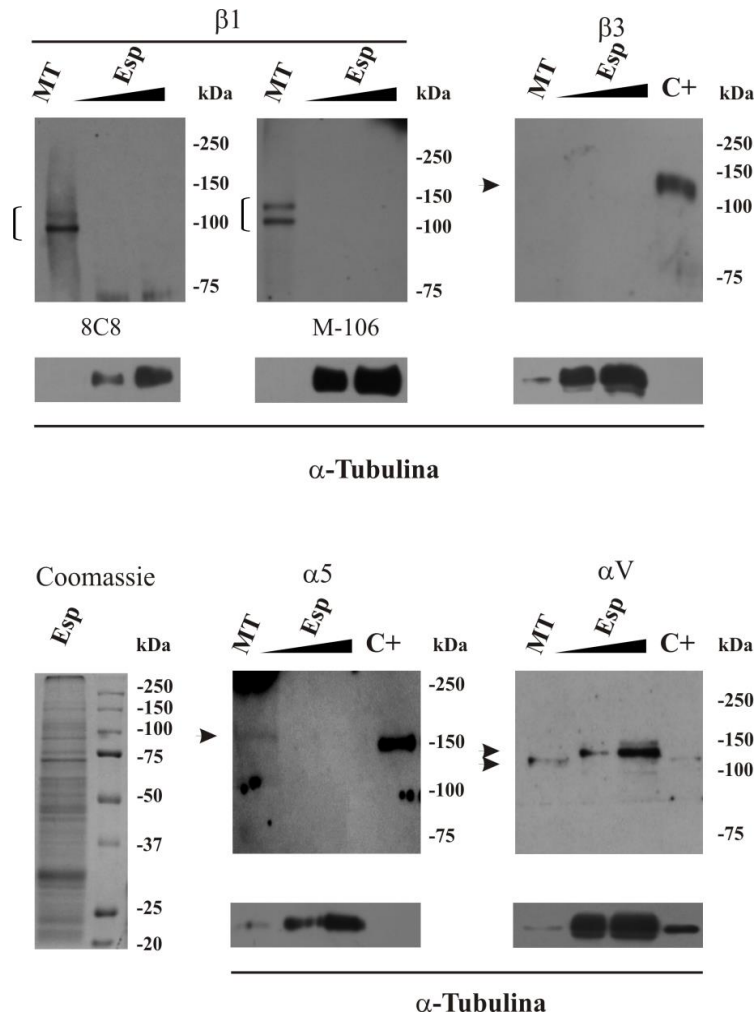


Figura IV.3: Análisis de la expresión de las subunidades subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina en espermatozoides de *Bufo arenarum*. Las subunidades integrina  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  fueron analizadas mediante Western blot de proteínas de espermatozoides extraídas con detergente (SDS 0,5% p/v). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, teñidas con el colorante Azul de Coomassie (Coomassie) o inmunodetectadas con los anticuerpos 8C8, M-106, H-96, D71E2 o H-75. En cada calle se sembraron extractos proteicos obtenidos de 4 y 8 millones de células, respectivamente (Esp). En todos los geles además de la muestra de espermatozoides, también se sembró una muestra de membranas totales de ovocitos (MT) de ovocitos de *Bufo arenarum*, que para los Westerns de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$ , sirvieron de control. Controles positivos (C+): El Western blot de  $\beta 3$  incluye un extracto de plaquetas humanas, el de  $\alpha 5$  un extracto obtenido de músculo de pollo, mientras que el de  $\alpha V$  incluye un lisado de células HeLa. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -Tubulina. Se disminuyó la cantidad de muestra de los extractos proteicos que fueron utilizados como control a efectos de permitir mayores exposiciones en el intento de detectar las proteínas integrina en las muestras de espermatozoides. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha de cada panel. Las bandas inmunoreactivas se indican con flechas o corchetes (doblete  $\beta 1$  integrina).

Como se observa en la Figura IV.3, las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\alpha 5$  integrina no pudieron detectarse. Estos experimentos fueron realizados con muestras de espermatozoides provenientes de distintos animales, y aunque se incrementó

considerablemente el número de células analizado (8 millones de espermatozoides), en ningún caso pudo detectarse una señal del peso molecular esperado. Por otro lado, la subunidad  $\alpha V$  integrina pudo detectarse claramente en estas muestras. La misma se observó como una banda de peso molecular apenas mayor al observado en las muestras de ovocitos y en los extractos de células HeLa.

#### **IV.2.3 Detección de la expresión de la integrina $\beta 1$ en la membrana plasmática de los ovocitos mediante inmunofluorescencia**

En los ensayos de detección de la subunidad  $\beta 1$  integrina mediante Western blot se analizó su presencia en membranas totales de ovocitos. Estas membranas se obtienen luego de una centrifugación a 150.000 g, la cual permite separar el citosol (sobrenadante) del resto de los componentes celulares. Por este motivo dichas membranas no sólo contienen membranas plasmáticas sino también membranas de retículo endoplasmático, aparato de Golgi y demás vesículas presentes en el citoplasma.

En ovocitos de *Xenopus laevis* se ha descrito que la subunidad  $\beta 1$  integrina se encuentra acumulada dentro de estructuras citoplasmáticas denominadas “radii” las cuales se ubican en el polo animal del ovocito (Müller y col., 1993). Estas vesículas le permitirían al ovocito contar con una reserva de dicha proteína durante la rápida formación de nuevas membranas en las sucesivas divisiones mitóticas que ocurren luego de la fecundación. De esta manera a medida que avanza el desarrollo del embrión la subunidad  $\beta 1$  integrina que se encuentra acumulada en estas vesículas se irá insertando en la membrana plasmática de las nuevas células (Müller y col., 1993).

Teniendo en cuenta lo anterior, la detección de la subunidad  $\beta 1$  integrina en las membranas totales de *B. arenarum* no indicaría fehacientemente la presencia de dicha proteína en la membrana plasmática de la gameta. Para confirmar esto, se analizó la expresión de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la membrana plasmática de los ovocitos de *B. arenarum* mediante inmunofluorescencia.

Secciones de ovocitos de *B. arenarum* fueron bloqueados y posteriormente tratados con el anticuerpo policlonal anti  $\beta 1$  integrina M-106. Finalmente para detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína  $\beta 1$  integrina se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 que permite observar fluorescencia roja.

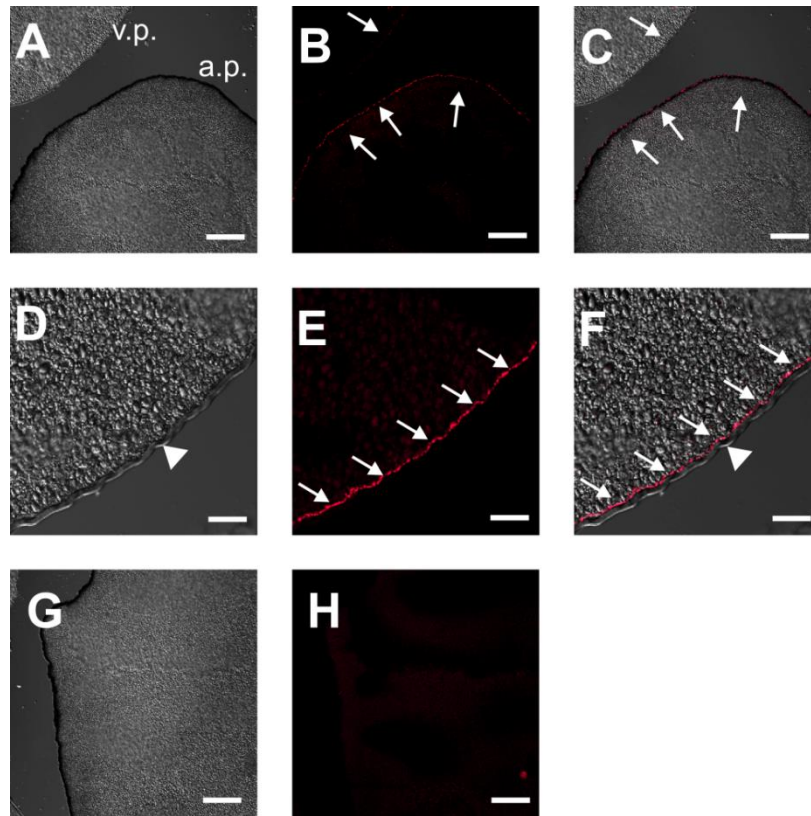


Figura IV.4: Detección por inmunofluorescencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina en ovocitos de *B. arenarum*. Secciones de ovocitos se incubaron con el anticuerpo M-106 (anti- $\beta 1$  integrina), seguido por tinción con anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (señal roja). Las flechas indican la expresión de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la membrana plasmática del ovocito. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Nikon. (A-D-G) imágenes DIC/Nomarski, (B-E-H) imágenes de fluorescencia Cy3 (subunidad  $\beta 1$  integrina), (C-F) imágenes superpuestas de DIC y  $\beta 1$  integrina. (G y H) Control en ausencia del anticuerpo primario M-106. v.p., polo vegetal; a.p., polo animal. Las cabezas de flecha en D y F indican la ubicación de la envoltura vitelina. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$  en A, B, C, G y H, y 25  $\mu\text{m}$  en D, E y F.

Como puede observarse en las Figuras IV.4 (A-F) mediante la utilización del anticuerpo M-106 se detectó señal de fluorescencia en la membrana plasmática del ovocito. La señal de fluorescencia se observa por debajo de la envoltura vitelina (señalada en la Figura IV.4 D y F mediante una cabeza de flecha), lo que indicaría la presencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina en el oolema.

#### **IV.2.4 Efecto de la presencia de anticuerpos anti- $\beta$ 1 integrina en la fecundación de *B. arenarum***

Habiendo confirmado que la subunidad  $\beta$ 1 integrina se expresa en las membranas plasmáticas de los ovocitos, se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* en presencia del anticuerpo M-106 (anti  $\beta$ 1 integrina). El anticuerpo M-106 fue generado contra una región del dominio extracelular de la subunidad  $\beta$ 1 integrina humana y el mismo fue agregado a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml durante los ensayos de fecundación. La presencia de dicho anticuerpo provocó una disminución de un 41,5% respecto al porcentaje de fecundación observado en el control. Como controles de especificidad se realizaron ensayos similares en los cuales se utilizó IgG de conejo no reactiva. Otro control que se realizó fue la incubación de los ovocitos con un anticuerpo capaz de reconocer la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es una proteína que se expresa en la membrana plasmática del ovocito de *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006) y que a su vez (dada su función) se esperaría que no estuviese involucrada en la interacción con la membrana plasmática del espermatozoide. El anticuerpo anti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa fue generado contra una proteína de conejo, sin embargo, el mismo fue previamente utilizado con éxito para detectar la proteína homóloga de *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006). En ninguno de los dos casos (IgG no reactiva y anti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa) se observaron diferencias significativas respecto al porcentaje de fecundación observado en ausencia de anticuerpo (Figura IV.5).

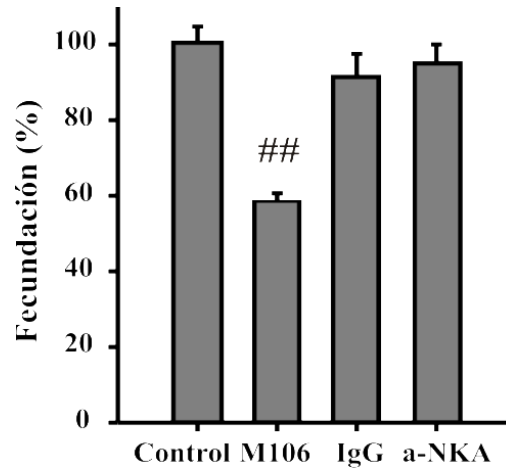


Figura IV.5: Efecto del anticuerpo policlonal anti  $\beta 1$  integrina (M-106) en la fecundación. El anticuerpo M-106 fue generado contra una región del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrina humana. La concentración de espermatozoides utilizada fue de  $3,3 \cdot 10^5$  células/ml. Control: fecundación *in vitro* en ausencia de cualquier anticuerpo, M-106: fecundación en presencia de  $50 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti- $\beta 1$  integrina humana generado en conejo, IgG: fecundación en presencia de  $50 \mu\text{g/ml}$  de IgG normal de conejo, a-NKA: fecundación en presencia de  $50 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de conejo (generado en cabra). ##  $p < 0,01$  versus Control, IgG o a-NKA. En todos los experimentos, la fecundación se determinó por la observación de la primera división mitótica. Los ovocitos (20–40 en cada tratamiento) se obtuvieron de 3 hembras diferentes.

Este resultado es una evidencia más a favor de la participación de las integrinas en el proceso de fecundación. En particular indica que un heterodímero formado por la subunidad  $\beta 1$  integrina tendría un rol importante en la interacción entre las membranas plasmáticas del ovocito y el espermatozoide.

### IV.3 DISCUSIÓN

En las especies de reproducción sexual, el preciso reconocimiento entre las gametas es el paso más importante para que se dé una fecundación exitosa. Este complejo proceso involucra interacciones que se dan entre el espermatozoide y las distintas cubiertas del ovocito. La última interacción se produce entre ligandos presentes en el espermatozoide con receptores específicos del oolema (Kaji & Kudo, 2004). A principios de los 90' en cobayos se propuso un modelo para esta interacción, que incluía la participación de integrinas en el ovocito (Blobel y col., 1992). En un primer momento el principal candidato que se planteó como proteína ligando para las integrinas del ovocito fueron las proteínas ADAM, las cuales presentan un dominio desintegrina en la porción extracelular.

Sin embargo, en los últimos años se han planteado otros posibles candidatos como ser las proteínas de matriz extracelular fibronectina, vitronectina, osteopontina y las proteínas Guanilil-Ciclasas receptoras (Erikson y col., 2007; Thys y col., 2009; Boissonnas y col., 2010; Yang y col., 2010).

En mamíferos, como se describió ampliamente en la sección I.6.9 de la Introducción, la participación de las integrinas en la etapa de unión de las gametas durante la fecundación ha sido sujeto de numerosos estudios, aunque algunos de ellos bastante contradictorios (Almeida y col., 1995; Campbell y col., 2000; Linfor & Berger 2000; He y col., 2003; Sengoku y col., 2004; Sessions y col., 2006; Tatone & Carbone, 2006). Sin embargo, estudios cinéticos realizados en ratón finalmente demostraron que en particular, la presencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina les confiere a los ovocitos murinos una ventaja reproductiva; y aunque no es esencial, si es beneficiosa y por lo tanto ha sido mantenida durante la evolución mediante presión de selección positiva (Baessler y col., 2009).

Cabe remarcar que la participación de las integrinas en esta etapa de la fecundación no sólo ha sido descrita en mamíferos sino que también se han encontrado evidencias que sugieren su participación en un modelo de anfibio como es *Xenopus laevis* (Iwao & Fujimura, 1996; Sato y col., 1999).

Resultados previos de nuestro laboratorio sugerían la interacción entre proteínas integrinas presentes en el oolema con los espermatozoides de *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006). Estos datos, junto con lo descrito en la literatura nos llevó a analizar con mayor profundidad cuáles podrían ser las subunidades integrina presentes en las gametas de *B. arenarum* y analizar el rol que estas proteínas podrían llegar a tener en el proceso de fecundación.

Los resultados que presentamos en este Trabajo de Tesis indican que en el ovocito de *B. arenarum* se encuentran presentes ARN mensajeros que codifican para las subunidades:  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha V$  integrina, mientras que no pudo detectarse la presencia de ARN mensajeros para las subunidades  $\beta 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$ . Posteriormente, mediante Western blot pudimos determinar la presencia de las proteínas  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina en membranas totales del ovocito.

Tanto las subunidades  $\alpha V$  como las subunidades  $\beta 1$  integrina han sido detectadas en las membranas plasmáticas de los ovocitos de todas las especies en las que han sido

analizadas, en humanos (Ziyyat y col., 2006; Sengoku y col., 2004), en ratón (Almeida y col., 1995), en rana (Joos y col., 1995, Gawantka y col., 1992), en bovinos (Pate y col., 2007), y en porcinos (Linfor & Berger, 2000). En cuanto a la expresión de la subunidad  $\alpha 5$ , se ha evidenciado su expresión en todos los modelos recién mencionados con excepción de los porcinos (de Nadai y col., 1996; Sengoku y col., 2004; Tarone y col., 1993; Joos y col., 1995; Thys y col., 2009; Linfor & Berger, 2000).

Las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  suelen asociarse con subunidades  $\beta 1$  para formar los heterodímeros  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 1$  (Hynes, 1992), por lo tanto, la presencia de ambas subunidades alfa, junto con una alta expresión de la subunidad  $\beta 1$ , sugiere que probablemente ambos heterodímeros se encuentren en el oolema de *Bufo arenarum*. Estos heterodímeros pertenecen a la subfamilia de integrinas sensibles a RGD y, cabe remarcar que en ensayos previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró la participación de integrinas de este tipo en el proceso de fecundación de *B. arenarum*. En experimentos de fecundación *in vitro*, la presencia del péptido RGDS provocó una inhibición parcial de la fecundación.

En este Trabajo de Tesis también se evaluó la presencia de las subunidades integrina  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  en espermatozoides de *B. arenarum*. De estas 4 subunidades sólo pudimos detectar la expresión de la subunidad  $\alpha V$  integrina. Hasta el momento en la bibliografía no había reportes de estudios que analicen la expresión de subunidades integrina en las gametas masculinas de ningún anfibio. Sin embargo, en espermatozoides de mamíferos las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 5$  sí han sido descritas (Fusi y col., 1996; Barboni y col., 2001; Thys y col., 2009; Feugang y col., 2009; Boissonnas y col., 2010). No obstante, hay que tener en cuenta que los espermatozoides de estas especies deben enfrentarse a ambientes totalmente diferentes (fecundación interna vs. fecundación externa) con lo cual es probable que el conjunto de proteínas que estas gametas requieran para lograr su objetivo pueda variar ampliamente. Esto podría explicar las diferencias observadas en el patrón de expresión de integrinas entre los espermatozoides de anfibios (fecundación externa) respecto a lo descrito en especies de fecundación interna (mamíferos).

La subunidad  $\alpha V$  integrina puede asociarse con distintas subunidades  $\beta$ :  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ , y  $\beta 8$  (Hynes, 2002). Teniendo en cuenta nuestros resultados, dos de ellas ( $\beta 1$  y  $\beta 3$ ) se

descartan como posibles candidatos para asociarse a la subunidad  $\alpha V$  en la membrana del espermatozoide de *Bufo arenarum*. Faltaría evaluar las tres subunidades  $\beta$  integrina restantes ( $\beta 5$ ,  $\beta 6$  y  $\beta 8$ ) para poder determinar cuál es el heterodímero que se está expresando en la membrana del espermatozoide. Si bien cualquiera de estas combinaciones pertenece a la subfamilia de integrinas RGD, ensayos de fecundación *in vitro* en donde se utilizaron espermatozoides que habían sido preincubados con el péptido RGDS demostraron que dichas integrinas no tendrían un rol importante en la fecundación de *B. arenarum* (Mouguelar, 2007). En cuanto a los reportes referidos a la presencia de subunidades  $\beta$  integrina en espermatozoides, hace pocos años por primera vez se evaluó la expresión de la subunidad  $\beta 5$  integrina en espermatozoides de porcinos y se encontró que dicha proteína estaba presente en esta gameta. La subunidad  $\beta 5$  sólo puede asociarse con la subunidad  $\alpha V$ , con lo cual se deduce que el heterodímero  $\alpha V\beta 5$  integrina estaría presente en la membrana del espermatozoide de esta especie (Feugang y col., 2009). Por lo tanto, sería factible que también en espermatozoides de *Bufo* sea la subunidad  $\beta 5$  quien se asocie a la  $\alpha V$  integrina presente en la membrana plasmática.

Numerosas evidencias de nuestro y de otros laboratorios indican la participación de integrinas de la subfamilia RGD presentes en la membrana plasmática del ovocito en la fecundación de vertebrados. Dado que hemos logrado determinar la presencia de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$  y  $\beta 1$  integrina en muestras de membranas totales, es probable que al menos dos heterodímeros que pertenecen a la subfamilia RGD:  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 1$ , estén presentes en la membrana plasmática del ovocito de *Bufo arenarum*. La subfamilia de integrinas sensibles a RGD incluye a ocho miembros de los cuales tres están formados por la subunidad  $\beta 1$  en combinación con distintas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 8\beta 1$ ). Si bien el sitio de reconocimiento para el ligando extracelular se forma por la combinación de los dominios amino terminales de ambas subunidades integrina, la transducción de señales hacia el interior celular se da en la mayoría de los casos por la interacción de proteínas citosólicas con secuencias presentes en el dominio carboxilo terminal de las subunidades  $\beta$  integrina. Por estos motivos, decidimos continuar el estudio focalizándonos en la participación de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la fecundación de *B. arenarum*. Mediante ensayos de inmunofluorescencia pudimos demostrar la expresión de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la superficie de los ovocitos de *B. arenarum*. Con este resultado en mente, y

para reforzar el rol de la subunidad  $\beta 1$  integrina en el proceso de fecundación, se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de un anticuerpo policlonal diseñado contra una región del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrina (M-106). Los ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de anticuerpos contra distintas subunidades integrina ha sido una estrategia ampliamente utilizada en el estudio del proceso de fecundación en diversas especies (Almeida y col., 1995; Sengoku y col., 2004; Gonçaves y col., 2007; Boissonnas y col., 2010).

En *Bufo arenarum*, la presencia del anticuerpo anti  $\beta 1$  integrina en el medio de fecundación provocó una disminución de un 41,5% respecto al porcentaje de fecundación observado en la condición control. Estos resultados apoyaron nuestra hipótesis que sugiere a proteínas formadas por la subunidad  $\beta 1$  integrina (probablemente asociada a las subunidades  $\alpha 5$  y/o  $\alpha V$ ), cumpliendo un rol en la interacción entre las membranas plasmáticas de ambas gametas. Cabe remarcar que en particular tanto los heterodímeros  $\alpha 5\beta 1$  como los  $\alpha V\beta 1$  ha sido involucrados en el proceso de fecundación de otras especies (Linfor & Berger, 2000; Thys y col., 2009). Además, en una gran variedad de especies se ha demostrado la participación de la subunidad  $\beta 1$  integrina por medio de ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de anticuerpos anti  $\beta 1$  integrina análogos a los realizados durante esta Tesis, con resultados similares (Evans y col., 1997; Ji y col., 1998; Linfor & Berger, 2000; Sengoku y col., 2004; Barraud-Lange y col., 2007).

Nuestros resultados demuestran la participación de las integrinas en la interacción que se da a nivel de membranas entre las gametas, al menos en lo que refiere a las mismas actuando como proteínas de adhesión. Sin embargo, las integrinas también pueden tener funciones relacionadas con la señalización intracelular. De hecho se ha demostrado que las mismas están involucradas en la regulación del pH intracelular (Schwartz y col., 1991), la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma (Schwartz & Denninghoff, 1994), el metabolismo de lípidos de inositol (McNamee y col., 1993) y la fosforilación de proteínas (Kornberg y col., 1992). El siguiente capítulo de este Trabajo de Tesis estará abocado al análisis de esta segunda función de las integrinas.

## V. "Análisis de los eventos tempranos de fosforilación desencadenados por la fecundación"

### V.1 INTRODUCCIÓN

Los ovocitos de numerosas especies animales se encuentran arrestados en diversos estadios de la meiosis y sólo completan este proceso luego de la fecundación. El espermatozoide es por lo tanto el responsable de liberar al ovocito del arresto meiótico y también de inducir otros eventos que constituyen el proceso de activación del ovocito. Estos cambios son de tipo morfológicos y bioquímicos e incluyen: la rotación cortical, la exocitosis de los gránulos corticales, la elevación de la envoltura vitelina, la formación de la envoltura de fecundación, el reinicio de la meiosis, la extrusión del segundo corpúsculo polar, la formación de los pronúcleos, dando por resultado finalmente el comienzo de la primera división mitótica del ovocito fertilizado, que desde este momento se denomina cigoto, y por consiguiente conllevan a la formación de un nuevo individuo con genoma diploide.

Sin embargo, otros factores/estrategias pueden provocar la activación artificial del ovocito, por ej. mediante estimulación eléctrica o mecánica, incubación con ionóforo de calcio, microinyección de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito, etc. Los ovocitos activados artificialmente (sin la participación del espermatozoide), pueden avanzar hasta las primeras divisiones partenogénicas, sin embargo, el desarrollo embrionario no prospera y en poco tiempo el embrión degenera (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2000).

A la lista de compuestos activadores, desde hace algunos años se ha sumado la incubación de los ovocitos con péptidos del tipo RGD. Sin embargo, esta metodología ha sido efectiva sólo para un número acotado de especies: rana (*Xenopus laevis*) y bovinos (*Bos taurus*) (Iwao & Fujimura, 1996; Shilling y col., 1998; Campbell y col. 2000; Sessions y col. 2006; White y col., 2007). Los péptidos del tipo RGD actuarían como agonistas en la activación de proteínas receptoras del tipo integrina presentes en la membrana plasmática de dichos ovocitos. Dichas integrinas, luego de la interacción con su ligando (espermatozoide *in vivo*, péptido RGD *in vitro*), serían las responsables de gatillar la activación del ovocito (aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , exocitosis de los gránulos corticales, división mitótica, etc.).

En otra especie de mamífero (ratón), el tratamiento de los ovocitos con el péptido RGD no logró activar de forma completa al ovocito, induciendo sin embargo, la exocitosis de gránulos corticales y también la activación de la proteína PKC (Tatone & Carbone, 2006).

En *Bufo arenarum*, a diferencia de lo observado en otro anfibio, *Xenopus laevis* (Iwao & Fujimura, 1996), resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que la incubación de ovocitos con péptidos del tipo RGD no era capaz de provocar los cambios morfológicos típicos del proceso de activación.

Cabe remarcar que la utilización de péptidos sintéticos del tipo RGD en el estudio de cascadas de señalización en las que participan integrinas, es una metodología que se ha aplicado en una gran variedad de células (Laser y col., 2000; Campbell y col., 2003; Ortega-Velazquez y col., 2003; Plows y col., 2006; Tamma y col., 2011).

## V.2 RESULTADOS

### V.2.1 Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación de la proteína p42 MAPK

Una característica que comparten la mayoría de los animales es que sus ovocitos, previo a la fecundación, se encuentran arrestados en alguna fase de la meiosis (Stricker, 1999; Miyazaki, 2006). Algunos se encuentran arrestados en profase I (ej. el bivalvo *Macra stultorum*), entre la rotura de la vesícula germinal y la formación del primer corpúsculo polar (ej. las estrellas de mar) o en metafase I (ej. las ascidias). En el grupo de las especies que presentan ovocitos arrestados en metafase II se encuentran los peces, los anfibios y los mamíferos. Las medusas y los erizos de mar son una excepción a esta regla general, ya que los ovocitos de estas especies al momento de la fecundación ya han completado la meiosis (Stricker, 1999).

El arresto en metafase II se debe al accionar de varias proteínas que en su conjunto se denominan factor citoestático (CSF, de sus siglas en inglés: “cytostatic factor”). La actividad del CSF inhibe el accionar del complejo promotor de la anafase (APC, de sus siglas en inglés: “Anaphase Promoting Complex”), el cual es una ubiquitina ligasa que provoca la salida del arresto meiótico mediante la degradación de las proteínas Securina y de la Ciclina B a través del direccionamiento de estas proteínas hacia los proteosomas

(Fang y col., 1999; Peters, 2002). Esto provoca a su vez una disminución abrupta de la actividad del factor promotor de la maduración (MPF, de sus siglas en inglés: “Maturation Promoting Factor”). Este factor está compuesto por la ciclina B y la quinasa dependiente de ciclina Cdc2 (ver Figura V.1). La salida del arresto meiótico se da en el momento de la interacción del espermatozoide con el ovocito, la cual provoca un aumento en la concentración intracelular de calcio y esta señal, a su vez, gatilla el resto de los sucesos.

Como puede observarse en la figura V.1A, el CSF involucra la actividad de la proteína p42 MAPK (de sus siglas en inglés: “Mitogen-Activated Protein Kinases”). La inactivación por desfosforilación de la proteína p42 MAPK luego de la fecundación forma parte de un proceso de señalización intracelular que le permite al ovocito (arrestado en metafase II) completar el proceso de meiosis (Inoue y col., 2007; Wu & Kornbluth, 2008). Posteriormente se dará la fusión de los pronúcleos de cada una de las gametas y de esta manera se formará el huevo o cigoto y se iniciarán las divisiones mitóticas propias del inicio del desarrollo embrionario. Por este motivo, el estado de fosforilación de p42 MAPK ha sido utilizado como indicador de activación en distintas especies de vertebrados (Moos y col., 1995; Sette y col., 1997; Mammadova y col., 2009).

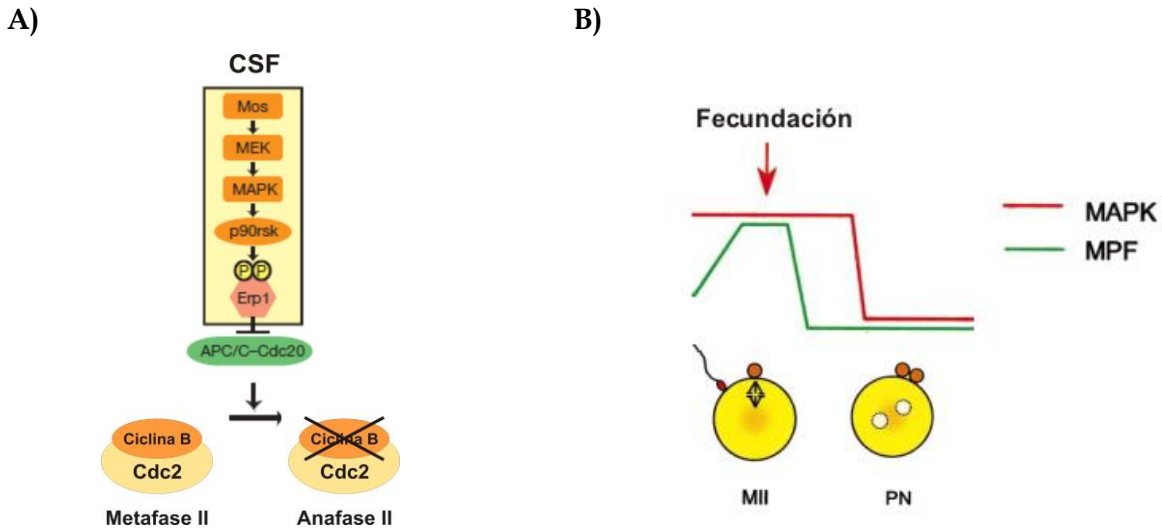


Figura V.1: Relación entre la actividad de MAPK y el arresto meiótico. A) Vía principal que induce el arresto meiótico en metafase II. La actividad del factor citoestático (CSF) provoca la inhibición del complejo promotor de la anafase (APC), y así evita de forma indirecta la degradación de la ciclina B. El factor citoestático consiste en la proteína Mos, las tres quinasas transductoras (MEK, MAPK, y p90rsk) y la proteína efectora Erp1. Erp1 al unirse al complejo APC lo inhibe. Adaptado de Inoue y col. (2007). B) En el momento de la fecundación (flecha roja) la actividad del complejo MPF (Ciclina B + Cdc2) disminuye rápidamente (línea verde) debido a la degradación de la Ciclina B. Minutos después también se observa una disminución en la actividad de la proteína MAPK (línea roja) debido a la defosforilación de dicha proteína en residuos tirosina. MII: metafase II, PN: formación de los pronúcleos. Adaptado de Fan & Sun (2004).

En nuestro laboratorio se había analizado el efecto de la incubación de ovocitos de *Bufo arenarum* con el péptido RGDS a una concentración final de 1 mM. En estos ensayos no se pudieron observar los cambios morfológicos que son propios de la activación de los ovocitos (rotación cortical, elevación de la cubierta de fecundación, etc.). Estos resultados eran diferentes de los observados en *Xenopus laevis* por Iwao & Fujimura (1996). Por lo tanto, decidimos evaluar otro parámetro de activación como es la defosforilación en residuos tirosina de la proteína p42 MAPK que se da luego de la activación de los ovocitos, ya sea ésta natural (fecundación) o artificial (agregado de ionóforo de calcio u otra sustancia activadora). Esto se realizó usando un anticuerpo específico anti p-ERK  $\frac{1}{2}$  en experimentos de inmunodetección utilizando extractos de ovocitos (tratados o no) y cigotos tempranos.

Primero, se evaluó la defosforilación fisiológica que ocurre en el ovocito luego de la fecundación. La Figura V.2 A muestra que MAPK está altamente fosforilada en ovocitos sin fecundar y también a tiempos cortos luego de la fecundación (hasta los 5 minutos post-

inseminación). Sin embargo, la banda que corresponde a la proteína MAPK fosforilada es apenas perceptible a los 10 minutos post fecundación. La Figura V.2 B muestra otro grupo de cigotos y ovocitos tratados o no con el péptido RGDS durante 10 min. En ella se aprecia que el tratamiento con el péptido RGDS no es capaz de inducir la defosforilación de MAPK. Aún luego de tratamientos más prolongados con el péptido RGDS (30 min de incubación), MAPK continúa en un estado de fosforilación similar al inicial (ovocitos) (datos no mostrados).

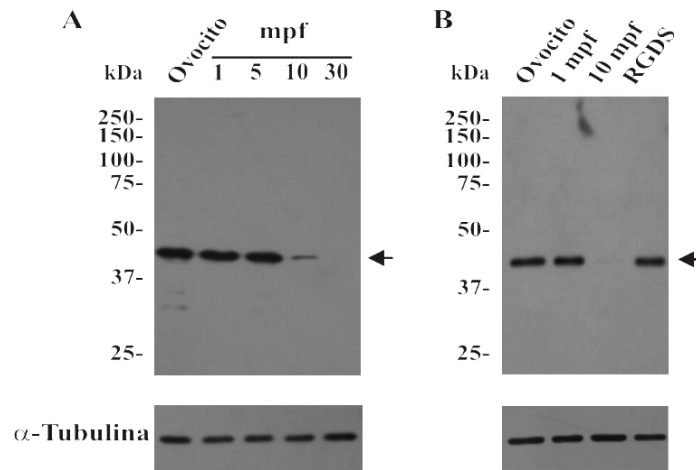


Figura V.2: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación de la proteína MAPK. A) Defosforilación en el tiempo de la proteína p42 MAPK inducida por espermatozoides. Extractos totales fueron preparados a partir de ovocitos y de cigotos a diferentes tiempos post-fecundación (mpf: minutos post fecundación). Las muestras proteicas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, transferidos y analizados utilizando un anticuerpo anti p-ERK ½. B) Efecto del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación de p42 MAPK. Se prepararon extractos totales a partir de ovocitos que fueron incubados con el péptido RGDS (1 mM) durante 10 min. Se analiza el estado de fosforilación de la proteína p42 MAPK en esta muestra, así como en muestras de ovocitos y cigotos 1 y 10 min post fecundación. La posición de la proteína p42 MAPK fosforilada se indica mediante una flecha en ambos paneles. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de cada panel. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -Tubulina.

Este tipo de análisis nos brinda una confirmación bioquímica de las observaciones morfológicas que habíamos obtenidos previamente. Pudiendo de esta manera aseverar que en *Bufo arenarum*, el tratamiento de los ovocitos con el péptido RGDS no provoca la activación de los mismos.

## **V.2.2 Fosforilación/ defosforilación de residuos tirosina en proteínas presentes en el ovocito de *B. arenarum***

### **V.2.2.1 Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS**

Como se expuso en los párrafos anteriores, el péptido RGDS no fue capaz de provocar los cambios morfológicos que indican la activación del ovocito, ni de causar la defosforilación de la proteína p42 MAPK. Sin embargo, sí pudo observarse una inhibición parcial de la fecundación en experimentos de fecundación *in vitro* en presencia del péptido RGDS. Esto era un indicio de que el péptido RGDS tenía un efecto sobre algún proceso relevante durante la interacción de las gametas.

La fosforilación y defosforilación de proteínas en residuos tirosina ha sido relacionado con la regulación de una gran variedad de procesos celulares que incluyen, diferenciación, apoptosis, comunicación célula-célula y también en el proceso de fecundación (Hunter, 1998). De hecho, en diversas especies se ha demostrado que el proceso de fecundación se ve acompañado por cambios en el patrón de fosforilación (Kinsey, 1997; Ueki & Yokosawa, 1997; Peaucellier y col., 1988; Sato y col., 2002; McGinnis y col., 2007). En este sentido, en otros organismos se ha informado la fosforilación de proteínas en residuos tirosina luego de la unión del péptido RGDS a las integrinas que actuarían como proteínas receptoras de dicho ligando (Sato y col., 1999; Ortega-Velazquez y col., 2003; Plows y col., 2006).

La fosforilación en tirosinas es un tipo de modificación post-transduccional que puede provocar tanto la activación como la desactivación de proteínas mediante la alteración de la conformación de las mismas (Alberts y col., 2006; Jin & Pawson, 2012). También, se ha descrito que puede afectar las interacciones del tipo proteína-proteína posibles: como ejemplo sirve recordar que muchas proteínas involucradas en señalización contienen dominios del tipo SH2 que presentan afinidad por residuos tirosina fosforilados. De esta forma, esta simple modificación permite controlar o modular diversas cascadas de señalización intracelular.

Por lo anteriormente expuesto, se decidió analizar si el proceso de fecundación provocaba cambios en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas presentes en ovocitos de *B. arenarum*, y también, si alguno de estos cambios podía inducirse mediante la incubación de los ovocitos con el péptido RGDS.

El patrón de fosforilación en residuos tirosina se analizó mediante inmunodetección en muestras de extractos totales de ovocitos antes y a tiempos cortos posteriores a la fecundación (1, 5, 10 y 30 min) y también en ovocitos tratados durante 10 minutos con el péptido RGDS. La Figura V.3 muestra un gel de poliacrilamida representativo teñido con Azul de Coomassie en donde se analizó el patrón proteico de dichas muestras. Para detectar las señales correspondientes a residuos tirosina fosforilados se utilizó el anticuerpo policlonal PY350. También, se realizaron ensayos de Western blot en donde se utilizó el anticuerpo PY350 en presencia de un exceso de 100 veces del péptido inhibitorio, para descartar aquellas bandas que fuesen inespecíficas. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tubulina, asegurándose de esta manera la misma cantidad de proteínas ( $\mu$ g) en la siembra de cada una de las calles.

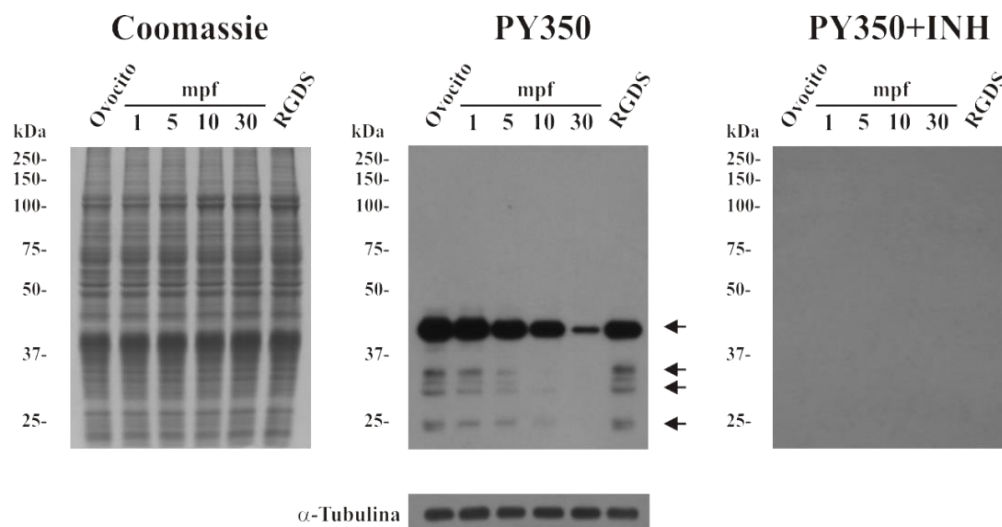


Figura V.3: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas presentes en extractos totales de ovocitos de *B. arenarum*. Extractos totales de ovocitos fueron preparados antes (ovocito) y a distintos tiempos post fecundación (1, 5, 10 y 30 min) y también utilizando ovocitos que fueron previamente incubados durante 10 min con el péptido RGDS a una concentración final de 1 mM (RGDS). Las muestras proteicas fueron separadas mediante SDS-PAGE en gels de poliacrilamida al 12% y teñidos (Coomassie) o transferidos y analizados utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (panel PY350) o dicho anticuerpo más un exceso de 100 veces del péptido inhibitorio (panel PY350 + INH). Las flechas indican las proteínas que cambiaron su estado de fosforilación debido a la fecundación. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de cada panel. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -Tubulina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en el panel correspondiente a la tinción por Coomassie, la fecundación no provocó un cambio importante en el perfil proteico en los diferentes estadios post-fecundación analizados. En el panel correspondiente al anticuerpo PY350, se pudieron observar varias bandas. Las mismas fueron específicas ya que el agregado del péptido inhibitorio provocó la desaparición de todas ellas. Los pesos moleculares aparentes de las proteínas detectadas por el anticuerpo PY350 fueron: 42, 33, 31 y 25 kDa (señaladas mediante flechas en la Figura V.3, panel central).

La proteína de 42-kDa resultó ser la principal proteína fosforilada en ovocitos no fecundados. Luego de la fecundación la intensidad de esta banda decrece gradualmente, siendo prácticamente indetectable a los 30 min post-fecundación. Las señales de fosforilación a los 33, 31 (a veces como doblete) y 25 kDa permanecen hasta los 5 min post-fecundación y luego disminuyen de manera rápida.

El patrón observado en la calle que corresponde a los ovocitos tratados con el péptido RGDS no difiere del que presentan los ovocitos no fecundados. Estos resultados sugieren que durante los primeros minutos que siguen a la fecundación, varias proteínas cambian su patrón de fosforilación en tirosinas, ya sea por fosforilación o desfosforilación. Algunos de estos cambios pueden detectarse cuando se analizan extractos totales, sin embargo, ninguno de estos cambios se visualizan cuando se analizan muestras de extractos totales de ovocitos tratados con el péptido RGDS.

Con el objetivo de profundizar el estudio de la posibilidad de que el péptido RGDS sea capaz de inducir cambios en el patrón de fosforilación en residuos tirosina, se obtuvieron fracciones citosólicas y de membranas plasmáticas de los ovocitos. El objetivo de estos experimentos fue mejorar la detección mediante el enriquecimiento/purificación de las muestras a analizar, así como también determinar la localización subcelular de las bandas fosforiladas. Cabe aclarar, que en el caso de los anfibios, el ovocito es una célula que contiene una gran cantidad de organelas (por ejemplo, cada ovocito de *X. laevis* contiene 16 millones de mitocondrias (Marinos, 1985)), las cuales pueden interferir en la detección de las señales de fosforilación en residuos tirosina que cambian luego de la fecundación o del tratamiento con el péptido RGDS.

La Figura V.4 muestra el resultado obtenido cuando se analizaron muestras citosólicas y de membrana plasmática de: ovocitos y cigotos 1 y 10 min post-fecundación,

y ovocitos tratados con el péptido RGDS 1 mM durante 10 min. En la figura se presenta un gel teñido con azul de Coomassie, un Western blot en donde se utilizó el anticuerpo policlonal anti fosfotirosina (PY350), así como un control realizado mezclando el anticuerpo primario con un exceso del péptido antigénico que permite descartar aquellas bandas que son inespecíficas.

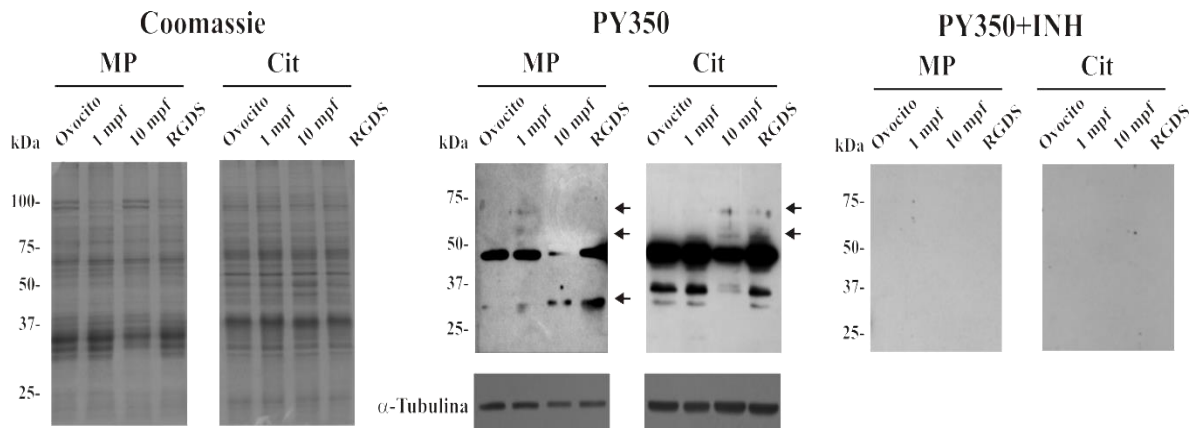


Figura V.4: Efecto de la fecundación y del tratamiento con el péptido RGDS en el estado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas presentes en muestras de membranas plasmáticas y citosólicas de ovocitos de *B. arenarum*. Extractos citosólicos y de membranas plasmáticas fueron preparados a partir de ovocitos, cigotos 1 min y 10 min post fecundación y ovocitos que fueron incubados durante 10 min con el péptido RGDS a una concentración de 1 mM (RGDS). Las muestras de proteínas se separaron por SDS-PAGE y los gels fueron teñidos (Coomassie) o electrotransferidos y analizados mediante ensayos de Western blot. El patrón de fosforilación de proteínas en residuos tirosina se determinó mediante la utilización del anticuerpo policlonal PY350. Las flechas indican las proteínas que cambian su estado de fosforilación debido a la fecundación, y también al tratamiento de los ovocitos con el péptido RGDS. Se descartaron posibles bandas inespecíficas de este anticuerpo mediante la realización de un Western blot utilizando una mezcla del anticuerpo primario PY350 junto con un exceso de 100 veces del péptido antigénico. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -Tubulina. Los marcadores de peso molecular se encuentran a la izquierda de cada panel.

A la izquierda del panel PY350 de la Figura V.4, que corresponde a la fracción de membranas plasmáticas de los ovocitos, se observa una banda intensa a 42 kDa que disminuye notablemente a los 10 min post-fecundación. En esa misma calle (10 mpf) también se observa la aparición de una banda que corresponde a la fosforilación en tirosina de una proteína de peso molecular aparente 30 kDa (flecha). Esta banda, a su vez, también puede detectarse en la muestra obtenida a partir de ovocitos tratados con el péptido RGDS. Cabe remarcar que en la calle correspondiente a la muestra de membranas

plasmáticas 1 min post-fecundación también se observan un par de bandas tenues que presentan un peso aparente de 58 y 70 kDa (flechas).

A la derecha de este panel, que corresponde a proteínas citosólicas, se puede observar una banda a un peso molecular aparente de 42 kDa la cual disminuye la intensidad a los 10 min post-fecundación. El comportamiento de las señales que se observan a los 33 y 31 kDa sigue el mismo patrón. También, puede observarse la aparición de bandas que corresponden a proteínas fosforiladas en residuos tirosina de aproximadamente 58 y 70 kDa (flechas) en las calles que corresponden a los cigotos 10 min post fecundación y también en la muestra de ovocitos tratados con el péptido RGDS.

Estos resultados sugerirían que el péptido RGDS a una concentración final de 1 mM es capaz de mimetizar, al menos en parte, la cascada de señalización que se desencadena en el ovocito luego de la fecundación. A su vez, como el péptido RGDS es un ligando de integrinas, esto estaría avalando la participación de estas proteínas en el proceso de transducción de señal que se da durante la fecundación.

De las bandas que cambian su patrón de fosforilación debido a la fecundación, las que revisten mayor interés son aquellas que sufren un cambio similar debido al tratamiento con el péptido RGDS, es decir, las bandas de 30, 58 y 70 kDa. Si bien en la literatura hay reportes que analizan la participación de proteínas de 30 y 58 kDa en el proceso de fecundación (Kinsey, 1995; Sato y col., 1999; Wu & Kinsey, 2000; Sakakibara y col., 2005), no hay evidencias que vinculen la fosforilación en tirosina de proteínas de 70 kDa con dicho proceso. Debido a esto, se decidió estudiar con mayor profundidad la participación de dicha proteína en la fecundación, e intentar determinar su posible identidad (ver sección V.2.3).

#### **V.2.2.2 Efecto de la pre-incubación con Genisteína**

La genisteína es una isoflavona que actúa como inhibidor específico de tirosina quinasas (Akiyama y col., 1987). Debido a esta acción, ha sido utilizada para estudiar el rol de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina en diferentes procesos biológicos, incluida la fecundación. En *X. laevis*, por ejemplo, los ovocitos preincubados con genisteína no son capaces de sufrir contracción cortical ni presentan la típica desfosforilación de la proteína p42 MAPK que se observa luego de la fecundación (Sato y col., 1998).

Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar la participación de las proteínas tirosina quinasas en la reproducción de *B. arenarum*, analizando el efecto del tratamiento con genisteína sobre la fosforilación/ desfosforilación en residuos tirosina de proteínas **citósólicas** que se induce luego de la fecundación de ovocitos de *B. arenarum*.

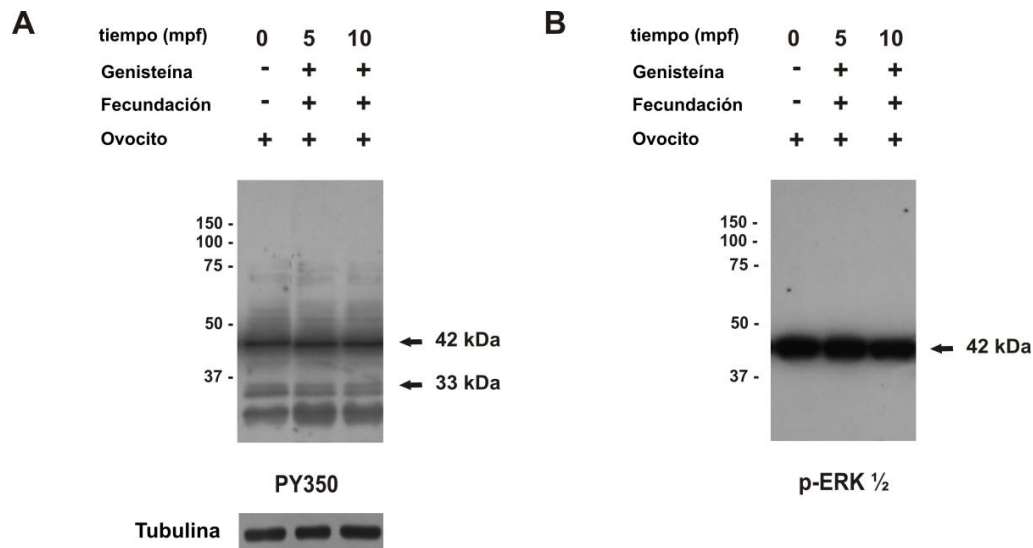


Figura V.5: Efecto del tratamiento con genisteína en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas de ovocitos fecundados. Los ovocitos fueron pre-incubados con el reactivo genisteína 100  $\mu$ M durante 1 hora, lavados y posteriormente se llevó a cabo la fecundación de los mismos. La fecundación se detuvo a los 5 min y 10 min luego del agregado de los espermatozoides. También se analizó el patrón de ovocitos que no estuvieron en contacto con espermatozoides. A) El patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas se determinó mediante la utilización del anticuerpo policlonal PY350. Las flechas señalan una proteína de 42 kDa y otra de 33 kDa que deberían defosforilarse luego del agregado de los espermatozoides, sin embargo, ambas permanecen fosforiladas debido al efecto de la genisteína. B) El grado de fosforilación de la proteína MAPK se determinó mediante la utilización del anticuerpo policlonal p-ERK 1/2. Los marcadores de peso molecular se encuentran a la izquierda de cada panel.

Como puede observarse en la Figura V.5, el patrón de fosforilación observado en las muestras de ovocitos fecundados (5 y 10 min post fecundación) que fueron previamente tratados con genisteína no difiere del observado en la muestra de ovocitos no fecundados. Este resultado estaría indicando que, como ocurre en *X. laevis* (Sato y col., 1998), la cascada de señalización que se desencadena luego de la fecundación involucra al menos una proteína tirosina quinasa. Además, se podría sugerir que esta/s proteína/s participa/n de manera temprana dentro de la cascada ya que el patrón de fosforilación observado tanto a los 5 min como a los 10 min posteriores al agregado de los espermatozoides, es muy similar al correspondiente a los ovocitos no fecundados.

### V.2.2.3 Efecto del tratamiento con Ionóforo de calcio (A23187)

El aumento del calcio intracelular es un evento que se produce luego de la fecundación en todas las especies analizadas hasta el momento (Stricker, 1999; Miyazaki, 2006). Sin embargo, la cantidad e intensidad de los picos de liberación de  $Ca^{2+}$  varía entre las distintas especies (Whitaker, 2006).

El ionóforo de calcio A23187 es un compuesto que permite elevar artificialmente la concentración de calcio intracelular (Stark & O'Doherty, 1982; White y col., 1984; Itoh y col., 1985). Debido a esta característica, el mismo ha sido ampliamente usado para provocar la activación artificial de ovocitos de distintas especies (Kline & Nuccitelli, 1985; Nakada & Mizuno, 1998; Schuetz, 1975; Vincent y col., 1992). Mediante la utilización de este compuesto, se analizó cuáles de los cambios observados en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas podrían llegar a producirse mediante el aumento artificial de la  $[Ca^{2+}]$  en el citosol.

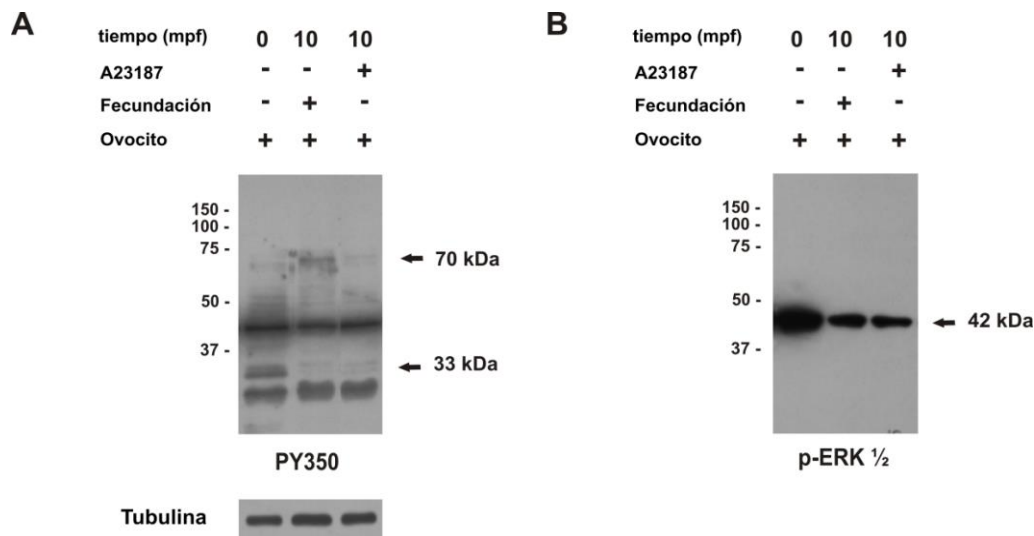


Figura V.6: Efecto del aumento artificial de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas de ovocitos de *Bufo arenarum*. Se utilizó ionóforo de calcio (A23187) a una concentración de  $2,5 \mu M$ . Se analizaron ovocitos no fecundados, ovocitos fecundados en donde el proceso se detuvo 10 min después del agregado de los espermatozoides y ovocitos activados de manera artificial mediante el agregado del ionóforo de calcio A23187. A) El patrón de fosforilación en residuos tirosina de proteínas citosólicas se determinó mediante Western blot utilizando el anticuerpo policlonal PY350. B) El grado de fosforilación de la proteína MAPK se determinó mediante la utilización del anticuerpo policlonal p-ERK 1/2. Los marcadores de peso molecular se encuentran a la izquierda de cada panel.

Como puede observarse en la Figura V.6 A, debido a la fecundación se producen tres cambios notorios en los extractos citosólicos: la aparición (fosforilación) de una proteína de un peso molecular aproximado de 70 kDa, la degradación y/o defosforilación de una proteína con un peso molecular aparente de 33 kDa y la defosforilación de la proteína p42 MAPK. Si luego se comparan las bandas observadas a los 10 min post-fecundación con las de los ovocitos tratados con ionóforo de calcio, puede concluirse que sólo los dos últimos cambios mencionados (defosforilación de las proteínas de 42 y 33 kDa) dependerían del aumento intracelular de calcio.

### **V.2.3 Identificación y rol de la proteína de 70 kDa que se fosforila en residuos tirosina pocos minutos después de la fecundación**

Previamente se observó que la fecundación provocaba la fosforilación en residuos tirosina de una proteína de aproximadamente 70 kDa presente en la fracción citosólica (Figuras V.4 (panel central) y V.6 A). Debido a la ausencia de informes que involucren proteínas de estas características (peso molecular de aprox. 70 kDa y fosforilación en tirosina) con el proceso de fecundación, se decidió intentar determinar la identidad de dicha proteína. Analizando la bibliografía disponible en busca de proteínas no receptoras, fosforilables en restos tirosina, que se asociaran de manera directa o indirecta a integrinas y cuyo peso molecular aproximado fuese de 70 kDa, surgieron tres candidatos probables: las proteínas de la familia **SYK** (de sus siglas en inglés: “Spleen tyrosine (Y) Kinase”)/ **ZAP70** (de sus siglas en inglés: “Zeta-chain-Associated Protein kinase of 70 kDa”) y las de la familia **TEC**.

#### **V.2.3.1 Análisis de la presencia de ARN mensajeros que codifican para las proteínas SYK, ZAP70 y TEC en ovocitos de *Bufo arenarum***

Con el objetivo de examinar la presencia de ARN mensajeros que codifiquen para estas 3 proteínas en ovocitos de *B. arenarum*, se diseñaron cebadores degenerados teniendo en cuenta zonas conservadas dentro de las secuencias de los ARN mensajeros que codifican para dichas proteínas en distintas especies (ver secuencia de los cebadores utilizados en la sección III.22 de Materiales y Métodos). Como molde de la reacción de PCR se utilizaron ADN complementarios obtenidos de ovocito y bazo de *B. arenarum*. El bazo actúa como filtro inmunológico de la sangre. Este órgano está compuesto por una

gran variedad de células del sistema hematopoyético: células B, células T, macrófagos, células dendríticas, células NK (de sus siglas en inglés: “Natural Killer”) y glóbulos rojos (Abbas y col., 2011). Teniendo en cuenta que las tres proteínas han sido principalmente descritas en tejidos del sistema hematopoyético (Taniguchi y col., 1991; Smith y col., 2001; Bradshaw, 2010), se decidió utilizar ADNc obtenido de bazo como control positivo de las distintas reacciones de PCR.

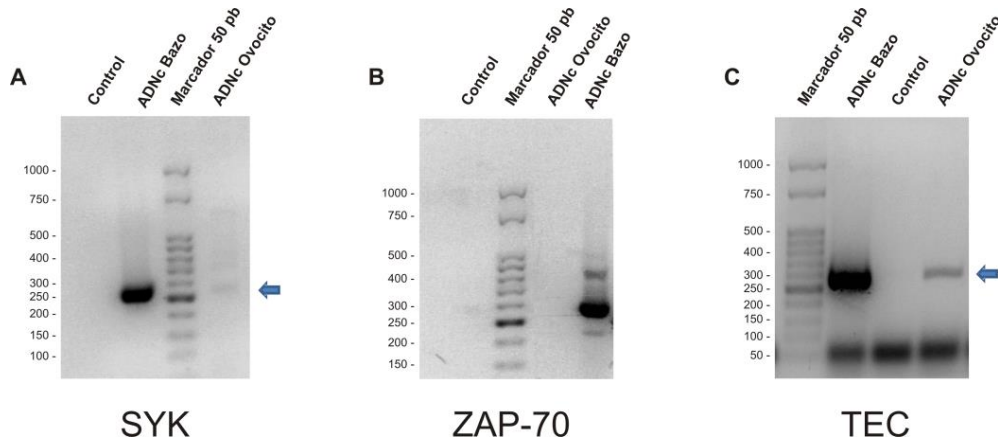


Figura V.7: Análisis de la presencia de ARNm que codifican para las proteínas SYK, ZAP70 y TEC mediante PCR. En todos los casos se utilizó ADNc de bazo como control positivo de la reacción. A) El producto de amplificación para SYK se observó tanto cuando se utilizó ADNc de bazo como cuando se usó el molde generado a partir de ovocitos. El tamaño del fragmento corresponde con el esperado (aprox. 266 pb). B) Sólo pudo observarse el producto de amplificación para ZAP-70 cuando se utilizó como molde ADNc obtenido de bazo. El tamaño del fragmento corresponde con el esperado (aprox. 295 pb). C) El producto de amplificación para TEC pudo observarse al utilizarse como molde tanto ADNc de bazo como ADNc de ovocitos. El fragmento obtenido presentó un tamaño similar al esperado (aprox. 283 pb). En todos los casos se realizaron reacciones de PCR en ausencia de molde como control negativo (Control).

Las bandas obtenidas fueron clonadas (para SYK y TEC las bandas obtenidas al utilizar ADNc de ovocito, y para ZAP-70 la banda obtenida utilizando ADNc de bazo), purificadas y posteriormente enviadas a secuenciar. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron posteriormente enfrentadas contra la base de datos del *GenBank* (ver sección III.26 de Materiales y Métodos) verificándose de esta manera la identidad de cada una de ellas, ya que las mismas presentaron un alto grado de homología con las secuencias de SYK, ZAP-70 y TEC de *Xenopus laevis*. De esta manera, se confirmó la identidad de cada uno de los fragmentos amplificados y se demostró la presencia de ARN mensajeros que codifican para las proteínas SYK y TEC en ovocitos de *B. arenarum*. Habiéndose aclarado la

identidad de la secuencia amplificada a partir de ADNc obtenido de bazo como ZAP-70 se pudo descartar la posibilidad de que los cebadores degenerados diseñados (ZAP70F y ZAP70R) no reconocieran el ARNm de *Bufo arenarum*. Por lo tanto, estos resultados nos permiten concluir que el ARNm que codifica para la proteína ZAP-70 no estaría presente (o lo estaría en un nivel muy bajo) en ovocitos de *Bufo arenarum*.

Posteriormente, mediante la utilización del programa Edit Seq del DNASTAR se obtuvieron las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos obtenidas por PCR para SYK y TEC (Figura V.8).

A)

**CATCAGGTTTCCATGGGCATGAA**GTACTTGGAAAGAAAAAATTTTGTTCACAGGGATTGGCAGCAAGA  
 Y L E E K N F V H R D L A A R  
 AATGTTCTATTGGTGACTCAACATTATGCCAAAATTAGTGATTTTGGGCTTTCTAAAGCAATTGGT  
 N V L L V T Q H Y A K I S D F G L S K A I G  
 TCTGATGAAAATTACTATAAAGCAAAAAGTTGTGGAAAATGGCCGGTCAAGTGGTATGCGCCTGAA  
 S D E N Y Y K A K S C G K W P V K W Y A P E  
 TGTATTAAGTACTATAAATTTTCAAGCAAAAAGTATGTA**TGGAGCTTTGGAGTTTAAATGTGGGA**  
 C I N Y Y K F S S K S D V

B)

**GGATGTGTCTGGATGTGTGTGA**GGCCATGAACTACCTGGAGCAAAACAGTTTCATACATCGTGACCTG  
 A M N Y L E Q N S F I H R D L  
 GCTGCCAGAACTGTTTtagTCAATGCCCTTGGGGTAGTAAAGGTGTCTGATTTTGGAAATGACAAGG  
 A A R N C L V N A L G V V K V S D F G M T R  
 TATGTCCTTGACGATCAGTACACAAGTTCTTGTGGAGCCAAGTTCCAGTAAAATGGTCACCCCC  
 Y V L D D Q Y T S S C G A K F P V K W S P P  
 GAAGTGTTCAACTACAGTAGATTCAGCAGCAAATCTGATGTCTGGTCTTTTGGTGTATTA**TGTGGG**  
 E V F N Y S R F S S K S D V W S F G V L  
**AGGTGTTCACTGAAGG**

Figura V.8: Secuencias de SYK y TEC amplificadas por RT-PCR a partir de cDNA de ovocitos de *Bufo arenarum* y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las mismas. A) La secuencia de 266 nucleótidos amplificada (descartando la región de hibridación de los cebadores) codifica para un fragmento de 72 aminoácidos de la región COOH terminal de la proteína Spleen Tyrosine Kinase (SYK) de *B. arenarum*. B) La secuencia de 239 nucleótidos amplificada (descartando la región de hibridación de los cebadores) codifica para un fragmento de 79 aminoácidos de la región COOH terminal de la proteína Tec de *B. arenarum*. Los sitios de hibridación de los cebadores utilizados se encuentran remarcados en color. Para la deducción de las secuencias aminoacídicas se utilizó el programa EditSeq del DNASTAR.

Las secuencias de aminoácidos deducidas en base a los fragmentos amplificados por RT-PCR corresponden al dominio quinasa de ambas proteínas, SYK y TEC de *B. arenarum* y como puede observarse en la Figura V.9, esta región presenta un alto grado de homología entre distintas especies. Este dominio es el que le confiere la actividad catalítica a las enzimas, lo cual explica el alto nivel de conservación de las secuencias.

El fragmento de SYK amplificado en *B. arenarum* correspondería a los aminoácidos (484-555) de la proteína homóloga de *Homo sapiens*, dentro de esta secuencia se encuentran dos sitios de fosforilación (residuos tirosina 525 y 526) que son importantes en la regulación de la actividad de la proteína y por lo tanto, se encuentran conservados en las secuencias de todas las especies analizadas. También se encuentra altamente conservado el motivo proteína tirosina quinasa en ambas proteínas (resaltado en verde en la Figura V.9).

## A) Secuencias de SYK

525/526

```

H.sap 484 YLEESNFVHRDLAARNVLLVTQHYAKISDFGLSKALRADENYYKAQTHGKWPVKWY
G.gal YLEENNFVHRDLAARNVLLVTQHYAKISDFGLSKALSADENYYKAQSHGKWPVKWY
B. are YLEEKNFVHRDLAARNVLLVTQHYAKISDFGLSKAIGSDENYYKAKSCGKWPVKWY
D.rer YLEEHNFFVHRDLAARNVLLVTQHYAKISDFGLSKALTEDENYYKAKGHGKWPVKWY
X.lae YLEETNFVHRDLAARNVLLVTQHYAKISDFGLSKALGTDENYYQAKTTGKWPVKWY
**** *****: *****: *****:****

```

```

H.sap APECINYYKFSSKSDV 555
G.gal APECMNFYKFSSKSDV
B. are APECINYYKFSSKSDV
D.rer APECMNYLKFSSKSDV
X.lae APESLNYHKFSSKSDV
***.:*: *****

```

## B) Secuencias de TEC

```

H.sap GMEYLERNSFIHRDLAARNCLVSEAGVVKVSDFGMARYVLDDQYTSSSGAKFPVKW
G.gal GMEYLERNSFIHRDLAARNCLVNDLGVVKVSDFGMTRYVLDDQYTSSSGAKFPVKW
X.lae AMSYLEQSNFIHRDLAARNCLVNDTGCVVKVSDFGMTRYVLDDQYTSSCGAKFPVKW
B. are AMNYLEQNSFIHRDLAARNCLVNALGVVKVSDFGMTRYVLDDQYTSSCGAKFPVKW
D.rer GMQHLEENRFIHRDLAARNCLVNTSMVVKVSDFGMTRYVLDDQYWSSSGTKFPVKW
.*.:**.. *****. *****:***** **.:*****

```

```

H.sap CPPEVFNYSRFSSKSDVWSFGVL
G.gal CPPEVFNYSRFSSKSDVWSFGVL
X.lae SPPEVFNYSKFSSKSDVWSFGVL
B. are SPPEVFNYSRFSSKSDVWSFGVL
D.rer SPPEVFNFRCRYSSKSDVWSFGVL
.*****:.:*****

```

Figura V.9: Apilamiento de secuencias de SYK y TEC de distintas especies en la región que corresponde a los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de cDNA de ovocitos de *B. arenarum*. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos en todas las secuencias analizadas. Los dos puntos (:) indican que los aminoácidos que se encuentran en esa posición pertenecen al mismo grupo (no polares, polares, ácidos, básicos). En verde se remarcan los aminoácidos que componen el motivo proteína tirosina quinasa de ambas proteínas. En amarillo se remarcan los sitios de fosforilación en residuos tirosina que son importantes en la activación de las proteínas y que se encuentran dentro del loop de activación de las mismas. A) Los números de acceso de las secuencias de SYK utilizadas en el apilamiento se detallan a continuación: H.sap: *Homo sapiens* (NP\_003168.2), G.gal: *Gallus gallus* (NP\_001026601.1), B. are: *Bufo arenarum*, D.rer: *Danio rerio* (NP\_998008.1), X.lae: *Xenopus laevis* (NP\_001086665.1). B) Los números de acceso de las secuencias de TEC utilizadas en el apilamiento se detallan a continuación: H.sap: *Homo sapiens* (NP\_003206.2), G.gal: *Gallus gallus* (NP\_001025543.1), B. are: *Bufo arenarum*, D.rer: *Danio rerio* (NP\_001108215.1), X.lae: *Xenopus laevis* (NP\_001089927.1). Apilamiento realizado por el programa CLUSTAL W (1.82) Multiple Sequence Alignment.

Como mencionamos antes, ambas proteínas (SYK y TEC) han sido descritas en células del sistema hematopoyético (células B, células T, macrófagos, plaquetas, glóbulos rojos, etc.). En los últimos años también se ha detectado la presencia de las proteínas SYK en otros tipos de células (células epiteliales mamarias, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares, células epiteliales de pulmón, neuronas, y melanocitos) (Coopman y col., 2000; Tsuchida y col., 2000; Yamada y col., 2001; Yanagi y col., 2001; Tsujimura y col., 2001; Ulanova y col., 2005; Hoeller y col., 2005). Sin embargo, hasta el momento en la bibliografía el único reporte de la presencia en ovocitos de mensajeros que codifican para proteínas de las familia SYK y TEC, proviene de un estudio realizado en una especie de invertebrado, como es el erizo de mar (*Anthocidaris crassispina*) (Sakuma y col., 1997). Posteriormente, también se describió la transcripción preferencial del ARNm que codifica para SYK, tanto en ovario como en testículos del platelminto *Schistosoma mansoni*, parásito de los humanos causante de la enfermedad conocida como esquistosomiasis o bilharzia (Knobloch y col., 2002). Por el contrario, en animales vertebrados jamás se ha descrito la transcripción de dichos genes en ovocitos.

En cuanto a la función que dichas proteínas podrían estar cumpliendo en las gametas, sólo hay referencias en la bibliografía que describen la participación de la proteína Spleen Tyrosine Kinase (SYK) en diversas especies. Dentro de los invertebrados, se ha descrito que SYK estaría involucrada en la maduración de los ovocitos de las especies *Cerebratulus*, que es un tipo de gusano celomado. En estas especies, la inhibición de SYK mediante la exposición de los ovocitos al reactivo Piceatannol, evitó la ruptura de la membrana nuclear de la vesícula germinal (GVBD, de sus siglas en inglés: “germinal vesicle breakdown”), así como también bloqueó la activación de MAPK y MPF, que normalmente ocurre durante la maduración del ovocito al ser estos expuestos a agua de mar (Stricker & Smythe, 2006). En el parásito *Schistosoma mansoni* se ha descrito la expresión de SYK principalmente en las células que conforman las gónadas de ambos sexos (testículo y ovario) y se comprobó que esta proteína estaría involucrada en el proceso de gametogénesis. En dicho trabajo la inhibición específica de SYK mediante la utilización de Piceatannol o la inhibición de la transcripción de dicho gen mediante ARN de interferencia, provocó una alteración tanto en la ovogénesis como en la espermatogénesis, la cual se observó mediante un detallado estudio morfológico de dichos órganos (Beckmann y col., 2010). Finalmente, el único reporte que describe la participación

de la proteína SYK en alguna función que involucre gametas de vertebrados es el trabajo de Harayama y colaboradores. En este trabajo, se describe la fosforilación de la proteína SYK en la pieza conectora y principal del flagelo y su probable relación con la regulación de la motilidad de los espermatozoides porcinos (Harayama y col., 2004).

Además, se ha demostrado que existe un vínculo estrecho en las vías de señalización mediadas por las integrinas y por las proteínas SYK. En estudios realizados en diversas células (neutrófilos (Mócsai y col., 2002), monocitos y macrófagos (Vines y col., 2001; Mócsai y col., 2006), plaquetas (Oberfell y col., 2002) y osteoclastos (Zou y col., 2008) que eran deficientes en SYK, se observó una señalización mediada por integrinas alterada. Además, estudios *in vivo* mostraron que la proteína SYK es necesaria para la adhesión fuerte entre los leucocitos y el endotelio inflamado (Frommhold y col., 2007).

Los datos obtenidos al utilizar el péptido RGDS, indicaban que la activación de integrinas presentes en la membrana, provocaban un cambio en el grado de fosforilación de residuos tirosina de una proteína de 70 kDa y por consiguiente probablemente la activación/inactivación de dicha proteína. Por todo lo expuesto en los párrafos anteriores decidimos continuar este trabajo focalizándonos en SYK.

### **V.2.3.2 Spleen Tyrosine Kinase (SYK): breve reseña**

La principal función que se le ha adjudicado a SYK es la de actuar como proteína adaptadora, participando en la cascada de señalización en células del sistema inmune (células B, macrófagos, monocitos, plaquetas), transmitiendo señales desde la membrana plasmática hacia el interior celular.

La proteína SYK consiste de dos dominios SH2 (de sus siglas en inglés: “Src Homology 2”) en la región amino terminal, separados por un dominio conocido como interdominio A. Los dominios SH2 tienen la capacidad de interactuar con distintas proteínas blanco uniéndose a residuos tirosina fosforilados que se encuentran dentro de las mismas. Cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína se encuentra el dominio quinasa, el cual a su vez se encuentra separado del dominio C-SH2 por medio del interdominio B (Figura V.10).

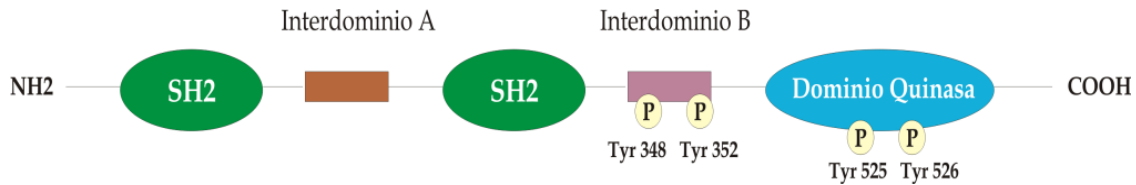


Figura V.10: Estructura de la proteína Spleen Tyrosine Kinase. La proteína presenta 2 dominios del tipo SH2 (verde) y un dominio quinasa (celeste). Los dominios SH2 se encuentran separados por una secuencia denominada interdominio A también conocida como “inter-SH2 linker” (marrón). Mientras que el dominio SH2 más cercano al extremo COOH se encuentra separado del dominio quinasa por una secuencia denominada interdominio B o “SH2-kinase linker” (violeta). Se encuentran resaltados los sitios de fosforilación en residuos tirosina de SYK que son importantes para la activación de la proteína. Los residuos Tyr 348 y Tyr 352 se encuentran dentro del interdominio B, y los residuos Tyr 525 y Tyr 526 dentro del bucle de activación (Adaptado de Bradshaw, 2010).

### Mecanismos de activación de la quinasa SYK

La proteína SYK presenta dos conformaciones: una inactiva en la cual el interdominio B presenta una interacción intramolecular con el dominio quinasa, autoinhibiendo de esta manera la actividad enzimática de la proteína, y una conformación activa en la cual se elimina esta interacción autoinhibitoria. El cambio de conformación puede darse por dos mecanismos diferentes.

Mecanismo 1: Este mecanismo de activación de SYK se inicia cuando quinasas de la familia Src fosforilan secuencias ITAMs (de sus siglas en inglés: “Immune Tirosine Activation Motifs”) presentes dentro de distintos receptores de membrana plasmática (receptor de células B, FC $\epsilon$ RI, FC $\gamma$ RIIA, etc.) (Reth, 1989). Las proteínas SYK se unen posteriormente a las secuencias ITAM fosforiladas (YxxI/Lx7-12YxxL) a través de los dos dominios SH2. La unión de las quinasas SYK a las secuencias ITAM sirve tanto para inducir la actividad quinasa de la proteína SYK así como también para localizar a la quinasa cerca de sus sustratos. Posteriormente, la proteína SYK activada provocará la fosforilación de proteínas que se encuentran por debajo de la cascada de señalización (Bradshaw, 2010).

Mecanismo 2: La fosforilación de residuos tirosina presentes en el interdominio B (Y342 y Y346 en ratón, Y348 y Y352 en humano), introduce cargas negativas en esta región de la proteína que provocan un cambio conformacional, en el cual el dominio quinasa pierde la capacidad de interactuar con el interdominio B y de esta manera, la enzima se activa. Para una completa activación de la enzima también es necesaria la fosforilación de

dos residuos tirosina presentes en el dominio quinasa de la enzima (Y519 y Y520 en ratón, Y525 y Y526 en humano)

El mecanismo de activación de la proteína SYK por medio de las integrinas ha sido debatido por mucho tiempo, planteándose tanto mecanismos de activación independientes de las secuencias ITAM como dependientes. En favor del mecanismo de activación independiente de las secuencias ITAM, se ha descrito la activación de la proteína SYK mediante la interacción directa con el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  integrina (Woodside y col., 2001). Posteriormente, el mismo grupo demostró que si bien la interacción se daba a través del dominio SH2 amino terminal de la proteína SYK, dicha interacción era independiente del estado de fosforilación en residuos tirosina del dominio citoplasmático  $\beta$  integrina (Woodside y col., 2002). En el mecanismo de activación dependiente de secuencias ITAM, se postula la participación de proteínas adaptadoras, ya que las integrinas carecen de secuencias tipo ITAM en sus dominios citoplasmáticos (Mócsai y col., 2006; Abtahian y col., 2006; Zou y col., 2007). Sin embargo, ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes, y de hecho se plantea que el escenario más probable es que los dos mecanismos en conjunto regulen la actividad de SYK (Mócsai y col., 2010).

### **Modulación de la actividad quinasa de las proteínas SYK murina y humana por fosforilación en residuos tirosina**

Las proteínas SYK murina y humana presentan diez sitios principales de fosforilación en tirosinas: Y130, Y290, Y317, Y342, Y346, Y519, Y520, Y623, Y624 y Y625 (numeración dada teniendo en cuenta la secuencia de la proteína murina).

El residuo **Y130** se encuentra en el interdominio A y se ha demostrado que su fosforilación provoca una disminución en la afinidad de la proteína SYK hacia las secuencias ITAM, lo que provoca la liberación de la quinasa (activa) del receptor. Al residuo **Y290** no se le ha podido todavía asignar un rol ya que su mutación por un residuo de fenilalanina no tiene un efecto importante en la habilidad de la proteína SYK para transducir señales desde los receptores FC $\epsilon$ RI o del TCR (Geahlen, 2009).

Los residuos **Y317** y los tres residuos tirosina adyacentes localizados en el extremo COOH terminal de la proteína (**Y623**, **Y624** y **Y625**) corresponden a los sitios de regulación negativa de la proteína. La fosforilación de la tirosina 317 inhibe la capacidad de la enzima

SYK de señalizar desde el receptor BCR de las células B o del receptor FCεRI en los mastocitos. Los residuos Y623, Y624 y Y625 tienen un rol importante en la formación de la interacción entre el dominio quinasa y el interdominio A que estabiliza la forma autoinhibitoria de la quinasa. Por este motivo, el reemplazo de estos residuos por fenilalanina genera una mutante con ganancia de función (Geahlen, 2009).

Como contrapartida, los residuos tirosina: **Y342, Y346, Y519, Y520** (Y348, Y352, Y525, Y526 en humano) son los sitios de regulación positiva (activación) de la proteína. La fosforilación de los residuos Y342 y 346 estimula la señalización tanto por un aumento en la actividad quinasa de la proteína SYK, como también debido a que se generan sitios de anclaje involucrados en interacciones del tipo proteína-proteína. Varias proteínas incluyendo PLCγ, Vav-1, Vav-2, las quinasas de la familia Src: Lck y Fgr, la subunidad p85 de la proteína PI3K y Grb2, tienen dominios SH2 que pueden unirse a uno o ambos de estos residuos fosfotirosinas. Los residuos tirosina Y519 e Y520 están localizados en el loop de activación que se encuentra dentro del dominio catalítico y formas mutantes de la proteína en las cuales estos residuos han sido reemplazados por fenilalaninas presentan deficiencias en la señalización celular (Geahlen, 2009).

#### **V.2.3.3 Spleen Tyrosine Kinase: Estudio de su estado de fosforilación durante la fecundación en *Bufo arenarum***

Habiendo determinado la presencia de ARNm que codifica para la proteína SYK en *B. arenarum*, se decidió analizar el posible rol de esta proteína en el proceso de fecundación, analizando el patrón de fosforilación de la proteína a distintos tiempos post fecundación. Se realizaron ensayos de inmunodetección utilizando dos anticuerpos monoclonales comerciales (C87C1 y 65E4, ambos de *Cell Signaling*) capaces de detectar a la proteína SYK en su estado fosforilado. El anticuerpo 65E4 es capaz de detectar al residuo tirosina 352 fosforilado, mientras que el anticuerpo C87C1 reconoce la fosforilación de los residuos tirosina 525 y 526. Estos anticuerpos han sido utilizados en la detección de dichos residuos fosforilados en una gran variedad de células (Suzuki-Inoue y col., 2004; Speich y col., 2008). En estos ensayos se analizaron muestras citosólicas (sobrenadante de una centrifugación a 150.000 g) obtenidas de ovocitos sin fecundar, y de cigotos a distintos tiempos post-fecundación (1, 5 y 10 mpf).

Como se mencionó anteriormente, las tirosinas 525 y 526 se encuentran en el bucle de activación de la proteína SYK y se ha demostrado que la fosforilación de las mismas es esencial para la total activación de la proteína (Zhang, 2000). La tirosina 352, por su parte, se cree que es un importante sitio de regulación positiva de la función de SYK, ya que influye en la unión de esta proteína con proteínas como PLC $\gamma$ 1, PLC $\gamma$ 2, Vav1, la subunidad p85 de la proteína PI3K, Lck y Grb2. (Law y col., 1996; Moon y col., 2005; Simon y col., 2005).

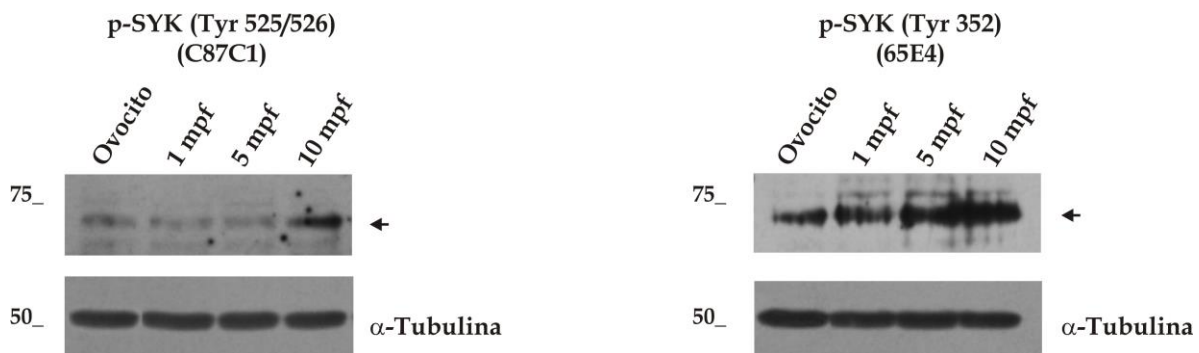


Figura V.11: Análisis durante la fecundación del estado de fosforilación de la proteína SYK presente en el ovocito de *B. arenarum*. Muestras citosólicas obtenidas de ovocitos sin fecundar (SF) y de cigotos 1, 5 y 10 min post-fecundación se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Los geles fueron electrotransferidos y las membranas fueron enfrentadas a un anticuerpo monoclonal generado contra los residuos Tyr525/526 de la proteína SYK humana (C87C1) (panel de la izquierda) ó contra el residuo Tyr352 de la proteína SYK humana (65E4) (panel de la derecha). Las flechas indican las bandas inmunoreactivas de cada panel. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tubulina.

En ambos Western blots pudo detectarse que la proteína SYK sufre un cambio en el nivel de fosforilación en residuos tirosina de la proteína como resultado del proceso de fecundación. En el caso del anticuerpo C87C1 lo que se observa es que los aminoácidos 525 y 526 presentan un diferencia muy marcada en el grado de fosforilación entre la muestra de 5 min y la de 10 min post-fecundación (Figura V.11, panel de la izquierda), mientras que el resultado obtenido con el anticuerpo 65E4 indica que la fosforilación que se produce en la tirosina 352 es paulatina, aumentando en intensidad desde el primer minuto posterior a la fecundación (Figura V.11, panel de la derecha).

Estos cambios en el nivel de fosforilación de los residuos tirosina 352, 525 y 526 se encuentran directamente relacionados con cambios en la conformación de la proteína que a su vez están asociados con la activación de la misma (mecanismo 2). Por lo que nuestros

resultados nos estarían indicando que la proteína Spleen Tyrosine Kinase (SYK) se estaría activando como consecuencia de la fecundación.

### V.3 DISCUSIÓN

La denominada “activación del ovocito” se refiere a los eventos celulares y moleculares que ocurren durante la fecundación y que median la transición del ovocito desde una gameta haploide a un cigoto diploide (Machaca, 2007). Se inicia por el aumento transitorio de calcio intracelular en el citosol de los ovocitos animales. Una de las señales más tempranas de la activación del ovocito es la exocitosis de los gránulos corticales de la superficie del ovocito, lo que ocasiona la reacción de zona (cambio estructural de la envoltura vitelina), que permiten prevenir la poliespermia. En el caso de mamíferos, anfibios y peces, los siguientes eventos son la inhibición del factor citoestático, el reinicio de la meiosis II, la liberación del 2° cuerpo polar, la descondensación del núcleo del espermatozoide, la replicación del ADN, la fusión de los pronúcleos y la primera división celular por mitosis (Xu y col., 1994; Longo, 1997).

Si bien el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es un fenómeno “universal”, la cantidad e intensidad (amplitud) de los picos varía de acuerdo a la especie (Stricker, 1999). En cuanto al mecanismo por el cual la interacción espermatozoide-ovocito provoca el aumento intracelular de calcio, hasta el momento dos son las hipótesis que tienen mayor aceptación, sin embargo es importante aclarar que ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes:

- 1) Hipótesis del Receptor para el espermatozoide: En esta hipótesis el espermatozoide es visto como una especie de “hormona” que genera el aumento de calcio mediante su unión a receptores presentes en el oolema (Foltz & Shilling, 1993).
- 2) Hipótesis del Factor Espermático: Esta hipótesis postula que luego de la fusión de las gametas, el espermatozoide introduce dentro del ooplasma moléculas que conllevan al aumento del calcio intracelular (Swann, 1990, 1993).

En el anfibio *Xenopus laevis*, la inducción de la activación del ovocito por el espermatozoide parece estar mediada por componentes del espermatozoide que interactuarían con la membrana plasmática del espermatozoide y que provocarían una cascada de transducción de señal dentro del citoplasma del ovocito (Iwao & Fujimura, 1996; Sato y col., 2000, 2004, 2006; Runft y col., 2002). En esta especie se ha descrito que

péptidos desintegrina que contienen las secuencias RGD o KTE activarían a integrinas presentes en la superficie celular, y como consecuencia se produciría un incremento transiente en la  $[Ca^{2+}]_i$ , causando finalmente la activación de los ovocitos de *Xenopus* (Iwao & Fujimura, 1996; Shilling y col., 1998). Además, se ha demostrado que proteasas derivadas del espermatozoide o ciertas clases de proteasas agregadas de manera exógena promueven la activación en *Xenopus* (Iwao y col., 1994; Mizote y col., 1999). Un escenario similar se ha sugerido para otras especies de vertebrados e invertebrados como son bovino (desintegrinas del espermatozoide) (Campbell y col., 2000) y estrella de mar (proteasa del espermatozoide) (Carroll & Jaffe, 1995).

En mamíferos, por el contrario, la hipótesis más aceptada hasta el momento es la del “Factor Espermático”. En cuanto a la identidad de este factor espermático, se propone que el mismo sería un tipo de fosfolipasa C, la PLC $\zeta$  (Saunders y col., 2002; Cox y col., 2002; Rogers y col., 2004; Kashir y col., 2012).

En el modelo de estudio con el cual trabajamos (anfibio *Bufo arenarum*) los ensayos de incubación con el péptido RGDS indicaron que el péptido no fue capaz de activar a los ovocitos. La activación de los mismos se analizó mediante la visualización de los cambios morfológicos típicos de los ovocitos activados (rotación cortical, pérdida de la hendidura, elevación de la cubierta de fecundación, etc.), así como también el análisis bioquímico en donde se evaluó el grado de fosforilación de la proteína p42 MAPK.

Sin embargo, la incubación de los ovocitos con el péptido RGDS, sí provocó una inhibición considerable en el porcentaje de fecundación observado. Estos resultados nos indicaban que probablemente las integrinas de la subfamilia RGD presentes en la membrana plasmática del ovocito sí estarían participando en el proceso de fecundación de *Bufo*. Lo cual nos llevó a evaluar los cambios en el patrón de fosforilación de residuos tirosina luego de la fecundación, y comparar estos cambios con el patrón observado en las muestras provenientes de ovocitos incubados con el péptido RGDS.

Cuando se analizaron extractos totales, no se pudieron detectar diferencias entre el patrón observado en las muestras de ovocitos sin fecundar y las de ovocitos preincubados con el péptido RGDS (activación artificial de las integrinas presentes en el oolema). Por este motivo, decidimos trabajar con muestras más purificadas y para esto, se aislaron por centrifugación diferencial fracciones citosólicas y de membranas plasmáticas. Mediante

esta estrategia, sí pudimos observar la fosforilación en restos tirosina de distintas proteínas tanto en las muestras correspondientes a ovocitos fecundados como también en la de ovocitos que no tuvieron contacto con los espermatozoides sino que fueron preincubados con el péptido RGDS, y por lo tanto, la vía de señalización integrina dependiente fue activada.

Los resultados obtenidos nos permitirían concluir que los receptores de unión a RGDS participarían en la señalización de los ovocitos de *B. arenarum*, pero que la unión del péptido RGDS no sería suficiente para la completa activación de los ovocitos. Con lo cual se propone que en *Bufo arenarum*, las integrinas presentes en la membrana plasmática del ovocito estarían actuando como co-receptores, participando y ayudando en el proceso de fecundación, contribuyendo en uniones más rápidas o más eficientes entre las membranas plasmáticas de las dos gametas. También estarían transmitiendo señales desde el exterior hacia el citoplasma, que sin embargo, no son suficientes para provocar el reinicio de la meiosis (analizado por el grado de fosforilación de MAPK), y por consiguiente tampoco permitiendo el inicio del desarrollo embrionario (evaluado por la observación de las primeras divisiones mitóticas).

Los cambios en el patrón de fosforilación de residuos tirosina que son similares entre los ovocitos fecundados y los preincubados con el péptido RGDS son fundamentalmente los que se dan en proteínas de 30, 60 y 70 kDa. Con respecto a la identidad de estas proteínas, en trabajos realizados en otras especies se han estudiado proteínas de 30 y 60 kDa, sin embargo, no hay reportes en la literatura que analicen la participación de proteínas de 70 kDa durante la fecundación.

### **Proteína de aproximadamente 30 kDa**

En el 2005, Sakakibara y colaboradores identificaron una proteína asociada a los microdominios de membrana del ovocito de *Xenopus laevis* que es rápidamente fosforilada en tirosina luego de la fecundación (5 mpf). Esta proteína fue posteriormente identificada como la proteína homóloga de la Uroplaquina III humana y denominada: xUPIII. (Sakakibara y col., 2005). La misma consiste en un dominio extracelular N-glicosilado en el extremo amino terminal, una secuencia transmembrana y en el extremo carboxilo terminal, una secuencia citoplasmática que contiene el residuo tirosina que es fosforilado luego de la fecundación (Tyr 249). Dicho residuo se encuentra conservado en distintas

especies. A su vez, la presencia de un anticuerpo policlonal generado contra el dominio extracelular de la proteína en el medio de fecundación, provocó una inhibición de la fecundación de forma dosis dependiente (Sakakibara y col., 2005). Estas evidencias sugerirían que la proteína xUPIII estaría involucrada en la interacción de las membranas del ovocito y el espermatozoide. Cabe aclarar, que la proteína xUPIII se encuentra en la membrana plasmática formando un heterocomplejo con la proteína xUPIb. xUPIb pertenece a la familia de las tetraspaninas (Mahbub Hasan y col., 2005) y como se mencionó en la introducción la familia de la tetraspaninas tendrían un rol importante en la fecundación de mamíferos.

La proteína xUPIII se encuentra asociada a los “rafts” de membrana tanto antes como después de la fecundación, no detectándose nunca su presencia en la fracción citosólica. Esta característica de la proteína xUPIII (30 kDa) coincidiría con los resultados obtenidos en *Bufo arenarum*, en donde la banda de 30 kDa se observa sólo en las muestras de membranas plasmáticas pero no cuando se analizaron fracciones citosólicas.

#### **Proteína de aproximadamente 60 kDa**

En un trabajo realizado por Sato y colaboradores en 1996, lograron purificar en *Xenopus laevis* una proteína de 57 kDa que resultó pertenecer a la familia de las quinasas Src. Esta proteína se fosforila en tirosina 1 min luego de la fecundación y esta fosforilación le ocasiona un aumento en su actividad quinasa. Además, se observó que Src sufre un proceso de translocación post-fecundación desde la fracción de membranas a la citosólica (Sato y col., 1996). Años después, el mismo grupo demostró que la incubación de los ovocitos de *Xenopus laevis* con el péptido RGDS era capaz de provocar los mismos cambios observados en la proteína xSrc durante la fecundación. Sin embargo, cuando utilizaron formas alternativas de activación partenogénica de los ovocitos (incubación de los mismos con el ionóforo de calcio A23187 ó mediante shock eléctrico) no pudieron observar ni la fosforilación en tirosina, ni el aumento en la actividad quinasa de la enzima, ni su translocación hacia la fracción citosólica (Sato y col., 1999).

Estos resultados coincidirían con los observados en *Bufo arenarum* en donde tanto la fecundación como el tratamiento de los ovocitos con el péptido RGDS provocó la fosforilación en tirosina de una proteína de aproximadamente 60 kDa, y probablemente también su translocación, ya que la banda observada en las muestras de membrana 1 mpf,

desaparece a los 10 mpf, y una banda del mismo peso molecular aparece en ese tiempo en la fracción citosólica.

Cabe aclarar que la participación de proteínas de la familia Src (60 kDa) en el proceso de fecundación no se restringe a anfibios sino que también ha sido observada en otras especies: erizo de mar (Kinsey, 1995; Kinsey, 1996; Abassi y col., 2000, Kinsey & Shen, 2000; Belton y col., 2001; Giusti y col., 2003; Townley y col., 2009); estrella de mar (Giusti y col., 1999; Giusti y col., 2000; O'Neill y col., 2004; Runft y col., 2004); ascidias (Runft & Jaffe, 2000); y peces (Wu & Kinsey 2000; Wu & Kinsey, 2002; Sharma & Kinsey, 2006).

En todas estas especies la proteína de la familia Src tendría el rol de fosforilar/activar a la proteína PLC $\gamma$ , esta generaría inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual finalmente permitiría la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde la reservas intracelulares (principalmente retículo endoplasmático), lo cual conllevaría a la activación del ovocito.

En un estudio realizado recientemente se demostró un alto nivel de expresión de dos proteínas de la familia Src (Fyn y Yes) en ovocitos de ratón (McGinnis y col., 2011). Sin embargo, las mismas no estarían involucradas en el mecanismo de activación del ovocito ya que, inhibidores farmacológicos específicos de la familia Src (PP2, Lavendustina A) no tienen efecto en el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en ovocitos de ratón (Kurokawa y col., 2004).

Estudios realizados en mamíferos relacionan la actividad de la quinasa Fyn en la regulación de la polimerización de microtúbulos y la estabilización del huso meiótico. Esta proteína también participaría en la regulación de la citocinesis mediante su asociación a la maquinaria citoesquelética que involucra a la Actina F durante los estadios de Anafase II y Telofase II (McGinnis y col., 2009; Levi y col., 2010; Levi & Shalgi, 2010).

Con lo cual se podría concluir que el efecto de la fecundación en la actividad de las quinasas que pertenecen a la familia Src del ovocito difiere entre las especies de fecundación externa (erizos de mar, estrellas de mar, anfibios y peces) y las especies de fecundación interna (mamíferos).

Debido a que la posible identidad de proteínas con esas características ya había sido evaluada en un modelo muy cercano evolutivamente a *Bufo arenarum*, decidimos focalizarnos en el estudio de la proteína de 70 kDa de la cual prácticamente no había nada informado en la literatura.

El análisis bibliográfico nos llevó a evaluar la posible participación durante la fecundación de tres proteínas: SYK, ZAP70 y TEC, ya que las tres cumplían con ciertos criterios de selección:

- Presentar un peso molecular de aproximadamente 70 kDa.
- Ser proteínas que se encuentren involucradas en cascadas de señalización y que tengan la capacidad de asociarse aunque sea de manera transitoria a la membrana plasmática (ya que la señal que corresponde a esta proteína fue detectada tanto en las muestras de membrana plasmática como en la fracción de proteínas citosólicas).
- Tener sitios de fosforilación en residuos tirosina y que dicha fosforilación esté relacionada con cambios en la actividad de la proteína.
- Tener la capacidad de asociarse de manera directa o indirecta a integrinas

El análisis comenzó con el diseño de cebadores degenerados para cada una de las tres secuencias que codifican para estas proteínas. Los resultados de los ensayos de RT-PCR indicaron que en el ovocito estarían presentes moléculas de ARNm que codifican para las proteínas SYK y TEC, pero no para la proteína ZAP-70.

Hasta el momento, las únicas células en donde se ha reportado la expresión de la proteína ZAP-70 han sido las células T y las células NK (de sus siglas en inglés: “Natural Killer”) (Chan y col., 1992; Chan y col., 1994), lo cual coincidiría con los resultados negativos obtenidos para la amplificación de ZAP-70 en ovocitos de *B. arenarum*.

Si bien la presencia de ambas proteínas quinasas no receptoras (SYK y TEC) en ovocitos es novedosa, decidimos profundizar el estudio de la participación de SYK en el proceso de fecundación principalmente por tres motivos: 1- se ha demostrado la expresión de SYK en diferentes células (incluyendo células que no pertenecen al sistema hematopoyético) (Yanagi y col., 2001); 2- dentro de la gran variedad de receptores con los cuales SYK interactúa, se ha demostrado que también lo hace con integrinas (ya sea de forma directa o indirecta), aún cuando estos receptores no presentan secuencias ITAM en el dominio citoplasmático (Mócsai y col., 2010); 3- existen trabajos que describen la participación de la proteína SYK en diversas cascadas de señalización que se dan dentro de gametas (Harayama y col., 2004; Stricker & Smythe, 2006; Beckmann y col., 2010).

Por estos motivos decidimos analizar los cambios en el patrón de fosforilación en residuos tirosina de la proteína SYK a distintos tiempos post fecundación, focalizándonos principalmente en aquellos residuos tirosina que están involucrados en la activación de la enzima.

Mediante la utilización de los anticuerpos monoclonales: C87C1 y 65E4, se analizaron tres de los cuatro sitios de fosforilación que implican una activación de la proteína. Con ambos anticuerpos se pudo observar la fosforilación de estos residuos tirosina luego de la fecundación. Estos resultados sugerirían que la proteína Spleen Tyrosine Kinase se estaría activando como consecuencia de la fecundación.

El peso molecular de la proteína, su capacidad de asociarse a integrina (y por lo tanto, ser afectada por la presencia de péptidos del tipo RGD) y el cambio rápido en la fosforilación de residuos tirosina que sufre luego de la fecundación sugerirían que la banda de 70 kDa observada en los Western blots de la Figura V.4, en donde se analizó el patrón de fosforilación de residuos tirosina en fracciones citosólicas y de membrana, podría corresponder a la proteína Spleen Tyrosine Kinase. Sin embargo, tampoco se puede descartar la participación en esta etapa temprana de la fecundación de otras proteínas de 70 kDa, como por ejemplo Tec. La proteína Tec cumple también con los requisitos que la convierten en un candidato posible: se detectó la presencia de ARNm que codifica para dicha proteína en ovocitos de *B. arenarum*, su peso molecular aparente es de 70 kDa, se activa por fosforilación en el residuo tirosina que se encuentra en el bucle de activación del dominio quinasa, es capaz de asociarse a los fosfolípidos de membrana mediante el dominio de homología a pleckestrina (PH, por sus siglas en inglés: "Pleckestrin Homology domain") presente en el extremo amino terminal de la proteína; y también hay evidencias que indican su asociación indirecta (a través de la proteína FAK) con proteínas integrinas (Lewis y col., 2001; Takesono y col., 2002; Zarbock & Ley, 2011).

Finalmente, cabe aclarar que la aparición de una banda inmunoreactiva al utilizar los anticuerpos anti-fosfotirosina no necesariamente implica que la misma se deba a una única proteína. Es posible, sino altamente probable, que se deba también a la presencia de otros tipos de proteínas (ej. Serina/Treonina quinasa, proteínas adaptadoras, otras) que se fosforilen en residuos tirosina como consecuencia de la fecundación. Lo que sí podemos aseverar con nuestros experimentos es que en *B. arenarum* SYK se fosforila (y en consecuencia, se activa) debido a la fecundación.

Si por otro lado, asumimos que la banda de aproximadamente 70 kDa observada en el Western blot de la Figura V.4 corresponde a la proteína SYK, se podría sugerir que SYK no estaría relacionada con la cascada de señalización que conlleva a la activación del ovocito. En este contexto, se especula que la proteína SYK activa sí podría estar involucrada en el vía de señalización que provoca la reorganización de los microfilamentos de actina y que finalmente llevaría a la internalización del espermatozoide dentro del ovocito. Las evidencias que avalan esta posible función son aquellos reportes que proponen a la proteína SYK mediando el proceso de fagocitosis en distintos tipos de células (Greenberg y col., 1996; Berton y col., 2005; Tohyama & Yamamura, 2009).

## VI. "Clonado y análisis molecular de la subunidad $\beta 1$ integrina de *B. arenarum*"

### VI.1 INTRODUCCIÓN

La subunidad  $\beta 1$  integrina, también conocida como CD29, se encuentra de manera casi ubicua en los tejidos, estando presente en casi todas las células en las cuales se ha analizado su expresión, siendo una excepción a esta regla la ausencia de  $\beta 1$  integrina en eritrocitos (Brown y col., 1990).

Esta subunidad conforma la sub-familia más extensa de integrinas la cual cuenta con 12 miembros, ya que se ha descrito que la subunidad  $\beta 1$  integrina puede asociarse con 12 subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha V$ ) (Hynes, 2002). La gran diversidad de subunidades  $\alpha$  con las que puede asociarse, determina que los heterodímeros formados por la subunidad  $\beta 1$  integrina pueden interactuar con una gran variedad de ligandos como puede observarse en la siguiente tabla.

<u>Heterodímero</u>	<u>Ligandos</u>
$\alpha 1\beta 1$	Colágeno, E-Cadherina, Endorepentina, Laminina, Semaphorina 7A Tenascina-C
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno, Laminina
$\alpha 3\beta 1$	Laminina
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectina
$\alpha 5\beta 1$	Endostatina, Fibronectina
$\alpha 6\beta 1$	Laminina
$\alpha 7\beta 1$	Laminina
$\alpha 8\beta 1$	Fibronectina, Nefronectina, Tenascina-C, Vitronectina
$\alpha 9\beta 1$	Tenascina-C, VEGF-C, VEGF-D
$\alpha 10\beta 1$	Colágeno
$\alpha 11\beta 1$	Colágeno
$\alpha V\beta 1$	Fibronectina, Osteopontina, Vitronectina

Tabla VI.1: Ligandos descritos para los distintos miembros de la subfamilia  $\beta 1$  integrina.

Las subunidades  $\beta 1$  integrina, por lo general presentan un dominio extracelular de aproximadamente 790 aminoácidos, un pequeño dominio transmembrana que le permite a la proteína anclarse a la membrana plasmática y un corto dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1$  integrina tiene la capacidad de interactuar con diferentes proteínas del citoesqueleto como ser  $\alpha$ -actinina (Otey y col., 1993), Filamina

(Pfaff y col., 1998), Talina (Pfaff y col., 1998). Y si bien el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1$  integrina no tiene actividad catalítica intrínseca, esta subunidad tiene un rol importante en la propagación de señales a través de la membrana plasmática ya que es capaz de asociarse a distintas moléculas de señalización como ser: c-Yes y Lyn (Arias-Salgado y col., 2005), FAK (Schaller y col., 1995), ILK (Hannigan y col., 1996), SYK (Woodside y col., 2002), etc.

### VI.1.1 Isoformas de la subunidad $\beta 1$ integrina

En humanos se han descrito cinco isoformas para la subunidad  $\beta 1$  integrina. Estas variantes se generan por empalme alternativo (“alternative splicing”) entre el exón 6 y el exón 7 del gen presente en humanos.

Las cinco isoformas conocidas varían en la secuencia aminoacídica del extremo COOH-terminal de la proteína (dominio citoplasmático), las cuales se presentan en la Figura VI.1.

<b>Membrana</b>	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDT GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK $\beta 1A$
	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDT VSYKTSKKQSGL $\beta 1B$
	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDT SLSVAQPGVQWCDISSLQPLTSRFQQFSCLSLPSTWDYRVKILFIRVP $\beta 1C-1$
	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDT ----- PGVQWCDISSLQPLTSRFQQFSCLSLPSTWDYRVKILFIRVP $\beta 1C-2$
	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDT QENPIYKSPINNFKNPNYGRKAGL $\beta 1D$

*Figura VI.1: Isoformas de la subunidad  $\beta 1$  integrina humana. Apilamiento de las secuencias de aminoácidos que corresponden a los dominios citoplasmáticos de las distintas variantes de empalme alternativo descritas para la subunidad  $\beta 1$  integrina humana. Los 26 aminoácidos que se encuentran más cercanos a la membrana plasmática son comunes para las cinco isoformas. Los dominios cito-1, cito-2 y cito-3, los cuales están involucrados en la localización de la proteína en los contactos focales, se encuentran subrayados. El motivo cito-1 se encuentra conservado en todas las variantes de la subunidad  $\beta 1$  integrina, mientras que los dominios cito-2 y cito-3 (secuencias del tipo NPXY) que se representan resaltados en verde, se encuentran conservados sólo en las isoformas A y D. Adaptado de Svineng y col., 1998 y de Melker y col., 1999.*

La subunidad  $\beta 1A$  se expresa de forma abundante en todos los tejidos (Argraeves y col., 1987). En el humano, la variante  $\beta 1B$  se encuentra en piel e hígado, y en pequeñas cantidades en músculo esquelético y cardíaco (Altruda y col., 1990). Los ARN mensajeros que codifican para las variantes  $\beta 1C-1$  y  $\beta 1C-2$  están presentes en una gran variedad de

células sanguíneas, así como en plaquetas, monocitos, hígado y riñón (Languino & Ruoslahti, 1992; Svineng y col., 1998). Las variantes  $\beta 1B$  y  $\beta 1C$  no contienen los motivos cito-2 ni cito-3 (secuencias del tipo NPXY), que están implicados en la asociación de la integrina con el citoesqueleto y la localización de la proteína en los contactos focales. La variante  $\beta 1D$  se expresa específicamente en músculo estriado: músculo esquelético y cardíaco (Zhidkova y col., 1995; van der Flier y col., 1995). Las secuencias del dominio citoplasmático que están implicadas en la localización de la proteína en los contactos focales están conservadas en las isoformas  $\beta 1A$  y  $\beta 1D$  y, se ha demostrado que ambas isoformas se localizan en dichos sitios de unión. La isoforma  $\beta 1D$  tiene una mayor afinidad tanto por los ligandos extracelulares como por el citoesqueleto de actina. Tanto la distribución tisular como las diferencias de afinidad, sugieren que a medida que los músculos se desarrollan, el cambio de la isoforma  $\beta 1A$  por la  $\beta 1D$  serviría para aumentar la fuerza de la interacción que se da entre la matriz y el citoesqueleto en aquellos lugares en donde van a darse fuertes contracciones (Belkin y col., 1996).

Previamente determinamos que la subunidad  $\beta 1$  integrina tendría un rol en la interacción que se da a nivel de membranas plasmáticas entre el espermatozoide y el ovocito durante la fecundación de *Bufo arenarum*. En ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de un anticuerpo policlonal contra dicha subunidad (M-106) se observó una disminución significativa en el porcentaje de fecundación alcanzado (sección IV.2.4). Teniendo en cuenta que no pudimos detectar la presencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina en la gameta masculina, la disminución en el porcentaje de fecundación observado se debería al bloqueo de la función que dicha subunidad cumpliría en el ovocito de *Bufo arenarum*. Además, como se describió en el capítulo II de este Trabajo de Tesis, integrinas sensibles a RGD (probablemente los heterodímeros  $\alpha 5\beta 1$  y/o  $\alpha V\beta 1$ ) estarían participando en la transducción de señales desde la membrana plasmática hacia el interior celular luego de la interacción con el espermatozoide.

El siguiente objetivo propuesto fue obtener la secuencia completa del ARNm que codifica para la subunidad  $\beta 1$  integrina. Determinar qué tipo de isoforma se encuentra

presente en el ovocito de *B. arenarum*, y analizar las características particulares de la proteína codificada por dicho ARNm.

## VI.2 RESULTADOS

### VI.2.1 Obtención de la secuencia codificante de la subunidad $\beta 1$ de integrina que se expresa en ovocitos

En una primera instancia, se diseñaron cebadores degenerados con la finalidad de amplificar un fragmento de la secuencia que codifica para la subunidad  $\beta 1$  integrina (Cebadores: ForwB1y RevB1, ver sección III.22 de Materiales y Métodos). Estos cebadores se ensayaron en reacciones de PCR utilizando como molde ADNc obtenido a partir de ARN total de ovocitos de *Bufo arenarum*. Esta estrategia nos permitió obtener un fragmento inicial de 235 pares de bases. Mediante análisis bioinformático se comparó dicha secuencia con la base de datos del *GenBank* (ver sección III.26 de Materiales y Métodos). De esta forma se determinó que la misma presentaba una alta homología con las secuencias nucleotídicas de subunidades  $\beta 1$  integrina de distintas especies. Posteriormente se usó la técnica de RACE (de sus siglas en inglés: “Rapid Amplification cDNA End”) para obtener las secuencias adyacentes a la recientemente mencionada. En la técnica de RACE se utilizó como molde una biblioteca no clonada generada a partir de ovario de *B. arenarum* disponible en el laboratorio. Mediante el diseño de sucesivos cebadores tanto hacia el extremo 5' como hacia el 3', y utilizando distintas estrategias en donde se combinaron diversos pares de cebadores, en una especie de “caminata” sobre el ARNm (ver esquema de la estrategia utilizada, Figura VI.2) se obtuvo una secuencia de 4194 nt, de los cuales 2394 corresponden a la secuencia codificante (marco abierto de lectura) mientras que 202 nt pertenecen al extremo 5' no traducible (5' UTR) y 1598 nt al extremo 3' no traducible (3' UTR). Dentro de esta extensa secuencia 3' UTR se observa el inicio de la cola de poliadenilación 15 nucleótidos corriente abajo de la señal de poliadenilación (AATAAA) localizada entre los nucleótidos 4156-4161 (Figura VI.3).

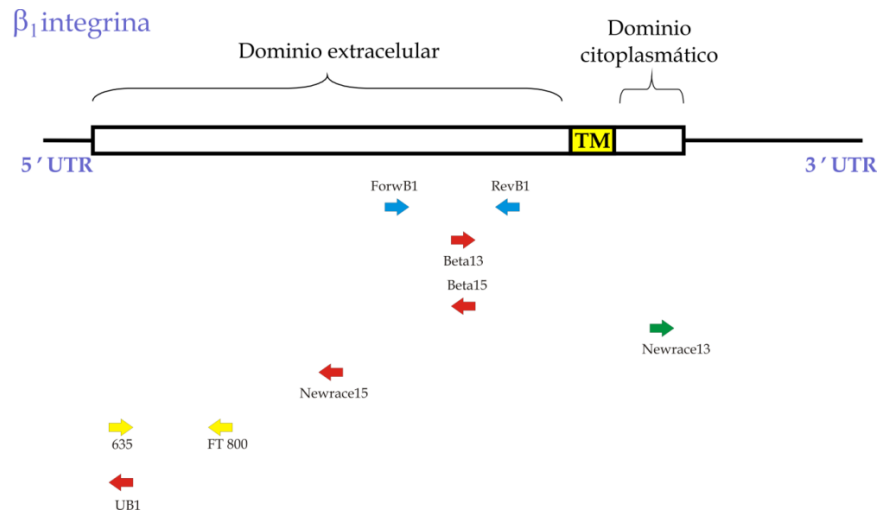


Figura VI.2: Esquema de la estrategia utilizada para obtener la secuencia completa del ARNm que codifica para la subunidad  $\beta_1$  integrina en el anfibio *Bufo arenarum*. En aquellas reacciones en donde como molde se utilizó la biblioteca no clonada de ovario de *Bufo arenarum*, los cebadores se encuentran representados de color rojo. Dichos cebadores se utilizaron en combinación con el cebador AP1, como se detalla en Materiales y Métodos. El cebador Newrace13 (verde) se utilizó en reacciones de PCR en las cuales el molde (ADNc) fue generado utilizando el cebador R1 en las reacciones de transcripción reversa, por lo que en dichas reacciones de PCR el cebador Newrace 13 se utilizó en combinación con el cebador R2. Los cebadores representados en color azul y amarillo se utilizaron en reacciones de PCR en donde como molde se usó ADNc generado utilizando oligodT en la reacción de transcripción reversa. La secuencia de los cebadores y el detalle de la estrategia de amplificación utilizada en cada caso se detallan en la sección III.22 de Materiales y Métodos.

En la Figura VI.3 se presenta la isoforma amplificada a partir de ovocitos de *Bufo arenarum* que corresponde a la variante A de la subunidad  $\beta_1$  integrina.



## VI.2.2 Comparación de la secuencia obtenida para *Bufo arenarum* con distintas secuencias $\beta$ 1A integrina informadas

Con la finalidad de analizar comparativamente las secuencias de nucleótidos que conforman los ARN mensajeros completos que codifican para la subunidad  $\beta$ 1A integrina en distintas especies, las secuencias de diversos mamíferos, anfibios, aves y peces se obtuvieron de la base de datos del *GenBank*. Posteriormente dichas secuencias se utilizaron para obtener un árbol filogenético, que permite visualizar las relaciones evolutivas entre las distintas secuencias.

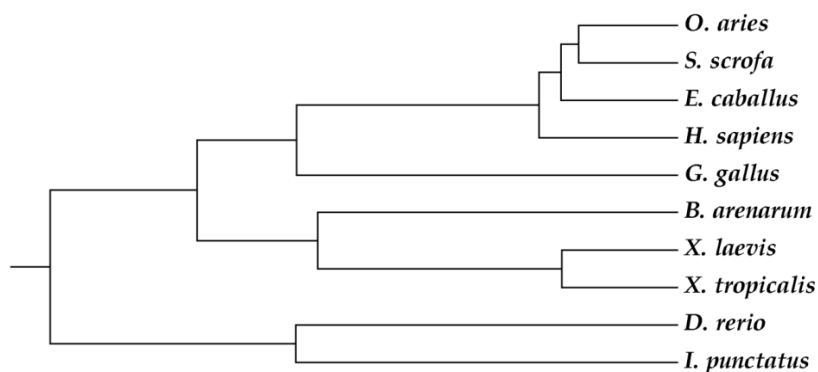


Figura VI.4: Dendrograma que representa las relaciones filogenéticas entre subunidades  $\beta$ 1A integrina de distintas especies. Para la construcción de este árbol filogenético se utilizaron secuencias obtenidas del *GenBank* de distintas especies de mamíferos: *Ovis aries* (NM\_001113770.1), *Sus scrofa* (NM\_213968.1), *Equus caballus* (XM\_001492665.3), *Homo sapiens* (NM\_002211.3); aves: *Gallus gallus* (NM\_001039254.2); anfibios: *Xenopus laevis* (NM\_001087817.1), *Xenopus tropicalis* (NM\_203829.1) y peces: *Danio rerio* (NM\_001034987.1), *Ictalurus punctatus* (NM\_001200086.1). Los números de acceso de cada una de las secuencias se indican entre paréntesis.

Como puede observarse en la Figura VI.4, resulta evidente que la secuencia que corresponde a la subunidad  $\beta$ 1A integrina de *Bufo arenarum* se encuentra evolutivamente más cercana a las secuencias  $\beta$ 1A integrina de otros anfibios: *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*.

## VI.2.3 Análisis de la secuencia de la subunidad $\beta$ 1 integrina en *B. arenarum*

El marco abierto de lectura (2394 nt) codifica para una proteína de 797 aminoácidos. Esta secuencia puede dividirse en tres grandes dominios: el dominio extracelular de 727 aminoácidos, el dominio transmembrana de 23 aminoácidos y el

dominio citosólico de tan sólo 47 aminoácidos (Figura VI.3). Las características particulares de cada uno de estos dominios se detallan a continuación.

### VI.2.3.1 Dominio extracelular

El dominio de la proteína que se encuentra expuesto al medio externo tiene un tamaño de 727 aminoácidos. Los primeros 20 aminoácidos (MARLLLLVGLCIYSLSYTRA) corresponden al péptido señal de la proteína. Esta secuencia tiene como función direccionar la proteína hacia el retículo endoplasmático y finalmente hacia la membrana plasmática, mediante la vía exocítica clásica. La secuencia que corresponde al péptido señal fue determinada mediante la utilización del programa SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Al comparar esta secuencia con las correspondientes a péptidos señal de subunidades  $\beta 1$  integrina de otras especies, se observa que la longitud de la secuencia se encuentra conservada, no así la secuencia de aminoácidos.

Dentro del dominio extracelular de las subunidades  $\beta$  integrinas se localizan dos regiones de unión al ligando. La primera es la secuencia localizada entre los aminoácidos 138-195 en la  $\beta 1$  de *Bufo arenarum* (D'Souza y col., 1988), implicada en la unión de la integrina a tripéptidos del tipo RGD (Arginina-Glicina-Aspártico). Dentro de esta región se encuentra el motivo aminoacídico DXSXS el cual está conservado en todas las subunidades  $\beta$  integrina. Su importancia en la unión de la integrina a su ligando específico ha sido demostrada mediante ensayos de mutación dirigida (Takada y col., 1992). El segundo sitio que interactúa con el ligando, está constituido por los aminoácidos 238-249 en la subunidad  $\beta 1$  integrina.

La región extracelular de la subunidad  $\beta 1$  integrina madura presenta dos características estructurales típicas de las subunidades  $\beta$  integrina. La primera, es su elevado contenido en el aminoácido cisteína, en el caso particular de la secuencia de *B. arenarum* 57 residuos Cys. A excepción de la cisteína que se encuentra dentro del péptido señal, las demás 56 cisteínas se conservan en número y posición, no sólo en todas las subunidades  $\beta 1$  integrina de vertebrados, sino también en la subunidad  $\beta 1$  de una especie alejada evolutivamente como es *Drosophila melanogaster* (Calvete y col., 1991; Hynes, 1992). Estos residuos cisteína son importantes en el mantenimiento de la estructura, y por

consiguiente de la función de estas moléculas. De los 57 residuos de cisteína, 31 constituyen cuatro dominios homólogos, dispuestos en tándem en la proximidad de la región citoplasmática e internamente unidos mediante puentes disulfuro. El primer dominio es incompleto, mientras que los siguientes tres contienen ocho cisteínas cada uno (Figura VI.5). El alto grado de conservación de estos residuos cisteína está relacionado con la importante función que los mismos cumplen que es mantener la estructura global de la proteína.

```

β1 465 CQESGTPDSPECCHYGNGTFECGACRCNEGRIGKH-----CE-CSTEQVSNEEDMDAQ 514
β1 515 CRKENSSEI--CSNNGDCI-CGQCVCCKRDNPNEVYSGKHCD-CDNFN----- 558
β1 559 CDRSNGLI---CGNGIICK-CRVCECFPNFSGSA-----CD-CSEDKST----- 597
β1 598 CMASNGQL---CNGRGIICE-CGRCKCTDPKFQGGT-----CEMCQT----- 634

```

Figura VI.5: Representación de los cuatro dominios ricos en cisteína presentes en la subunidad β1A integrina de *Bufo arenarum*. Se encuentran resaltados los 31 residuos cisteínas que los constituyen. El primer dominio es incompleto, presentando sólo 7 residuos cisteína, mientras que los restantes presentan 8 cisteínas cada uno. La posición de estos residuos cisteína se encuentra conservada en todas las secuencias β1 integrina de vertebrados.

La segunda característica de la región extracelular es la presencia de 9 sitios potenciales de N-glicosilación. La comparación de las distintas β1 integrinas pareciera indicar que el número de sitios de glicosilación en esta subunidad aumenta con la escala evolutiva. Los siete sitios de glicosilación presentes en *Ictalurus* (la especie más antigua de las consideradas en la comparación), están incluidos en los 8 sitios de glicosilación presentes en *Xenopus*, estos en los 9 de *Bufo arenarum*, estos en los 10 de pollo y finalmente éstos en los 12 sitios de N-glicosilación que son característicos para las subunidades β1 integrina en los mamíferos (Figura VI.6).

La posición de los 9 sitios potenciales de N-glicosilación determinados para la subunidad β1A integrina de *Bufo arenarum* pueden observarse en la Figura VI.3 marcados con rombos.

<i>Ictalurus punctatus</i>	N4–N5–N6	N8–N9–N10–N11
<i>Xenopus laevis</i>	N4–N5–N6	N8–N9–N10–N11–N12
<b><i>Bufo arenarum</i></b>	N3–N4–N5–N6	N8–N9–N10–N11–N12
<i>Gallus gallus</i>	N3–N4–N5–N6–N7–N8–N9–N10–N11–N12	
Mamíferos	N1–N2–N3–N4–N5–N6–N7–N8–N9–N10–N11–N12	

Figura VI.6: Sitios potenciales de N-glicosilación en las subunidades  $\beta 1A$  integrina de distintas especies. El número de sitios de glicosilación aumenta con la escala evolutiva, siendo el máximo 12, los cuales se encuentran presentes en las secuencias  $\beta 1$  integrina de distintos mamíferos (*Homo sapiens*, *Sus scrofa*, etc.).

### VI.2.3.2 Dominio transmembrana

La región de la subunidad  $\beta 1A$  que atraviesa la membrana plasmática de *B. arenarum*, tiene una extensión de 23 aminoácidos y la misma presenta un porcentaje de identidad del 100% cuando se la compara con secuencias homólogas de otros organismos (Figura VI.7).

<i>Xenopus laevis</i>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
<i>Gallus gallus</i>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
<i>Sus scrofa</i>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
<i>Homo sapiens</i>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
<b><i>Bufo arenarum</i></b>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
<i>Ictalurus punctatus</i>	I I P I V A G V V A G I V L I G L A L L L I W
	*****

Figura VI.7: Análisis comparativo del dominio transmembrana de la subunidad  $\beta 1A$  integrina de distintos organismos vertebrados. Los asteriscos indican identidad de aminoácidos en todas las secuencias apiladas. Los 23 aminoácidos que componen el dominio transmembrana son aminoácidos hidrofóbicos. Los números de acceso de las secuencias  $\beta 1$  integrina utilizadas en el apilamiento se detallan a continuación: *Xenopus laevis* (NP\_001081286.1); *Gallus gallus* (NP\_001034343.2); *Sus scrofa* (NP\_999133.1); *Homo sapiens* (NP\_596867.1); *Ictalurus punctatus* (NP\_001187015.1). Apilamiento realizado por el programa CLUSTAL W (1.82) Multiple Sequence Alignment.

Tal nivel de conservación en especies pertenecientes a vertebrados que se encuentran tan alejados evolutivamente sugiere que, además del alto grado de hidrofobicidad que es característico de los dominios que atraviesan regiones apolares como las membranas plasmáticas, otras fuerzas selectivas, entre las que se pueden incluir las interacciones de la subunidad  $\beta$  con la subunidad  $\alpha$  o con otras proteínas (DeSimone & Hynes, 1988), han debido actuar sobre dicha región.

### VI.2.3.3 Dominio citoplasmático

Debido a que las integrinas no poseen actividad enzimática el mecanismo molecular por el cual la información pasa desde el dominio citoplasmático de las integrinas a mediadores intracelulares de la cascada de transducción de señal involucra la interacción de este dominio con diversas proteínas, ya sea del citoesqueleto:  $\alpha$ -actinina (Otey y col., 1993), talina, filamina, actina (Pfaff y col., 1998), como también, proteínas de señalización: FAK (Schaller y col., 1995), Lyn y c-Yes (Arias-Salgado y col., 2005), etc. Los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\beta$  integrina son secuencias cortas y se encuentran altamente conservadas entre distintas especies (excepto las cadenas  $\beta 4$  y  $\beta 8$ , que son altamente divergentes) (Vignoud y col., 1997). En particular, cuando se compara las secuencias del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina se observa que las mismas presentan una conservación casi total de secuencia, aun cuando se comparan organismos que se encuentran alejados evolutivamente (anfibios, aves, mamíferos y peces) (Figura VI.8).

<i>Xenopus laevis</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>T</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<i>Gallus gallus</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>T</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<i>Sus scrofa</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>T</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<i>Homo sapiens</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>T</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<b><i>Bufo arenarum</i></b>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>A</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<i>Ictalurus punctatus</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>A</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
<i>Danio rerio</i>	KLLMI IHDRREFAKFEKEKMNAKWD <b>A</b> GENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
	* * ** *

Figura VI.8: Comparación del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina de distintos organismos vertebrados. Los números de acceso de las secuencias  $\beta 1$  integrina utilizadas en el apilamiento se detallan a continuación: ***Xenopus laevis*** (NP\_001081286.1); ***Gallus gallus*** (NP\_001034343.2); ***Sus scrofa*** (NP\_999133.1); ***Homo sapiens*** (NP\_596867.1); ***Ictalurus punctatus*** (NP\_001187015.1); ***Danio rerio*** (NP\_001030159.1). Se resalta con color la posición del único aminoácido que presenta diferencias entre las distintas secuencias analizadas. Los asteriscos señalan la ubicación de los sitios de fosforilación descriptos dentro de este dominio. Los dos dominios NPXY presentes en este dominio se encuentran subrayados. Apilamiento realizado por el programa CLUSTAL W (1.82) Multiple Sequence Alignment.

La secuencia de la subunidad  $\beta 1$  integrina de *B. arenarum* que corresponde al dominio citosólico presenta una longitud de 47 aminoácidos. Dicha secuencia es idéntica a la informada para dos peces como son: *Danio rerio* (NP\_001030159.1) e *Ictalurus punctatus* (NP\_001187015.1), y difiere en sólo un aminoácido respecto al resto de las secuencias

seleccionadas para el gráfico (abarcando éstas especies de mamíferos, aves y anfibios) (Figura VI.8).

Dentro del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1$  integrina se encuentran secuencias que poseen funciones particulares:

- La región del dominio citoplasmático que se encuentra cercana al dominio transmembrana está involucrado en la interacción que se da con la subunidad  $\alpha$  integrina y que determina una conformación inactiva para la proteína (la delección de esta región proximal a la membrana en cualquiera de las dos subunidades provoca la activación de la integrina). En esta interacción está involucrado un aminoácido con carga negativa presente en esta región (D758 en la secuencia de *Bufo*), el cual participa en la formación de un puente salino con un aminoácido cargado positivamente (Arginina=R) presente en el motivo GFFKR, que se encuentra conservado en la mayoría de las cadenas  $\alpha$ . También participan aminoácidos apolares del tipo leucina (L) e isoleucina (I), que están involucrados en interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de las mismas características presentes en la subunidad  $\alpha$  integrina.
- Dos dominios del tipo NPXY: Estos dominios estructuralmente tienen la tendencia a formar giros  $\beta$  (" $\beta$  turns") y funcionalmente actúan como secuencias canónicas de reconocimiento de proteínas intracelulares que presentan dominios de unión a fosfotirosinas, también conocidas como proteínas PTB (por sus siglas en inglés: "phosphotyrosine binding proteins") (Chang y col., 2002). Estos dominios PTB están presentes en una gran variedad de proteínas de señalización y de citoesqueleto. Dentro de la familia de proteínas PTB algunas de las que se han descrito que interactúan con el dominio citosólico de la subunidad  $\beta 1A$  integrina son: Talina, EPS8 y Dab1 (Calderwood y col., 2003), e ICAP-1 (Chang y col., 1997).
- El dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina de *Bufo arenarum* contiene cinco sitios putativos de fosforilación: Y<sup>782</sup>, S<sup>784</sup>, T<sup>787</sup>, T<sup>788</sup>, Y<sup>794</sup> (ver Figura VI.3), los cuales han sido descritos previamente en proteínas homólogas de mamíferos. Estos cinco aminoácidos se encuentran dentro de una secuencia de 16 aminoácidos (aminoácidos 779-794 en la secuencia de *B. arenarum*) que incluye los

dos motivos NPXY (Mulrooney y col., 2001). Los cinco residuos fosforilables están localizados dentro del giro/rulo que se forma debido a los dos dominios NPXY, por lo que la introducción de un grupo fosfato en uno de estos residuos puede cambiar la estructura secundaria del dominio citoplasmático de la proteína. Este cambio a su vez, puede exponer u ocultar dominios de interacción para diversas proteínas, por este motivo, el estado de fosforilación de estos residuos influye en la afinidad de distintas proteínas al dominio citosólico de la subunidad  $\beta 1A$  integrina.

### VI.3 DISCUSIÓN

Mediante distintas estrategias de amplificación obtuvimos la secuencia completa que codifica para la subunidad  $\beta 1$  integrina en ovocitos de *Bufo arenarum*. La secuencia amplificada tuvo una longitud total de 4194 nucleótidos, los cuales incluyen: el marco abierto de lectura (2394 nt) y los extremos no traducibles 5'UTR y 3'UTR de 202 y 1598 nt respectivamente.

La secuencia codificante de 797 aminoácidos, está conformada por el dominio extracelular (727 aminoácidos), un corto fragmento transmembrana (23 aminoácidos) y el dominio citoplasmático de 47 aminoácidos. De estos tres fragmentos de la proteína, la secuencia más variable es el dominio extracelular ya que los otros dos son prácticamente idénticos en todas las secuencias  $\beta 1A$  integrinas descritas hasta el momento.

El análisis de la secuencia citoplasmática de la subunidad  $\beta 1$  integrina permitió determinar que la isoforma mayoritaria en ovocitos de *Bufo arenarum* es la  $\beta 1A$ .

Como hemos mencionado, las integrinas carecen de actividad enzimática y tampoco pueden unirse por sí mismas a la actina, con lo cual dependen de moléculas adaptadoras que se unen a los cortos dominios citoplasmáticos de las integrinas para mediar y regular estas funciones. Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de proteínas adaptadoras que median la activación y el agrupamiento o "clustering" de las integrinas y que sirven como plataformas para el ensamblado de complejos de señalización y estructurales mayores.

En particular para la subunidad  $\beta 1A$  integrina las distintas proteínas adaptadoras que se han descrito pueden clasificarse en tres categorías amplias (Legate & Fässler, 2009):

- 1) Proteínas estructurales:  $\alpha$ -actinina, Filamina, Talina, Tensina, Miosina
- 2) Proteínas de plataforma: CD98, Dab1, Kindlina, Paxilina, ICAP-1
- 3) Proteínas catalíticas: FAK, ILK, Syk, Lyn, Yes, PKD1, PP2A

Como puede observarse, dentro de este listado se encuentran las proteínas de la familia Src: Lyn y Yes, así como también la proteína Spleen Tyrosine Kinase (Syk). En relación con los resultados descritos en el capítulo anterior acerca de la activación de la proteína SYK a través de una integrina, cabe remarcar que para la subunidad  $\beta 1A$  integrina serían factibles dos caminos de activación de SYK: un camino directo en el cual la proteína SYK interactuaría con el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina, como ya se ha descrito en un sistema *in vitro* (Woodside y col., 2002) o a través de un mecanismo indirecto en el cual la subunidad  $\beta 1A$  integrina interactuaría con proteínas de la familia Src (Lyn y/o Yes), y éstas a su vez, serían las responsables de interactuar y activar a la proteína SYK (Arias-Salgado y col., 2005). De hecho, ya en otras células (plaquetas, monocitos, células epiteliales de bronquio) se ha descrito que la activación de la integrina  $\beta 1A$  provoca la fosforilación en residuos tirosina de la proteína SYK (Lin y col., 1995; Keelly & Parise, 1996; Miller y col., 1999; Ulanova y col., 2005).

En la Figura VI.9 se indican los sitios de unión dentro del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina de algunas de las proteínas del listado.



Figura VI.9: Sitios de unión de algunas de las proteínas adaptadoras que se han descrito hasta el momento (Legate & Fässler, 2009) dentro del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 1A$  integrina.

En algunos casos la unión de proteínas adaptadoras depende del estado de fosforilación de los residuos Y<sup>782</sup>, S<sup>784</sup>, T<sup>787</sup>, T<sup>788</sup>, Y<sup>794</sup>, que se encuentran dentro del dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$ 1A integrina.

Una característica sobresaliente de la secuencia obtenida es la extensión del extremo 3' no traducible (1598 nucleótidos). Sin embargo, en distintas especies las isoformas  $\beta$ 1 integrina presentan una elevada longitud en la región 3' UTR (*X. laevis* 1619 nucleótidos, *Homo sapiens* 1261 nucleótidos, *Gallus gallus* 1155 nucleótidos). Dentro de la secuencia correspondiente al extremo 3' UTR de la subunidad  $\beta$ 1 integrina humana se han descrito sitios de unión para diversos microARNs: miR 124 (Cao y col., 2007; Hunt y col., 2011); miR 29b (Liu y col., 2010); miR 183 (Li y col., 2010); miR 31 (Augoff y col., 2011). Estas especies de microARNs se encuentran filogenéticamente conservadas y son capaces de regular la expresión proteica del ARNm al cual se unen (Lee y col., 2007; Friedman y col., 2009). El análisis *in silico* de la secuencia 3' UTR correspondiente a la subunidad  $\beta$ 1 integrina de *Xenopus tropicalis* mediante el programa disponible en el sitio de internet <http://www.targetscan.org>, permitió identificar sitios de unión para los microARNs: miR 29b y miR 183, los cuales estarían conservados en la secuencia 3' UTR obtenida para *B. arenarum*.

Los microARNs se transcriben en el núcleo como pre-microARNs largos. Posteriormente, en el citoplasma los mismos son procesados en microARNs maduros que presentan una longitud de entre 19 y 22 pb, los cuales son capaces de unirse a los extremos 3' no traducibles de los ARN mensajeros blancos promoviendo la degradación de los mismos o la represión de la traducción de dichos ARN mensajeros (Filipowicz y col., 2008; Chekulaeva & Filipowicz, 2009). Este tipo de regulación ha sido involucrado en el control de la expresión de la subunidad  $\beta$ 1 integrina durante distintas etapas del desarrollo embrionario (Cao y col., 2007; Stefani & Slack, 2008), con lo cual es probable que este mismo mecanismo esté participando en la regulación de la expresión de la proteína durante el desarrollo embrionario de *Bufo arenarum*.

## VII. “Detección de HSPA en las gametas de *Bufo arenarum* y análisis de su participación en el proceso de fecundación”

### VII.1 INTRODUCCIÓN

La respuesta fisiológica de los organismos frente a los efectos perjudiciales del ambiente, como incrementos bruscos de la temperatura, se denomina respuesta de estrés (Welch, 1992; Söti & Csermely, 2007). Esta respuesta se caracteriza por una disminución en la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares y una rápida producción de un conjunto particular, denominadas proteínas de estrés térmico (HSP, por sus siglas en inglés: “Heat Shock Proteins”) (Welch, 1992). Esta respuesta es universal, ya que se ha observado tanto en bacterias, como en eucariotas inferiores y superiores. Además del incremento de temperatura, son muchos los estímulos que inducen una respuesta similar a nivel celular, como la exposición a metales pesados, a radiación, a especies reactivas del oxígeno, cambios bruscos en la osmolaridad, etc. (Jäättelä, 1999). Aunque las funciones exactas de las proteínas de estrés térmico son todavía imprecisas, se sabe que las mismas protegen al organismo de las diversas agresiones del medio ambiente (Welch, 1992; Nollen & Morimoto, 2002; Daugaard y col., 2007).

Las HSPs en su rol de chaperonas ayudan a mantener la conformación de las proteínas, previniendo el agregado de proteínas nacientes parcialmente plegadas o desplegadas, promoviendo así la generación de la estructura terciaria correcta y estabilizando los precursores que luego formarán parte de complejos macromoleculares (Ellis & van der Vies, 1991; Hendrick & Hartl, 1993; Becker & Craig, 1994; Hartl, 1996). Las HSPs también participan en la transferencia de proteínas a través de las membranas celulares de las organelas así como en la transferencia de proteínas desde el citoplasma hacia el núcleo (Mandell & Feldherr, 1990). Si bien, como se describió anteriormente, en muchos organismos se ha descrito la aparición de estas proteínas en situaciones de estrés, las HSPs también están involucradas en procesos que son esenciales para el funcionamiento celular bajo condiciones normales. Clara muestra de esto son los numerosos reportes que indican la presencia de estas proteínas en situaciones de NO estrés en diferentes células eucariotas como ser levaduras, *Drosophila*, anfibios, ratones y humanos (Bienz & Gurdon, 1982; Bensaúde y col., 1983; Craig y col., 1983; Zimmerman y col., 1983; Kurtz y col., 1986; Palter y col., 1986; Heikkila y col., 1987; Rosario y col., 1992).

Las proteínas de estrés térmico están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y están entre las moléculas más altamente conservadas que se conocen, tanto en estructura primaria, como en el modo de regulación (Minowada & Welch, 1995). El alto grado de conservación de las HSPs a través de la evolución, sugiere que estas proteínas son de vital importancia para diversas funciones celulares.

Las HSPs pertenecen a una familia multigénica, y se han clasificado de acuerdo a homología de secuencias y a sus pesos moleculares en cinco sub-familias (Kampinga y col., 2009):

- HSPA (HSP70)
- HSPH (HSP110)
- HSPC (HSP90)
- DNAJ (HSP40)
- HSPB (proteínas de estrés térmico pequeñas: HSP27, etc.)
- HSPD/EF (chaperoninas: HSP60/HSP10, etc.)

Dentro de estas sub-familias, la de las HSPA (anteriormente conocidas como HSP70) son las que han sido más ampliamente estudiadas (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988). Las proteínas HSPA se identificaron por primera vez en células de *Drosophila* sometidas a un rápido incremento de temperatura (Tissières y col., 1974). Los miembros de esta familia son los más conservados evolutivamente, tanto en estructura como en función. DNAK, una de las HSPA que expresa *E. coli*, tiene aproximadamente un 50% de identidad de secuencia con las HSPs de eucariotas.

El número de genes que codifica para los distintos miembros de una sub-familia varía mucho en diferentes organismos. Por ejemplo, en la familia HSPA (HSP70) el número de miembros varía desde tres en *Escherichia coli* (DNAK, Hsc 62, Hsc 66) hasta trece en los humanos (Kampinga y col., 2009).

En humanos estas trece proteínas que conforman la familia HSPA, incluyen tanto formas de expresión constitutiva (ej. HSPA8, previamente conocida como HSC70), como formas inducibles por calor (HSPA1A, 1B, etc.); las cuales a su vez, presentan una importante expresión basal (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Morimoto, 1993; Daugaard y col., 2007).

Todas las proteínas HSPA (HSP70/HSC70) comparten características estructurales que incluyen un dominio de unión a ATP amino terminal de 44 kDa, un dominio de unión a péptidos de 18 kDa y un dominio carboxilo terminal de 10 kDa que contiene la secuencia terminal EEVD (Freeman y col., 1995; Kiang & Tsokos, 1998; Demand y col. 1998).

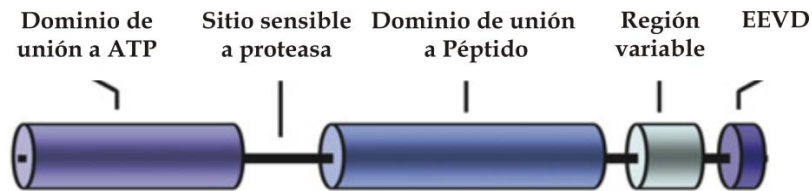


Figura VII.1: Representación lineal de los dominios presentes en las proteínas de la familia HSPA. Dominio ATPasa en el extremo amino terminal de la proteína, dominio de unión a sustratos (este dominio contiene aminoácidos neutros e hidrofóbicos) y el dominio carboxilo terminal que incluye una región variable y la secuencia EEVD la cual es esencial para la unión de los péptidos sustrato. Adaptado de Daugaard y col., 2007.

En cuanto a la presencia de proteínas HSPA en anfibios, se han descrito proteínas relacionadas a las HSPA en ovocitos y embriones de *Xenopus laevis* en condiciones de no estrés (Bienz & Gurdon, 1982; Browder y col., 1987; Heikkila y col., 1987; Horrell y col., 1987; Herberts y col., 1993). A su vez, también en ovocitos de *Xenopus laevis* se ha descrito que el ARNm que codifica para la forma inducible de HSP70 se transcribe de manera eficiente aún sin estar estos expuestos a estrés térmico (Bienz, 1984). En otra especie, el anfibio urodelo *Pleurodeles waltl*, se han encontrado evidencias de la expresión constitutiva del gen inducible por calor HSP70, como también de la forma constitutiva, HSC70, durante la ovogénesis (Billoud y col., 1993; Angelier y col., 1996). Mientras que en otro anfibio (*Rana lessonae*) se aislaron y caracterizaron dos ADNc que codifican para un miembro constitutivo y un miembro inducible de la familia HSPA (Simoncelli y col., 2010).

Las evidencias obtenidas en nuestro laboratorio indicaban una fuerte afinidad entre proteínas de la cabeza de los espermatozoides reaccionados y proteínas HSPA presentes en las membranas plasmáticas de los ovocitos de *B. arenarum* (Coux & Cabada, 2006). Estos resultados sugerían que la interacción a nivel de membranas plasmáticas durante la fecundación involucraba a proteínas de la familia HSPA, lo cual nos llevó a tratar de ahondar más el estudio de la expresión de esta proteína en la gameta femenina y su rol durante la fecundación.

## VII.2 RESULTADOS

### VII.2.1 Expresión de la proteína HSPA en ovocitos en ausencia de estrés

Con el objetivo de estudiar la expresión de HSPA en ovocitos de *Bufo arenarum* en condiciones normales, se realizaron ensayos de Western blot en extractos totales de ovocitos, utilizando dos anticuerpos diferentes (DPAK, BRM22). La Figura VII.2A muestra que ambos anticuerpos fueron capaces de detectar bandas del peso molecular esperado. Además, un análisis semi-cuantitativo de la intensidad de las bandas (relativizadas a Actina) indicó que ambos anticuerpos son capaces de detectar variaciones de abundancia de la proteína HSPA en extractos de ovocitos obtenidos de diferentes hembras (Figura VII.2B). Estos resultados sugieren que las proteínas HSPA se expresan en los ovocitos de esta especie en ausencia de estrés y, además, que ovocitos de diferentes animales pueden presentar niveles constitutivos diferentes de esta proteína. En los siguientes ensayos, se decidió seguir trabajando con el anticuerpo BRM22, ya que de los dos anticuerpos, éste es el que permitía obtener Western blots más limpios.

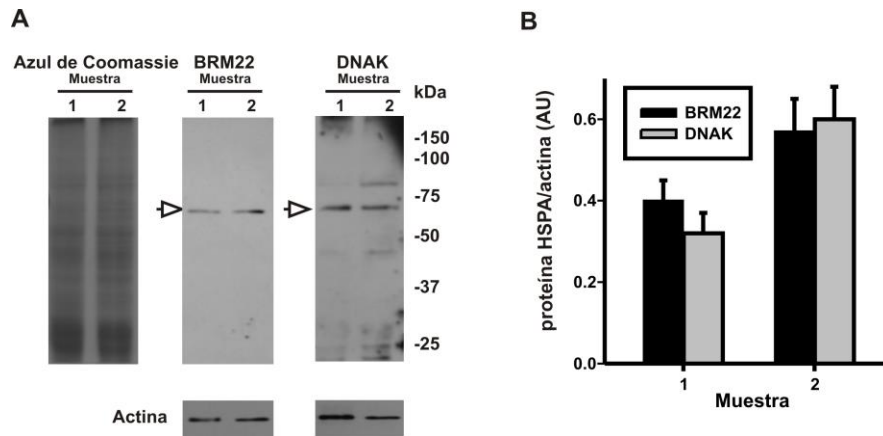


Figura VII.2: Detección de HSPA en ovocitos de *Bufo arenarum* en ausencia de estrés. A) Lisados de ovocitos clarificados de vitelogeninas fueron separados en geles de SDS-PAGE al 12% y teñidos con Azul de Coomassie o transferidos y analizados con dos anticuerpos anti HSPA diferentes (BRM22 y DPAK). La flecha indica la banda que corresponde a HSPA. Como control de carga se utilizó Actina. B) Abundancia de HSPA en dos grupos de ovocitos obtenidos de animales diferentes. La señal detectada con los anticuerpos BRM22 y DPAK fue relativizada a la señal detectada para la proteína Actina.

Teniendo en cuenta que esta sub-familia suele estar representada por varias isoformas decidimos analizar muestras de ovocitos mediante geles bidimensionales.

La Figura VII.3 muestra los resultados obtenidos en geles bidimensionales en los cuales se analizaron extractos de ovocitos en los que se redujo la cantidad de proteínas vitelogeninas mediante centrifugación a baja velocidad (1000 g). En el panel A se muestra el resultado de la tinción plata de un gel bidimensional mientras que en el panel B se muestra el resultado obtenido al utilizar el anticuerpo BRM22 en un ensayo de Western blot realizado sobre un gel bidimensional (similar al del panel A) transferido a una membrana de nitrocelulosa. La ampliación de un sector de la figura muestra de manera más nítida las dos señales detectadas al peso molecular esperado para las proteínas HSPA (70 kDa). Los puntos isoeléctricos (pI) que presentaron estas dos proteínas fueron de 5,25 y 5,45. La señal con pI=5,25 presenta una intensidad de 4 a 6 veces mayor que la de pI=5,45. Estos resultados indican que al menos dos isoformas de la proteína HSPA están presentes en los ovocitos de *B. arenarum*.

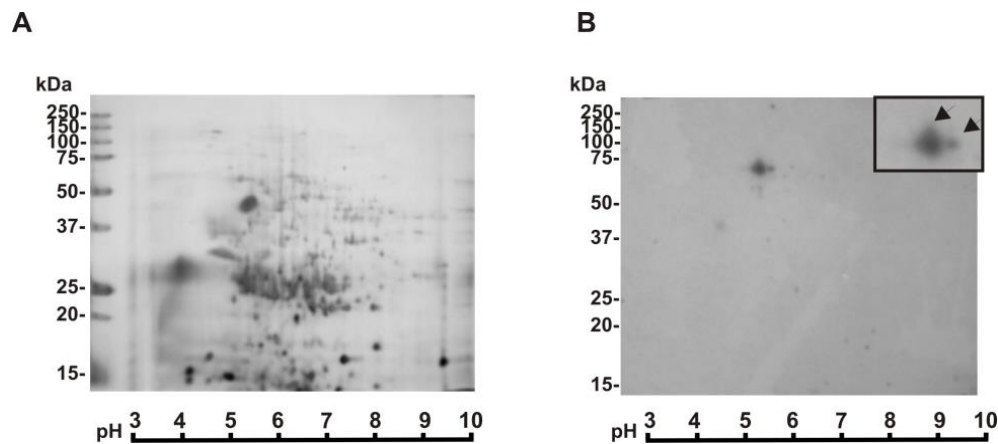


Figura VII.3: Detección de distintas isoformas de HSPA en ovocitos de *Bufo arenarum* en ausencia de estrés. A) Gel bidimensional de un lisado de ovocitos clarificado de vitelogeninas (100  $\mu$ g), teñido con plata. B) Gel bidimensional similar al mostrado en A, electrotransferido y revelado usando el anticuerpo BRM22. En el margen superior derecho de la figura B, se muestra una magnificación de las señales positivas (indicado con flechas). Los marcadores moleculares y la escala de pH se muestran a la izquierda y debajo de ambos paneles.

## VII.2.2 Distribución subcelular de las proteínas HSPA

Posteriormente se analizó la presencia de la proteína HSPA en distintas fracciones aisladas del ovocito (Figura VII.4). La proteína HSPA pudo ser fácilmente detectada en homogeneizados completos de ovocitos (Extractos Totales), en extractos clarificados de vitelogeninas mediante centrifugación a baja velocidad (Sn 1000), así como en la fracción de proteínas citosólicas. En estas muestras, 10  $\mu$ g de proteínas y 1 min de exposición

fueron suficientes para obtener una buena señal. Vale resaltar, sin embargo, que en las muestras de Extractos Totales se observó una señal no específica muy fuerte que corresponde a la presencia en esta muestra de vitelogeninas (asterisco en la Figura VII.4). En la muestra de membranas totales, para obtener una señal similar fue necesaria una exposición mayor (10 min) y 20 µg de proteínas. Las muestras de membranas plasmáticas (tanto livianas como pesadas) requirieron de un tiempo de exposición aun mayor (media hora) para obtener una señal comparable, utilizando la misma cantidad de muestra (20 µg). Estos resultados indican que la proteína HSPA está presente en todas las fracciones estudiadas, siendo más abundante en la fracción citosólica.

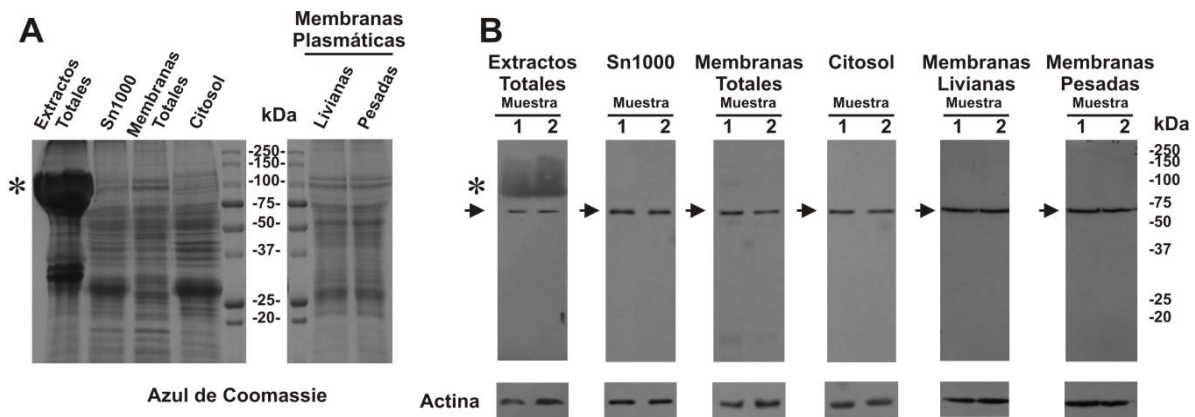


Figura VII.4: Distribución subcelular de la proteína HSPA en ovocitos de *B. arenarum*. A) Gel teñido con azul de Coomassie de muestras típicas de cada fracción analizada: Extractos totales, Extractos clarificados de vitelogeninas (Sn1000), Membranas Totales, Citosol, Membranas Plasmáticas Livianas, Membranas Plasmáticas Pesadas. Se indican los marcadores de peso molecular. B) Dos muestras (indicadas como 1 y 2) de cada una de las fracciones mencionadas anteriormente fueron separadas por electroforesis, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas para detectar HSPA mediante la utilización del anticuerpo BRM22. Las flechas indican la banda que corresponde a HSPA. Como control de carga se utilizó Actina. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha. Los asteriscos indican la presencia de vitelogeninas en las muestras de extractos totales.

Con el objetivo de ahondar el estudio de la expresión de HSPA en los diferentes compartimentos sub-celulares del ovocito, se analizaron cortes de ovocitos por inmunofluorescencia (Figura VII.5). Como referencia se utilizó Actina (señal verde). En general, la señal detectada para HSPA (señal roja) mostró una distribución similar a la de Actina. Sin embargo, en algunos casos la proteína HSPA mostró un patrón de “patches” (punteado) en la membrana plasmática del ovocito. Este patrón se observó con mayor

frecuencia en el polo animal del ovocito aunque en algunas ocasiones la señal se encontró uniformemente distribuida. Sorprendentemente, la envoltura vitelina (matriz extracelular análoga a la zona pelúcida de mamíferos) mostró una señal intensa para HSPA (punta de flecha Figura VII.5 C).

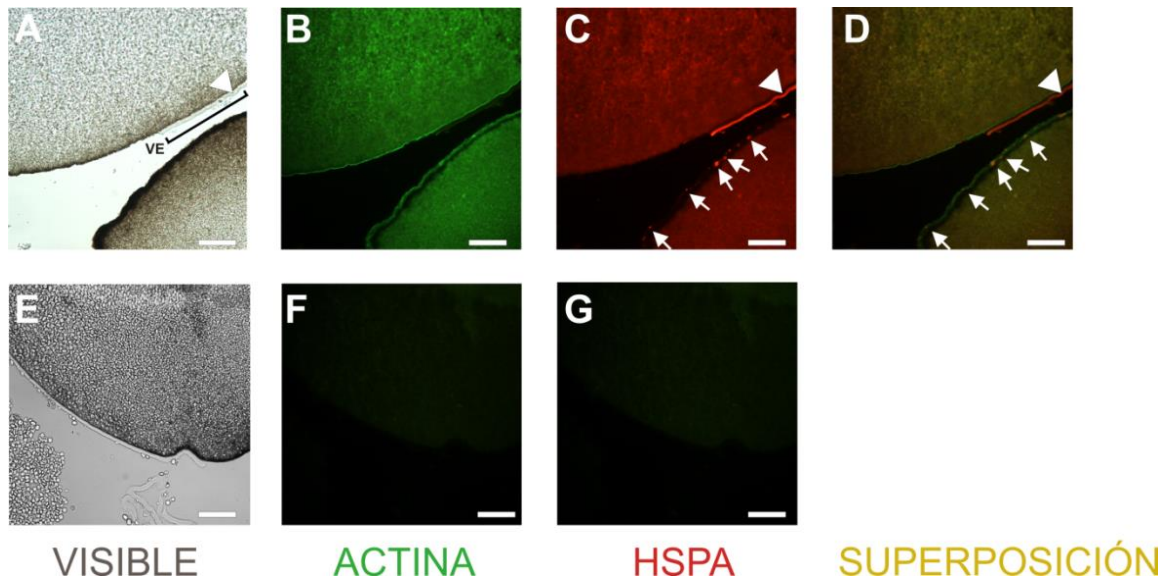


Figura VII.5: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de la proteína HSPA en ovocitos de *B. arenarum*. A-G) Detección de HSPA en ovocitos por microscopía de inmunofluorescencia. Ovocitos maduros ovulados fueron fijados y teñidos con un anticuerpo monoclonal anti HSPA: BRM22 (señal roja) y un anticuerpo policlonal de conejo anti actina (señal verde). Las flechas indican la distribución punteada de HSPA en la membrana plasmática de los ovocitos. La cabeza de flecha y el corchete indican la presencia de la envoltura vitelina (positiva para HSPA en C). Notar que en el ovocito de abajo (A-D), se observa el polo animal del mismo. En el polo animal se acumulan pigmentos oscuros por debajo de la membrana plasmática. Notar también que dicho ovocito ha perdido por completo la envoltura vitelina. A y E: imágenes tomadas en el visible, B: Actina detectada utilizando el anticuerpo A2066 junto con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (señal verde), C: HSPA detectada con el anticuerpo BRM22 y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (señal roja), D: imágenes superpuestas de B y C. F y G: controles realizados en ausencia de anticuerpo primario. Las barras representan 100  $\mu$ m.

### VII.2.3 Presencia de las proteínas HSPA en estructuras extracelulares

La detección de la proteína HSPA en la envoltura vitelina de los ovocitos por microscopía de fluorescencia nos llevó a intentar confirmar la presencia de esta proteína en esta estructura mediante Western blot. Teniendo en cuenta que las proteínas HSPA son solubles y que durante la estrategia de obtención de envolturas vitelinas se llevan a cabo sucesivos pasos de lavado, decidimos aislar envolturas vitelinas de ovocitos entrecruzados con el reactivo DSP (EV entrec) y no entrecruzados (EV). En la Figura VII.6 (panel de la

izquierda) se analizan ambas muestras por SDS-PAGE al 12% y tinción con Azul de Coomassie y de esta manera puede observarse cómo cambia el patrón proteico luego del entrecruzamiento de la muestra de envolturas vitelinas. Cuando se analizó la presencia de la proteína HSPA mediante inmunodetección con el anticuerpo BRM22 en estas muestras, pudo observarse una banda correspondiente a la proteína HSPA exclusivamente en las muestras de envolturas vitelinas obtenidas de ovocitos entrecruzados (Figura VII.6, panel de la derecha). La proteína Actina no pudo detectarse en ninguna de las preparaciones de envolturas vitelinas (EV entrec y EV), lo cual nos permite descartar que la banda observada en la muestra de EV entrecruzadas se deba a una contaminación de esta muestra con otras estructuras del ovocito.

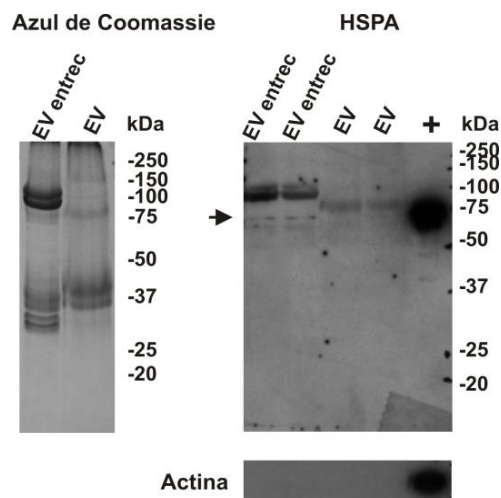


Figura VII.6: HSPA en muestras de envoltura vitelina. Muestras de envolturas vitelinas (entrecruzadas o no) fueron separadas en geles al 12% y teñidas con Azul de Coomassie o transferidas y analizadas con el anticuerpo BRM22 (panel HSPA). En este panel se observan 2 muestras de envolturas vitelinas entrecruzadas (EV entrec) y 2 muestras no entrecruzadas (EV) junto con una muestra citosólica que es utilizada como control positivo (+). Esta membrana también se ensayó con un anticuerpo anti Actina, mostrando que dicha proteína no se encuentra presente en las muestras de envoltura vitelina. La flecha indica las bandas que corresponden a la proteína HSPA.

En los ovocitos de anfibios, la envoltura vitelina está rodeada por otra matriz extracelular conocida como cubierta gelatinosa, la cual está compuesta por glicoconjugados de alto peso molecular que cumplen funciones estructurales, así como componentes de bajo peso molecular, algunos de los cuales se denominan “factores difusibles” (Bonnell y col., 1996; Arranz y col., 1997). Una vez que los ovocitos son depuestos los “factores difusibles” de la cubierta gelatinosa son liberados de esta matriz

extracelular modificando la solución hipotónica en la que los ovocitos se encuentran, conociéndose esta solución como agua de huevo (o EW, del inglés “egg water”) (Al-Anzi & Chandler, 1998; Krapf y col., 2007; Krapf y col., 2009). Teniendo en cuenta que las proteínas HSPA son proteínas solubles que pueden difundir fácilmente (y que de hecho habíamos comprobado que estaban difundiendo de la envoltura vitelina), decidimos analizar su presencia en el agua de huevo. El agua de huevo (obtenida como se describe en la sección III.7 de Materiales y Métodos) fue concentrada por liofilización y analizada por Western blot utilizando el anticuerpo anti HSPA, BRM22. En la Figura VII.7 se observan los patrones típicos de la muestra de agua de huevo en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie (panel de la izquierda) y la presencia de la proteína HSPA en dichas muestras (panel de la derecha). A su vez, en el panel inferior puede observarse la ausencia de Actina en las muestras de agua de huevo, indicando que la banda observada para HSPA no se puede adjudicar a una contaminación de la muestra de agua de huevo con restos de ovocitos.

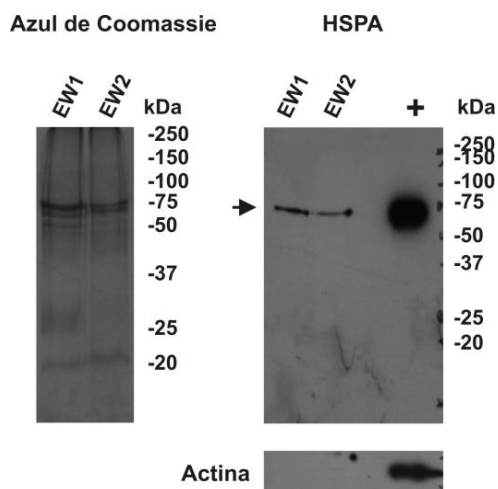


Figura VII.7: HSPA en muestras de difundido total. Muestras de agua de huevo (EW) fueron separadas en geles al 12% y teñidas con Azul de Coomassie o transferidas y analizadas con el anticuerpo BRM22 (panel HSPA). Este panel incluye una muestra de citosol utilizada como control positivo (+). Esta membrana también se ensayó con un anticuerpo anti Actina, mostrando que dicha proteína no se encuentra presente en las muestras de agua de huevo. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha de cada panel. La flecha indica las bandas que corresponden a la proteína HSPA.

#### VII.2.4 Unión de la proteína HSPA recombinante a los espermatozoides

En organismos de fecundación externa, como *Bufo arenarum*, los espermatozoides se ven expuestos a un fuerte estrés (cambio repentino en la tonicidad, pH, etc.) cuando son liberados al medio ambiente durante la fecundación. Por este motivo, surgió la hipótesis de que esta gameta podría ser el blanco de la proteína HSPA liberada por el ovocito. Con el objetivo de analizar esta posibilidad, se expresó una proteína HSPA de origen humano (HSPA1A) en *E. coli*. Esta proteína recombinante es una proteína de fusión que posee una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína (HSPAr), lo que permitió utilizar la técnica de cromatografía de afinidad (columnas de níquel) para su purificación. Posteriormente, se usó la proteína HSPAr en ensayos de unión. Brevemente, se incubaron espermatozoides con cantidades variables de la proteína HSPAr, posteriormente los mismos fueron lavados y concentrados por centrifugación. Estas muestras de espermatozoides se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti etiqueta de histidina. La señal detectada para la etiqueta de histidina fue relativizada a la señal de Tubulina. Como se observa en la Figura VII.8 A, a mayor concentración de HSPAr en el medio, mayor es la señal de inmunodetección en la muestra de espermatozoides. El comportamiento del sistema se asemeja al de una saturación. En la Figura VII.8 B se realizó un control con otra proteína recombinante (Tiorredoxina-CNBP) fusionada a una secuencia de histidinas, con el objetivo de descartar que la unión al espermatozoide fuera inespecífica. Como puede observarse en la calle central de este panel, bajo las mismas condiciones experimentales, esta proteína no relacionada pero que contiene una etiqueta de histidina no se unió a los espermatozoides de *Bufo arenarum*.

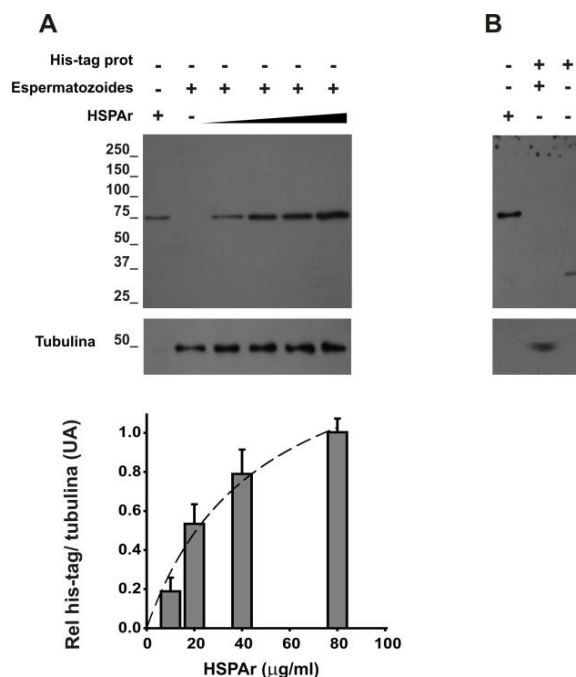


Figura VII.8: Unión de HSPAr a los espermatozoides de *B. arenarum*. A) La unión de HSPAr a los espermatozoides aumenta con la concentración de HSPAr. Los espermatozoides fueron incubados con concentraciones crecientes de HSPAr y una concentración constante de BSA (40 µg/ml), lavados y analizadas usando un anticuerpo anti-etiqueta de histidina. B) Control de especificidad. Una proteína recombinante fusionada a histidina (Tiorredoxina-CNBP) fue utilizada en el medio de incubación en lugar de HSPAr. Se incluyeron controles positivos como HSPAr y Tiorredoxina-CNBP fusionada a histidina para mostrar que ambos son reconocidos de igual manera por el anticuerpo anti histidina.

También se hicieron ensayos en los cuales se mantuvo constante la concentración de la proteína HSPAr mientras se elevaba la concentración de albúmina sérica bovina (BSA) en el medio de incubación. Estos experimentos se realizaron para descartar una unión inespecífica al espermatozoide (en tal caso, BSA desplazaría la unión de la proteína HSPAr). Como se observa en la Figura VII.9 A, aún a la concentración de 80 µg/ml de BSA en el medio de incubación, la señal correspondiente a HSPAr en los espermatozoides no se vió afectada. Sin embargo, cuando se utilizó agua de huevo (la cual contiene la proteína HSPA como se mostró anteriormente, Figura VII.7) en lugar de BSA, la misma sí fue capaz de competir la unión de la proteína recombinante HSPAr a los espermatozoides (Figura VII.9 B).

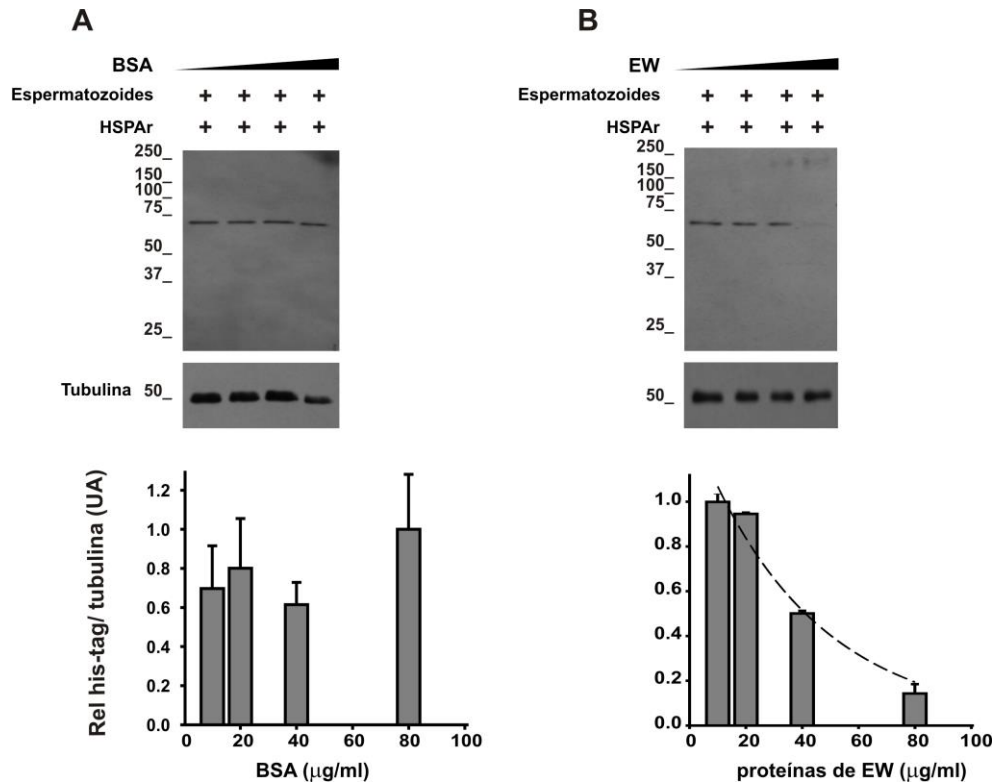


Figura VII.9: Ensayos de competencia de la unión de HSPAr a los espermatozoides de *B. arenarum*. A) La unión de HSPAr a los espermatozoides es independiente de la concentración de BSA en el medio de incubación. Los espermatozoides fueron incubados con una concentración constante de HSPAr (40 μg/ml), y concentraciones variables de BSA. B) La unión de HSPAr puede ser competida con proteínas presentes en el agua de huevo (EW). Los espermatozoides fueron incubados con HSPAr (20 μg/ml) y concentraciones crecientes de proteína de agua de huevo. Cada calle corresponde a 10<sup>6</sup> espermatozoides. Las figuras son representativas de al menos 3 experimentos independientes. En todos los Westerns se utilizó Tubulina como control de carga. Debajo de cada panel se encuentra la semicuantificación de los resultados, en donde los datos están expresados relativizados a Tubulina en unidades arbitrarias (UA).

También se realizaron ensayos de unión de la proteína HSPAr a espermatozoides que se analizaron por inmunofluorescencia. En la Figura VII.10 A y B se observa como la proteína HSPAr se une de manera preferencial a la región de la pieza media del espermatozoide, detectándose en algunos casos también señal en el acrosoma de los mismos. En la Figura VII.10 C los espermatozoides no fueron incubados con el anticuerpo anti-etiqueta de histidina, descartándose de esta forma una señal inespecífica debido al anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3. Los espermatozoides también fueron incubados con una proteína no relacionada (Tiorredoxina-CNBP), que presenta también una etiqueta de histidina, en lugar de HSPAr (Figura VII.10 D). Estos resultados corroboraron aquellos obtenidos previamente y sugieren que la proteína HSPA liberada

hacia el agua de huevo desde el ovocito o alguna de sus estructuras extracelulares, se une finalmente a la pieza media de los espermatozoides.

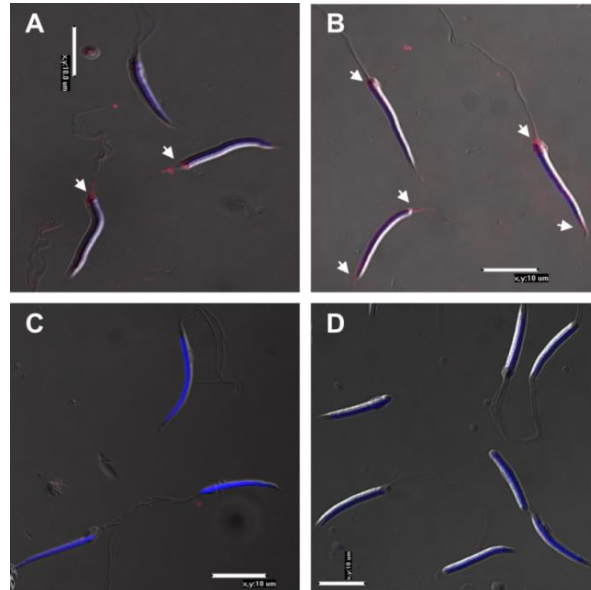


Figura VII.10: Detección por inmunofluorescencia de los sitios de unión de la proteína HSPAr a los espermatozoides de *B. arenarum*. Los espermatozoides fueron incubados con la proteína HSPAr, lavados y fijados. A y B: la proteína HSPAr se detectó utilizando un anticuerpo anti etiqueta de histidina y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (señal roja). Las flechas indican la tinción que corresponde a la presencia de HSPAr. HSPAr se une de manera preferencial a la pieza media de los espermatozoides y en algunos casos también al acrosoma. C: Control en el cual no se utilizó el anticuerpo primario anti His-tag. D: Control en el cual se utilizó una proteína recombinante no relacionada (Tiorredoxina-CNBP) que contenía una etiqueta de histidina en lugar de HSPAr. El colorante Hoechst se utilizó para teñir los núcleos. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

### VII.2.5 Expresión de HSPA endógena en espermatozoides de *B. arenarum*

Las proteínas HSPA, como se mencionó anteriormente, han sido descritas en ovocitos de distintas especies: desde invertebrados como erizo de mar (Giudice y col., 1999), pasando por vertebrados inferiores: *Xenopus laevis* (Herberts y col., 1993), hasta vertebrados superiores: *Mus musculus* (Calvert y col., 2003). Por otra parte, también hay reportes que indican la presencia de este tipo de proteínas en la gameta masculina: el espermatozoide. Mediante técnicas de Western blot o inmunofluorescencia se ha detectado la presencia de esta proteína en espermatozoides de humanos (Naaby-Hansen & Herr, 2010), en espermatozoides de cerdos (Spinaci y col., 2005), y en las gametas de los toros (Kamaruddin y col., 2004; Pate y col., 2008). Teniendo en mente estos datos, se decidió

evaluar la expresión endógena de la proteína HSPA en espermatozoides mediante Western blot e inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo monoclonal BRM22. Por ambas técnicas se determinó que HSPA se expresa en los espermatozoides de *B. arenarum*. En los ensayos de Western blot se analizaron tanto extractos de espermatozoides enteros, como fracciones solubles e insolubles luego del tratamiento de las células con el detergente Tritón X-100. Este método de extracción permite distinguir aquellas proteínas que se encuentran asociadas al citoesqueleto (insolubles luego del tratamiento con el detergente), de aquellas que no lo están (solubles) (Moos y col., 1998; Vigodner y col., 2013). En la Figura VII.11 A se observa que la proteína HSPA se encuentra presente en ambas fracciones, pero es mayoritaria en la fracción soluble. Para evaluar la ubicación de esta proteína dentro de la célula se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Como puede observarse en las Figuras VII.11 B y C, esta proteína se encuentra principalmente en la pieza media del espermatozoide y en algunas ocasiones también se la puede detectar en la región acrosomal. La Figura VII.11 D es un control en el cual se omitió el anticuerpo primario BRM22. Cabe aclarar que la localización de la proteína HSPA endógena del espermatozoide es la misma que se observó para la unión de la proteína HSPAr (Figura VII.10 A y B).

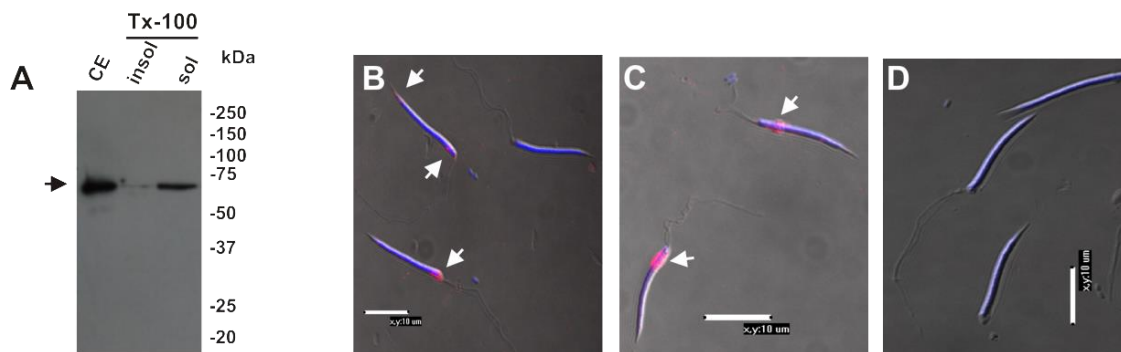


Figura VII.11: Expresión de HSPA en espermatozoides de *B. arenarum*. A) Western blot representativo de espermatozoides tratados con Tritón X-100: célula entera (CE), fracción insoluble luego del tratamiento con el detergente (insol), fracción soluble (sol), y analizados con el anticuerpo BRM22 con el objetivo de detectar proteína HSPA endógena en la gameta masculina. La flecha señala la banda que corresponde a la proteína HSPA. Los marcadores de peso molecular se encuentran a la derecha del panel. B-C: Detección de la expresión de HSPA endógena mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario BRM22 y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (señal roja). Las flechas indican la posición dentro del espermatozoide en donde se detectó señal correspondiente a HSPA. D: ensayo de inmunofluorescencia control en donde se omitió el anticuerpo primario. El colorante Hoechst fue utilizado para teñir los núcleos presentes en la cabeza de los espermatozoides. La barra representa 10 μm.

### VII.2.6 Efecto de la proteína HSPAr sobre viabilidad de los espermatozoides

El siguiente objetivo fue intentar determinar qué efectos o ventajas le podría llegar a brindar la proteína HSPA liberada desde el ovocito y/o sus estructuras extracelulares a la fisiología del espermatozoide. En trabajos realizados en mamíferos se demostró que proteínas chaperonas liberadas por células epiteliales del oviducto le conferían una mayor sobrevivencia al espermatozoide (Elliot y col., 2009). Siguiendo esta idea, analizamos la viabilidad de los espermatozoides mediante dos técnicas: conversión de MTT y Exclusión del colorante Azul de Tripán. Los espermatozoides fueron incubados durante 10 min en una solución hipotónica que contenía la proteína HSPAr (40  $\mu\text{g/ml}$ ), o BSA o una proteína no relacionada que presenta una etiqueta de histidina o simplemente el buffer (condición libre de proteínas). Transcurridos esos 10 minutos se evaluó la viabilidad de los espermatozoides mediante las dos técnicas recién mencionadas. Los controles realizados con la proteína BSA y la proteína recombinante no relacionada dieron resultados similares a los obtenidos cuando no se adicionó al medio ninguna proteína, por este motivo todos estos resultados se agruparon (-HSPAr). Los resultados obtenidos cuando se utilizó la técnica de MTT fueron similares tanto en presencia de la proteína HSPAr como en las condiciones control (-HSPAr =  $101,9 \pm 4,7$ ; +HSPAr =  $103,0 \pm 3,5$ ,  $n \geq 3$ ). Sin embargo, cuando se utilizó la técnica de Exclusión del colorante Azul de Tripán, los espermatozoides que estuvieron expuestos a la proteína HSPAr mostraron una mayor viabilidad (Figura VII.12). Este efecto, si bien modesto fue estadísticamente significativo (-HSPAr =  $96,2 \pm 1,2$ ; +HSPAr =  $99,9 \pm 0,8$ ,  $n \geq 3$ , \*  $p \leq 0,05$ ). Estos resultados sugieren que las proteínas HSPA liberadas por el ovocito representan un efecto beneficioso para la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides.

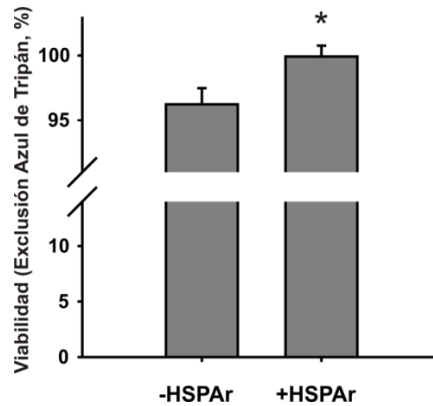


Figura VII.12: Efecto de la proteína HSPAr sobre la viabilidad de los espermatozoides analizado mediante el ensayo de exclusión del colorante Azul de Tripán. Los espermatozoides fueron incubados en una solución hipotónica (similar a lo que ocurre durante la fecundación) a la cual se le agregó 40  $\mu\text{g/ml}$  de HSPAr (+HSPAr) o la misma concentración de BSA o de una proteína no relacionada que presenta una etiqueta de histidina o ninguna proteína (-HSPAr). Se observó la coloración de los espermatozoides a través del microscopio, determinándose así la cantidad de espermatozoides que lograron impedir el ingreso del colorante a la célula (espermatozoides viables). En cada experimento se contaron al menos 200 espermatozoides. Los valores son el resultado de al menos tres experimentos independientes. \*  $p \leq 0,05$ .

### VII.2.7 Fecundación en presencia de anticuerpos anti HSPA

Con el objetivo de determinar una posible participación de la proteína HSPA durante la fecundación se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* en presencia del anticuerpos anti HSPA. En estos ensayos se utilizaron dos anticuerpos, uno monoclonal (BRM22) y otro policlonal (DNAK). El anticuerpo monoclonal no provocó variaciones en el porcentaje de fecundación alcanzado (datos no mostrados). El anticuerpo policlonal (DNAK) provocó una disminución significativa en el porcentaje de fecundación, cuando la concentración de espermatozoides utilizada fue de  $1.10^5$  cél/ml. En porcentajes: Control =  $58,5 \pm 7,5$ , Preimmune =  $50,0 \pm 6,0$ , y a-HSPA (DNAK) =  $28,0 \pm 5,0$ ,  $n \geq 6$ , \*  $p < 0,05$  vs. Control y Preimmune. En los ensayos en los que se utilizaron concentraciones de espermatozoides menores o mayores no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en presencia o ausencia del anticuerpo DNAK (Figura VII.13). Estos resultados sugerirían que la proteína HSPA cumple un rol en la fecundación de *B. arenarum*. Sin embargo no permiten especificar cuál o cuáles de las proteínas HSPA son las que están involucradas (endógenas del ovocito, liberadas por el ovocito y/o sus estructuras extracelulares, y/o endógenas del espermatozoide).

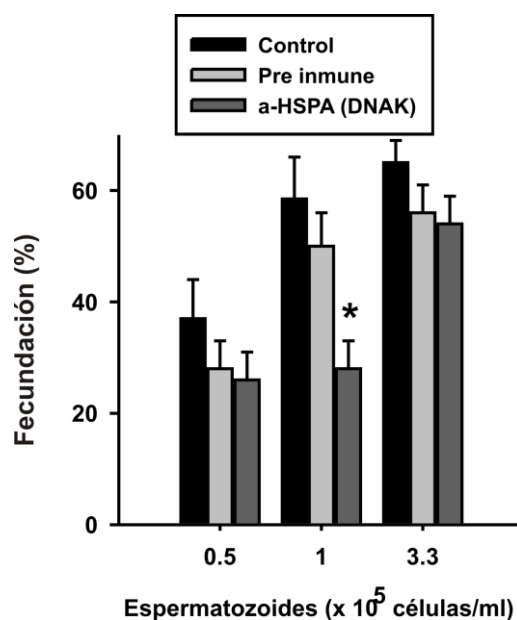


Figura VII.13: Ensayos de fecundación *in vitro* en presencia del anticuerpo anti-HSPA. Control: Fecundación en ausencia de anticuerpos. Pre-inmune: Fecundación en presencia de suero pre-inmune (dilución 1/15). a-HSPA (DNAK): Fecundación en presencia del anticuerpo DNAK (dilución 1/15). Los porcentajes de fecundación se obtuvieron a distintas concentraciones de espermatozoides (0,5.10<sup>5</sup>, 1.10<sup>5</sup>, y 3,3.10<sup>5</sup> cél/ml) bajo cada uno de los tratamientos). En todos los experimentos la fecundación se determinó mediante la observación de la primera división mitótica. Los ovocitos (6-8 en cada tratamiento) fueron obtenidos de al menos seis animales, los cuales fueron procesados de manera independiente. Se utilizaron diferentes dadores de espermatozoides. Los valores se expresan como porcentajes de fecundación  $\pm$  error estándar de la media.\*  $p \leq 0,05$  vs. Control y Preinmune a la misma concentración de espermatozoides.

### VII.3 DISCUSIÓN

En líneas generales, las proteínas de estrés térmico (HSP) actúan como chaperonas ayudando a mantener la conformación de las proteínas, estabilizando los precursores que luego formarán parte de complejos macromoleculares, y también participando en la transferencia de proteínas a través de las membranas intracelulares (Ellis & van der Vies, 1991; Hendrick & Hartl, 1993).

Originalmente se planteó que la función de las proteínas que pertenecen a esta familia era proteger al organismo de los impactos medioambientales adversos, y se ha analizado la inducción de dichas proteínas bajo diferentes condiciones de estrés. Sin embargo, hace relativamente pocos años, se ha demostrado la expresión constitutiva de muchas de estas proteínas, así como la expresión basal de aquellos genes que son inducibles por estrés. En humanos por ejemplo, las proteínas de la familia HSPA incluyen formas de expresión constitutiva (ej. HSPA8, previamente conocida como HSC70) y

formas inducibles por calor (HSPA1A, 1B, etc.) las cuales a su vez presentan una importante expresión basal. Esto se debe a que las proteínas de estrés térmico están involucradas en procesos que son esenciales para el correcto funcionamiento celular bajo condiciones normales: (1) importe de proteínas a diversos compartimentos celulares; (2) plegado de proteínas en el citosol, retículo endoplasmático y mitocondria; (3) degradación de proteínas inestables; (4) desensamblado de complejos proteicos; (5) prevención de la agregación de proteínas; (6) control proteínas regulatorias; y (7) re-plegamiento de proteínas mal plegadas (Bukau & Horwich, 1998).

Como se mencionó previamente, resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que una de las proteínas de la membrana plasmática del ovocito que presentaba afinidad por proteínas presentes en la cabezas de los espermatozoides pertenecía a la familia de las HSP. En particular, en *B. arenarum* la proteína que se determinó tendría un rol en la interacción con la gameta masculina pertenecía a la sub-familia de proteínas de estrés térmico HSPA (anteriormente conocidas como HSP70) (Coux & Cabada, 2006). Teniendo en cuenta las evidencias que sugerían un rol de esta sub-familia de proteínas en la interacción con el espermatozoide, en esta parte del Trabajo de Tesis evaluamos la expresión bajo condiciones de no estrés y la distribución subcelular en el ovocito de las HSPA. También intentamos determinar cuál sería el rol de esta proteína, si lo tenía, durante la fecundación en *B. arenarum*.

Cuando se analizaron extractos de ovocitos enteros (depletados de vitelogenina) mediante ensayos de Western blot utilizando dos anticuerpos diferentes, uno policlonal (DNAK) y otro monoclonal (BRM22), pudo comprobarse que efectivamente en los ovocitos que no habían sido expuestos a ningún tipo de estrés la expresión de la proteína HSPA era alta. Además, también pudo observarse que la cantidad de la proteína HSPA es variable de un animal a otro. Patrones variables en la expresión de proteínas del tipo HSPA ya se habían descrito previamente en ovocitos de otro modelo de anfibio: *Xenopus laevis* (Horrell y col., 1987).

La electroforesis bidimensional de los extractos de ovocitos nos permitió analizar la presencia de distintas isoformas de la proteína, las cuales en un gel de una sola dimensión serían indistinguibles. Se pudieron observar así al menos dos isoformas de la proteína HSPA. Los puntos isoelectricos de dichas proteínas fueron de 5,25 y 5,45, siendo la/s

isoforma/s de menor punto isoelectrico la/s más abundante/s. Como se mencionó en la introducción de este capítulo la familia de proteínas HSPA en humanos está compuesta por 13 isoformas, las cuales presentan una homología de secuencia de más del 84%, si se excluye de la comparación a las isoformas HSPA5 (anteriormente conocida como Grp78) y HSPA9 (previamente conocida como Mortalina). En el anfibio *X. laevis* se han encontrado los ortólogos de la mayoría de estos genes (Rupik y col., 2011), lo cual lleva a pensar que lo mismo debería estar ocurriendo en un anfibio evolutivamente relacionado a *X. laevis* como es *B. arenarum*. Por lo tanto, si bien en ausencia de estrés sólo se observan dos spots, teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia que tienen todos los miembros de esta familia, probablemente cada uno de ellos corresponda a más de una isoforma HSPA.

El análisis de la distribución subcelular de la proteína HSPA en la gameta femenina se realizó mediante dos técnicas: Western blot e inmunofluorescencia. Se analizaron distintas fracciones subcelulares de ovocito, detectándose la expresión de esta proteína en condiciones de ausencia de estrés tanto en fracciones citosólicas como de membranas, siendo más abundante en las primeras.

En cuanto al estudio de la presencia de las proteínas HSPA en membranas, se analizaron: membranas totales, membranas livianas y membranas pesadas. Se ha demostrado que las membranas livianas son similares a los microdominios presentes en las membranas plasmáticas de los eucariotas, también conocidos como “rafts” (Luria y col., 2002). Por otra parte se ha descrito que en distintas líneas celulares las HSPA tienen tendencia a asociarse a las membranas plasmáticas en los microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos (“rafts”) (Broquet y col., 2003; Vega y col., 2008). También en el mismo sentido, cabe remarcar que en el año 2003 estudios proteómicos que analizaban la composición de la membrana plasmática de ovocitos murinos identificaron diferentes proteínas de estrés térmico (HSPA=HSP70, HSPC=HSP90, HSPA5=Grp78, etc.) en esta localización, las cuales se estaban expresando de manera muy abundante en condiciones normales (de no estrés) (Calvert y col., 2003).

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia fueron congruentes con los observados mediante Western blot, demostrando que la presencia de la proteína HSPA es ubicua en el ovocito. Pero, lo llamativo al analizar las imágenes de microscopía de inmunofluorescencia fue que pudimos observar que la proteína HSPA también se hallaba presente en la envoltura vitelina, siendo ésta una estructura extracelular del ovocito

análoga a la zona pelúcida de los mamíferos. Este resultado fue corroborado mediante Western blot en muestras de envolturas vitelinas purificadas. Cabe resaltar que sólo se pudo detectar la presencia de HSPA en cubiertas vitelinas que habían sido previamente entrecruzadas con el reactivo DSP, lo cual constituye un indicio de que esta proteína estaría en tránsito, y por lo tanto, finalmente se perdería de esta cubierta extracelular (como se puede observar en aquellas muestras de envolturas vitelinas que no fueron entrecruzadas).

El hecho de encontrar a la proteína HSPA en la envoltura vitelina junto con el carácter soluble de dicha proteína, nos llevó a preguntarnos si la misma podría estar difundiendo desde esta cubierta hacia el medio. Para analizar esta posibilidad se obtuvieron muestras de “difundido total o agua de huevo” las cuales fueron concentradas por liofilización y posteriormente analizadas por Western blot. Mediante esta estrategia pudimos confirmar que la proteína HSPA difunde desde el ovocito y/o desde la envoltura vitelina hacia el medio externo. Si bien desde hace muchos años se ha establecido la importancia de los factores difusibles en el proceso de fecundación (Olson & Chandler, 1999; Krapf y col., 2006), la liberación de proteínas HSPA desde el ovocito y/o sus estructuras extracelulares hacia el medio ambiente en el momento de la deposición no ha sido descrito en ningún otro organismo de fecundación externa hasta el momento. Sin embargo, lo que sí se ha demostrado es que una gran variedad de células serían capaces de secretar proteínas de estrés térmico: neuronas, monocitos, macrófagos, células B y células tumorales de origen epidérmico (Robinson y col., 2005; Clayton y col., 2005; Davies y col., 2006). La particularidad de estas proteínas es que en su estructura no poseen señales que las dirijan al medio extracelular por la vía exocítica clásica (retículo endoplasmático → aparato de Golgi → Vesículas → Fusión con membranas). Hasta el momento el mecanismo por el cuál las proteínas HSPA estarían atravesando la membrana plasmática no ha sido del todo dilucidado. Sin embargo, hay teorías que proponen mecanismos que involucran exosomas, endolisosomas o la inserción de las proteínas HSPA en las membranas plasmáticas con la posterior formación de vesículas que ulteriormente son liberadas al medio extracelular (Lancaster & Febbraio, 2005; Mambula y col., 2007; Vega y col., 2008).

La difusión de proteínas HSPA desde el ovocito y/o sus cubiertas hacia el medio externo nos impulsó a evaluar la función que dicha proteína podría estar cumpliendo.

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas con una limitada capacidad para sintetizar proteínas y por lo tanto, iniciar una respuesta a estrés (Hecht, 1998). Los anfibios como *Bufo arenarum* presentan fecundación externa, por lo que los espermatozoides en el momento de la deposición conjunta de gametas deben pasar de un entorno fisiológico hacia el medio ambiente (generalmente un charco). Esto con seguridad representa un gran desafío para la fisiología del espermatozoide. Durante este proceso de liberación al medio, los espermatozoides se ven expuestos a un importante estrés: cambio brusco en tonicidad, pH, etc. Por estos motivos decidimos evaluar la posibilidad de que las proteínas chaperonas del tipo HSPA liberadas por el ovocito y/o sus cubiertas se estuviesen uniendo a ellos.

Para evaluar esta hipótesis se utilizó una proteína recombinante humana (HSPA fusionada a una etiqueta de histidina) en ensayos de unión. La interacción HSPAr-espermatozoide se evaluó utilizando dos técnicas: Western blot e inmunofluorescencia, en ambos casos se utilizó un anticuerpo capaz de reconocer la etiqueta de histidina presente en la proteína de fusión.

La unión de la proteína HSPA recombinante a los espermatozoides no pudo ser competida mediante el agregado de una proteína no relacionada como la albúmina sérica bovina. Sin embargo, dicha unión sí fue competida de manera exitosa cuando se agregó al medio "difundido total" (el cual como se comentó anteriormente presentaba HSPA). Estos ensayos permitieron confirmar la especificidad de la unión la proteína HSPA recombinante al espermatozoide de *B. arenarum*.

De esta manera pudimos concluir que efectivamente la proteína HSPAr tiene la capacidad de unirse de forma rápida y específica a los espermatozoides. Mediante experimentos de inmunofluorescencia pudimos observar que lo hace principalmente en la pieza media y en menor grado en el acrosoma. Cabe aclarar que la unión de la proteína HSPA recombinante se produce en las mismas localizaciones en donde se detectó la expresión endógena de la proteína HSPA del espermatozoide. Estos resultados podrían indicar que la HSPA exógena estaría suplementando a la proteína HSPA endógena, y de ser así, que ambas estarían cumpliendo las mismas funciones.

Posteriormente, para intentar comprender cuál podría ser el efecto de la unión de las proteínas HSPA sobre los espermatozoides, analizamos la viabilidad de los

espermatozoides mediante la técnica de exclusión del colorante azul de tripán. Este método suele ser utilizado como un indicador indirecto de la viabilidad celular, ya que debido a la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática funcional, el colorante queda excluido de aquellas células que se encuentran vivas. Los resultados obtenidos indicarían que la unión de la proteína HSPA exógena ayudarían a preservar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides.

En los últimos años en distintas especies de mamíferos (cerdos, bovinos y humanos) se ha descrito la secreción de moléculas de la familia HSPA desde las células epiteliales del oviducto y su unión con espermatozoides homólogos (Elliot y col., 2009; Marín-Briggiler y col., 2010b). En particular, en el trabajo realizado por Elliot y col. demostraron que la incubación de espermatozoides porcinos y bovinos con la fracción soluble de proteínas aisladas de la membrana plasmática apical del oviducto (y también con HSPA8 recombinante bovina) provocaba un aumento en el índice de viabilidad de estas gametas. Mientras que en el trabajo realizado en humano se llegó a la conclusión que la proteína Grp78 liberada por el oviducto modularía la interacción entre los espermatozoides y las proteínas presentes en la zona pelúcida del ovocito. Al comparar estos resultados resulta importante recordar que *Bufo arenarum* es un organismo de fecundación externa, mientras que los modelos analizados en esos trabajos presentan fecundación interna. Teniendo en mente estas diferencias, se podría sugerir que las funciones citoprotectoras o facilitadoras que cumplen las células presentes en el oviducto (durante la fecundación interna) deberían ser realizadas por el ovocito y sus estructuras extracelulares en aquellos organismos que presentan fecundación externa.

Para confirmar un rol de las proteínas HSPA en el proceso de fecundación de esta especie, se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de anticuerpos anti-HSPA. El anticuerpo monoclonal (BRM22), no provocó ningún efecto en el porcentaje de fecundación obtenido respecto al control. La empresa que lo comercializa no provee de la información acerca del epítopo que es reconocido por dicho anticuerpo, por lo que una posible explicación de este resultado es que en particular el epítopo reconocido por el anticuerpo BRM22 no esté involucrado en ninguna etapa fundamental del proceso de fecundación. Por el contrario, en los ensayos en los que se utilizó el anticuerpo policlonal DNAK se observó una disminución significativa en el porcentaje de fecundación cuando se

utilizaron concentraciones de espermatozoides menores a las óptimas,  $1.10^5$  células/ml (esta concentración de espermatozoides provoca la fecundación de menos del 70% de los ovocitos en condiciones control). Cuando la concentración de espermatozoides utilizada fue aún menor ( $0,5.10^5$  células/ml) no se observó ningún efecto, probablemente porque a esta concentración los porcentajes de fecundación alcanzados son muy bajos en todas las condiciones y por lo tanto, es más difícil observar una diferencia significativa entre los distintos tratamientos. A concentración mayores ( $3,3.10^5$  células/ml) el efecto del anticuerpo es indetectable, probablemente debido a la gran cantidad de espermatozoides presente en el medio de fecundación. Estos resultados podrían interpretarse como una especie de inhibición competitiva, en la cual el espermatozoide actuaría como sustrato y el anticuerpo D<sub>NAK</sub> como un inhibidor competitivo. Ensayos similares fueron realizados en modelos de mamíferos: en bovino (Matwee y col., 2001) y en porcino (Spinaci y col., 2005) obteniéndose resultados similares a los nuestros, ya que en presencia de anticuerpos anti HSPA los porcentajes de fecundación fueron menores respecto a la condición control.

Teniendo en cuenta estos estudios y nuestros resultados, se podría concluir que las proteínas HSPA participan en el proceso de fecundación tanto en anfibios como en mamíferos. Sin embargo, proponemos que en organismos de fecundación externa, las proteínas HSPA del espermatozoide son suplementadas por HSPA del ovocito. Y que el rol de las proteínas HSPA en la fecundación de *Bufo arenarum* sería más evidente y crucial cuando las condiciones de fecundación no son las ideales.

Tanto la proteína HSP70 endógena como la exógena se ubican en la pieza media del espermatozoide. La pieza media posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, lo cual nos llevó a preguntarnos, ¿hay una relación entre la función de las proteínas HSP70 en la pieza media y la presencia de un elevado número de mitocondrias allí?

El principal rol de las mitocondrias del espermatozoide es la producción de la energía necesaria para la motilidad de la gameta a través de la fosforilación oxidativa. Este proceso metabólico se ve acompañado por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés: “reactive oxygen species”), siendo en espermatozoides de distintas especies, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) la principal (Liu y col., 2006; Kazama y col., 2006).

A su vez, la generación de especies reactivas del oxígeno conlleva a cambios deletéreos para el espermatozoide como ser: fragmentación del ADN de la gameta; peroxidación lipídica; apertura de los poros mitocondriales (lo cual lleva a una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )); liberación de las proteínas AIF (de sus siglas en inglés: “Apoptosis Inducing Factor”), y citocromo c hacia el citosol; etc., cambios todos que pueden provocar la apoptosis de la célula.

Las proteínas HSPs poseen una función citoprotectora, permitiendo a la célula adaptarse a cambios que se dan en el medio ambiente y así sobrevivir en lo que de otra forma serían condiciones letales. Al respecto, se ha demostrado que las proteínas HSP70 son capaces de interferir en la vía apoptótica mediante la interacción directa con varios componentes de la maquinaria de muerte celular programada (Parcellier y col., 2003). Por otra parte, también hay evidencias que indican que proteínas del tipo HSP70 serían capaces de prevenir la fragmentación del ADN (Li y col., 2000).

Si bien esto no deja de ser una hipótesis, esta explicación estaría de acuerdo con los datos obtenidos respecto a la ubicación en el espermatozoide de la proteína HSP70 (tanto exógena como endógena) y el efecto citoprotector que se evidenció para la HSP70 exógena en los ensayos de exclusión del colorante Azul de tripán.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados que se presentan en este Trabajo de Tesis aportan datos significativos para la comprensión de los procesos involucrados en el encuentro entre las gametas y en la consiguiente activación del ovocito, en el anfibio *Bufo arenarum*. Mediante distintas técnicas se corroboraron las evidencias preliminares que indicaban la participación de integrinas y proteínas HSPA durante la fecundación y se avanzó en la determinación del rol que cada una de estas proteínas tendría en el proceso. Sin embargo, mucho resta por conocerse ya que, como otros fenómenos interesantes de la biología, la fecundación es un proceso extremadamente complejo.

Respecto a las integrinas, se evaluó la expresión de distintas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tanto en ovocitos como en espermatozoides. En ovocitos de *Bufo arenarum* se detectó la presencia de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina en la fracción de membranas totales. En espermatozoides, de las subunidades integrina analizadas ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$ ), sólo se detectó la expresión de la subunidad  $\alpha V$  integrina. Además, se determinó que, en particular, la subunidad  $\beta 1$  integrina del ovocito tendría un rol en la fecundación, que hasta este punto experimental, podía ser una función meramente de adhesión o también de transducción de señal.

En relación a la subunidad  $\beta 1$  integrina, mediante técnicas basadas en RT-PCR se logró clonar y secuenciar la región codificante completa del ADNc que corresponde a esta subunidad integrina de *B. arenarum*. El ADN clonado presentó un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 797 aminoácidos. El análisis del extremo carboxilo terminal de la proteína, nos indicó que en ovocitos de *B. arenarum* se expresa el homólogo de la isoforma  $\beta 1A$  integrina humana, el cual según la bibliografía se encuentra asociado a numerosas cascadas de transducción de señal.

La presencia de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  integrina en la fracción de membranas totales del ovocito constituyó otra evidencia más a favor de la participación de integrinas de la subfamilia RGD en el proceso de fecundación. Esto se debe a que las combinaciones de dichas subunidades entre sí, o con otras subunidades, serían en teoría capaces de formar siete de los ocho heterodímeros que representan la subfamilia RGD (ver Figura I.7). Si bien no se ha analizado cuál/es de estos siete heterodímeros estaría/n presente/s en la membrana plasmática del ovocito, el resultado obtenido al analizar la expresión de la

subunidad  $\beta 3$  integrina nos permitiría descartar la presencia del heterodímero  $\alpha V\beta 3$  integrina en dicha ubicación.

Posteriormente, un análisis más detallado de la cascada de señalización que se desencadena en el ovocito luego de la fecundación, nos permitió comprobar que al menos parte de ella estaría íntimamente relacionada con la activación a nivel de membrana de las integrinas de la subfamilia RGD. Cabe aclarar que a diferencia de lo que ocurre en *Xenopus laevis*, en *Bufo arenarum*, la activación completa del ovocito no estaría cursando por un mecanismo mediado únicamente por las integrinas de la subfamilia RGD. Sin embargo, las integrinas de esta subfamilia sí tendrían un rol en la transducción de señal que se desencadena en el ovocito de *B. arenarum*, luego de que éste interactúa con ligandos presentes en la membrana del espermatozoide.

En *Bufo arenarum* podrían plantearse distintos modelos para explicar el mecanismo de activación del desarrollo embrionario. Cualquiera de estos modelos difiere del observado en otro anfibio evolutivamente cercano como es *Xenopus laevis*. Nuestros datos sugieren que la señal disparada por el tratamiento con el péptido RGDS es insuficiente para desencadenar la activación del ovocito, sin embargo no sabemos si es necesaria. De ser así, se podría plantear que quizás se necesiten más señales que en conjunto con la participación de integrinas del tipo RGD, activarían al ovocito. A su vez, estas “otras señales” podrían provenir de la activación de otros tipos de integrinas (que no pertenecen a la subfamilia RGD). De hecho, en *Xenopus laevis* la aplicación de péptidos que corresponden al dominio desintegrina de la proteína ADAM2 presente en el espermatozoide de esta especie (CRMPKTEC), provocó un porcentaje de activación muy superior al alcanzado mediante la incubación de los ovocitos con el péptido RGDS (Shilling y col., 1998), lo cual parecería indicar que también en este modelo podrían estar participando integrinas diferentes a las de la subfamilia RGD. Otra opción es que estas “otras señales” sean desencadenadas luego de la interacción de otro tipo de ligando presente en el espermatozoide con otro tipo de receptor (diferente a las integrinas) presente en la membrana plasmática del ovocito, pero que siga siendo un modelo de activación mediada por receptores. La tercera posibilidad es que *Bufo arenarum* presente un modelo de activación similar al observado en mamíferos, en donde la activación de los ovocitos es una consecuencia de la fusión previa entre las gametas. En este modelo, un factor liberado por el espermatozoide dentro del ooplasma sería el agente que finalmente

provocaría la activación del desarrollo embrionario. La principal función que las integrinas estarían cumpliendo en este caso sería asegurar el acercamiento de las gametas que finalmente llevaría a la fusión de las membranas plasmáticas y al ingreso del “factor espermático”. Los tres modelos de activación propuestos para *Bufo arenarum*, junto con el descrito hasta la fecha para *Xenopus laevis*, se esquematizan en la siguiente figura.

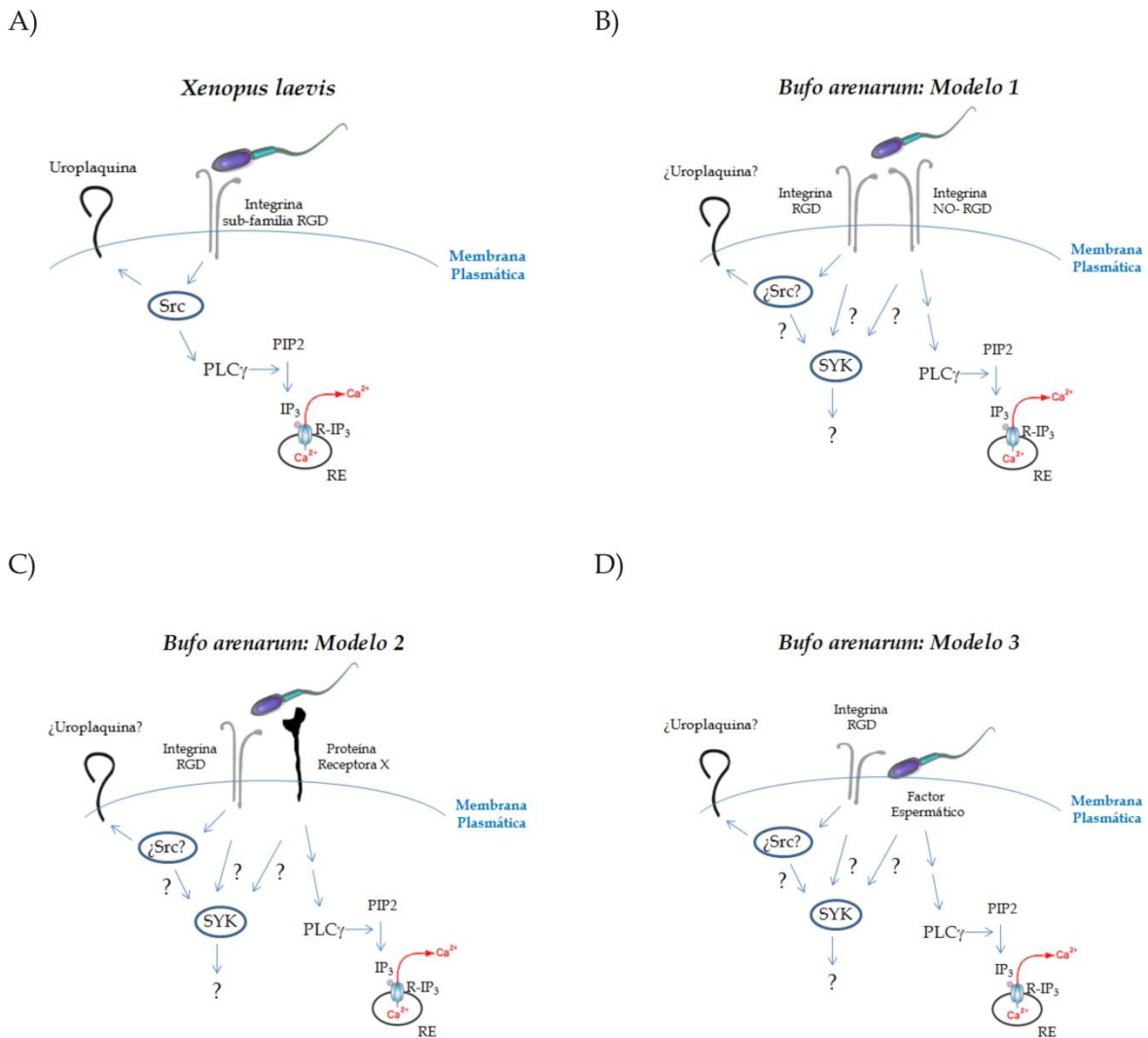


Figura VIII.1: Mecanismos de activación de ovocitos de anfibios. A) Mecanismo de activación observado en *Xenopus laevis* (Adaptado de Iwao, 2012). Modelos de activación propuestos para *Bufo arenarum* en donde B) sólo estarían involucradas integrinas; C) la activación dependería de integrinas y otra/s proteína/s receptoras; D) la activación sería una efecto de la fusión de las gametas y la consecuente liberación de factores espermáticos en el ooplasma. SYK: Spleen Tyrosine Kinase. PLC $\gamma$ : Fosfolipasa C $\gamma$ . PIP2: fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato. IP3: inositol 1, 4, 5 trifosfato. R-IP3: Receptor de IP3. RE: retículo endoplasmático.

En el intento de determinar la identidad de las proteínas que participan en la cascada de señalización que se desencadena en el ovocito luego de la interacción con el espermatozoide, se pudo describir no sólo la presencia en ovocitos, sino también la participación dentro de dicha cascada de la proteína Spleen Tyrosine Kinase. Esta proteína se activaría mediante fosforilación en los residuos tirosina 352 y 525/526 durante la fecundación. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, no podemos aseverar que SYK participe o no en el mecanismo de activación del ovocito, ya que: i) no podemos asegurar que la proteína de 70 kDa que se fosforila en residuos tirosina luego del tratamiento con el péptido RGDS (recordemos que este tratamiento no produce activación embrionaria) corresponda a SYK y ii) tampoco podemos descartar la posibilidad de que la activación embrionaria implique no sólo la señalización desencadenada por la activación de SYK sino también la causada por otras señales, y que por lo tanto, la fosforilación de SYK sea una condición necesaria pero NO suficiente para la activación del ovocito.

Con respecto a las proteínas de estrés térmico, en este Trabajo de Tesis detectamos la expresión de proteínas que pertenecen a la familia HSPA tanto en ovocitos como en espermatozoides, y en ambos casos en situaciones de NO estrés. La presencia de la proteína HSPA se detectó principalmente en dos regiones del espermatozoide: en el acrosoma y en la pieza media. Mientras que la localización dentro del ovocito fue mucho más amplia, detectándose en todas las fracciones sub-celulares analizadas (citósol, membranas plasmáticas, membranas totales).

Un resultado llamativo fue la detección de la proteína HSPA tanto en la envoltura vitelina como en el difundido total, lo cual representó un indicio de que estas proteínas estaban difundiéndose a través de las cubiertas extracelulares del ovocito hacia el medio ambiente, luego de la deposición de las gametas por parte de la hembra. Posteriormente, mediante ensayos diseñados para intentar determinar cuál podría ser el blanco de las proteínas HSPA que estaban difundiéndose desde el ovocito y/o sus cubiertas extracelulares, se pudo establecer que la HSPA exógena tendría la capacidad de unirse al espermatozoide, y que los sitios de unión se corresponderían con los sitios en donde se encuentra la HSPA endógena de la gameta. Esto estaría indicando que las proteínas HSPA captadas del medio probablemente estarían suplementando la proteína endógena (Figura VIII.2).

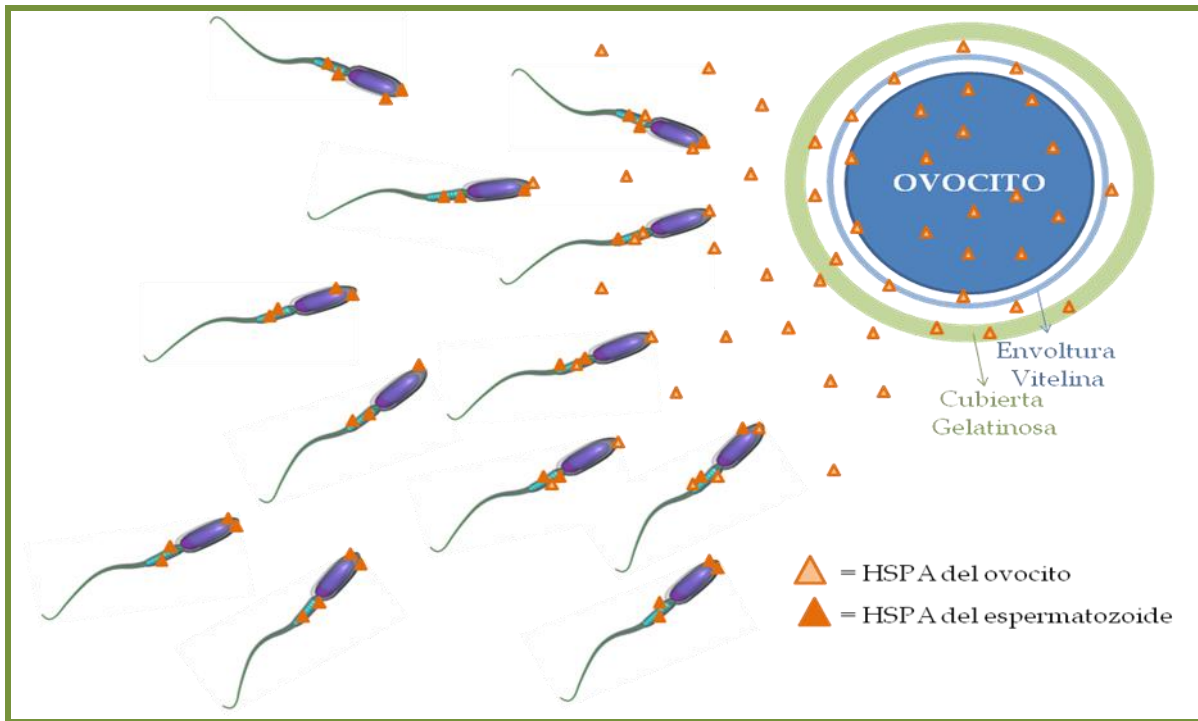


Figura VIII.2: Presencia de HSPA en las gametas de *Bufo arenarum*. Se representa la expresión de proteínas de la familia HSPA tanto en espermatozoides como en ovocitos de *Bufo arenarum* en condiciones de NO estrés. También se esquematiza la difusión de la proteína HSPA desde el ovocito y/o alguna de sus cubiertas extracelulares (envoltura vitelina y cubierta gelatinosa) en el momento de la deposición de las gametas y su posterior unión al acrosoma y a la pieza media de los espermatozoides.

Los estudios en los que se analizó la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide permitieron inferir que la unión de la HSPA exógena le otorgaría una mayor estabilidad a dicha membrana, lo cual se traduciría en una mayor viabilidad de los espermatozoides en su camino para encontrarse con la gameta femenina. Estos resultados junto con los obtenidos en ensayos de fecundación *in vitro* en presencia de un anticuerpo policlonal anti HSPA en donde se observó una disminución significativa en el porcentaje de fecundación alcanzado, permiten concluir que las proteínas HSPA serían importantes para lograr una fecundación exitosa.

En resumen, los resultados presentados en este Trabajo de Tesis aportan datos significativos a la comprensión de procesos involucrados en la fecundación de anfibios. Albert Tyler (1967) fue uno de los primeros autores en sostener que deben estudiarse

diferentes organismos para entender los mecanismos de la fecundación. Un estudio comparativo permite abordar generalizaciones e identificar procesos o mecanismos conservados y, por lo tanto, fundamentales. Particularmente, el estudio en la especie *Bufo arenarum* (vertebrado anfibio) permite el análisis comparativo entre los organismos más estudiados en este campo en la actualidad: mamíferos y erizo de mar (invertebrado). Trabajos futuros permitirán profundizar el conocimiento de los procesos involucrados en la fecundación, que poseen impacto directo en el diseño de terapias de contracepción, en el aumento de la eficiencia reproductiva en animales, así como en el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida que actualmente se utilizan en aquellas parejas que presentan problemas de fertilidad.

## IX. ANEXO: Secuencias amplificadas por PCR en *Bufo arenarum*

### BETA 3 INTEGRINA

TGCGACGAGAAGATTGGCTGGAGGAACGAATCTTCCCACCTACTGGTTTTTACCACAGATGCCAGG  
ACACACATAGCTTTAGATGGAAGACTTGCTGGCATTGTCCAGCCCAATGATGGGCACTGTCATTTA  
GGAGAAGACAATCATTACACCTTATCTACCACCTTGGATTACCCATCTATTGGTCTCATTACAGAG  
AACTATCACAGAAAAACATTAATCTTGTTTTTGCTGTCACAAACGAAGTCCAGGACCTCTATACG  
AAATACAGTGCCTTGATTCCCTGGAGCCACAGTAGGCACATTATCTGGAGATTCCAGCAATGTTATT  
CAGCTCATTGTGGATTCCCTATGAGAAGATTTCGCTCCAAAGTAGAATTGGAAGTCCGTGATCTACCA  
GAAGAGCTGTCACCTCATTTAATGCAACCTGCACCAACAATGAGGTCACGCCAGGCCTAAAGTCC  
TGCTCAGGTCTCAAGATTGGAGACACGGTAAG

### ALFA 4 INTEGRINA

TGAAGTCAGAGGTAAAAAGCTTGGTTCATACTTTGGAGCTTCTGTGTGCGCAGTGGATTTAAATGG  
TGATGGACTGTCAGACTTGCTTGTGGTGCACCAATGGAGAGCACAGTGCAGAGGAAGGCAAGGT  
GTACGTCTACATGAACTATGGATGGGGACAATTATCAGAACTTGATTATGAACTTTCTGGAAGTGA  
CCTATATGCAGCAAGGTTTGGAGAAGCAATAACCAATCTGGGAGATCTTGACAATGATGGCTTTGA  
AGATGTGGC

### ALFA 5 INTEGRINA

GGACCGGGCAGCTACTTCTGGCAAGGTCAGGTCTTCACTGCTACTCCAGATGACATTCGGAATGAC  
TTCTACGCTGAATACTTCATCCTAGAAATTAAGGACAAATGCAGACCCGTCAAGTTTTATCAAACC  
TACGACGACAGTTATATGGGTTACTCTGTAGCAGTCCGAGAGTTCAGTGGAGATAATACTGAAGAT  
TATGTGGCTGCAGTTCCCAAAAGAAACGATACTTATGGATATGTTACCATCCTGAATGGAAGTGA  
CTAAAATCACTTTATAACTTCTCAGGAGAACAGATGGCCTCCTACTTCGGGTA

### ALFA 6 INTEGRINA

TGGATATTCAGTGGCCAAAAGAAATCAGCAATGGAAAATGGCTTCTCTACATTGTAAAAATAGACT  
CCAAGGGACTGGAAAAAGTCGCATGTGAACCATTTTTCTGAAATTAACAGACTGAAATTGCTGGAGT  
CTGGTAAAAGTCGAAACAGACGTGAAATAGCAGAAAAACAATCTGATCCGGATGACAAATCTTTTT  
CATCTTCTCGGATAGGAAGTACATGACACTGGACTGTAATACTCATGCAAAGTGTGTGACCATTA  
GATGTCCCCTTCAAGGACTGGACAGTAATGCTGTCATTAACATTCGCTCCAGGTTATGGAACAGCA  
CGTTCCTCGAGGAATATTCAAAAATGAGCTATCTCGACATAATTGTGAAGGCCTCAATCAGTCTGA  
ATTCAACAGCCGACAACATTAATGGACTAATGAAGCTTACCAGGTGCGTGTACAGTTTTCCAG  
AGAAGATGCAGGTGCATTATAACCGGAGTACCGTGGTGGATTGTGTTGGTGGCTATACTAGCAGGAA  
TCTTAATGCTTGCCCTATTAGTGTTTATACTATGGAAGTGTGGCTTTTTCAAGAGAAGTAAGCAAG  
ATGAATTTGATGCCACATATCACAAGGCTGAGAT

### ALFA 8 INTEGRINA

CTTGGGAACCCATAGGTGGCTGGAACATAATCTCTCGCTTGGTCTCCGATTTGTGGTCCAGAGGTTA  
GAAAGCGCTGACAGCATCAAATTTGATCTTTTTGTAAAAAGTTCTAACAAGGACAATCCTAACAGT  
AACTTCGCCAGTCTGGAAATTTTCATCACTGCTGTGGCCCAGGTGGAGATCAGAGGAGTTTCTCAT  
CCCCCTCAGATCGTCCATCCCATTCCTAACTGGCAACCTAAGGAAAAACCAGCTGAAGAAGTGGAA  
ATAGGACCTTTAGTTCAACACATCTATGAGCTGCACAATATTGGCCC

**ALFA 9 INTEGRINA**

TGGCCTGTGCTCATCGCTGGAAGAATATCTACTATGAAAGTGAGCTTATACTTCCGTATGGTTCCT  
GCATCATCCTCCCACCAAATCTGCAGTCCAATGGGAAGAAGCTATTGCCTTGCTACGAGGAATACA  
AGAAGAAATATGGAGAGGAACATGGCTCATGCCAAGCCGGGATTGCAGGATCCTTCATGGAGGAGC  
TGGTTGTGATGGGAGCACCAGGATCATATTACTGGACTGGCACAGTGAAAGTATTGAATCTTACTG  
ACAACACATACTTCAAGCTGAGTAATGAAGCTGTCATTGCCAAAGGTTACACCTATTTAGGATATG  
CGGTCACTGCTGGTCACTTTTTCAACCTACCACCATGGACATAGTTGGTGGAGCTCCCCGAGATA  
GTGGCATCGAAAGGTCTATATTTTCAGATCAGATAAGGCATCTGGATCACTTGTTAGGATTTTTT  
AAGCTTTGGGAAAAAAGATGGGCTCTTACTTCGGCTCCTCCTT

**ALFA V INTEGRINA**

AATCAGGGGGAAGGAGCCTATGAAGCTGAACTCATTGTCCACATCCCACCCCAAGCTGACTTCATC  
GGGGTGGTCCGAAAAACGAAACTCTGTGAGGTTATCCTGTGCGTTCAAGACGGAGAATCAGACA  
AGACTCGTCTGCGATCTCGGAAACCCCATGAAGGCCAGAACGAGGGTGTGGCGGCCCTGCTC  
TTCACTGTCCATCAACTGAAAGAGATGGATGACACAGTCAACTTTGACCTTCAGATCCAAAGCTCG  
AACCAATACGACAATACCAGCCCTAAAAGATCGCTGCAGATAGCGCTGGCCGTGATGGCAGCAGTT  
GAAATTAGAGGCATTTCTATGCCAACCGAGGTTTTTCTGCCAATTTCCCAACTGGGAACCCAAAGAA  
AACCCAAAGCACAGAAGATGAAGTTGGCCCACTCATCCAACATATCTTTGAGCTTCGAAACAATGGA  
CCCAGCACGTTTCAGCAAAGCAATCCTCAATGTCCAGTGGCCTTACAGATA

**SYK**

CATCAGGTTTTCCATGGGCATGAAGTACTTGGAAAGAAAAAATTTTGTTTACAGGGATTTGGCAGCA  
AGAAATGTTCTATTGGTGACTCAACATTATGCCAAAATTAGTGATTTTTGGGCTTTCTAAAGCAATT  
GGTCTGATGAAAATTACTATAAAGCAAAAAGTTGTGGAAAATGGCCGGTCAAGTGGTATGCGCCT  
GAATGTATTAATACTATAAATTTTCAAGCAAAAGTGATGTATGGAGCTTTGGAGTTTAAATGTGG  
GA

**ZAP 70**

TGGAACAGGCAATCATCAGCCAGGCTCCACAGGTGGAGAACTCATTGCTACAACCTGCTCATGAAA  
AAATGGCATGGTACCATGGGAACATAAGCAGAGAAGAAGCTGAGCGAAAATTATACTCTGGAGCAC  
AGCCAGATGAAAAATTTCTGATAAGGGAGAGAAAAGAACCTGGTACCTTTGCTCTGTCAATAGTTT  
ATGAAAGACCATATATCATTATAAAATTGATCTTGACAAGTCTGGGAAGTATTCAATACCTGAAG  
GCACAAAGTTTGACACCCTATGGCAACTTGT

**TEC**

GGATGTGTCTGGATGTGTGTGAGGCCATGAACTACCTGGAGCAAAACAGTTTCATACATCGTGACC  
TGGCTGCCAGAACTGTTTAGTCAATGCCCTTGGGGTAGTAAAGGTGTCTGATTTTGGAAATGACAA  
GGTATGTCCTTGACGATCAGTACACAAGTTCTTGTGGAGCCAAGTTTCCAGTAAAATGGTCACCCC  
CCGAAGTGTTCAACTACAGTAGATTCAGCAGCAAATCTGATGTCTGGTCTTTTGGTGTATTAATGT  
GGGAGGTGTTCACTGAAGG

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarabi M, Qin Z, Xu W, Mewburn J, Oko R. (2010) Sperm-borne protein, PAWP, initiates zygotic development in *Xenopus laevis* by eliciting intracellular calcium release. *Mol Reprod Dev.* 77, 249-56

Abassi YA, Carroll DJ, Giusti AF, Belton RJ Jr, Foltz KR. (2000) Evidence that Src-type tyrosine kinase activity is necessary for initiation of calcium release at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol.* 218, 206-19

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2011) *Cellular and Molecular Immunology* (7th edition), Saunders

Abdalla H, Shimoda M, Hirabayashi M, Hochi S. (2009) A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytesharvested from stored ovaries and microinjected with spermatozoa. *Theriogenology* 72, 453-60

Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML, Koretzky GA. (2006) Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 26, 6936-49

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5

Al-Anzi B, Chandler DE. (1998) A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Dev Biol.* 198, 366-75

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2006) *Introducción a la Biología Celular*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York

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

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81, 1095-1104

Altruda F, Cervella P, Tarone G, Botta C, Balzac F, Stefanuto G, Silengo L. (1990) A human integrin beta 1 subunit with a unique cytoplasmic domain generated by alternative mRNA processing. *Gene* 95, 261-6

Anderson E. (1967) The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. *J Cell Biol.* 35, 193-212

Angelier N, Moreau N, Rodriguez-Martin ML, Penrad-Mobayed M, Prudhomme C. (1996) Does the chaperone heat shock protein hsp70 play a role in the control of developmental processes? *Int J Dev Biol.* 40, 521-9

Argaves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1987) Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* 105, 1183-90

Arias-Salgado EG, Lizano S, Shattil SJ, Ginsberg MH. (2005) Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 280, 29699-707

Arranz SE, Albertali IE, Cabada MO. (1997) *Bufo arenarum* egg jelly coat: purification and characterization of two highly glycosylated proteins. *Biochem J.* 323, 307-12

Arranz SE, Cabada MO. (2000) Diffusible highly glycosylated protein from *Bufo arenarum* egg-jelly coat: biological activity. *Mol Reprod Dev.* 56, 392-400

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci.* 117, 3645-57

Augoff K, Das M, Bialkowska K, McCue B, Plow EF, Sossey-Alaoui K. (2011) miR-31 is a broad regulator of  $\beta$ 1-integrin expression and function in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 9, 1500-8

Baessler KA, Lee Y, Sampson NS. (2009) Beta1 integrin is an adhesion protein for sperm binding to eggs. *ACS Chem Biol.* 4, 357-66

Bain JM, Hall JM. (1969) Observations on the development and structure of the vitelline membrane of the hen's egg: an electron microscope study. *Aust J Biol Sci.* 22, 653-65

Barbieri FD, Villecco EI (1966). A fertilizing like substance in the jelly coat of the toad *Bufo arenarum*. *Arch. Zool. Ital.* 51, 227

Barbieri FD, Cabada M. (1969) The role of the diffusible factor released by the egg jelly in fertilization of the toad egg. *Experientia* 25, 1312-3

Barbieri FD, Raisman JS. (1969) Non-gametic factors involved in the fertilization of *Bufo arenarum* oocytes. *Embryologia* 10, 363-72

Barbieri FD, Oterino JM (1972). A study of the diffusible factor released by the jelly of the egg of the toad, *Bufo arenarum*. *Dev. Growth Differ.* 14, 107-117

Barbieri FD, del Pino EJ (1975). Jelly coats and difusible factor in anuran fertilization. *Arch. Biol. (Liege)* 86, 311-21

- Barbieri FD. (1976) Diffusible factors in anuran fertilization. *Acta Physiol Lat Am.* 26, 1-9
- Barboni B, Lucidi P, Mattioli M, Berardinelli P. (2001) VLA-6 integrin distribution and calcium signalling in capacitated boar sperm. *Mol Reprod Dev.* 59, 322-9
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269-80
- Barisone GA, Hedrick JL, Cabada, MO. (2002) Vitelline envelope of *Bufo arenarum*: biochemical and biological characterization. *Biol Reprod* 66, 1203-9
- 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.* 7, 102
- Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ, Wohlrab F. (2000) The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 275, 28866-72
- Becker J, Craig EA. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 219, 11-23
- Beckmann S, Buro C, Dissous C, Hirzmann J, Grevelding CG. (2010) The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog.* 6, e1000769
- Belkin, A. M., N. I. Zhidkova, F. Balzac, F. Altruda, D. Tomatis, A. Maier, G. Tarone, V. E. Koteliansky & K. Burrige (1996)  $\beta$ 1D Integrin Displaces the  $\beta$ 1A Isoform in Striated Muscles: Localization At Junctional Structures and Signaling Potential in Nonmuscle Cells. *J. Cell Biol.* 132, 211-26
- Belton RJ Jr, Adams NL, Foltz KR. (2001) Isolation and characterization of sea urchin egg lipid rafts and their possible function during fertilization. *Mol Reprod Dev.* 59, 294-305
- Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F. (1983) Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* 305, 331-3
- Berton G, Mócsai A, Lowell CA. (2005) Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol.* 26, 208-14
- Bienz M, Gurdon JB. (1982) The heat-shock response in *Xenopus* oocytes is controlled at the translational level. *Cell* 29, 811-9
- Bienz M. (1984) *Xenopus* hsp 70 genes are constitutively expressed in injected oocytes. *Embo J* 3, 2477-83

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

Billoud B, Rodriguez-Martin ML, Berard L, Moreau N, Angelier N. (1993) Constitutive expression of a somatic heat-inducible hsp70 gene during amphibian oogenesis. *Development* 119, 921-32

Blaschuk OW, Rowlands TM. (2002) Plasma membrane components of adherens junctions. *Mol Membr Biol.* 19, 75-80

Bleil JD, Wassarman PM. (1980) Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873-82

Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM. (1990) Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol.* 111, 69-78

Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. (2001) Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod.* 7, 113-8

Boissonnas CC, Montjean D, Lesaffre C, Auer J, Vaiman D, Wolf JP, Ziyyat A. (2010) Role of sperm alpha(v)beta3 integrin in mouse fertilization. *Dev Dyn.* 239, 773-83

Bonnell BS, Reinhart D, Chandler DE. (1996) *Xenopus laevis* egg jelly coats consist of small diffusible proteins bound to a complex system of structurally stable networks composed of high-molecular-weight glycoconjugates. *Dev Biol.* 174, 32-42

Bradshaw JM. (2010) The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches. *Cellular Signalling* 22, 1175-84

Brewis IA, Clayton R, Browes CE, Martin M, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. (1998) Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol Hum Reprod.* 4, 1136-44

Bridges LC, Bowditch RD. (2005) ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr Pharm Des.* 11, 837-47

Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M. (2003) Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem.* 278, 21601-6

Bronson RA, Fusi F. (1990) Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biol Reprod* 43, 1019-25

Browder LW, Pollock M, Heikkila JJ, Wilkes J, Wang T, Krone P, Ovsenek N, Kloc M. (1987) Decay of the oocyte-type heat shock response of *Xenopus laevis*. Dev Biol 124, 191-9

Brown E, Hooper L, Ho T, Gresham H. (1990) Integrin-associated Protein: A 50-kD Plasma Membrane Antigen Physically and Functionally Associated with Integrins. J Cell Biol. 111, 2785-94

Bukau B, Horwich AL. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-66

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

Cabada MO. (1975) Some female coordinating factors in amphibian fertilization. Dev. Growth Differ. 17, 187-95

Cabada MO, Mariano MI, Gómez MI. (1987) Cortical granules products and fertility prevention in *Bufo arenarum* oocytes. J. Exp. Zool. 241, 359-67

Cabada MO, Sanchez Riera AN, Genta HD, Sanchez SS & Barisone GA (1996) Vitelline envelope formation during oogenesis in *Bufo arenarum*. Biocell 20, 77-86

Cajal JL. (1972) Morfología e histoquímica de las cubiertas gelatinosas de los ovocitos de *Bufo arenarum* (Tesis). Instituto de Biología, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, García-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, McClade CJ, Liddington RC, Ginsberg MH. (2003) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 100, 2272-7

Calvert ME, Digilio LC, Herr JC, Coonrod SA. (2003) Oolemmal proteomics--identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. Reprod Biol Endocrinol 1, 27

Calvete JJ, Henschen A, González-Rodríguez J. (1991) Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. Biochem J. 274, 63-71

Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RD, Kisiel DG, Marcinkiewicz C. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. Biochem J. 372, 725-34

Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, Sanz L. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. Toxicon. 45, 1063-74

Campanella C, Carotenuto R, Infante V, Maturi G, Atripaldi U. (1997) Sperm-egg interaction in the painted frog (*Discoglossus pictus*): an ultrastructural study. *Mol Reprod Dev.* 47, 323-33

Campbell KD, Reed WA & White KL (2000) Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 62, 1702-9

Campbell S, Otis M, Côté M, Gallo-Payet N, Payet MD. (2003) Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology* 144, 1486-95

Cánovas S, Coy P. (2008) Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion. *Rev Invest Clin.* 60, 403-13

Cao X, Pfaff SL, Gage FH. (2007) A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.* 21, 531-6

Carroll DJ, Jaffe LA. (1995) Proteases stimulate fertilization-like responses in starfish eggs. *Dev Biol.* 170, 690-700

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-62

Chan AC, van Oers NS, Tran A, Turka L, Law CL, Ryan JC, Clark EA, Weiss A. (1994) Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol.* 152, 4758-66

Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. (1997) ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol.* 138, 1149-57

Chang DD, Hoang BQ, Liu J, Springer TA. (2002) Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 277, 8140-5

Chekulaeva M, Filipowicz W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 21, 452-60

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

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

Chung JT, Keefer CL, Downey BR. (2000) Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology* 53, 1273-84

Clark EA, Brugge JS. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-9

Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci.* 118, 3631-8

Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicu PS. (2000) Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev* 56, 180-8

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.* 65, 1000-5

Coonrod SA, Naaby-Hansen S, Shetty J, Shibahara H, Chen M, White JM, Herr JC. (1999) Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. *Dev Biol* 207, 334-49

Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, Blancato JK, Vezza PR, McLeskey SW, Mangeat PH, Mueller SC. (2000) The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742-7

Coux G, Cabada MO. (2006) Characterization of *Bufo arenarum* oocyte plasma membrane proteins that interact with sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 326-33

Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. (2002) Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 33-58

Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. (2002) Sperm phospholipase C $\zeta$  from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 124, 611-23

Craig EA, Ingolia TD, Manseau LJ. (1983) Expression of *Drosophila* heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Dev Biol.* 99, 418-26

Cross NL, Elinson RP. (1980) A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. *Dev Biol* 75, 187-98

Crow JF. (1994) Advantages of sexual reproduction. *Dev Genet.* 15, 205-13

Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza AD, Cameo MS, Blaquier JA. (1984) Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil* 72, 467-71

Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581, 3702-10

Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH. (2006) Heat shock proteins form part of danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clin Exp Immunol.* 145, 183-9

Demand J, Lüders J, Höhfeld J. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol.* 18, 2023-8

de Melker AA, Sonnenberg A. (1999) Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 21, 499-509

DeSimone DW, Hynes RO. (1988) *Xenopus laevis* integrins. Structural conservation and evolutionary divergence of integrin beta subunits. *J Biol Chem.* 263, 5333-40

Diaz Fontdevila MF, Bloj B, Cabada MO. (1988) Effect of cholesterol and phosphatidylcholine of different chain length on acrosome breakdown and fertilizing capacity of amphibian spermatozoa. *Gamete Res* 21, 59-70

Diaz Fontdevila MF, Bloj B, Cabada MO. (1991) Effect of egg water from *Bufo arenarum* on the fertilizing capacity of homologous spermatozoa. *J Exp Zool* 257, 408-14

D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC, Plow EF. (1988) Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* 242, 91-3

Ducibella T. (1996) The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update.* 2, 29-42

Ducibella T, Fissore R. (2008) The roles of Ca<sup>2+</sup>, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev Biol.* 315, 257-79

Duellman W.E., Trueb L. (1986) *Biology of Amphibians*. New York: Mc Graw-Hill

Dumont JN. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* 136, 153-79

Eddy EM, O'Brien DA. (1994) The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, 29-78. Knobil E, Neill JD editors. New York, USA: Raven Press.

Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29, 258-89

Elinson RP. (1971) Fertilization of partially jellied and jellyless oocytes of the frog *Rana pipiens*. J Exp Zool. 176, 415-28

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

Ellerman DA, Ha C, Primakoff P, Myles DG, Dveksler GS. (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. Mol Biol Cell. 14, 5098-103

Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicú PS. (2006a) Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. Dev Biol. 297, 228-37

Ellerman DA, Myles DG, Primakoff P. (2006b) A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. Dev Cell. 10, 831-7

Elliott RM, Lloyd RE, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou AS, Satake N, Watson PF, Holt WV. (2009) Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. Reproduction 137, 191-203

Ellis RJ, van der Vies SM. (1991) Molecular chaperones. Annu Rev Biochem. 60, 321-47

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 133, 909-17

Erkkila K, Kyttanen S, Wikstrom M, Taari K, Hikim AP, Swerdloff RS, Dunkel L. (2006) Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production. Am J Physiol Endocrinol Metab. 290, E1145-54

Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. (1995) Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta. J Cell Sci. 108, 3267-78

Evans JP, Kopf GS, Schultz RM. (1997) Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. Dev Biol. 187, 79-93

Evans JP. (2001) Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. Bioessays 23, 628-39

Fan HY, Sun QY. (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. Biol Reprod. 70, 535-47

Fang G, Yu H, Kirschner MW. (1999) Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354, 1583-90

Feugang JM, Kaya A, Page GP, Chen L, Mehta T, Hirani K, Nazareth L, Topper E, Gibbs R, Memili E. (2009) Two-stage genome-wide association study identifies integrin beta 5 as having potential role in bull fertility. *BMC Genomics* 10, 176

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9, 102-14

Fissore RA, Robl JM. (1994) Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev Biol.* 166, 634-42

Fissore RA, Gordo AC, Wu H. (1998) Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 49, 43-52

Foltz KR, Partin JS, Lennarz WJ. (1993) Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. *Science* 259, 1421-5

Foltz KR, Shilling FM. (1993) Receptor-mediated signal transduction and egg activation. *Zygote* 1, 276-9

Fonovich de Schroeder TM, Gauna L, Pechén de D'Angelo AM. (1993) Is buffering capacity the principle role of the jelly coat in *Bufo arenarum* fertilization? *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 105, 533-7

Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI. (1995) Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 14, 2281-92

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs *Genome Res.* 19, 92-105

Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mocsai A, Poeschl J, Walzog B, Sperandio M. (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation *in vivo*. *BMC Immunol.* 8, 31

Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. (2010) Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci.* 123, 1531-6

Furnus CC, Valcarcel A, Dulout FN, Errecalde AL. (2003) The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 60, 1633-44

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.* 2, 169-75

Gawantka V, Ellinger-Ziegelbauer H, Hausen P. (1992) Beta 1-integrin is a maternal protein that is inserted into all newly formed plasma membranes during early *Xenopus* embryogenesis. *Development* 115, 595-605

Geahlen R. (2009) Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1115-27

Gething MJ, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45

Gibbons IR. (1981) Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol.* 91, 107s-124s

Gichuhi PM, Ford WC, Hall L. (1997) Evidence that peptides derived from the disintegrin domain of primate fertilin and containing the ECD motif block the binding of human spermatozoa to the zona-free hamster oocyte. *Int J Androl.* 20, 165-70

Gilbert SF. (2000) *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts

Giudice G, Sconzo G, Roccheri MC. (1999). Studies on heat shock proteins in sea urchin development. *Dev. Growth Differ.* 41, 375-80

Giusti AF, Carroll DJ, Abassi YA, Terasaki M, Foltz KR, Jaffe LA. (1999) Requirement of a Src family kinase for initiating calcium release at fertilization in starfish eggs. *J Biol Chem.* 274, 29318-22

Giusti AF, Foltz KR, Jaffe LA. (2000) The role of Src family kinases in starfish egg fertilisation. *Zygote* 8, S16-7

Giusti AF, O'Neill FJ, Yamasu K, Foltz KR, Jaffe LA. (2003) Function of a sea urchin egg Src family kinase in initiating Ca<sup>2+</sup> release at fertilization. *Dev Biol.* 256, 367-78

Glazar AI, Evans JP. (2009) Immunoglobulin superfamily member IgSF8 (EWI-2) and CD9 in fertilisation: evidence of distinct functions for CD9 and a CD9-associated protein in mammalian sperm-egg interaction. *Reprod Fertil Dev.* 21, 293-303

Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. (2007) Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 67, 468-74

Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. (1996) Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 1103-7

Guckian JC, Christensen WD, Fine DP. (1978) Trypan blue inhibits complement-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 120, 1580-6

Han C, Choi E, Park I, Lee B, Jin S, Kim do H, Nishimura H, Cho C. (2009) Comprehensive analysis of reproductive ADAMs: relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM complex required for fertilization in mice. *Biol Reprod.* 80, 1001-8

Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-6

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.* 66, 735-44

Harayama H, Muroga M, Miyake M. (2004) A Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Induced Tyrosine Phosphorylation of Syk Protein Tyrosine Kinase in the Flagella of Boar Spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 69, 436-47

Hartl FU. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-9

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

He ZY, Gupta S, Myles D, Primakoff P. (2009) Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. *Mol Reprod Dev.* 76, 629-36

Hecht NB. (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 20, 555-61

Hedrick JL, Hardy DM. (1991) Isolation of extracellular matrix structures from *Xenopus laevis* oocytes, eggs, and embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 231-47

Hedrick JL, Nishihara T. (1991) Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J Electron Microscop Tech* 17, 319-35

Heikkila JJ, Ovsenek N, Krone P. (1987) Examination of heat shock protein mRNA accumulation in early *Xenopus laevis* embryos. *Biochem Cell Biol* 65, 87-94

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

Hendrick JP, Hartl FU. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62, 349-84

Herberts C, Moreau N, Angelier N. (1993) Immunolocalization of HSP 70-related proteins constitutively expressed during *Xenopus laevis* oogenesis and development. *Int J Dev Biol* 37, 397-406

Herrero MB, Mandal A, Digilio LC, Coonrod SA, Maier B, Herr JC. (2005) Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Dev Biol* 284, 126-42

Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Culleré M, Ross FP, Coller BS, Teitelbaum S, Hynes RO. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. (1999) *J Clin Invest*. 103, 229-38

Hoeller C, Thallinger C, Pratscher B, Bister MD, Schicher N, Loewe R, Heere-Ress E, Roka F, Sexl V, Pehamberger H. (2005) The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 124, 1293-9

Homa ST, Swann K. (1994) A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod*. 9, 2356-61

Horiuchi T. (2006) Application study of intracytoplasmic sperm injection for golden hamster and cattle production. *J Reprod Dev*. 52, 13-21

Horner VL, Wolfner MF. (2008) Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation. *Dev Dyn*. 237, 527-44

Horrell A, Shuttleworth J, Colman A. (1987) Transcript levels and translational control of hsp70 synthesis in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 1, 433-44

Houssay BA, Giusti LA, Lascano Gonzales JN. (1929) Implantation d'hypophyse et stimulation des glandes et des fonctions sexuelles du crapaud. *Comp. Rend. Soc. Biol*. 102, 864-6

Huang X, Griffiths M, Wu J, Farese RV Jr, Sheppard D. (2000) Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 20, 755-9

Hunt S, Jones AV, Hinsley EE, Whawell SA, Lambert DW. (2011) MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett*. 585, 187-92

Hunter, T. (1998) The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 353, 583-605

Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. (2000) Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*. 63, 925-32

- Hynes RO. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-54
- Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25
- Hynes RO. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87
- Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson JI. (2004) Demonstration of *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Hum Reprod.* 19, 1121-6
- Idahl A, Abramsson L, Kumlin U, Liljeqvist JA, Olofsson JI. (2007) Male serum *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int J Androl.* 30, 99-107
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. (2010) Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest.* 120, 984-94
- Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T, Sagata N. (2007) A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446, 1100-4
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-8
- Itoh T, Kanmura Y, Kuriyama H. (1985) A23187 increases calcium permeability of store sites more than of surface membranes in the rabbit mesenteric artery. *J Physiol.* 359, 467-84
- Iwao Y, Miki A, Kobayashi M, Onitake K. (1994). Activation of *Xenopus* eggs by an extract of *Cynops* sperm. *Dev. Growth Differ.* 36, 469-79
- Iwao Y, Fujimura T. (1996) Activation of *Xenopus* eggs by RGD-containing peptides accompanied by intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Dev Biol* 177, 558-67
- Iwao Y. (2012) Egg activation in physiological polyspermy. *Reproduction* 144, 11-22
- Jäättelä M. (1999) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 31, 261-71
- Jaffe LA. (1990) First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil Suppl.* 42, 107-16
- Jaffe LF. (1991) The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9883-7
- Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. (2011) CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci* 108, 10946-51

Ji YZ, Wolf JP, Jouannet P, Bomsel M. (1998) Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. Hum Reprod. 13, 682-9

Jin J, Pawson T. (2012) Modular evolution of phosphorylation-based signaling systems Phil. Trans. R. Soc. B 367, 2540-55

Jones KT, Soeller C, Cannell MB. (1998) The passage of Ca<sup>2+</sup> and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. Development 125, 4627-35

Jones KT. (2007) Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. Clin Exp Pharmacol Physiol. 34, 1084-9

Joos TO, Whittaker CA, Meng F, DeSimone DW, Gnau V, Hausen P. (1995) Integrin alpha 5 during early development of *Xenopus laevis*. Mech Dev. 50, 187-99

Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM. (2004) A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. Proc Natl Acad Sci USA 101, 5922-7

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 24, 279-82

Kaji K, Kudo A. (2004) The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. Reproduction 127, 423-9

Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, Hansen PJ, King WA. (2004) Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. Andrologia 36, 327-34

Kamei N, Glabe CG. (2003) The species-specific egg receptor for sea urchin sperm adhesion is EBR1, a novel ADAMTS protein. Genes Dev 17, 2502-7

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 14, 105-11

Kashir J, Jones C, Coward K. (2012) Calcium oscillations, oocyte activation, and phospholipase C zeta. Adv Exp Med Biol. 740, 1095-121

Katagiri C. (1973) Chemical analysis of toad egg-jelly in relation to its 'spermcapacitating' activity. Dev. Growth Differ. 15, 81-92

Katagiri C. (1987) Role of oviductal secretions in mediating gamete fusion in anuran amphibians. Zoolog. Sci. 4, 1-14

Kawarsky SJ, King WA. (2001) Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. Zygote 9, 39-50

- Kazama M, Asami K, Hino A. (2006) Fertilization induced changes in sea urchin sperm: mitochondrial deformation and phosphatidylserine exposure. *Mol Reprod Dev.* 73, 1303-11
- Keely PJ, Parise LV. (1996) The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem.* 271, 26668-76
- Kiang JG, Tsokos GC. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 80, 183-201
- Kiefer SM, Saling P. (2002) Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol Reprod.* 66, 407-14
- Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park KE, 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.* 281, 5634-9
- Kim JH, Macháty Z, Cabot RA, Han YM, Do HJ, Prather RS. (1998) Development of pig oocytes activated by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Biol Reprod.* 59, 655-60
- Kimura Y, Yanagimachi R. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 52, 709-20
- Kinsey WH. (1995) Differential phosphorylation of a 57-KDa protein tyrosine kinase during egg activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 208, 204-9
- Kinsey WH. (1996) Biphasic activation of Fyn kinase upon fertilization of the sea urchin egg. *Dev Biol.* 174, 281-7
- Kinsey WH. (1997) Tyrosine kinase signaling at fertilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 240, 19-22
- Kinsey WH, Shen SS. (2000) Role of the Fyn kinase in calcium release during fertilization of the sea urchin egg. *Dev Biol.* 225, 253-64
- Kleinhans FW, Travis VS, Du J, Villines PM, Colvin KE, Critser JK. (1992) Measurement of human sperm intracellular water volume by electron spin resonance. *J Androl.* 13, 498-506
- Kline D, Nuccitelli R. (1985) The wave of activation current in the *Xenopus* egg. *Dev Biol* 111, 471-87
- Kline D, Kopf GS, Muncy LF, Jaffe LA. (1991) Evidence for the involvement of a pertussis toxin-insensitive G-protein in egg activation of the frog, *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 143, 218-29

Knobloch J, Winnen R, Quack M, Kunz W, Grevelding CG. (2002) A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294, 87-97

Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. (1992) Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 267, 23439-42

Krapf D, Vidal M, Arranz SE, Cabada MO. (2006) Characterization and biological properties of L-HGP, a glycoprotein from the amphibian oviduct with acrosome-stabilizing effects. *Biol Cell* 98, 403-13

Krapf D, Visconti PE, Arranz SE, Cabada MO. (2007) Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* induces capacitation-like changes in homologous spermatozoa. *Dev Biol.* 306, 516-24

Krapf D, O'Brien ED, Cabada MO, Visconti PE, Arranz SE. (2009) Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* modulates the ability of homologous sperm to undergo the acrosome reaction in the presence of the vitelline envelope. *Biol Reprod.* 80, 311-9

Kurokawa M, Sato K, Smyth J, Wu H, Fukami K, Takenawa T, Fissore RA. (2004) Evidence that activation of Src family kinase is not required for fertilization-associated  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse eggs. *Reproduction.* 127, 441-54

Kurtz S, Rossi J, Petko L, Lindquist S. (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231, 1154-7

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5

Lallier TE, Whittaker CA, DeSimone DW. (1996) Integrin alpha 6 expression is required for early nervous system development in *Xenopus laevis*. *Development* 122, 2539-54

Lancaster GI, Febbraio MA. (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem.* 280, 23349-55

Languino LR, Ruoslahti E. (1992) An alternative form of the integrin  $\beta 1$  subunit with a variant cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 267, 7116-20

Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper G, Menick DR, Zile MR, Kuppuswamy D. (2000) Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 275, 35624-30

Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. (1996) Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 16, 1305-15

Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. (1997) Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca<sup>2+</sup> increase at fertilization in the mouse. *Development* 124, 233-41

Lee CT, Risom T, Strauss WM. (2007) Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *Dev Cell Biol*. 26, 209-18

Legate KR, Fässler R. (2009) Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*. 122, 187-98

Leitinger, B., McDowall, A., Stanley, P., and Hogg, N. (2000) The regulation of integrin function by Ca<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta* 1498, 91-8

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

Lesnefsky EJ, Hoppel CL. (2006) Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev*. 5, 402-33

Levental I, Grzybek M, Simons K. (2010) Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* 49, 6305-16

Levi M, Maro B, Shalgi R. (2010) Fyn kinase is involved in cleavage furrow ingression during meiosis and mitosis. *Reproduction* 140, 827-34

Levi M, Shalgi R. (2010) The role of Fyn kinase in the release from metaphase in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 314, 228-33

Lewis CM, Broussard C, Czar MJ, Schwartzberg PL. (2001) Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. *Curr Opin Immunol*. 13, 317-25

Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 275, 25665-71

Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. (2010) Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183. *J Biol Chem*. 285, 5461-71

Li YH, Hou Y, Ma W, Yuan JX, Zhang D, Sun QY, Wang WH. (2004) Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm-egg interaction. *Reproduction* 127, 151-7

Lin TH, Rosales C, Mondal K, Bolen JB, Haskill S, Juliano RL. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 270, 16189-97

Lindquist S. (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191

- Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-77
- Linfor J & Berger T (2000) Potential role of alpha v and beta 1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 120, 65-72
- Liu Y, Taylor NE, Lu L, Usa K, Cowley AW Jr, Ferreri NR, Yeo NC, Liang M. (2010) Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* 55, 974-82
- Liu Z, Lin H, Ye S, Liu QY, Meng Z, Zhang CM, Xia Y, Margoliash E, Rao Z, Liu XJ. (2006) Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 8965-70
- Llanos RJ, Whitacre CM, Miceli DC. (2000) Potential involvement of C(3) complement factor in amphibian fertilization. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 127, 29-38
- Longo FJ. (1997) Fertilization. 2nd. ed. London: Chapman & Hall.
- Low MG, Finean JB. (1978) Specific release of plasma membrane enzymes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* 508, 565-70
- Luria A, Vegelyte-Avery V, Stith B, Tsvetkova NM, Wolkers WF, Crowe JH, Tablin F & Nuccitelli R (2002) Detergent-free domain isolated from *Xenopus* egg plasma membrane with properties similar to those of detergent-resistant membranes. *Biochemistry* 41, 13189-97
- Lv ZM, Wang M, Xu C. (2010) Antifertility characteristics of the N-terminal region of mouse equatorial segment protein. *Anat Rec (Hoboken)* 293, 171-81
- Machaca K. (2007) Ca<sup>2+</sup> signaling differentiation during oocyte maturation. *J Cell Physiol.* 213, 331-40
- Macháty Z, Mayes MA, Prather RS. (1995) Parthenogenetic activation of porcine oocytes with guanosine-5'-O-(3'-thiotriphosphate). *Biol Reprod.* 52, 753-8
- Mahbub Hasan AK, Sato K, Sakakibara K, Ou Z, Iwasaki T, Ueda Y, Fukami Y. (2005) Uroplakin III, a novel Src substrate in *Xenopus* egg rafts, is a target for sperm protease essential for fertilization. *Dev Biol.* 286, 483-92
- Malcuit C, Maserati M, Takahashi Y, Page R, Fissore RA. (2006) Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev.* 18, 39-51
- Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK. (2007) Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods* 43, 168-75

Mammadova G, Iwasaki T, Tokmakov AA, Fukami Y, Sato K. (2009) Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization. *BMC Dev Biol.* 9, 68

Mandal A, Klotz KL, Shetty J, Jayes FL, Wolkowicz MJ, Bolling LC, Coonrod SA, Black MB, Diekman AB, Haystead TA, Flickinger CJ, Herr JC. (2003) SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 68, 1525-37

Mandell RB, Feldherr CM. (1990) Identification of two HSP70-related *Xenopus* oocyte proteins that are capable of recycling across the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 111, 1775-83

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.* 14, 561-71

Marín-Briggiler CI, Lapyckyj L, González Echeverría MF, Rawe VY, Alvarez Sedó C, Vazquez-Levin MH. (2010a) Neural cadherin is expressed in human gametes and participates in sperm-oocyte interaction events. *Int J Androl.* 33, e228-39

Marín-Briggiler CI, González-Echeverría MF, Munuce MJ, Ghersevich S, Caille AM, Hellman U, Corrigall VM, Vazquez-Levin MH. (2010b) Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril.* 93, 1574-84

Marinos E. (1985) The number of mitochondria in *Xenopus laevis* ovulated oocytes. *Cell Differ.* 16, 139-43

Martinez ML, Cabada MO. (1996) Assessment of the acrosome reaction in *Bufo arenarum* spermatozoa by immunostaining: comparison with other methods. *Zygote* 4, 181-90

Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur PK, King WA. (2001) The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Mol Hum Reprod* 7, 829-37

Mayer U, Saher G, Fässler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, Miosge N, Pöschl E, von der Mark K. (1997) Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* 17, 318-23

Mengerink KJ, Vacquier VD. (2001) Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. *Glycobiology* 11, 37R-43R

McGinnis LK, Albertini DF, Kinsey WH. (2007) Localized activation of Src-family protein kinases in the mouse egg. *Dev Biol.* 306, 241-54

McGinnis LK, Kinsey WH, Albertini DF. (2009) Functions of Fyn kinase in the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol.* 327, 280-7

- McGinnis LK, Carroll DJ, Kinsey WH. (2011) Protein tyrosine kinase signaling during oocyte maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 78, 831-45
- McNamee HP, Ingber DE, Schwartz MA. (1993) Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J Cell Biol.* 121, 673-8
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. (2000) Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin  $\alpha 6 \beta 1$  and is CD9-dependent. *J Cell Biol* 149, 1289-96
- Miller LA, Hong JJ, Kinch MS, Harrison ML, Geahlen RL. (1999) The engagement of  $\beta 1$  integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and  $\beta 1$  integrin. *Eur J Immunol.* 29, 1426-34
- Minowada G, Welch WJ. (1995) Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest.* 95, 3-12
- 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* 287, 321-4
- Miyazaki S. (1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol.* 106, 345-53
- Miyazaki S. (2006) Thirty years of calcium signals at fertilization. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17, 233-43
- Mizote A, Okamoto S, Iwao Y. (1999) Activation of *Xenopus* eggs by proteases: possible involvement of a sperm protease in fertilization. *Dev Biol.* 208, 79-92
- Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16, 547-58
- Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol.* 7, 1326-33
- Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 10, 387-402
- Moon KD, Post CB, Durden DL, Zhou Q, De P, Harrison ML, Geahlen RL. (2005) Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 280, 1543-51

Moore GD, Ayabe T, Visconti PE, Schultz RM, Kopf GS. (1994) Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* 120, 3313-23

Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. (1995) Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod.* 53, 692-9

Moos J, Pěkníková J, Geussova G, Philimonenko V, Hozák P. (1998) Association of protein kinase A type I with detergent-resistant structures of mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev.* 50, 79-85

Morimoto RI. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259, 1409-10

Mouguelar V. (2007) Moléculas involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito en el anfibio *Bufo arenarum*. Tesina de la carrera Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Müller A, Gawantka V, Ding X, Hausen P. (1993) Maturation induced internalization of  $\beta$ 1-integrin by *Xenopus* oocytes and formation of the maternal integrin pool. *Mechanisms of Development* 42, 77-88

Mulrooney JP, Hong T, Grabel LB. (2001) Serine 785 phosphorylation of the beta1 cytoplasmic domain modulates beta1A-integrin-dependent functions. *J Cell Sci.* 114, 2525-33

Muschler JL, Horwitz AF. (1991) Down-regulation of the chicken alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor during development. *Development* 113, 327-37

Myles DG, Kimmel LH, Blobel CP, White JM, Primakoff P. (1994) Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 4195-8

Naaby-Hansen S, Herr JC. (2010) Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol.* 84, 32-40

Nagai K, Ishida T, Hashimoto T, Harada Y, Ueno S, Ueda Y, Kubo H, Iwao Y. (2009) The Sperm-surface glycoprotein, SGP, is necessary for fertilization in the frog, *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ.* 51, 499-510

Nakada K, Mizuno J. (1998) Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology* 50, 269-82

Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y, Miyazaki S. (1997) Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod.* 3, 1087-93

- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. (2001) Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol.* 233, 204-13
- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. (2004) Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem.* 279, 34957-62
- Nollen EA, Morimoto RI. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 115, 2809-16
- Norris JW, Tomczak NM, Oliver AE, Tsvetkova NM, Crowe JH, Tablin F, Nuccitelli R. (2003) Structural characterization of the ADAM 16 disintegrin loop active site. *Biochemistry* 42, 9813-21
- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157, 265-75
- O'Brien ED, Krapf D, Cabada MO, Visconti PE, Arranz SE. (2011) Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Dev Biol* 350, 80-88
- Oikawa T, Takada N, Kikuchi T, Numabe T, Takenaka M, Horiuchi T. (2005) Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci.* 86, 187-94
- Olson JH, Chandler DE. (1999) *Xenopus laevis* egg jelly contains small proteins that are essential to fertilization. *Dev Biol.* 210, 401-10
- Omata S, Katagiri C. (1996) Involvement of carbohydrate moieties of the toad egg vitelline coat in binding with fertilizing sperm. *Dev. Growth Differ.* 38, 663-72
- O'Neill FJ, Gillett J, Foltz KR. (2004) Distinct roles for multiple Src family kinases at fertilization. *J Cell Sci.* 117, 6227-38
- Onitake K, Takai H, Ukita M, Mizuno JI, Sasaki T, Watanabe A. (2000) Significance of egg-jelly substances in the internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 126, 121-8
- Ortega-Velázquez R, Díez-Marqués ML, Ruiz-Torres MP, González-Rubio M, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez Puyol D. (2003) Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide stimulates transforming growth factor beta1 transcription and secretion through integrin activation. *FASEB J.* 17, 1529-31
- Otey CA, Vasquez GB, Burrridge K, Erickson BW. (1993) Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 268, 21193-7

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-22

Palter KB, Watanabe M, Stinson L, Mahowald AP, Craig EA. (1986) Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. *Mol Cell Biol.* 6, 1187-203

Paniagua R, Fraile B, Sáez FJ. (1990) Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histol Histopathol.* 5, 365-78

Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 304, 505-12

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-8

Pate BJ, White KL, Winger QA, Rickords LF, Aston KI, Sessions 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.* 74, 600-7

Pate BJ, White KL, Chen D, Aston KI, Sessions BR, Bunch TD, Weimer BC. (2008) A novel approach to identify bovine sperm membrane proteins that interact with receptors on the vitelline membrane of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 75, 641-9

Peaucellier G, Veno PA, Kinsey WH. (1988) Protein tyrosine phosphorylation in response to fertilization. *J Biol Chem.* 263, 13806-11

Peters JM. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 9, 931-43

Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH. (1998) Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 273, 6104-9

Plows LD, Cook RT, Davies AJ, Walker AJ. (2006) Integrin engagement modulates the phosphorylation of focal adhesion kinase, phagocytosis, and cell spreading in molluscan defence cells. *Biochim Biophys Acta* 1763, 779-86

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol.* 104, 141-9

Primakoff P, Myles DG. (2002) Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296, 2183-5

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.* 316, 903-9

Ransom DG, Hens MD, DeSimone DW. (1993) Integrin expression in early amphibian embryos: cDNA cloning and characterization of *Xenopus* beta 1, beta 2, beta 3, and beta 6 subunits. *Dev Biol* 160, 265-275

Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, Hetherington L, Baker G, Liu DY, Aitken RJ. (2012) The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* 7, e50851

Redgrove KA, Anderson AL, McLaughlin EA, O'Bryan MK, Aitken RJ, Nixon B. (2013) Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition. *Mol Hum Reprod.* 19, 120-35

Reth M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-4

Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE. (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci.* 25, 9735-45

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

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

Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. (2004) Phospholipase Czeta causes Ca<sup>2+</sup> oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 128, 697-702

Rosario MO, Perkins SL, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM. (1992) Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Dev Biol.* 150, 1-11

Ross GD, Vetckicka V. (1993) CR3 (CD11b/CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 181-4

Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. (2006) Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol.* 290, 351-8

Rubinstein E. (2011) The complexity of tetraspanins. *Biochem Soc Trans.* 39, 501-5

Rufas O, Fisch B, Ziv S, Shalgi R. (2000) Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Mol Hum Reprod.* 6, 163-9

Runft LL, Jaffe LA. (2000) Sperm extract injection into ascidian eggs signals Ca<sup>2+</sup> release by the same pathway as fertilization. *Development* 127, 3227-36

- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. (2002) Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol.* 245, 237-54
- Runft LL, Carroll DJ, Gillett J, Giusti AF, O'Neill FJ, Foltz KR. (2004) Identification of a starfish egg PLC-gamma that regulates Ca<sup>2+</sup> release at fertilization. *Dev Biol.* 269, 220-36
- Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, Primakoff P, Myles DG. (2007) Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol* 304, 317-25
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-7
- Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA. (1994) Integrins. *Kidney Int Suppl* 44, S17-22
- Ruoslahti E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12, 697-715
- Rupik W, Jasik K, Bembenek J, Widłak W. (2011) The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 159, 349-66
- Sachdev M, Mandal A, Mulders S, Digilio LC, Panneerdoss S, Suryavathi V, Pires E, Klotz KL, Hermens L, Herrero MB, Flickinger CJ, van Duin M, Herr JC. (2012) Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization. *Dev Biol.* 363, 40-51
- Sakakibara K, Sato K, Yoshino K, Oshiro N, Hirahara S, Mahbub Hasan AK, Iwasaki T, Ueda Y, Iwao Y, Yonezawa K, Fukami Y. (2005) Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization. *J Biol Chem* 280, 15029-37
- Sakuma M, Onodera H, Suyemitsu T, Yamasu K. (1997) The protein tyrosine kinases of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Zoolog Sci.* 14, 941-6
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2<sup>o</sup> Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-7
- Santella L, Lim D, Moccia F. (2004) Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem Sci.* 29, 400-8

- Sato K, Aoto M, Mori K, Akasofu S, Tokmakov AA, Sahara S, Fukami Y. (1996) Purification and characterization of a Src-related p57 protein-tyrosine kinase from *Xenopus* oocytes. Isolation of an inactive form of the enzyme and its activation and translocation upon fertilization. *J Biol Chem.* 271, 13250-7
- Sato K, Iwasaki T, Tamaki I, Aoto M, Tokmakov AA, Fukami Y. (1998) Involvement of protein-tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in sperm-induced *Xenopus* egg activation. *FEBS Lett* 424, 113-8
- Sato K, Iwao Y, Fujimura T, Tamaki I, Ogawa K, Iwasaki T, Tokmakov AA, Hatano O, Fukami Y (1999) Evidence for the involvement of a Src related tyrosine kinase in *Xenopus* egg activation. *Developmental Biology* 209, 308-20
- Sato K, Tokmakov AA, Iwasaki T, Fukami Y. (2000) Tyrosine kinase-dependent activation of phospholipase Cgamma is required for calcium transient in *Xenopus* egg fertilization. *Dev Biol.* 224, 453-69
- Sato K, Iwasaki T, Ogawa K, Konishi M, Tokmakov AA, Fukami Y. (2002) Low density detergent-insoluble membrane of *Xenopus* eggs: subcellular microdomain for tyrosine kinase signaling in fertilization. *Development* 129, 885-96
- Sato K, Iwasaki T, Hirahara S, Nishihira Y, Fukami Y. (2004) Molecular dissection of egg fertilization signaling with the aid of tyrosine kinase-specific inhibitor and activator strategies. *Biochim Biophys Acta* 1697, 103-21
- Sato K, Fukami Y, Stith BJ. (2006) Signal transduction pathways leading to Ca<sup>2+</sup> release in a vertebrate model system: lessons from *Xenopus* eggs. *Semin Cell Dev Biol.* 17, 285-92
- Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. (2012) Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci.* 125, 4985-90
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>(2+)</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-44
- Schackmann RW, Christen R, Shapiro BM. (1984) Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. Changes upon activation and induction of the acrosome reaction. *J Biol Chem.* 259, 13914-22
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol.* 130, 1181-7
- Schuetz AW. (1975) Cytoplasmic activation of starfish oocytes by sperm and divalent ionophore A-23187. *J Cell Biol* 66, 86-94

Schultz RM, Kopf GS. (1995) Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol.* 30, 21-62

Schwartz MA, Ingber DE, Lawrence M, Springer TA, Lechene C. (1991) Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res.* 195, 533-5

Schwartz MA, Denninghoff K. (1994) Alpha v integrins mediate the rise in intracellular calcium in endothelial cells on fibronectin even though they play a minor role in adhesion. *J Biol Chem.* 269, 11133-7

Sedmak, J. J., and Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79, 544-52

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.* 19, 639-44

Sessions BR, Aston KI, Davis AP, Pate BJ, White KL. (2006) Effects of amino acid substitutions in and around the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) sequence on fertilization and parthenogenetic development in mature bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73, 651-7

Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R, Rossi P. (1997) Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 124, 2267-74

Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W. (1999) Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod.* 61, 1445-51

Sharma D, Kinsey WH. (2006) Fertilization triggers localized activation of Src-family protein kinases in the zebrafish egg. *Dev Biol.* 295, 604-14

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-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction. *J Biol Chem.* 278, 30506-15

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68, 850-8

Shilling FM, Carroll DJ, Muslin AJ, Escobedo JA, Williams LT, Jaffe LA. (1994) Evidence for both tyrosine kinase and G-protein-coupled pathways leading to starfish egg activation. *Dev Biol.* 162, 590-9

Shilling FM, Krätzschar J, Cai H, Weskamp G, Gayko U, Leibow J, Myles DG, Nuccitelli R, Blobel CP. (1997) Identification of metalloprotease/disintegrins in *Xenopus laevis* testis with a potential role in fertilization. *Dev Biol.* 186, 155-64

Shilling FM, Magie CR, Nuccitelli R. (1998) Voltage-dependent activation of frog eggs by a sperm surface disintegrin peptide. *Dev Biol.* 202, 113-24

Shivers CA, James JM. (1970) Capacitation of frog sperm. *Nature* 227, 183-4

Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW. (1995) Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev.* 40, 16-28

Simon M, Vanes L, Geahlen RL, Tybulewicz VL. (2005) Distinct roles for the linker region tyrosines of Syk in FcεRI signaling in primary mast cells. *J Biol Chem* 280, 4510-7

Simoncelli F, Morosi L, Di Rosa I, Pascolini R, Fagotti A. (2010) Molecular characterization and expression of a heat-shock cognate 70 (Hsc70) and a heat-shock protein 70 (Hsp70) cDNAs in *Rana (Pelophylax) lessonae* embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156, 552-60

Smith CI, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M. (2001) The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays* 23, 436-46

Son WY, Hwang SH, Han CT, Lee JH, Kim S, Kim YC. (1999) Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod.* 5, 1122-6

Söti C, Csermely P. (2007) Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J Biosci.* 32, 511-5

Speich HE, Grgurevich S, Kueter TJ, Earhart AD, Slack SM, Jennings LK. (2008) Platelets undergo phosphorylation of Syk at Y525/526 and Y352 in response to pathophysiological shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295, C1045-54

Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G. (2005) Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev.* 72, 534-41

Stark RJ, O'Doherty J (1982) Effect of ionophore A23187 on cytosolic Ca<sup>2+</sup> and enzyme secretion. *Am J Physiol.* 243, C196-9

Stefani G, Slack FJ. (2008) Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 219-30

Stricker S. (1999) Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. *Dev Biology* 211, 157-76

Stricker SA, Smythe TL. (2006) Differing mechanisms of cAMP- versus seawater-induced oocyte maturation in marine nemertean worms II. The roles of tyrosine kinases and phosphatases. *Mol Reprod Dev.* 73, 1564-77

Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Müller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. (2000) Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 54, 935-48

Suzuki-Inoue K, Wilde JL, Andrews RK, Auger JM, Siraganian RP, Sekiya F, Rhee SG, Watson SP. (2004) Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cgamma2 at distinct sites. *Biochem J* 378, 1023-1029

Svineng G, Fässler R, Johansson S. (1998) Identification of  $\beta$ 1C-2, a novel variant of the integrin  $\beta$ 1 subunit generated by utilization of an alternative splice acceptor site in exon C. *Biochem J* 330, 1255-63

Swann K. (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110, 1295-302

Swann K. (1993) The soluble sperm oscillogen hypothesis. *Zygote* 1, 273-6

Takada Y, Ylänne J, Mandelman D, Puzon W, Ginsberg MH. (1992) A point mutation of integrin beta 1 subunit blocks binding of alpha 5 beta 1 to fibronectin and invasin but not recruitment to adhesion plaques. *J Cell Biol.* 119, 913-21

Takahashi Y, Yamakawa N, Matsumoto K, Toyoda Y, Furukawa K, Sato E. (2000) Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. *Mol Reprod Dev* 56, 412-23

Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. (2001) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell* 12, 809-20

Takesono A, Finkelstein LD, Schwartzberg PL. (2002) Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases. *J Cell Sci.* 115, 3039-48

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.* 68, 1-9

Tamma G, Lasorsa D, Ranieri M, Mastrofrancesco L, Valenti G, Svelto M. (2011) Integrin signaling modulates AQP2 trafficking via Arg-Gly-Asp (RGD) motif. *Cell Physiol Biochem.* 27, 739-48

Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S, Yamamura H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 266, 15790-6

Tatone C, Carbone MC. (2006) Possible involvement of integrin-mediated signalling in oocyte activation: evidence that a cyclic RGD-containing peptide can stimulate protein kinase C and cortical granule exocytosis in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 4, 48

Tesarik J. (1989) Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum Reprod.* 4, 957-61

Tesarik J, Sousa M. (1994) Comparison of Ca<sup>2+</sup> responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 62, 1197-204

Tesarik J, Sousa M, Testart J. (1994) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 9, 511-8

Thys M, Nauwynck H, Maes D, Hoogewijs M, Vercauteren D, Rijsselaere T, Favoreel H, Van Soom A. (2009) Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization *in vitro*. *Reproduction.* 138, 471-82

Tian J, Gong H, Thomsen GH, Lennarz WJ. (1997) Gamete interactions in *Xenopus laevis*: identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *J Cell Biol.* 136, 1099-108

Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 84, 389-98

Tohyama Y, Yamamura H. (2009) Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells. *J Biochem.* 145, 267-7

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* 59, 22-9

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4

Townley IK, Schuyler E, Parker-Gür M, Foltz KR. (2009) Expression of multiple Src family kinases in sea urchin eggs and their function in Ca<sup>2+</sup> release at fertilization. *Dev Biol.* 327, 465-77

Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R, Ding J, Hermann P, Tsujimura T, Matsui N, Yamamura H. (2000) Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem.* 127, 321-7

Tsujimura T, Yanagi S, Inatome R, Takano T, Ishihara I, Mitsui N, Takahashi S, Yamamura H. (2001) Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett.* 489, 129-33

Tyler A. (1967) Problems and procedures of comparative gametology and syngamy. *Fertilization*, vol. 1 (1-26). Metz & Monroy, editors. New York. Academic Press.

Ueki K, Yokosawa H. (1997) Evidence for an erbstatin-sensitive tyrosine kinase functioning in ascidian egg activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 238, 130-3

Ulanova M, Puttagunta L, Marcet-Palacios M, Duszyk M, Steinhoff U, Duta F, Kim MK, Indik ZK, Schreiber AD, Befus AD. (2005) Syk tyrosine kinase participates in beta1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L497-507

van der Flier A, Kuikman I, Baudoin C, van der Neut R, Sonnenberg A. (1995) A novel beta 1 integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 369, 340-4

Valz-Gianinet JN, del Pino EJ, Cabada MO. (1991) Glycoproteins from *Bufo arenarum* vitelline envelope with fertility-impairing effect on homologous spermatozoa. *Dev Biol.* 146, 416-22

Vega VL, Rodríguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, Steinem C, Multhoff G, Arispe N, De Maio A. (2008) Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol.* 180, 4299-307

Vignoud L, Albigès-Rizo C, Frchet P, Block MR. (1997) NPXY motifs control the recruitment of the alpha5beta1 integrin in focal adhesions independently of the association of talin with the beta1 chain. *J Cell Sci.* 110, 1421-30

Vigodner M, Shrivastava V, Gutstein LE, Schneider J, Nieves E, Goldstein M, Feliciano M, Callaway M. (2013) Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum Reprod.* 28, 210-23

Vincent C, Cheek TR, Johnson MH. (1992) Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *J Cell Sci* 103, 389-96

Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, Lowell CA, Chang PW, Gresham HD, Willman CL. (2001) Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity.* 15, 507-19

Vjugina U, Evans JP. (2008) New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. *Front Biosci.* 13, 462-76

Vjugina U, Zhu X, Oh E, Bracero N, Evans J. (2009) Reduction of Mouse Egg Surface Integrin Alpha9 Subunit (ITGA9) Reduces the Egg's Ability to Support Sperm-Egg Binding and Fusion. *Biology of Reproduction* 80, 833-41

Vo LH, Hedrick JL. (2000) Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod.* 62, 766-74

Volpe S, Galeati G, Bernardini C, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Seren E, Spinaci M. (2008) Comparative immunolocalization of heat shock proteins (Hsp)-60, -70, -90 in boar, stallion, dog and cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 43, 385-92

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. (2001) A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3, E59-64

Welch WJ, Suhan JP. (1986) Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103, 2035-52

Welch WJ. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063-81

Whitaker M. (2006) Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 86, 25-88

Whittaker CA, DeSimone DW. (1993) Integrin alpha subunit mRNAs are differentially expressed in early *Xenopus* embryos. *Development* 117, 1239-49

White JR, Ishizaka T, Ishizaka K, Sha'afi R. (1984) Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 3978-82

Williams CJ, Schultz RM, Kopf GS. (1992) Role of G proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev Biol.* 151, 288-96

Wolkowicz MJ, Digilio L, Klotz K, Shetty J, Flickinger CJ, Herr JC. (2008) Equatorial segment protein (ESP) is a human alloantigen involved in sperm-egg binding and fusion. *J Androl.* 29, 272-82

Woodside DG, Oberfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Ginsberg MH. (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol.* 11, 1799-804

Woodside DG, Oberfell A, Talapatra A, Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. (2002) The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 277, 39401-8

Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, Park KW, Yi YJ, Xi YW, Prather RS, Oko R. (2007) PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *J Biol Chem.* 282, 12164-75

Wu H, He CL, Fissore RA. (1997) Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod Dev.* 46, 176-89

Wu JQ, Kornbluth S. (2008) Across the meiotic divide - CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *J Cell Sci* 121, 3509-14

Wu W, Kinsey WH. (2000) Fertilization triggers activation of Fyn kinase in the zebrafish egg. *Int J Dev Biol.* 44, 837-41

Wu W, Kinsey WH. (2002) Role of PTPase(s) in regulating Fyn kinase at fertilization of the zebrafish egg. *Dev Biol.* 247, 286-94

Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151-5

Xu Z, Kopf GS, Schultz RM. (1994) Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated  $Ca^{2+}$  release in early and late events of mouse egg activation. *Development* 120, 1851-9

Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Sunaga H, Saito H. (2001) Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol.* 166, 538-43

Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H. (2001) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 495-8

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>o</sup> Edición, Editorial E Knobil & JD Neill, vol. 1, pp. 189-317. New York: Raven Press.

Yang RB, Au HK, Tzeng CR, Tsai MT, Wu P, Wu YC, Ling TY, Huang YH. (2010) Characterization of a novel cell-surface protein expressed on human sperm. *Hum Reprod.* 25, 42-51

Yim DL, Opresko LK, Wiley HS, Nuccitelli R. (1994) Highly polarized EGF receptor tyrosine kinase activity initiates egg activation in *Xenopus*. *Dev Biol.* 162, 41-55

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 Endocrinol.* 8, 10

Yoshinaga K, Saxena DK, Oh-oka T, Tanii I, Toshimori K. (2001) Inhibition of mouse fertilization in vivo by intra-oviductal injection of an anti-equatorin monoclonal antibody. *Reproduction* 122, 649-55

Yoshizaki N, Katagiri C. (1982) Acrosome reaction in sperm of the toad, *Bufo bufo japonicus*. *Gamete Res.* 6, 342-52

Yuan R, Primakoff P, Myles DG. (1997) A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol.* 137, 105-12

Zarbock A, Ley K. (2011) Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. Arch Biochem Biophys. 510, 112-9

Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. (2000) Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. J Biol Chem. 275, 35442-7

Zhidkova NI, Belkin AM, Mayne R. (1995) Novel isoform of beta 1 integrin expressed in skeletal and cardiac muscle. Biochem Biophys Res Commun. 214, 279-85

Zhu X, Evans J. (2002) Analysis of the Roles of RGD-Binding Integrins,  $\alpha 4/\alpha 9$  Integrins,  $\alpha 6$  Integrins, and CD9 in the Interaction of the Fertilin  $\beta$  (ADAM2) Disintegrin Domain with the Mouse Egg Membrane. Biology of Reproduction 66, 1193-1202

Zimmerman JL, Petri W, Meselson M. (1983) Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. Cell 32, 1161-70

Ziv S, Rufas O, Shalgi R. (2002) Cadherins expression during gamete maturation and fertilization in the rat. Mol Reprod Dev. 62, 547-56

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. 119, 416-24

Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP, Teitelbaum SL. (2007) Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. J Cell Biol. 176, 877-88

Zou W, Reeve JL, Liu Y, Teitelbaum SL, Ross FP. (2008) DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. Mol Cell. 31, 422-31