



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO

Determinación del rol biológico de SBG (Sperm  
Binding Glycoprotein) aislada de oviducto porcino  
sobre espermatozoides homólogos

Presentada por  
Juan Manuel Teijeiro

Rosario, Santa Fe, Argentina  
2009

# **“Determinación del rol biológico de SBG (Sperm Binding Glycoprotein) aislada de oviducto porcino sobre espermatozoides homólogos”**

**Juan Manuel Teijeiro**

Licenciado en Genética

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR) y el Área Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los meses de mayo de 2006 y noviembre de 2009, bajo la dirección de la Dra. Patricia Marini.



**INSTITUTO DE BIOLÓGIA MOLECULAR Y CELULAR DE ROSARIO**  
CONICET - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario  
Suipacha 531 - S2002LRK - Rosario Argentina. Tel: 54.341.4350596/4350661/4351235 Fax: 54.341.4390465



## **DIVULGACIÓN**

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis fueron publicados en las siguientes revistas científicas:

**Juan M. Teijeiro, Marcelo O. Cabada and Patricia E. Marini.** (2008). Sperm Binding Glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm. *J Cell Biochem.* Apr 1; 103(5):1413-23.

**Juan M. Teijeiro, George G. Ignatz and Patricia E. Marini.** (2009). Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm-oviduct interaction. *Mol Reprod Dev.* 76:334-341.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis han sido comunicados en las siguientes reuniones científicas:

**Teijeiro Juan M., Marini Patricia E., Cabada Marcelo O.** (2005). Caracterización de proteínas de superficie de membrana de espermatozoides de cerdo capaces de interaccionar con sperm binding glycoprotein. 50 Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. Bs As. Argentina

**Teijeiro, Juan M.; Marini, Patricia E.; Cabada Marcelo O.** (2005). Aislamiento y caracterización parcial de proteínas de superficie de membrana de espermatozoides de cerdo *Sus scrofa domestica* capaces de interaccionar con SBG (“Sperm Binding Glycoprotein”). VII Congreso. XXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Teijeiro, Juan M.; Cabada Marcelo O; Marini, Patricia.** (2006). Estudio del rol de “sperm binding glycoprotein” sobre la fisiología espermática. VIII Congreso. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Teijeiro, Juan M; Cabada, Marcelo O; Marini, Patricia E.** (2006). Effect of sperm binding glycoprotein on the sperm physiology. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Teijeiro, Juan M; Cabada, Marcelo O; Marini, Patricia E.** (2007). SBG (Sperm Binding Glycoprotein) produce alteraciones en la fisiología de espermatozoides homólogos. Primera Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Huerta Grande. Córdoba. Argentina

**Marcelo Cabada, Patricia Marini, Juan M Teijeiro, Dora Dapino, Rodolfo Cabrera, Adriana Caille, Sergio Ghersevich, María J. Munuce, Carlos Zumoffen.** (2007). Moléculas del oviducto de mamíferos: efecto sobre la fisiología espermática. Jornadas de Divulgación Científica de la Universidad Nacional de Rosario. Sede de Gobierno de la UNR. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Dapino, D; Teijeiro, Juan M.; Marini, Patricia E. y Cabada Marcelo O.** (2007). Modificación de los sitios de unión a heparina en espermatozoides de verraco por efecto de la capacitación. IX Congreso. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Teijeiro, Juan M. y Marini, Patricia E.** (2008). Inmunodetección de una proteína homóloga a psoriasina humana en extractos de espermatozoides porcinos. X Congreso. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

**Teijeiro, Juan M, Ignatz George G. y Marini, Patricia E.** (2008). Anexinas en la interacción espermatozoide-oviducto. LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar Del Plata. Bs As. Argentina.

**Dapino, D., Teijeiro, J.; Cane, F.; Cabada, M; Marini, P.E.** (2008). Fosforilación de proteínas durante la capacitación de espermatozoides porcinos: rol de la heparina. Jornadas de Divulgación Técnico-científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR. Casilda. Santa Fé. Argentina.

**J. M. Teijeiro, P. E. Marini.** (2009). Espermatozoides porcinos: una nueva localización para psoriasina (S100A7). XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana. San Pablo. Brasil.

**Juan M. Teijeiro, Patricia E. Marini.** (2009). Annexin A2 and S100A10 in the mammalian oviduct epithelium. ECS workshop. Annexins, targets and calcium-binding proteins in pathology. Smolenice. República de Eslováquia.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Patricia Marini por haberme guiado durante todos estos años, desde mi trabajo de tesis de grado hasta la finalización de este trabajo de tesis de doctorado y no solamente en la formación académica.

Agradezco al Dr. Marcelo Cabada por haberme permitido formar parte del Área Biología y por su apoyo incondicional.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Doris Dapino (gracias por haberme enseñado las técnicas de espermatología), Rodolfo (Mosca) Cabrera, Jimena Ruiz Álvarez y Lorena Roldán por bancarme, por la paciencia, por su compañerismo y por su apoyo constante.

Debo expresar un profundo agradecimiento a las personas que colaboraron con este trabajo de tesis: Estadística Mercedes Leiva y Bioquímica Hebe Bottai de la cátedra de Estadística, Alejandra Martínez de la cátedra de Morfología, a Claudio Hofer del bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y al Med. Vet. Fernando Cane del Instituto de Porcinotécnica, Chañar Ladeado por el aporte de las muestras.

También quisiera agradecer las doctoras Claudia Banchio y Gabriela Coux por su aporte científico y humano, por sus consejos y también por la paciencia.

A todos los integrantes del Área Biología quiero expresarles un profundo agradecimiento por la convivencia cotidiana, por enseñarme, por apoyarme, por formarme como persona, como docente y como científico.

A Sebastián Najle por seguir brindándome su amistad en todos estos años.

Agradezco a ANPCyT y a CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar mi doctorado.

Le agradezco a Valeria el apoyo del día a día.

Motivos para agradecer a mis padres y hermana... me sobran.

INDICE GENERAL	I
RESUMEN	IV
ABREVIATURAS	V
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. El espermatozoide	3
I.1.1. Motilidad hiperactivada	4
I.1.2. Capacitación	5
I.1.3. Reacción acrosómica	9
I.2. El sistema reproductor del macho	14
I.2.1. Los testículos	14
I.2.2. El epidídimo	14
I.2.3. Glándulas accesorias (vesícula seminal, próstata y glándulas de Cowper)	16
I.3. El ovocito	17
I.3.1. Desarrollo folicular	17
I.3.2. Zona pelúcida	20
I.4. Ovulación y ciclo estral	22
I.5. Tracto reproductivo de la hembra	22
I.5.1. Ovario	22
I.5.2. Útero	22
I.5.3. Oviducto	23
I.6. Modelo Biológico	28
II. OBJETIVOS	31
II.1. Objetivos generales	31
II.2. Objetivos particulares	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
III.1. Obtención de muestras	32
III.1.1. Obtención de oviductos	32
III.1.2. Obtención de muestras de semen	32
III.2. Incubación de espermatozoides	32
III.3. Preparación de extractos proteicos	33
III.3.1. Extractos proteicos de membranas de células epiteliales de oviducto	33
III.3.2. Extractos proteicos de espermatozoides	33
III.3.2.1. Proteínas de superficie	33
III.3.2.2. Extractos de proteínas totales de espermatozoides	34
III.3.2.3. Obtención de fracciones enriquecidas en membranas periacrosomales de espermatozoides	34
III.4. Determinación de la concentración de proteínas	34
III.5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	34
III.6. Electroforesis bidimensionales	35
III.7. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida	35
III.8. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa o PVDF	35
III.9. Revelado con anticuerpos (western blot)	35
III.10. Anticuerpos	36
III.11. Preparación de columnas de afinidad	36
III.11.1. Columnas de afinidad para purificación de SBG y anexinas	36

III.11.2. Columnas de afinidad para purificación de proteínas de unión a SBG	37
III.12. Purificación de SBG	37
III.13. Purificación de proteínas de unión a SBG	38
III.14. Evaluación de la morfología y vitalidad espermática	38
III.15. Tinción con clortetraciclina (CTC)	39
III.16. Detección de proteínas sobre células espermáticas	39
III.17. Detección de proteínas sobre células epiteliales oviductales	39
III.18. Detección de sitios de unión a SBG sobre espermatozoides	40
III.19. Inmunohistoquímica	40
III.19.1. Preparación de criosecciones	40
III.19.2. Preparación de cortes embebidos en parafina	40
III.20. Estadística	41
III.21. Subclonado del ADNc que codifica para S100A7 humana	42
III. 22. Subclonado del ADNc que codifica para S100A7 porcina	43
III.23. Subclonado del carboxilotermino de AKAP4 de cerdo	43
III.24. Purificación de proteínas para obtención de anticuerpos	44
III.25. Generación de anticuerpos anti-S100A7 humana y porcina y fragmento C-terminal de AKAP4	44
III.26. Inmunoprecipitación	45
ANEXO DE SOLUCIONES	46
IV. PROTEÍNAS OVIDUCTALES QUE INTERACCIONAN CON ESPERMATOZOIDES	49
IV.1. SPERM BINDING GLYCOPROTEIN (SBG)	49
IV.1.1. INTRODUCCIÓN	49
IV.1.2. RESULTADOS	49
IV.1.2.1. Rol biológico de SBG	49
IV.1.2.1.1. Efecto de SBG sobre la morfología del espermatozoide	49
IV.1.2.1.2. Efecto de SBG en función de la concentración y el tiempo	51
IV.1.2.1.3. Efecto de SBG en medio no capacitante	52
IV.1.2.1.4. Requerimiento de calcio y bicarbonato para el efecto de SBG	52
IV.1.2.1.5. Efecto de SBG sobre espermatozoides capacitados	54
IV.1.2.1.6. Efecto de SBG evaluado mediante la técnica de tinción con CTC	55
IV.1.2.2 Detección de sitios de unión de SBG sobre espermatozoides en medio capacitante	58
IV.1.2.3. Evaluación de fosforilación de proteínas de espermatozoides en presencia de SBG	59
IV.1.2.3.1. Evaluación en medio capacitante	59
IV.1.2.3.2. Dependencia de calcio y bicarbonato en la fosforilación de p97	61
IV.1.2.3.3. Efecto del AMPc en la fosforilación de p97	62
IV.1.2.4. Identificación de SBG	63
IV.1.2.4.1. Identificación de SBG por espectrometría de masa	63
IV.1.2.4.2. Detección de DMBT1 y SBG mediante anticuerpos específicos	65
IV.1.3. DISCUSIÓN	66
IV.2. ANEXINAS	70
IV.2. 1. INTRODUCCIÓN	70
IV.2. 2. RESULTADOS	70
IV.2.2.1. Purificación e identificación de nuevas proteínas de unión a espermatozoides	70

IV.2.2.2. Identificación de anexinas mediante anticuerpos específicos	72
IV.2.2.3. Identificación de anexinas en extractos de proteínas oviductales de varias especies	73
IV.2.2.4. Localización	74
IV.2.3. DISCUSIÓN	75
IV.3. S100A10	77
IV.3.1. INTRODUCCIÓN	77
IV.3.2. RESULTADOS	78
IV.3.2.1. Identificación de S100A10 en oviducto de cerdo y de varios mamíferos	78
IV.3.2.2. Localización de S100A10 en oviducto de cerdo hembra	79
IV.3.2.3. Inmunoprecipitación con anticuerpos anti-anexina A2	80
IV.3.2.4. Extracción diferencial del complejo anexina A2/S100A10 de fracciones de membrana plasmática	81
IV.3.2.5. Elución de anexina A2 y/o complejo anexina A2/S100A10 de la superficie de células epiteliales de oviducto	82
IV.3.2.6. Detección de anexina A2 y S100A10 en células epiteliales incubadas en PBS y PBS-EGTA	83
IV.3.3. DISCUSIÓN	83
V. PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS QUE INTERACCIONAN CON SBG	86
V.1. S100A7	86
V.1.1. INTRODUCCION	86
V.1.2. RESULTADOS	87
V.1.2.1. Expresión de GST-S100A7 humana	87
V.1.2.2. Evaluación de la solubilidad de GST-S100A7 humana	87
V.1.2.3. Purificación de GST-S100A7 humana	88
V.1.2.4. Expresión de His-S100A7 de cerdo	88
V.1.2.5 Detección de S100A7 en extractos de proteínas de espermatozoides y plasma seminal	89
V.1.2.6. Inmunolocalización de S100A7	91
V.1.3. DISCUSIÓN	92
V.2 DERMCIDINA	94
V.2.1. INTRODUCCION	94
V.2.2. RESULTADOS	94
V.2.2.1. Presencia de una proteína homóloga a dermcidina en extractos proteicos de espermatozoides y plasma seminal	94
V.2.2.2. Inmunolocalización de dermcidina	94
V.2.3. DISCUSIÓN	95
V.3. AKAP4	97
V.3.1. INTRODUCCIÓN	97
V.3.2. RESULTADOS	97
V.3.2.1. Identificación de AKAP4 mediante anticuerpos específicos	97
V.3.2.2. Localización de AKAP4 en tejido testicular	98
V.3.2.3. Expresión de un fragmento carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo	99
V.3.3. DISCUSIÓN	100
VI. CONCLUSIONES GENERALES	101
VII. DISCUSIÓN GENERAL	103
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

## RESUMEN

El oviducto es, en los mamíferos euterios, el sitio donde ocurren el transporte de las gametas femeninas y masculinas, la interacción entre las mismas, la fecundación y el desarrollo embrionario inicial. El estudio del microambiente oviductal, así como de la participación de las distintas moléculas allí presentes resulta esencial para comprender mejor la fisiología del proceso reproductivo. Estudiar las moléculas presentes en el oviducto de mamíferos que son capaces de interactuar en forma directa con los espermatozoides y su localización en el microambiente oviductal, así como determinar sus efectos sobre la fisiología espermática, generan una mayor comprensión de los factores que participan en el proceso reproductivo. Esto resulta beneficioso para diseñar nuevas estrategias destinadas a favorecer o impedir la fecundación.

En este trabajo de tesis se ha estudiado el efecto de una glicoproteína oviductal porcina, SBG (Sperm Binding Glycoprotein), sobre espermatozoides homólogos y se le ha asignado una función a dicha proteína. Esta función relaciona a SBG con una selección negativa de espermatozoides en el oviducto porcino, evitando que gran cantidad de espermatozoides capacitados alcancen el sitio de fecundación, previniendo de esta forma la fecundación polispérmica. La selección negativa ocurre a través del efecto de SBG sobre la integridad acrosomal y la supresión de la motilidad del espermatozoide en un ambiente capacitante. Además se ha identificado una proteína de espermatozoides que se fosforila en residuos de tirosina como consecuencia de la interacción con SBG. Esta proteína, con homología a AKAP4 canina, estaría relacionada con el efecto en la supresión de la motilidad.

Se ha podido establecer que, *in vitro*, interactúan con SBG, S100A7 y dermcidina. S100A7 fue localizada, mediante la utilización de anticuerpos, en la cabeza de los espermatozoides y dermcidina comparte dicha localización.

Otra proteína de oviducto, anexina A2, fue identificada como putativa integrante de un mecanismo en el cual el espermatozoide interactúa con el oviducto. Su identificación en oviducto de varias especies de mamíferos lleva a considerar a esta proteína como un integrante de un mecanismo general de interacción espermatozoide-oviducto en la generación del reservorio.

## **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AMP: adenosina monofosfato

AMPc: AMP cíclico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BSA: albúmina sérica bovina

CTC: clortetraciclina

CUB: dominio de unión a carbohidrato

DAB: diaminobencidina

dbAMP: dibutil adenosina monofosfato

DMP: dimetilpimelimidato

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GST: glutathione S-transferasa

IBMX: isometilbutilxantina

MP: membrana plasmática

PBS: buffer fosfato salino

RA: reacción acrosómica

SRCR: dominio receptor scavenger rico en cisteínas

TALP: medio Tyrode Albumina Lactato Piruvato

TBS: Tris buffer salino

ZP: zona pelúcida

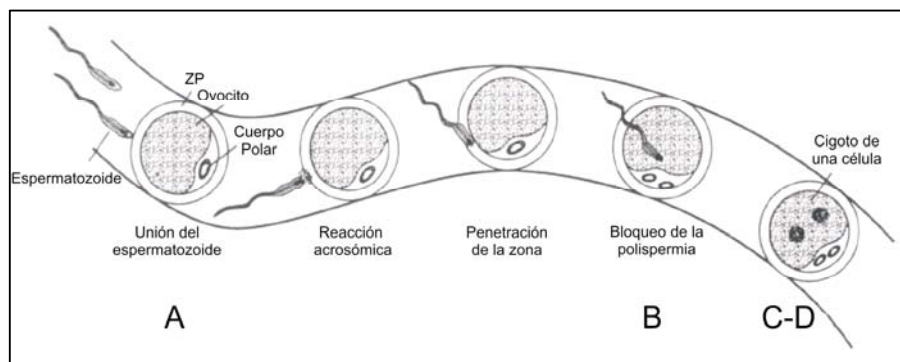
# Capítulo I

## I. INTRODUCCION

La reproducción sexual procede a través de la fecundación, durante la cual dos gametas haploides se unen para producir un individuo genéticamente distinto (Evans y Florman, 2002). En mamíferos, el encuentro entre un espermatozoide competente y un ovocito ovulado es el comienzo de una secuencia altamente coordinada de interacciones celulares entre las gametas haploides que conduce a la formación del cigoto diploide e inicia el desarrollo embrionario (Töpfer-Petersen y col., 2008). Si la fecundación falla, el espermatozoide y el ovocito degeneran en el tracto genital femenino, es decir, estas dos células altamente diferenciadas no pueden sobrevivir por sí mismas (Wassarman, 1999).

Si bien existen diferencias considerables en el proceso de fecundación de las distintas especies animales, investigaciones realizadas en equinodermos, anfibios y mamíferos indican que los eventos principales son comunes a todas ellas (Gilbert, 2005). Estos son (Fig. 1):

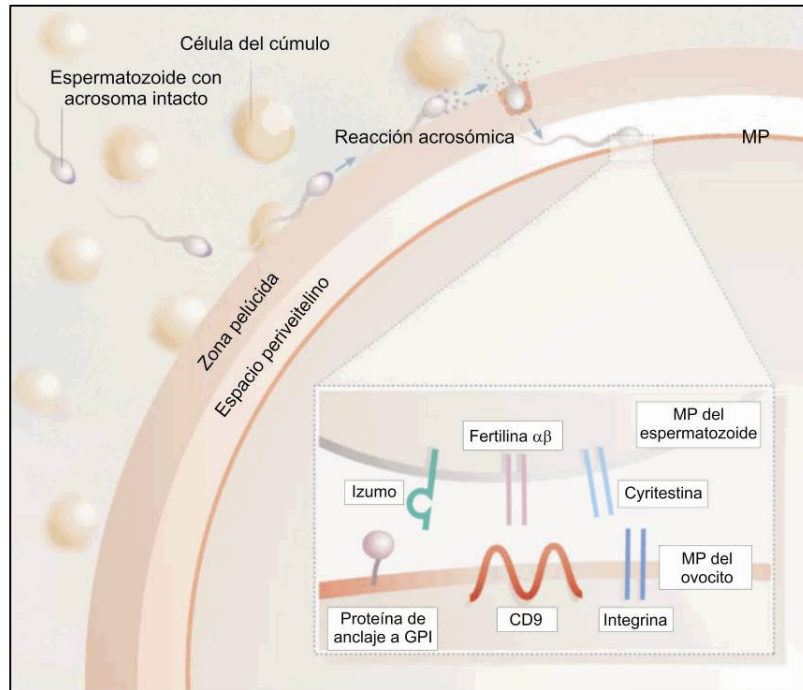
- A. Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino.
- B. Regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino (incluye el bloqueo de la polispermia en especies monospérmicas).
- C. Fusión del material genético del espermatozoide y del gameto femenino.
- D. Activación del metabolismo del huevo para comenzar el desarrollo.



**Fig. 1. Fecundación en mamíferos.** La unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP), cubierta glicoproteica que recubre al ovocito, induce la reacción acrosómica. Esto le permite penetrarla y fusionar su membrana con la del ovocito. Luego el espermatozoide ingresa al citoplasma y forma el pronúcleo masculino. Adaptado de Dean (1992).

A pesar de la importancia de las interacciones que conducen a la formación del cigoto, y a pesar de décadas de investigación, las bases moleculares de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito permanecen pobremente comprendidas. Un esquema

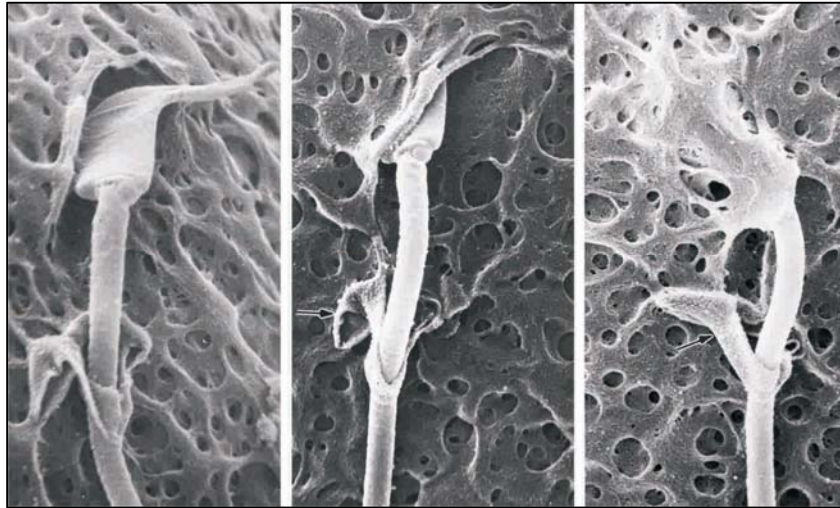
abreviado indicando las moléculas candidatas involucradas en el proceso de fusión se observa en la figura 2.



**Figura 2. Modelo propuesto para la interacción entre la membrana plasmática del ovocito y la membrana plasmática del espermatozoide.** En el modelo se muestran los eventos que conducen a la fecundación detallando las moléculas que podrían estar involucradas en el proceso de fusión de las membranas plasmática (MP) del ovocito y del espermatozoide. Adaptado de Schultz y Williams (2005).

En los eventos que conducen a la fecundación, un espermatozoide (cuyo acrosoma está intacto) pasa a través de una matriz secretada por las células del cúmulo (células que rodean al ovocito) compuesta principalmente por ácido hialurónico. La interacción con la cubierta del ovocito, la zona pelúcida (ZP), desencadena la secreción del contenido de la vesícula acrosomal (vesícula ubicada en la región anterior de la cabeza del espermatozoides) y expone las moléculas necesarias para la unión del espermatozoide al ovocito y su fusión. Aunque la zona pelúcida ha sido caracterizada bioquímicamente, la base molecular de cómo el espermatozoide se une a ella y sufre reacción acrosómica no ha sido resuelta. Luego de atravesar las células del cúmulo, el espermatozoide penetra la ZP (Fig. 3) accediendo al espacio perivitelino, y se une a la membrana plasmática del ovocito. Moléculas en la superficie del espermatozoide tales como la fertilina y cyritestina podrían estar involucradas en la unión espermatozoide-ovocito. Izumo es una proteína espermática esencial para la fusión de las membranas (Inoue y col., 2005). Sobre la superficie del ovocito, CD9 es requerida para la fusión y

podría colaborar con otras proteínas tales como las integrinas o proteínas de anclaje a fosfatidilinositol (Schultz y Williams, 2005).



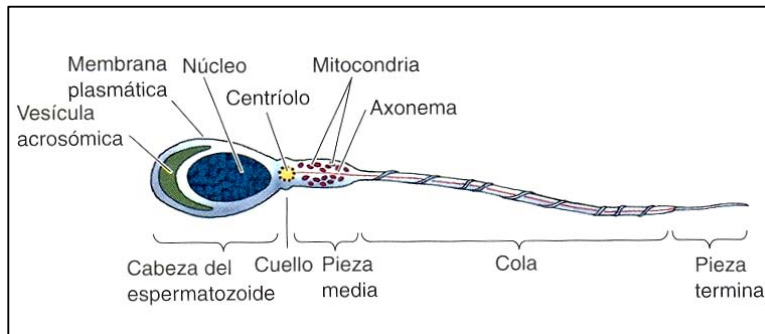
**Fig. 3. Micrografía electrónica de un espermatozoide atravesando progresivamente la zona pelúcida.** Los ovocitos fueron recuperados de hembras de hámster 3 h luego de la ovulación. Reproducido de Bedford (2008).

### I.1. El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final de la gametogénesis en el macho, la cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos (Kretser, 1994).

El espermatozoide de mamífero tiene dos componentes principales, la cabeza y el flagelo, los cuales están unidos por el cuello. La cabeza consiste del acrosoma, el núcleo y pequeñas cantidades de estructuras del citoesqueleto y citoplasma. El acrosoma está rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas en su interior. Éste recubre el extremo anterior del núcleo. El núcleo contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas y la cromatina se encuentra altamente condensada. El flagelo contiene un axonema central rodeado por densas fibras externas que se extienden desde la cabeza hasta cerca del extremo posterior. La parte anterior del flagelo contiene mitocondrias formando una hélice apretada alrededor de las fibras densas, y la parte posterior contiene una vaina fibrosa rodeada por fibras densas externas (Fig. 4). Las fibras densas externas y la vaina fibrosa forman parte del citoesqueleto del flagelo. Estas características del citoesqueleto podrían haber evolucionado con el desarrollo de la fecundación interna (Eddy y O'Brien, 1994). La cabeza del espermatozoide de cerdo tiene un largo promedio de 9,17  $\mu\text{m}$  y ancho promedio de 4,69  $\mu\text{m}$ . Su flagelo mide en

promedio 44,11  $\mu\text{m}$ , lo que hace un largo total del espermatozoide de cerdo de 53,28  $\mu\text{m}$  (Kondracki y col., 2006).



**Fig. 4. Esquema de un espermatozoide.** La figura muestra la morfología básica de un espermatozoide. Adaptado de Gilbert (2005).

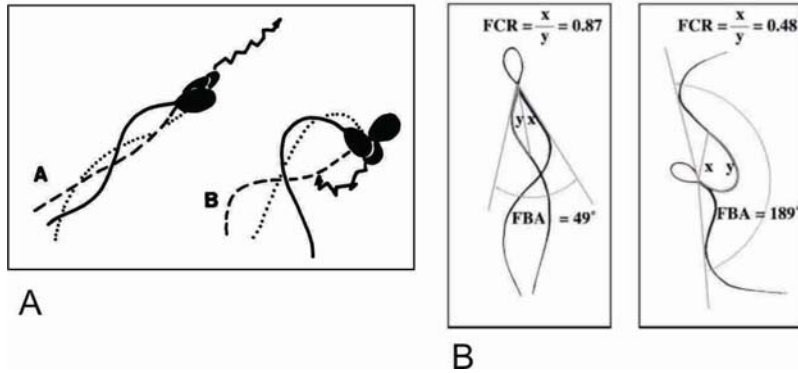
### I.1.1. Motilidad hiperactivada.

Los órganos femeninos imponen diferentes ambientes fisicoquímicos al espermatozoide que pueden afectar su actividad flagelar y su consecuente progreso hacia el ovocito, en dichos órganos el espermatozoide sufre una fuerte alteración en el movimiento flagelar denominada **hiperactivación** (Suarez y col., 1991).

La mayoría de los espermatozoides de mamífero muestran dos tipos de motilidad fisiológica: motilidad activada, la que se puede observar en eyaculados frescos y motilidad hiperactivada, la que se observa en los espermatozoides recuperados del sitio de fecundación (Turner, 2006). Hay evidencias de que la hiperactivación ofrece una ventaja al espermatozoide para liberarse de la mucosa oviductal, para penetrar las sustancias viscoelásticas del oviducto y para penetrar la ZP. El movimiento del espermatozoide hiperactivado aparece bajo diferentes condiciones fisiológicas y en diferentes especies, pero básicamente involucra un incremento en la amplitud de la curvatura flagelar y una asimetría del batido (Ho y Suarez, 2001) (Fig. 5A).

Por medio de análisis computarizado (computer-assisted sperm analysis, CASA) en cerdos se ha establecido que la transición de un espermatozoide normal a uno hiperactivado conlleva a un aumento en el ángulo del batido flagelar de  $49^\circ \pm 12^\circ$  a  $200^\circ \pm 36^\circ$  y una disminución en la proporción de la curvatura flagelar de  $0,8 \pm 0,04$  a  $0,47 \pm 0,11$  (Schmidt y Kamp, 2004) (Fig. 5B).

Presumiblemente existiría una señal o señales en el oviducto que producirían el inicio de la hiperactivación en el momento apropiado, pero éstas no han sido identificadas aún.



**Fig. 5. A. Patrones de movimiento de espermatozoides de cerdo activado (A) e hiperactivado (B).** Reproducido de Suarez y col. (1992). **B. Transición del espermatozoide de cerdo de no hiperactivado a hiperactivado.** FBA es el ángulo entre las tangentes de la onda flagelar externa y FRC el cociente entre la distancia en línea recta del cuello al primer punto de inflexión sobre la distancia de la curva hasta el mismo punto. El panel de la izquierda representa a un espermatozoide no hiperactivado y el de la derecha a un espermatozoide hiperactivado. Reproducido de Schmidt y Kamp (2004).

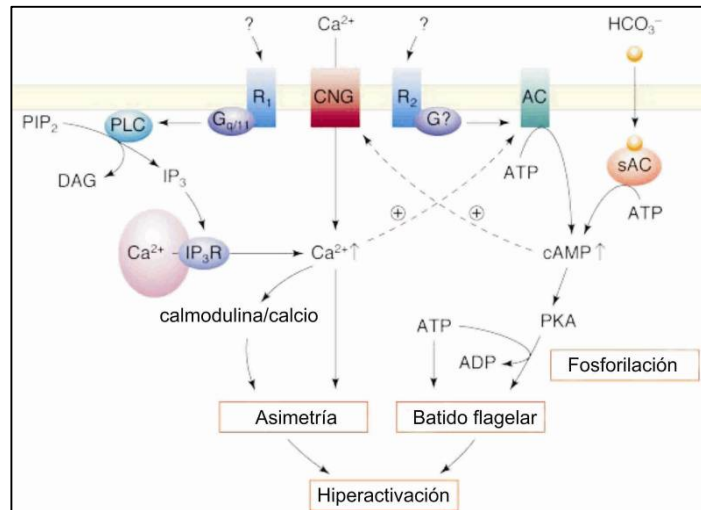
A pesar de que la cascada de transducción de señal no ha sido dilucidada completamente, es claro que los iones calcio interaccionan con el axonema del flagelo para iniciar la hiperactivación. El proceso podría involucrar incrementos en el AMPc intracelular, el cual es requerido para apoyar la movilidad en general.

Aunque la hiperactivación usualmente ocurre durante la capacitación, los dos eventos son regulados por vías diferentes (Ho y Suarez, 2001) (Fig. 6). La hiperactivación está mediada por una vía de señalización de calcio que está separada o es divergente de la vía asociada con la adquisición de respuesta acrosomal (Marquez y Suarez, 2004).

### I.1.2. Capacitación

Luego de la eyaculación, el espermatozoide de mamífero no tiene aún la capacidad de fecundar. Él requerirá de un período finito de residencia en el tracto reproductivo de la hembra antes de convertirse en competente para la fecundación. Los cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos que ocurren en el espermatozoide mientras transita por el tracto reproductivo femenino son referidos colectivamente como **capacitación** (Salicioni y col., 2007).

Una vez capacitados, los espermatozoides pueden interactuar con la ZP del ovocito y sobrellevar la llamada reacción acrosómica (RA), adquiriendo la habilidad de generar dominios fusogénicos involucrados en la penetración de la zona y en la fusión con el ovocito (Brewis y Wong, 1999; Cross y col., 1988).



**Fig. 6. Modelo hipotético del mecanismo de regulación de hiperactivación.** Luego de la señal de estimulación, se activa la vía que conduce a incrementos de calcio y AMPc. Una señal fisiológica desconocida activa la fosfolipasa C (PLC) a través de proteína G heterotrimérica (Gq/11)-receptor acoplado (R1) y produce inositol trifosfato (IP3). La unión de IP3 al receptor IP3 (IP3R) causa un incremento citoplasmático de calcio. La activación de la adenilato ciclasa asociada a membrana (AC) a través del incremento de calcio citoplasmático y posiblemente proteínas G (G?) y el potencial de membrana, incrementan el nivel de AMPc intracelular. El bicarbonato también puede causar un incremento en el AMPc intracelular directamente por la activación de la adenilato ciclasa soluble. El AMPc puede unirse a canales activados por nucleótidos cíclicos para inducir un influjo de calcio. El AMPc activa a proteína quinasa A (PKA) para fosforilar el axonema o proteínas de la vaina fibrosa resultando en el batido flagelar. El elevado calcio citoplasmático y el complejo calcio/calmodulina son los responsables del arqueado del flagelo. Adaptado de Ho y Suarez (2001).

El fenómeno de capacitación fue reportado hace más de 50 años de forma independiente por Austin y Chang (Austin, 1951; Chang, 1951) y este proceso puede ser reproducido *in vitro* por incubación de espermatozoides en un medio apropiado, el cual contiene generalmente albúmina sérica bovina y calcio (Visconti y col., 1998; Visconti y Kopf, 1998). La capacitación es definida como una serie de transformaciones que sufre el espermatozoide durante su migración a través del tracto genital de la hembra (de Lamirande y col., 1997). El bicarbonato induce modificaciones en la arquitectura de la membrana plasmática que están ligadas a la capacitación en espermatozoides de cerdo (Harrison y col., 1996). Niveles fisiológicos de bicarbonato inducen un rápido colapso de la asimetría de membrana mediado por “scramblasas” (Gadella y Harrison, 2002; Harrison y col., 1996). Para cerdo, ratón y toro existe la hipótesis de que el bicarbonato activa una adenilato ciclasa soluble del espermatozoide que consecuentemente incrementa los niveles de AMPc y activa proteínas quinasas desencadenando la fosforilación de proteínas (Galantino-Homer y col., 1997; Kalab y col., 1998; Visconti y col., 1999).

Una de las vías de señalización que recibió gran atención durante el estudio del proceso de capacitación es la de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. En cerdos, se han caracterizado proteínas de membrana que se fosforilan durante la capacitación (Flesch y col., 1999) y en particular una proteína de masa molecular relativa de 32 kDa que incrementa su nivel de fosforilación durante la misma (Tardif y col., 2001).

Se cree que la albúmina sérica bovina actúa absorbiendo el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, incrementando su fluidez (Cross, 1998), produciendo una alteración en la estabilidad y la distribución de dominios lipídicos de membrana y de las proteínas contenidas en ellos (Shadan y col., 2004), todos fenómenos asociados a la capacitación.

El rol del calcio es menos comprendido, pero es importante en la vía de transducción de señales de la capacitación (Visconti y col., 1995) y varios autores han demostrado la importancia del calcio para la capacitación de espermatozoides de mamíferos (DasGupta y col., 1993; Fraser y col., 1995; Handrow y col., 1989).

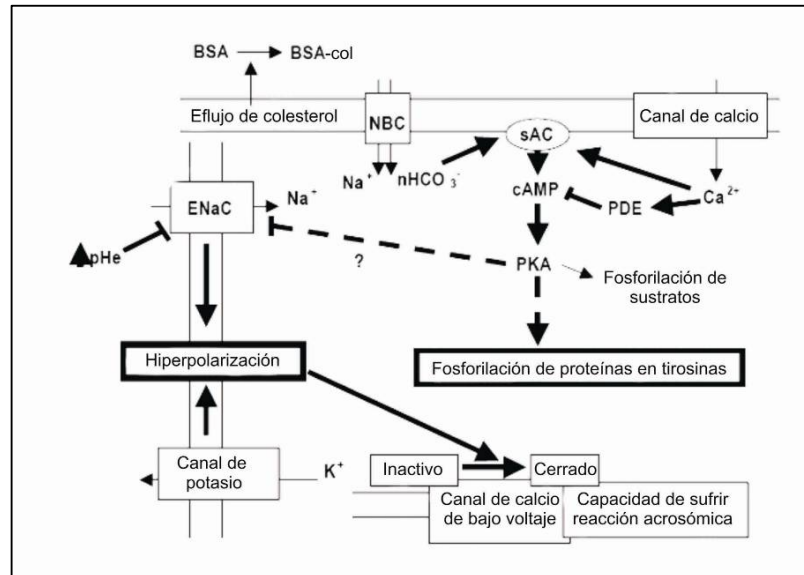
La capacitación del espermatozoide de ratón está acompañada de una hiperpolarización de su membrana plasmática (Zeng y col., 1995). Esto resulta como consecuencia de una combinación de cambios en la permeabilidad para iones que elevan el potencial de membrana. Aunque el rol funcional de la hiperpolarización asociada a la capacitación no es claro, se propone que como la capacitación prepara al espermatozoide para la reacción acrosómica, la hiperpolarización podría regular la habilidad del espermatozoide para generar elevaciones transitorias de calcio intracelular durante la reacción acrosómica inducida por agonistas fisiológicos como por ejemplo la ZP (Salicioni y col., 2007).

Durante la capacitación de espermatozoides porcinos se han observado cambios en la distribución de residuos de *N*-acetilglucosamina y ácido siálico, manosa y fucosa en el glicocálix, indicando que existe una redistribución de glicoproteínas durante estos procesos (Jimenez y col., 2003).

En la figura 7 se presenta un esquema de las vías de señalización involucradas, hasta el momento, en el proceso de capacitación.

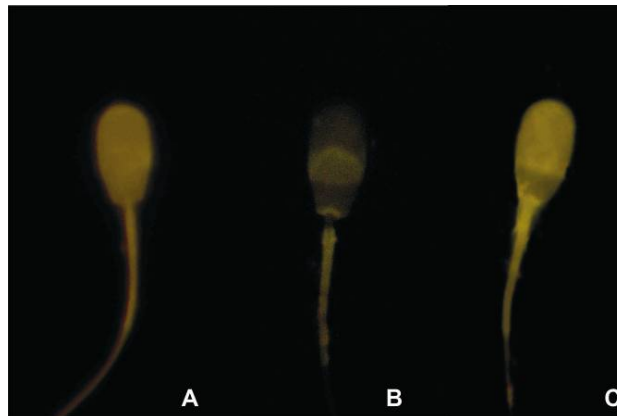
La capacidad del espermatozoide de responder a inductores de la RA es considerada una medida indirecta del estado de capacitación (de Lamirande y col., 1997). En cerdos se han identificado receptores de membrana de espermatozoide para progesterona (Lösel y col., 2004; Wu y col., 2006) y se han descrito técnicas *in vitro*

que han permitido estudiar varios fenómenos tales como capacitación y RA (Aitken y col., 1998; Roldan y Vazquez, 1996).



**Fig. 7. Esquema de las vías de señalización involucradas en la capacitación.** En la figura se resumen las vías conocidas en el proceso de capacitación con sus interrelaciones. NBC: cotransportador de sodio y bicarbonato, sAC: adenilato ciclasa soluble, ENaC: canal de sodio. Las líneas con extremo romo indican regulación. Adaptado de Salicioni (2007).

La tinción con clortetraciclina (CTC) es un método utilizado como indicador de capacitación, y a su vez permite la observación de espermatozoides reaccionados. Esta técnica fue validada para ratones (Saling y Storey, 1979), humanos (DasGupta y col., 1993), caballos (Varner y col., 1987) y cerdos (Mattioli y col., 1996). En cerdos la tinción genera tres patrones asociados al estado fisiológico de los espermatozoides (Fig. 8).



**Fig. 8. Patrones de tinción con CTC en espermatozoides de cerdo.** El patrón A con tinción fluorescente uniforme indica un espermatozoide que no ha sufrido modificaciones, el patrón B, con fluorescencia en la región postacrosomal o en la región ecuatorial, indica un espermatozoide reaccionado y el patrón C, con tinción en la región acrosomal sería indicativo de un espermatozoide capacitado.

### **I.1.3. Reacción acrosómica**

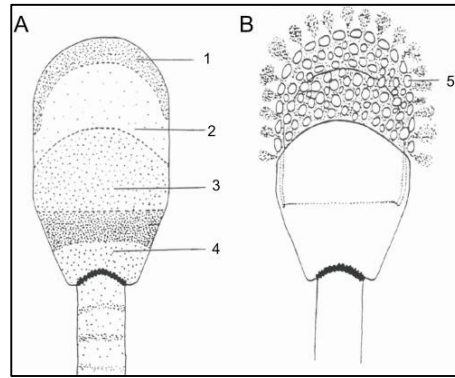
Luego de la capacitación, el espermatozoide debe penetrar la masa del cúmulo del ovocito, que consiste de células foliculares dispersas en una matriz polimerizada compuesta principalmente de ácido hialurónico.

En la mayoría de los animales un espermatozoide con acrosoma intacto hace contacto con el ovocito para sufrir un proceso de reconocimiento específico de gameta. Este está mediado por moléculas complementarias asociadas con la matriz extracelular del ovocito, la ZP, y la membrana plasmática que recubre la vesícula acrosomal. Luego de este primer contacto el espermatozoide sufre la RA (Brewis y col., 2005), es decir, la exocitosis del contenido del acrosoma. Sin embargo, si la exocitosis se completa prematuramente, el espermatozoide no puede entrar en el cumulus oophorus que rodea al ovocito (Cummins y Yanagimachi, 1986).

La exocitosis acrosomal es un tipo especializado de secreción regulada que conduce a una fusión masiva entre la membrana acrosomal externa y la membrana celular. Debido a que la fusión entre las dos membranas sucede en múltiples puntos, el contenido del gránulo acrosomal se pierde y la membrana acrosomal externa junto con la membrana plasmática y el citoplasma que rodean al acrosoma también (Yanagimachi, 1994) (Fig. 9).

El acrosoma es una organela secretora derivada del aparato de Golgi que se parece a un lisosoma en varias maneras, sin embargo, el acrosoma es considerado un orgánulo secretor (Abou-haila y Tulsiani, 2009). La hialuronidasa y la acrosina han sido las dos enzimas acrosomales más ampliamente estudiadas y mejor caracterizadas. Puesto que el acrosoma contiene una variedad de poderosas enzimas hidrolíticas, éste podría ser autodigerido en espermatozoides muertos o moribundos cuando sus membranas pierden semipermeabilidad. Es importante distinguir entre estos fenómenos de modificaciones acrosomales y la RA fisiológica (Yanagimachi, 1994)

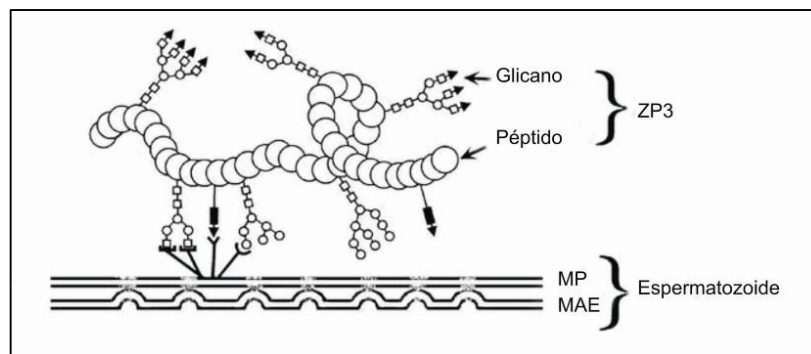
En varias especies se cree que la señal que inicia la RA es el reconocimiento y la unión del espermatozoide capacitado a la ZP de manera receptor-ligando (Abou-haila y Tulsiani, 2009). Tulsiani y colaboradores (1997), han recopilado una lista de por lo menos 23 receptores espermáticos para 8 especies diferentes de mamíferos.



**Fig. 9. Representación esquemática de la reacción acrosómica en espermatozoide de cerdo. A) Subdominios de la cabeza del espermatozoide:** 1) Borde apical, 2) pre-ecuatorial, 3) ecuatorial, y 4) post-ecuatorial. **B) Reacción acrosómica.** 5) vesículas de la reacción acrosómica formadas a través de la fusión múltiple entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. El subdominio ecuatorial no está involucrado en tales funciones. Adaptado de Boerke y col. (2008).

El esqueleto proteico de la ZP de ratón facilita la agregación de receptores de superficie de espermatozoides (Leyton y Saling, 1989), además, azúcares específicos pueden inducir la reacción acrosómica sólo cuando están acoplados covalentemente a cadenas proteicas (neoglicoproteínas) (Benoff y col., 1997; Brandelli y col., 1995; Loeser y col., 1999) (Fig. 10), indicando la necesidad de ambos componentes.

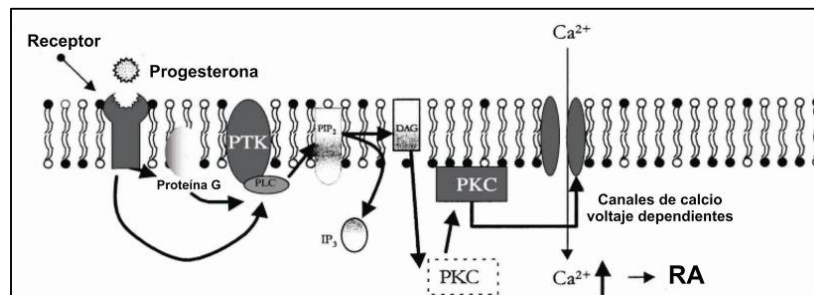
Aunque se cree que la ZP es el ligando primario para el o los receptores presentes en la superficie de la cabeza del espermatozoide capacitado (Yanagimachi, 1994), un número de sustancias fisiológicas y no fisiológicas son conocidas por inducir la reacción acrosómica de espermatozoides tanto del epidídimo como eyaculados (Florman y col., 2008).



**Figura 10. Modelo ilustrativo de la unión de ZP3 a espermatozoides.** Receptores múltiples se encuentran presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado. MP (membrana plasmática) MAE (membrana acrosomal externa) múltiples puntos de fusión se producen a lo largo de las MP y MAE. Adaptado de Abou-haila (2009).

Los inductores fisiológicos son sustancias que el espermatozoide encontraría durante la fecundación *in vivo*. Se ha sugerido que la progesterona puede inducir la reacción acrosómica por interacción con su receptor específico de membrana plasmática del espermatozoide (Abou-haila y Tulsiani, 2009) (Fig. 11). También se ha sugerido que las prostaglandinas, esteroides sulfato, y glicosaminoglicanos presentes en el líquido folicular y secreciones de las células del cúmulo podrían inducir la RA. Como inductores no fisiológicos cabe mencionar: ionóforo de calcio, lectinas y neoglicoproteínas (Tulsiani y col., 1998).

La inducción *in vitro* de la RA en espermatozoides de cerdo puede ser llevada a cabo por diferentes agentes incluyendo ionóforo de calcio, progesterona y proteínas de la ZP (Ashworth y col., 1995; Berger y col., 1989; Melendrez y Meizel, 1995; Melendrez y col., 1994; Petrunkina y col., 2005).



**Figura 11. Modelo propuesto para la vía de acción de la progesterona.** La progesterona actúa sobre un receptor de membrana plasmática, el cual es expuesto durante la capacitación. Este activa receptores tirosina quinasa (PTK) acoplados directamente a fosfolipasa C (PLC) o vía proteína G. La PLC hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol trifosfato IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) y la transloca hacia la membrana. PKC abre los canales calcio dependientes en la membrana produciendo un influjo de calcio extracelular. El incremento de calcio intracelular produce la excitosis acrosomal. Adaptado de Rathi y col. (2003).

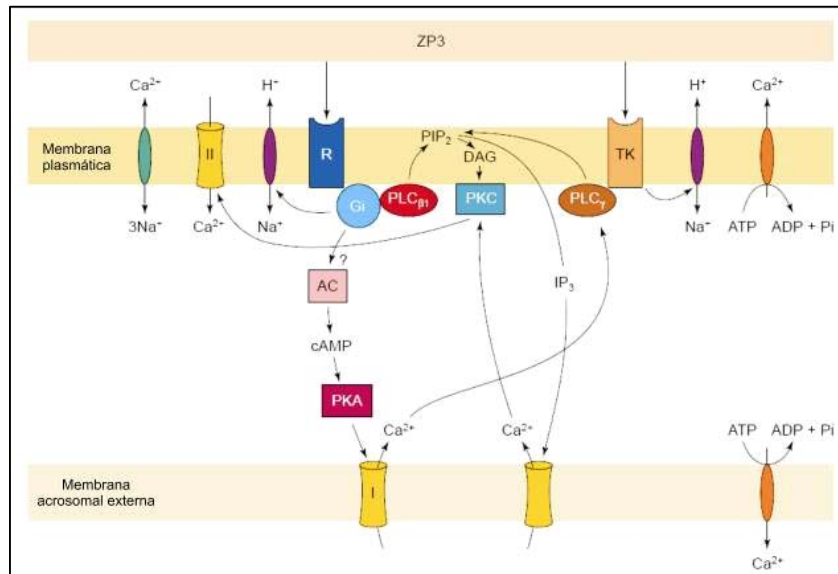
La interacción del espermatozoide con la ZP gatilla un número de respuestas iniciales que son requeridas para producir un influjo sostenido de Ca<sup>+2</sup> que conduce a la RA (O'Toole y col., 2000).

Utilizando indicadores fluorescentes se ha evidenciado que durante la RA en espermatozoides de mamífero, existe un incremento del pH intracelular (pHi) que podría darse a través de una vía dependiente de proteína G. Las proteínas G heterotriméricas de unión a GTP, Gi1 y Gi2 son activadas en los espermatozoides por la ZP (Florman y col., 2008). Breitbart y colaboradores (1997), sugieren que la ZP se une al menos a dos receptores diferentes en la membrana plasmática. Uno, R, es un receptor acoplado a Gi que activa a la fosfolipasa Cβ1 (PLCβ1). El otro, TK, es un receptor

tirosina quinasa acoplado a fosfolipasa  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ). La unión a R regularía a la adenilato ciclasa conduciendo a un incremento en AMPc y a la activación de proteína quinasa A (PKA). PKA activa canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana acrosomal externa que producen una liberación de calcio del interior del acrosoma al citosol. Este es el primer (I) incremento, relativamente pequeño, de calcio intracelular, el cual conduce a la activación de la  $PLC\gamma$ . Los productos de la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato ( $PIP_2$ ) por la  $PLC\gamma$ , diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ), conducen a la translocación de proteína quinasa C (PKC) a la membrana plasmática y a su activación. La PKC abre canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática generando así el segundo y más elevado incremento de calcio intracelular que desencadena la exocitosis acrosomal (Breitbart y col., 1997) (Fig. 12).

Morfológicamente, la exocitosis del contenido acrosomal o inducción de la reacción acrosómica sucede en varios pasos. Primero, hay una fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en múltiples sitios. La fusión comúnmente ocurre en diferentes regiones acrosómicas y podría no ser un fenómeno todo o nada. Segundo, la fusión de las membranas causa la formación de vesículas híbridas y la liberación del contenido acrosomal de manera tiempo dependiente. El proceso es lento y podría ser regulado por cambios en las membranas del espermatozoide y en elementos del citoesqueleto tales como los paquetes de F-actina, presentes entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa, los cuales podrían ayudar al espermatozoide a penetrar gradualmente la ZP. Finalmente hay una desaparición del contenido acrosomal y las vesículas son mantenidas juntas por la matriz acrosomal. La poderosa acción de las enzimas hidrolíticas (proteinasas, glicohidrolasas, etc.), liberadas en la superficie de la ZP, hace posible que el espermatozoide hiperactivado penetre la ZP y pueda fecundar (Abou-haila y Tulsiani, 2009).

Una variedad de técnicas se han utilizado para evaluar la reacción acrosómica. Entre ellas se encuentran el uso de lectinas conjugadas a fluoróforos (Mendoza y col., 1992), microscopía de contraste de fase (Saacke y Marshall, 1968), colorantes fluorescentes (Mattioli y col., 1996) y colorantes simples como Coomassie Blue (Zou y Yang, 2000) o incluso soluciones compuestas por más de un colorante (Wells y Awa, 1970).



**Figura 12. Posibles interacciones entre las actividades involucradas durante la reacción acrosómica.** La glicoproteína ZP3 se une al menos a dos receptores diferentes en la membrana plasmática. R es un receptor acoplado a Gi que activa a PLC $\beta_1$ . TK es un receptor tirosina quinasa acoplado a PLC $\gamma$ . La unión a R regularía a la adenilato ciclasa conduciendo a un incremento de AMPc y a la activación de PKA. PKA activa canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana acrosomal externa, lo cual libera calcio del interior del acrosoma hacia el citosol. Este es el primer incremento de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), el cual conduce a la activación de PLC $\gamma$ . Los productos de la hidrólisis de PIP $_2$  por PLC $\gamma$ , DAG e IP $_3$  translocarían a PKC a la membrana plasmática y la activarían. PKC abre canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana produciendo un segundo incremento de calcio. Gi o TK también pueden activar un intercambiador Na $^+$ /H $^+$  produciendo la alcalinización del citosol. El incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y de pH conducirían a la excitosis acrosomal. Adaptado de Breitbart y col. (1997).

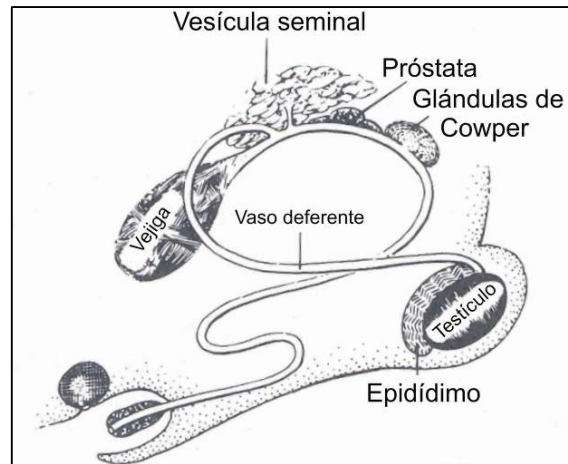
En la figura 13 se pueden observar dos espermatozoides de cerdo teñidos mediante la técnica Wells-Awa, 1970. Uno de ellos presenta su acrosoma intacto (AI) y el otro a sobrellevado la reacción acrosómica (AR).



**Figura 13. Espermatozoides teñidos mediante la técnica Wells-AWA.** Pueden verse dos espermatozoides, el de la izquierda presenta su acrosoma intacto (AI) y el de la derecha no presenta acrosoma (AR).

## I.2. El sistema reproductor del macho.

El tracto reproductivo del macho consiste de dos testículos; dos epidídimos, cada uno con sus conductos deferentes; y las glándulas accesorias. En el cerdo las glándulas accesorias son: vesícula seminal, próstata y glándulas de Cowper (Fig. 14).



**Figura 14. Esquema del tracto reproductivo del cerdo macho.** En el esquema se pueden observar un testículo, un epidídimo y las glándulas accesorias. Adaptado de Stetchel (1994).

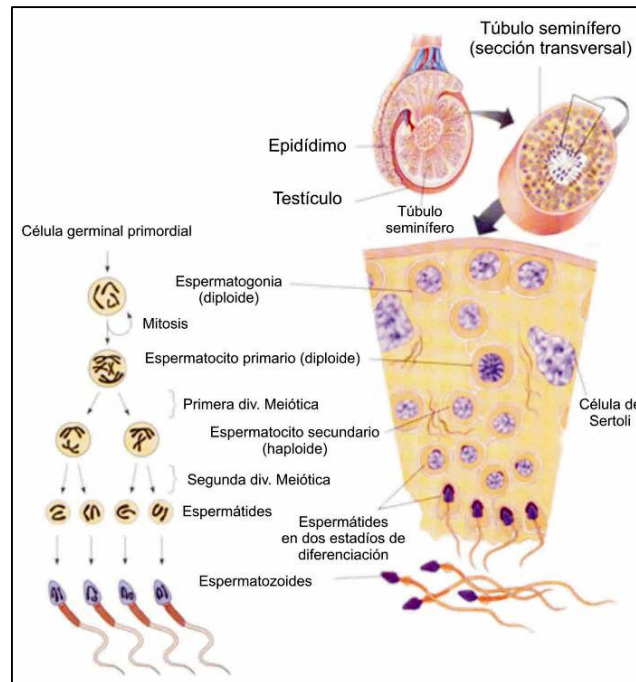
### I.2.1. Los testículos.

La mayoría de los testículos de mamíferos están compuestos por túbulos seminíferos, donde se forman los espermatozoides. La secuencia de eventos citológicos que resultan en la formación del espermatozoide maduro se conoce como espermatogénesis. Existen tres elementos principales que constituyen la espermatogénesis: a) renovación de células germinales por mitosis b) reducción del número de cromosomas por meiosis y c) transformación de una célula convencional en la compleja estructura del espermatozoide por una serie de cambios que no involucran divisiones celulares; esto representa un proceso metamórfico denominado espermiogénesis. Las condiciones bajo las cuales la espermatogénesis es completada indican la existencia de un ambiente único. Ese ambiente es creado por la organización de células no germinales llamadas células de Sertoli (Kretser, 1994) (Fig. 15).

### I.2.2. El epidídimo.

A partir de los testículos, el espermatozoide es transportado a un tubo epididimario que forma un órgano compuesto de varias regiones tales como cabeza, cuerpo y cola. El epidídimo está formado por un epitelio polarizado compuesto de

células basales y principales que crean un ambiente alrededor del espermatozoide que, ciertamente, es el más complejo hallado en cualquier glándula exócrina. Esta complejidad resulta de tener dos peculiaridades: 1) cambios continuos y progresivos en su composición a través del escurrido del ducto del macho y 2) la presencia de componentes en concentraciones inusuales, algunos de ellos no encontrados en otros fluidos del organismo.



**Figura 15. Representación de la espermatogénesis desarrollada en el túbulo seminífero.** En el esquema se puede observar una sección transversal de un túbulo seminífero. Adaptado de: <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>

La composición del contenido epididimario es mantenida no solo por la activa secreción y reabsorción a través del tracto sino también por la presencia de restricciones significativas en los intercambios entre el compartimiento luminal y el plasma sanguíneo. La barrera con la sangre, formada por las uniones estrechas entre las células epiteliales en los testículos y en el epidídimo, está presente durante la diferenciación de la gameta hasta el espermatozoide maduro final.

Una serie de interacciones secuenciales del espermatozoide con el fluido epididimario, más específicamente con proteínas presentes en diferentes regiones del lumen, son las responsables de inducir los pasos finales de la maduración (Dacheux y col., 2005). Las proteínas secretadas a lo largo del tracto genital masculino están

involucradas en la remodelación de la superficie del espermatozoide, que sucede durante el tránsito del espermatozoide a través del tracto y en la eyaculación. Este proceso se llama maduración post-testicular. Las proteínas adsorbidas por los espermatozoides en los procesos mencionados contribuyen a eventos tempranos y centrales de la secuencia de fecundación, por ejemplo, el establecimiento del reservorio oviductal, la modulación de la capacitación y la interacción entre gametas (Töpfer-Petersen y col., 2005).

### **I.2.3. Glándulas accesorias (vesícula seminal, próstata y glándulas de Cowper).**

Las glándulas accesorias fueron clasificadas originalmente sobre la base de su morfología grosera y relaciones anatómicas a otras partes del tracto reproductor masculino. Desafortunadamente, esta clasificación no siempre coincide con las relaciones funcionales desde el punto de vista de la naturaleza de los constituyentes químicos de la secreción (Stetchell y Brooks, 1994).

La vesícula seminal consiste de un tejido compacto glandular de múltiples lóbulos que contiene un sistema ramificado de conductos secretores. Estas vesículas están bien desarrolladas en cerdos, secretan entre el 15% y 20% del volumen del eyaculado y proveen el 80% de las proteínas del plasma seminal (Badia y col., 2006). Las espermadhesinas porcinas son el principal producto secretor de las vesículas seminales, en adición la espermadhesina AWN1 es también secretada por el epidídimo caudal (Töpfer-Petersen y col., 2005).

Las espermadhesinas son un grupo de polipéptidos de 12-16 kDa encontrados en plasma seminal y/o en la superficie del espermatozoide de cerdo. Las espermadhesinas AQN1, AQN3, PSPI, PSPII, AWN1 y AWN2 tienen una concentración en plasma seminal de 0,6 a 7 mg/ml y luego de la eyaculación,  $12-60 \times 10^6$  moléculas de cada una de ellas se adsorben a la tercera parte de la región apical de la cabeza del espermatozoide (Töpfer-Petersen y col., 1998). Sin embargo, la mayoría de este material de cobertura se libera durante la capacitación *in vitro* alcanzando un nivel de  $5-6 \times 10^6$  moléculas por espermatozoide (Dostalova y col., 1994). Los miembros de esta familia de proteínas contienen un dominio CUB de unión a carbohidratos estabilizado por dos puentes disulfuro. Son proteínas multifuncionales que exhiben habilidades para unirse a ligandos como heparina, inhibidores de proteasas, fosfolípidos y carbohidratos y se les han asignado diversas funciones (Töpfer-Petersen y col., 2005). AQN1 ha sido propuesta como proteína candidata en la interacción espermatozoide-oviducto en la

formación del reservorio (Ekhlesi-Hundrieser y col., 2005). AWN1, que se mantiene firmemente unida a la cabeza del espermatozoide por interacción con fosfolípidos aún después de atravesar el tracto reproductivo femenino, ha sido propuesta como proteína involucrada en la interacción con la ZP (Töpfer-Petersen y col., 1998).

La próstata, ubicada anterior a la vesícula seminal y a la vejiga, es una glándula tubuloalveolar, la cual descarga su contenido en la uretra prostática (Stetchell y Brooks, 1994). La próstata contribuye a la formación del plasma seminal. Poca atención se ha prestado a sus productos de secreción, excepto en humanos, donde se han caracterizado la fosfatasa ácida A2, el antígeno específico de próstata y la  $\beta$ -microseminoproteína. La  $\beta$ -microseminoproteína de cerdo es sintetizada en la próstata y se han caracterizado las demás proteínas que produce como proteínas de unión a heparina (Manaskova y col., 2002).

Las glándulas de Cowper son glándulas multilobulares compuestas, tubulares o tubuloalveolares presentes en la mayoría de los mamíferos pero ausente en mamíferos acuáticos, osos y perros. Estas glándulas son particularmente grandes en cerdos (Stetchell y Brooks, 1994), contribuyen a la lubricación uretral (Chughtai y col., 2005) y se ha demostrado en roedores que intervienen en la coagulación del semen (Beil y Hart, 1973).

### **I.3. El ovocito**

#### **I.3.1. Desarrollo folicular**

Los folículos son las principales unidades funcionales del ovario de los mamíferos. La función de cada folículo es proveer el sistema necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, alcance su máximo potencial. La unión de ésta con la célula germinal masculina producirá un embrión capaz de desarrollarse, conduciendo al nacimiento de una descendencia viable normal (Gore-Langton y Armstrong, 1994). Cada folículo contiene un ovocito que está rodeado por células de la granulosa. Para producir ovocitos maduros los folículos son activados a partir de un grupo de folículos primordiales dominantes y se desarrollan a través de los estadios primarios y secundarios adquiriendo una cavidad central (Liu y col., 2006).

En mamíferos, la ovogénesis comienza relativamente temprano en el desarrollo fetal y finaliza luego de meses o años en el adulto sexualmente maduro. La ovogénesis comienza con la formación de las células germinales primordiales y está acompañada de una serie de transformaciones celulares: de célula germinal primordial a ovogonia

(feto), de ovogonia a ovocito (feto), y de ovocito a óvulo (adulto) (Gore-Langton y Armstrong, 1994). El tiempo de desarrollo en el ovario en cerdos se resume en la figura 16.

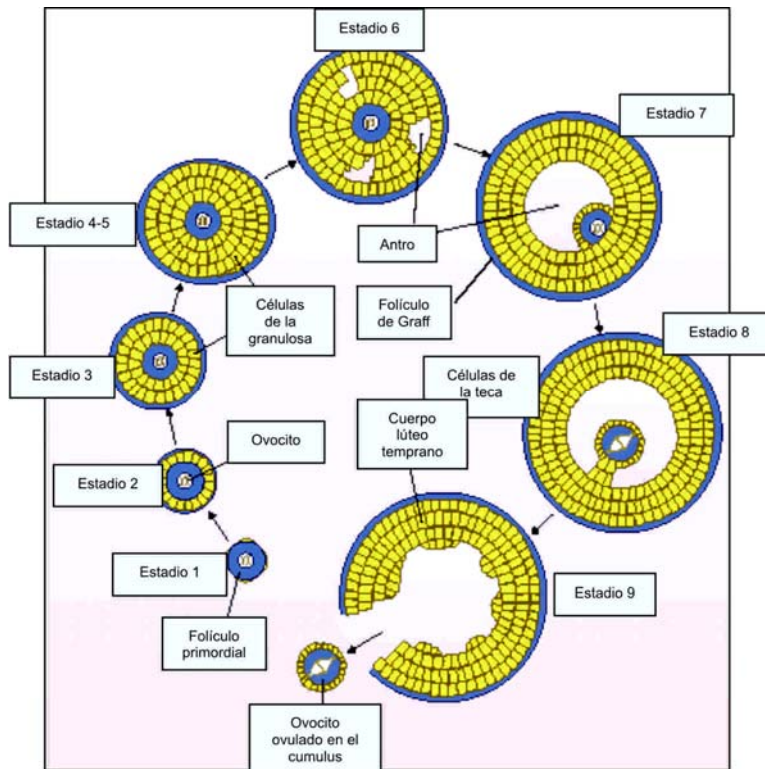


**Figura 16. Tiempo de desarrollo ovariano de folículos en cerdos.** El esquema muestra el desarrollo ovariano desde la concepción a la pubertad y primera ovulación. p.c: *post coitum*. VG: vesícula germinal, estadio de profase de la primera división meiótica. Adaptado de Hunter (2000)

Los estadios del desarrollo folicular se han clasificado distinguiendo a los folículos en términos de la morfología y el tamaño del ovocito, y el número de células de la granulosa que lo rodean y su organización.

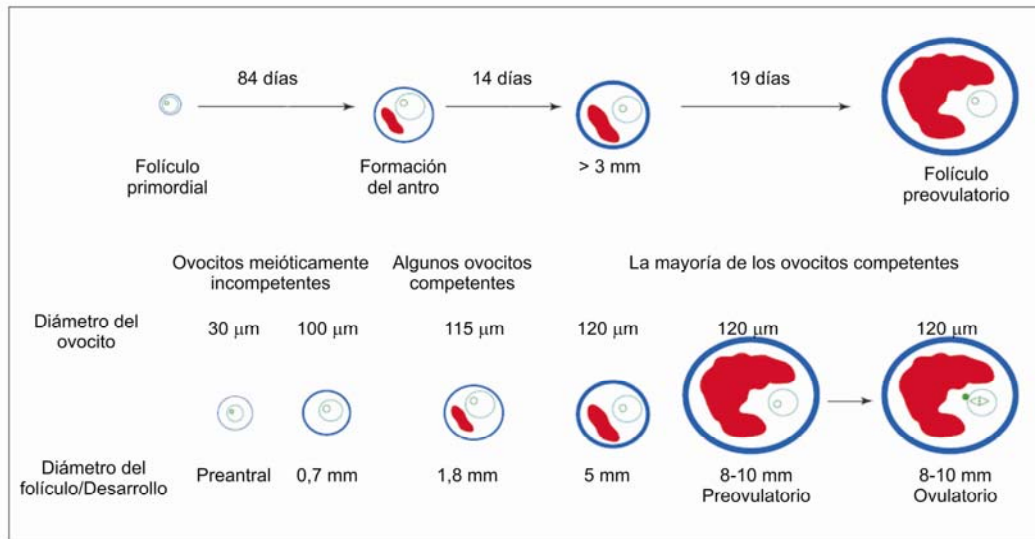
Esquemas similares al de la figura 17, para los ovarios de ratón y humano, han definido ocho tipos principales de folículos. Las categorías principales de los tipos de folículos son las siguientes: folículos pequeños sin crecimiento (por ejemplo, folículos primordiales clasificados como tipo 1-2 en humanos y 1-3a en ratón), folículos preantrales (por ejemplo, folículos primarios con capa simple de células y secundario multilaminar, clasificados como tipos 3-5 en humanos y tipo 3b-5b en ratones) los cuales son caracterizados principalmente por un incremento en el tamaño del ovocito y el número de células de la granulosa; y folículos antrales (por ejemplo, folículos terciario y de de Graaf clasificados como tipos 6-8 en humanos y ratones), los cuales ponen de manifiesto la formación de un antro lleno de fluido y un posterior incremento en el número de células de la granulosa. La mayoría de los animales restringen la proliferación ovogonial al desarrollo prenatal o brevemente luego del nacimiento. De modo que, en la mayoría de los mamíferos antes o tan pronto como nacen, las ovogonias son transformadas en ovocitos primarios, caracterizados por una prolongada profase meiótica y rodeados por una capa fina de células de la pregranulosa. Este *folículo primordial* constituye la reserva restante de los folículos que no están en crecimiento, los cuales son eliminados progresivamente a lo largo de la vida reproductiva del animal. Algunos folículos primordiales dejan continuamente esa reserva, que no está en crecimiento, para convertirse en *folículos primarios* en los cuales el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células de la granulosa cuboidales, descendientes estas últimas de las células de la pregranulosa. Luego, el folículo

comienza su crecimiento y desarrollo, culminando en la ovulación o más comúnmente siguiendo el destino de la atresia en algún estadio de su desarrollo. Uno de los pasos más críticos en la foliculogénesis es la transformación de folículo primordial a folículo primario. La conversión de las células delgadas de la pregranulosa en un epitelio cuboidal parece depender de una señal provista por el ovocito, pero la naturaleza de la misma es desconocida. Por una serie de divisiones mitóticas, el folículo primario unilaminar se convierte en un *folículo secundario*. Este es un estadio multilaminado preantral, que en varios momentos de la historia de su vida se envuelve con células de la teca. Con la aparición de una cavidad antral, el folículo secundario se convierte en un *folículo terciario*. El folículo continúa su crecimiento después de ser seleccionado como dominante y entra en el estado pre-ovulatorio, conocido también como folículo de Graaf (Greenwald y Roy, 1994).



**Figura 17. Estadios del crecimiento folicular en mamíferos.** El crecimiento folicular comienza con los folículos primordiales del estadio 1 en el ovario, el cual consiste de un ovocito sin crecimiento rodeado por unas pocas células somáticas parecidas a las epiteliales. Cuando el crecimiento se inicia, en los folículos del estadio 2, las células que acompañan al ovocito se vuelven cuboidales. Durante los estadios 3-5 las células de la granulosa proliferan mientras que el ovocito incrementa su diámetro y deposita la zona pelúcida. En el estadio 6 una cavidad llena de fluido (antro) comienza a formarse y por el estadio 8, el antro se completa. Rodeado por una fina zona pelúcida, el ovocito crecido completamente se sitúa en el extremo de un tallo de células de la granulosa, el cual a su vez está rodeado por varias capas de células del cúmulo. En el estadio 9, el ovocito, el cual está detenido en metafase II de la meiosis es ovulado dentro del oviducto. El folículo que es dejado atrás se convierte en el cuerpo lúteo. Adaptado de Wassarman (2002).

El folículo de de Graaf consiste de dos compartimientos celulares. En el centro del folículo se encuentra el ovocito completamente desarrollado detenido en diplotene de la primera profase meiótica. El ovocito está posicionado en el extremo de un tallo de células de la granulosa rodeadas por varias capas de células del cúmulo y una gran cavidad llena de fluido. Al momento de la ovulación el ovocito es expulsado (aún rodeado por las células del cúmulo) dentro del oviducto (Wassarman, 2002) (Fig. 17). Detalles del desarrollo folicular para cerdos pueden observarse en la figura 18.



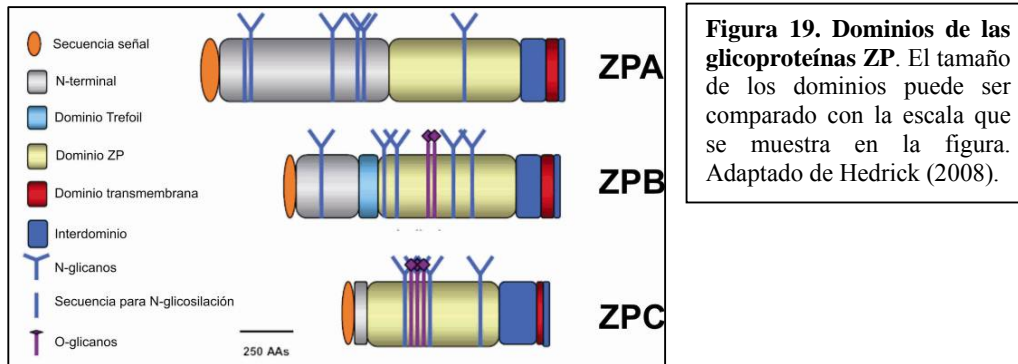
**Figura 18. Crecimiento del ovocito y del folículo y la adquisición de la competencia meiótica en cerdo.** Los días reportados para varios estadios del desarrollo están basados en el desarrollo *in vitro*. Adaptado de Hunter (2000).

### I.3.2. Zona pelúcida.

La membrana plasmática de los ovocitos de los mamíferos, incluyendo aquellos de los monotremas y marsupiales, está rodeada de una cubierta extracelular relativamente fina llamada zona pelúcida, derivado del latín que significa cinturón (*zona*) transparente (*pellucida*) (Wassarman y Litscher, 2008).

La ZP es una estructura elástica, compuesta de sólo unas pocas glicoproteínas (Wassarman, 1987), cada una de las cuales tiene una región conservada relativamente grande llamada dominio ZP (Bork y Sander, 1992). La ZP aparece durante el crecimiento del ovocito y el embrión en estadio de blastocito rompe la ZP antes de su implantación en el útero (Wassarman, 2008). En general, la ZP consiste de largas fibrillas o filamentos interconectados que exhiben una repetición estructural (Greve y Wassarman, 1985). El ovocito de cerdo está rodeado por tres glicoproteínas ZPA, ZPB y ZPC. Las glicoproteínas de la ZP contienen dominios conservados en todas ellas

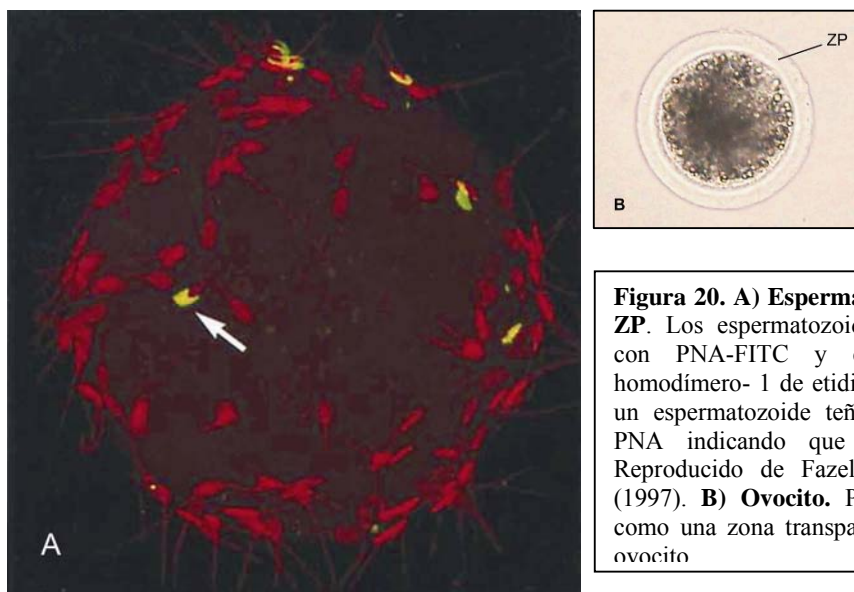
incluyendo una secuencia señal, secuencias para N-glicosilación, dominios ZP, sitios de clivaje por furina y secuencias transmembrana (Fig. 19) (Hedrick, 2008).



La unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida es un evento crucial en la fecundación (Wassarman, 1995) y se produce de manera especie-específica. El espermatozoide se une a la ZP, completa la RA y la penetra para alcanzar la membrana plasmática del ovocito y fusionarse con ella (Wassarman y Litscher, 2001).

Se sugiere que, en cerdos, la unión de un espermatozoide a ZP está mediada por residuos de carbohidratos presentes en las proteínas de la ZP (Berger y col., 1989) y que además se forma un complejo entre ZPB y ZPC que sería la unidad ligando funcional para el espermatozoide (Hedrick, 2008) (Fig. 20).

En otras especies como ratón se demostró que ZP3 es la glicoproteína que desencadena la RA en espermatozoides (Wassarman y Litscher, 2008).



**Figura 20. A) Espermatozoides unidos a ZP.** Los espermatozoides fueron teñidos con PNA-FITC y contrateñidos con homodímero-1 de etidio. La flecha indica un espermatozoide teñido por la lectina PNA indicando que ha sufrido RA. Reproducido de Fazeli y colaboradores (1997). **B) Ovocito.** Puede verse la ZP como una zona transparente que rodea al ovocito

#### **I.4. Ovulación y ciclo estral**

En los animales domésticos el apareamiento sólo ocurre durante el estro, que coincide con el momento de la ovulación. La duración del ciclo estral en las especies domésticas fluctúa entre los 16 y 24 días y para cerdas, es de 20 a 21 días. La duración del estro depende de la especie y varía ligeramente de una hembra a otra, en hembras de cerdo este período dura de 48 a 72 horas (Hafez, 1985). Esto también se aplica con el momento de la ovulación, que ocurre dentro de las 40 a 42 horas de comenzado el estro en hembras de cerda (Hunter, 1984). Para estudios de transporte de espermatozoides se han definido tiempos en relación a la ovulación. Hunter (1984) define los períodos pre-ovulatorios como las 38 horas desde el comienzo del estro, que son anteriores a la ovulación, de 38 a 42 horas como el período peri-ovulatorio, dentro del cual se produce la ovulación y de 42 a 44 horas como el período post-ovulatorio. Sin embargo, a través de ultrasonografía transrectal, otros autores pudieron definir períodos más precisos de tiempo, siendo: 8 a 10 horas el período pre-ovulatorio, luego el período peri-ovulatorio, de 2 horas, en el cual los folículos ya no son visibles y el período post-ovulatorio como el período de entre 8 y 10 horas luego de la ovulación (Mburu y col., 1997; Tienthai y col., 2004).

#### **I.5. Tracto reproductivo de la hembra**

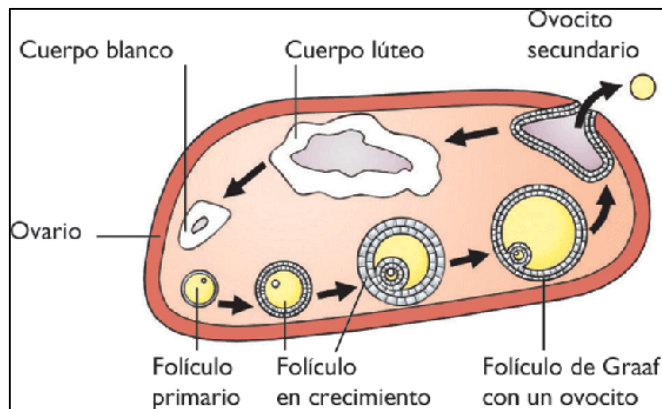
##### **I.5.1. Ovario**

La principal función del ovario es la diferenciación y la liberación de ovocitos proveyendo a la fecundación y así, a la propagación de la especie. Adicionalmente, el ovario produce hormonas esteroideas que permiten el desarrollo de las características sexuales secundarias y también el desarrollo de la preñez (Vanderhyden, 2002).

En hembras polítoacas los ovarios tienen aspecto de racimos de uvas debido a la presencia de varios folículos maduros. En el ovario se distinguen dos zonas: la corteza o zona parenquimatosa y la médula o zona vascularizada. La corteza contiene los folículos, cuerpos lúteos (estructura glandular vascularizada proveniente de la transformación del folículo luego de la ovulación) y cuerpos blancos (Claver y col., 1984) (Fig. 21).

##### **I.5.2. Útero**

El útero de la hembra de cerdo es bipartido como el de las especies polítoacas domésticas (con camadas numerosas), como también ocurre en los carnívoros.



**Figura 21. Esquema del ovario de mamífero.** En el esquema se muestra el desarrollo de los folículos y la formación y regresión del cuerpo lúteo. Tomado de: <http://images.google.com.ar/images?gbv=2&hl=es&client=firefox-a&rls=org.mozilla:es-AR:official&q=esquema+ovario&sa=N&start=36&ndsp=18>

Originariamente es una expansión muscular ensanchada del oviducto, donde se desarrollarán el o los embriones con sus envolturas. La particularidad del útero es su capacidad de regresar o involucionar hacia la forma y tamaño previos a la gestación.

Este órgano está revestido por un epitelio simple y/o pseudoestratificado y el cuello o cervix es la barrera fisiológica que separa el interior del útero del exterior del organismo (Claver y col., 1984).

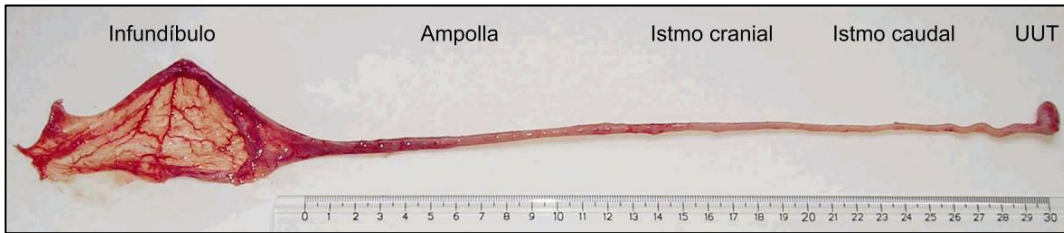
### I.5.3. Oviducto

El oviducto es, en los mamíferos euterios, el lugar donde ocurren la interacción entre las gametas, la posterior fecundación y los primeros estadios del desarrollo del embrión. Esto implica interacciones no solo entre los espermatozoides y los ovocitos, sino también entre las gametas y las células somáticas del oviducto y sus secreciones (Töpfer-Petersen y col., 2002).

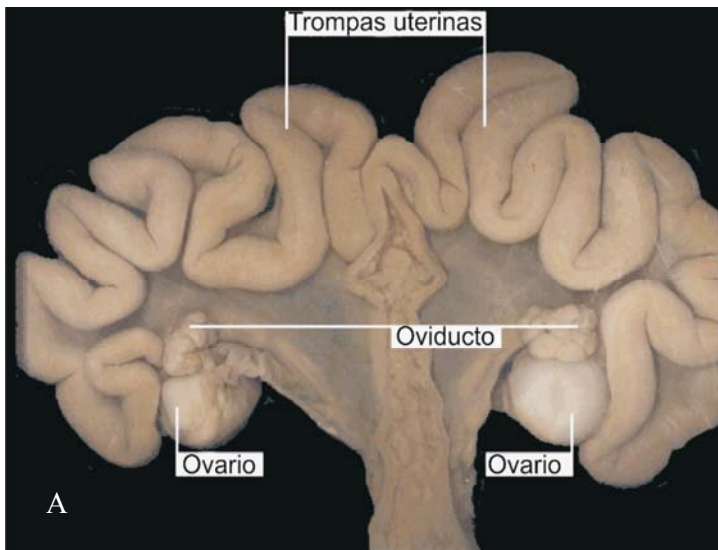
El ovocito y el oviducto coordinan las funciones del espermatozoide para que la unión entre el espermatozoide y el ovocito ocurra en el momento exacto y el lugar correcto (Töpfer-Petersen, 1999).

El oviducto es un tubo largo y tortuoso que conecta el ovario con el útero (Claver y col., 1984) (Fig. 22).

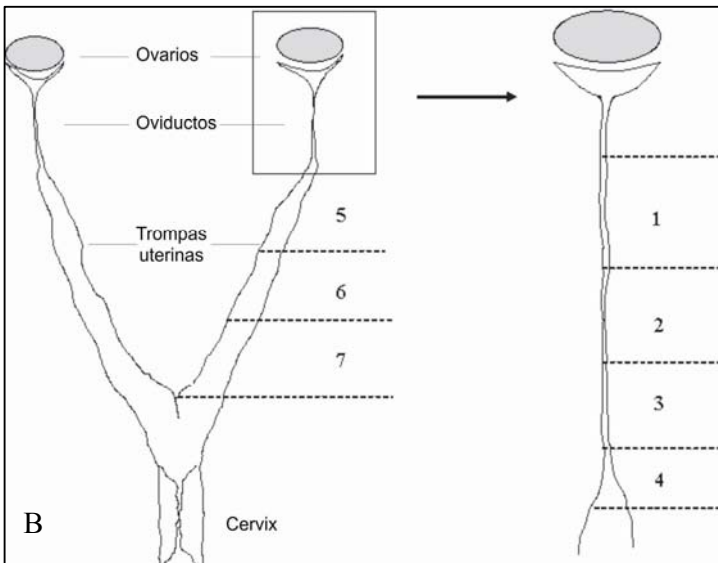
En la figura 23 A se observa una fotografía del tracto reproductivo de la hembra de cerdo y en la 23 B se presenta un esquema con las divisiones del tracto genital de cerdo hembra.



**Figura 22. Fotografía de un oviducto diseccionado.** En la fotografía se indican las distintas partes del oviducto. UUT es la unión útero-tubal, región que conecta el oviducto con el útero.

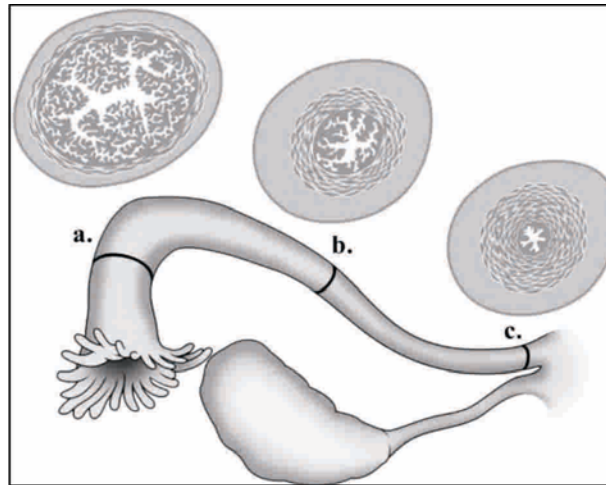


**Figura 23. A. Fotografía del tracto reproductivo de cerdo hembra.** En la fotografía se indican las principales partes anatómicas del tracto reproductivo del cerdo hembra. Adaptado de <http://upper%20reproductive%20tract-pig>. **B. Esquema del tracto reproductivo de la hembra.** Las divisiones indicadas en el esquema son: 1) ampolla, 2) istmo craneal, 3) istmo caudal, 4) unión útero-tubal, 5) trompa uterina craneal, 6) trompa uterina media y 7) trompa uterina caudal. Adaptado de Tummaruk (2007).



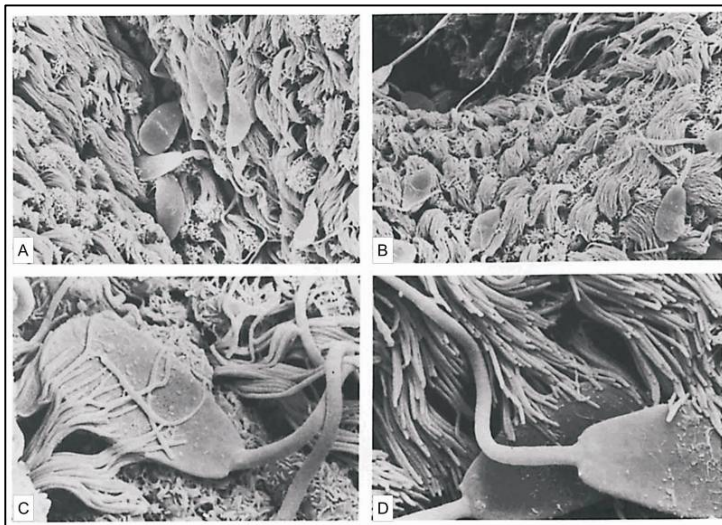
La mucosa tubal está organizada en pliegues longitudinales, los cuales se vuelven más enrevesados hacia el extremo craneal (Fig. 24). El oviducto tiene un epitelio cuboidal o columnar, el cual a menudo aparece como pseudoestratificado. Los

dos principales tipos celulares son células ciliadas y secretoras. Las células ciliadas se encuentran predominantemente en el ápice de los pliegues de la mucosa (Lyons y col., 2006).



**Figura 24. Ilustración del oviducto.** Secciones transversales de las diferentes partes del oviducto. a) Infundíbulo, b) ampolla, c) istmo. Adaptado de Lyons (2006).

Luego de la inseminación, millones de espermatozoides ingresan al tracto reproductivo de la hembra, de los cuales solo unos miles atraviesan la unión uterotubal. En la mayoría de las especies de mamíferos, la unión uterotubal actúa como un filtro selectivo para los espermatozoides móviles con morfología superior (Waberski y col., 2006).



**Figura 25. Micrografías electrónicas de espermatozoides de toro y epitelio oviductal.** A y B. espermatozoides unidos a las células epiteliales de los pliegues secundario del oviducto. C y D. Detalle de los espermatozoides unidos. Adaptado de Lefebvre, 1995.

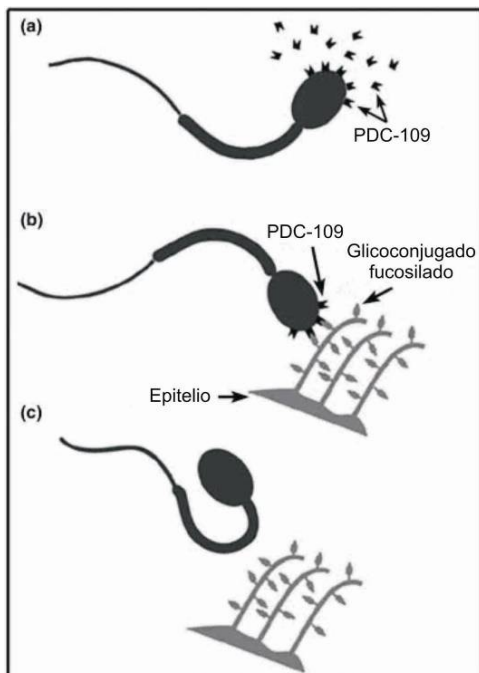
Muchos de los espermatozoides que ingresan al istmo oviductal generan un reservorio mediante la unión de los mismos a las células epiteliales ciliadas (Fig. 25)

(Lefebvre y col., 1995). El tiempo de permanencia de los espermatozoides en el reservorio varía con la especie (Green y col., 2001).

Si bien la base molecular de la interacción espermatozoide-célula oviductal aún no se ha establecido, se ha demostrado la intervención de carbohidratos en estas uniones (Green y col., 2001; Suarez, 2001). Actualmente se sostiene la hipótesis de que la interacción es mediada por glicoproteínas de las células oviductales y moléculas de tipo lectina de los espermatozoides (Töpfer-Petersen y col., 2008). Trisacáridos Lewis-a han demostrado inhibir la unión del espermatozoide de toro al epitelio oviductal (Suarez, 1998) y se han propuesto a las anexinas A1, A2, A4 y A5 como los receptores oviductales para dicha interacción en la que jugarían un rol significativo las espermadhesinas PDC-109, BSPA3 y BSP30K (Ignotz y col., 2007) (Fig. 26).

En cerdos se ha propuesto a la espermadhesina AQN1 como molécula espermática involucrada en la formación del reservorio (Ekhlesi-Hundrieser y col., 2005) y no se han propuesto receptores oviductales para dicha interacción.

En un momento cercano a la ovulación los espermatozoides unidos al epitelio oviductal responden a señales aún desconocidas desarrollando motilidad hiperactivada, y liberándose de dicho epitelio para desplazarse hacia la ampolla, sitio donde ocurre la fecundación (Suarez, 2001).



**Figura 26. Esquema propuesto para la unión del espermatozoide de toro al epitelio oviductal.** a) espermatozoide en semen: PDC-109 secretada por las vesículas seminales se une a la membrana plasmática pero también permanece en exceso en plasma seminal. Bajo estas condiciones se prevendría la unión del espermatozoide a cualquier molécula fucosilada en el epitelio en el sitio de deposición, en el tracto femenino. b) espermatozoide en el oviducto: componentes del plasma seminal se han dejado atrás, permitiendo a PDC-109 en la superficie del espermatozoide unir al espermatozoide a moléculas fucosiladas en el epitelio oviductal. c) PDC-109 se pierde de la cabeza del espermatozoide capacitado permitiendo al espermatozoide liberarse del epitelio. La hiperactivación podría asistir en empujándolo del epitelio. Adaptado de Suárez (2002).

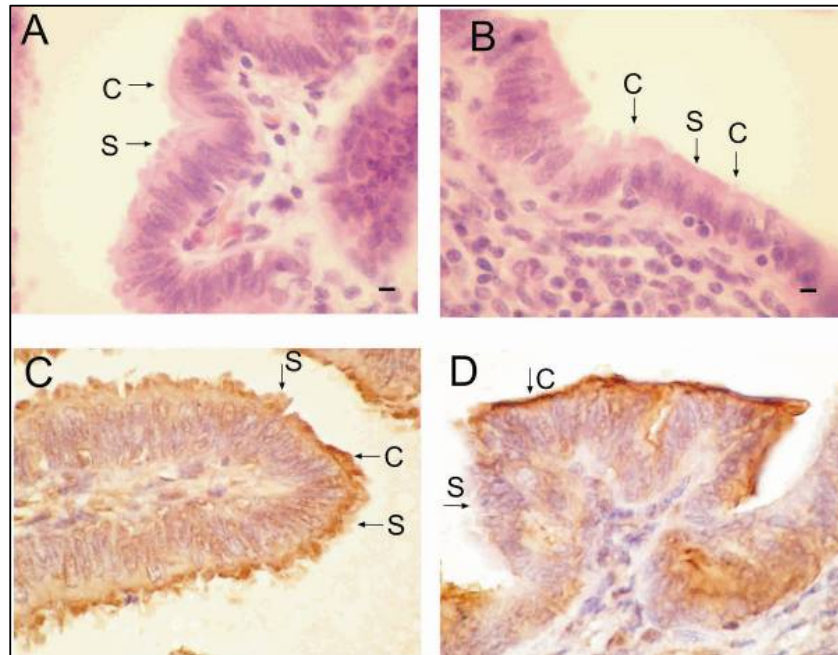
La formación del reservorio de espermatozoides permitiría: mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides hasta el momento de la ovulación, sincronizar el proceso de capacitación de los mismos con la ovulación, y controlar el transporte de los espermatozoides hasta la ampolla, contribuyendo así a la prevención de fecundación polispérmica (Suarez, 1998; Suarez, 2002). A partir del reservorio, un número restringido de espermatozoides son gradualmente liberados hacia el sitio de fecundación. De cualquier modo, hay una importante reducción del número de espermatozoides que alcanza la parte superior del oviducto, un hecho que contribuye fuertemente a la relación fisiológica 1:1 espermatozoide-ovocito en el momento de la fecundación *in vivo* (Rodríguez-Martínez y col., 2005).

Experimentos de extracción quirúrgica del istmo o anastomosis del oviducto realizados *in vivo* han demostrado que estas prácticas no inhiben la fecundación, pero se observa una gran cantidad de espermatozoides unidos a la ZP de los ovocitos recuperados, viéndose incrementada así la polispermia (Hunter, 1981; Hunter y Leglise, 1971).

Al momento no hay un mecanismo que pueda explicar de modo satisfactorio esta reducción de espermatozoides en el sitio natural de fecundación, siendo la liberación gradual de espermatozoides por acción hormonal del folículo de de Graaf (Hunter, 2008) la hipótesis más aceptada.

En cerdos se ha identificado una glicoproteína de oviducto que es capaz de unirse a espermatozoides (Marini y Cabada, 2003). Esta glicoproteína exhibe grupos Gal $\beta$ 1-3GalNac, presenta una masa molecular aproximada de 85 kDa luego de ser deglicosilada y reducida, y posee puentes disulfuro intracatenarios. Esta glicoproteína se localiza en el borde apical de las células epiteliales ciliadas del lumen del istmo y en células ciliadas de la ampolla (Fig. 27) (Pérez y col., 2006).

Su localización y su propiedad de unirse a espermatozoides hacen de esta proteína una candidata para el estudio de su posible rol en eventos tempranos de fecundación, especialmente enfocados en la fisiología espermática.



**Figura 27. Localización de SBG en epitelio oviductal.** A) y B) cortes de ampolla e istmo teñidos con hematoxilina, respectivamente. C) y D) cortes de ampolla e istmo incubados con anticuerpos anti-SBG. C: células ciliadas, S: células secretoras. Reproducido de Pérez (2006).

### I.6. Modelo Biológico.

El cerdo (*Sus scrofa*) es un animal que ha sido domesticado hace siglos y su carne ha sido tradicionalmente consumida. Raramente se observa un animal de este tipo en estado salvaje y lo más frecuente es su domesticación para consumo humano, siendo su producción de importancia económica para la provincia de Santa Fe.

La producción de ganado porcino en Argentina está centrada en un 76% en la región centro. La provincia de Santa Fe es el mayor productor, con más de 500.000 cabezas, seguido por Córdoba y Buenos Aires, con cerca de 500.000 cabezas cada una ([http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/santa\\_fe\\_produccion\\_porcina.html](http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/santa_fe_produccion_porcina.html)).

En la provincia de Santa Fe, el área donde se desarrolla la actividad de cría de porcinos abarca las dos terceras partes del territorio provincial, siendo la actividad complementaria a la agricultura. El tamaño de las explotaciones corresponde en su mayoría a las categorías de pequeños y medianos productores.

Los emprendimientos nuevos o de mayor dimensión apuestan a una mayor incorporación de tecnología en lo nutricional, genética, sanidad y gestión empresarial. En los últimos años se observa que, para evitar los períodos de desabastecimiento de

cachorros de invernada, algunas plantas frigoríficas han orientado parte de sus inversiones al desarrollo de granjas de producción de ciclo completo. Estos emprendimientos con un elevado nivel de asesoramiento técnico han alcanzado valores productivos que son equiparables a las mejores áreas de producción de cerdos del mundo.

Además, acompañando a la producción, existen granjas destinadas a la obtención de animales reproductores puros de pedigrí e híbridos comerciales, con capacidad de proveer material genético mejorado con garantías sanitarias.

Según un informe de la Dirección General de Sanidad Animal del Ministerio de la Producción (año 2005), existen en Santa Fe 15 establecimientos frigoríficos faenadores de porcinos, funcionando bajo la supervisión del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), que se nutren principalmente de la producción regional.

El rendimiento en la producción animal y la calidad genética de los mismos están íntimamente ligados a la eficiencia reproductiva. La tecnología en reproducción es bien aceptada por los productores de ganado porcino, siendo la inseminación artificial de uso común.

Actualmente es posible realizar fecundación *in vitro*, obtener cerdos transgénicos, conservar semen congelado o refrigerado, madurar gametas *in vitro*, realizar inseminación artificial a distintos niveles del tracto reproductivo, etc. Sin embargo, ninguna de estas tecnologías ha alcanzado su máximo desarrollo.

La fecundación *in vitro* no presenta una eficiencia óptima y la fecundación polispérmica es frecuente (Abeydeera, 2001; Funahashi, 2003; Nagai y Moor, 1990); el semen congelado-descongelado presenta características diferentes del sin congelar que disminuyen la eficiencia reproductiva al utilizarlo en inseminación artificial; el mantenimiento de semen a 16°C como temperatura óptima limita su utilización a distancia del lugar en que se obtiene; la maduración de gametas *in vitro* podría ser mas eficiente; la inseminación artificial, con sus variantes, también es afectada por la fecundación polispérmica, etc.

Dado que la fecundación, maduración de gametas, selección de espermatozoides, conservación de los mismos, ocurren *in vivo* en el oviducto, el estudio de los factores oviductales que intervienen en estos procesos podría mejorar la eficiencia de la tecnología reproductiva.

Por otra parte, el cerdo ha sido utilizado para diversas aplicaciones en medicina humana. Las más reconocidas son: el uso de válvulas cardíacas para su implantación en

humanos (hoy sustituidas mayoritariamente por válvulas humanas) o de insulina porcina para diabéticos insulino-dependientes (actualmente reemplazada por insulina obtenida por métodos recombinantes). Así mismo, se emplea piel de cerdo en casos de quemaduras graves. Además, se trata de animales con órganos de tamaño similar a los humanos, con un nivel de respuesta fisiológica equivalente y que se reproducen adecuadamente en cautividad en tiempos cortos y camadas grandes. (<http://www.trans-net.org/xenotras/debate.htm>).

Dada la expectativa de que proteínas porcinas y humanas homólogas compartan su comportamiento fisiológico, el uso de este modelo permitiría además realizar estudios que por razones éticas no pueden llevarse a cabo en seres humanos.

## **Capítulo II**

## **II. OBJETIVOS.**

### **II.1. Objetivos generales.**

El objetivo de este trabajo es ahondar en el conocimiento de los eventos tempranos de la fecundación, especialmente en la identificación y caracterización de moléculas involucradas en las etapas tempranas del reconocimiento y adhesión entre gametas y células epiteliales del oviducto de mamíferos. Este conocimiento aportará datos para explicar los mecanismos por los cuales las gametas se tornan "aptas" para la fecundación.

### **II.2. Objetivos particulares.**

**I.** Dilucidar el rol biológico de SBG (glicoproteína de epitelio oviductal de cerdo): a) determinar la influencia de SBG sobre los procesos fisiológicos que ocurran en el espermatozoide (capacitación, reacción acrosómica, vitalidad) al contactar con la misma. b) estudiar la posible influencia de SBG en la unión de los espermatozoides a las células epiteliales.

**II.** Investigar la posible interacción de SBG con moléculas de superficie de membrana de espermatozoides homólogos e identificar dichas moléculas.

## **Capítulo III**

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **III.1. Obtención de muestras**

##### **III.1.1. Obtención de oviductos.**

Los oviductos de hembras de bovino y porcino fueron obtenidos en un frigorífico (Frigorífico Paladini S.A., Rosario, Argentina) y los oviductos de mujeres y de hembras de perro, gato, ratón y conejo, a través de cirugía. Luego los oviductos fueron transportados en hielo hasta el laboratorio donde fueron utilizados inmediatamente o congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los oviductos de mujeres fueron obtenidos con el debido consentimiento del paciente y gentilmente cedidos por el Dr. Sergio Ghersevich de la cátedra de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Los oviductos de hembras de perro y gato fueron cedidos por IMUSA (Instituto de Sanidad Animal, Rosario).

##### **III.1.2. Obtención de muestras de semen**

El semen fue obtenido de cerdos machos adultos fértiles a través de la técnica de mano enguantada (Med. Vet. Fernando Cane del Instituto de Porcinotecnia, Chañar Ladeado, Argentina). La fracción rica de espermatozoides fue diluída en diluyente comercial Cronos (Laboratorio MediChimica, Reggio Emilia, Italia) y conservada a  $16^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (no más de 24 h). La calidad de las muestras fue establecida por la evaluación de la motilidad, vitalidad, concentración y parámetros morfológicos (Althouse, 1997). Los espermatozoides fueron centrifugados a  $700g$  durante 5 min y lavados 2 veces por centrifugación en el medio usado en cada experimento. El pellet fue resuspendido en concentraciones y en medios diferentes, que se indican en cada experimento en particular. El plasma seminal fue obtenido por centrifugación del semen durante 10 min a  $700g$ . Los testículos utilizados fueron obtenidos en el momento del sacrificio del animal.

##### **III.2. Incubación de espermatozoides.**

Para los experimentos de coincubación con glicoproteínas los espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración final de  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml en los medios correspondientes a cada experimento y alícuotas de  $100 \mu\text{l}$  fueron incubadas en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Como medio capacitante se utilizó TALP y TALP sin calcio y sin bicarbonato como medio no capacitante. En este último y en los medios sin calcio o sin bicarbonato las osmolaridades fueron ajustadas con el agregado de cloruro de sodio. Las

glicoproteínas que fueron utilizadas en las incubaciones fueron resuspendidas en los mismos medios en los cuales se realizó el experimento. Los medios con las glicoproteínas agregadas fueron controlados a fin de mantener la osmolaridad en un rango de 285-315 mOsm.

### **III.3. Preparación de extractos proteicos.**

#### **III.3.1. Extractos proteicos de membranas de células epiteliales de oviducto.**

La preparación de extractos proteicos de membranas de células epiteliales se realizó en base a Marini y Cabada (2003). Cada oviducto fue separado de los tejidos circundantes, se lavó el órgano haciendo pasar a su través 2 ml de TALP con una jeringa y aguja 21G y luego fue abierto longitudinalmente. Se procedió al raspado con el borde sin filo de un bisturí y los colgajos de células epiteliales fueron resuspendidos en TALP. Se separaron mecánicamente las células epiteliales mediante sucesivos pasajes por la aguja 21G y se lavaron con TALP por centrifugación a 650g durante 5 min a 4°C. Las células obtenidas de la última centrifugación fueron resuspendidas en agua destilada a 4°C y la suspensión de células se trasvasó a un homogenizador Potter-Elvehjem. Las células se rompieron por acción mecánica en el homogenizador y por el efecto osmótico. Esta suspensión se centrifugó nuevamente a 650g y el sobrenadante fue ultracentrifugado a 150.000g durante 1 h a 4°C. El extracto de proteínas se obtuvo resuspendiendo el pellet de la ultracentrifugación en 500 µl de Tris-HCl 10 mM, Tritón 0,2% o en NaCl 0,5 M para extracciones diferenciales de complejos anexina A2/S100A10, y en Tris-HCl 10 mM, Tritón 0,2% para SBG. En este último caso, los extractos fueron dializados contra TALP (véase apéndice de soluciones).

#### **III.3.2. Extractos proteicos de espermatozoides.**

##### **III.3.2.1. Proteínas de superficie.**

40 ml de semen conteniendo  $2,5 \times 10^7$  espermatozoides/ml fueron centrifugados a 700g durante 5 min a 16°C y resuspendidos en Tris-HCl 10 mM, NaCl 145 mM. La suspensión espermática fue incubada en hielo durante 1 hora y luego centrifugada a 700g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante fue centrifugado a 16.000g y las proteínas solubles fueron dializadas contra agua, liofilizadas y resuspendidas en agua o TALP según el caso.

**III.3.2.2. Extractos de proteínas totales de espermatozoides.**

Para la extracción de proteínas totales utilizadas en SDS-PAGE, los espermatozoides fueron resuspendidos en solución de siembra y hervidos durante 3 min a 95°C.

**III.3.2.3. Obtención de fracciones enriquecidas en membranas periacrosomales de espermatozoides.**

Para obtener fracciones enriquecidas en membranas periacrosomales de espermatozoides se procedió según Marini y Cabada (2003). Los espermatozoides fueron centrifugados durante 10 min a 1000g a 16°C, luego de resuspenderlos en 0,1 X Ringer, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 se los incubó 40 min en hielo y se procedió a centrifugar la suspensión a 1000g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a 150000g durante 1 h a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en agua destilada o Tris-HCl 10 mM pH 7,5 según corresponda para su posterior utilización.

**III.4. Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (1951) usando albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Bs As, Argentina) como estándar o alternativamente utilizando Qubit (Invitrogen, Bs As, Argentina) según las instrucciones del fabricante.

**III.5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida fueron realizadas de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles verticales en placas de 80 mm de altura, 100 mm de ancho y 0,75 o 1 mm de espesor. El gel de concentración fue preparado a una concentración 5% de poliacrilamida (Neolab, Argentina) y el gel de separación de acuerdo a la requerida para cada experiencia. Las muestras fueron suplementadas con solución de siembra (ver apéndice de soluciones). Previo a sembrarlas, las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento, en baño de agua hirviendo, durante 3 min. Las electroforesis se realizaron a 15 mA hasta que el frente de corrida llegó al fin del gel, utilizando equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (BioRad, Hercules, CA, EE.UU).

**III.6. Electroforesis bidimensionales.**

Las muestras utilizadas para electroforesis bidimensional fueron disueltas en soluciones tampón según las características de cada muestra utilizada. Alícuotas de 125 µl de las muestras así disueltas se utilizaron para hidratar tiras para isoelectroenfoque de 7 cm y con un rango de pH 3-10 (ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad, Tecnolab, Argentina). Las proteínas fueron resueltas a 10,000 V-h usando Protean® IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) o alternativamente Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Bs As, Argentina). Luego del isoelectroenfoque las tiras fueron equilibradas en las soluciones tampón correspondientes y fijadas en el borde superior de geles de separación. La segunda dimensión se llevó a cabo en Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**III.7. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Una vez finalizadas las electroforesis, las proteínas fueron detectadas en los geles por tinción con 0,2% Azul de Coomassie R 250 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EE.UU) en etanol-ácido acético-agua (40:10:50) durante 1 hora y posterior decoloración con etanol-ácido acético-agua (40:10:50). Alternativamente y para obtener mayor sensibilidad, se utilizó tinción con plata (Rabillond y col., 1994) o tinción de PAS-plata para la identificación de glicoproteínas (Gradilone y col., 1998).

**III.8. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa o PVDF.**

Una vez finalizadas las electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron durante 30 minutos en solución tampón de transferencia (20% metanol, glicina 0,15 M, Tris-HCl 25 mM pH 8,3) (Towbin y col., 1979) y la transferencia se llevó a cabo en Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 30 mA durante toda la noche o 1h a 250 mA a 4°C.

**III.9. Revelado con anticuerpos (western blot).**

Las membranas de nitrocelulosa o PVDF con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con una solución de bloqueo de leche descremada 5% (P/V) en TBS 1X a temperatura ambiente durante 1 h con agitación. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora o toda la noche en TBS 1X con el agregado de anticuerpo específico. Luego de realizar tres lavados de 5 minutos en TBS 1X se incubó con anticuerpos secundarios durante 1 h, transcurrido ese tiempo se realizaron lavados con TBS y T-TBS y el revelado se llevó a cabo mediante el uso de un ECL Kit (GE Healthcare,

Buenos Aires, Argentina) según las instrucciones del fabricante. Cuando se requirió, las membranas fueron teñidas durante 5 min con rojo Ponceau (ver apéndice de soluciones) y desteñidas por lavados con agua destilada y luego con TBS antes de proceder con el bloqueo.

### **III.10. Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados en este trabajo de tesis fueron: anticuerpos policlonales anti-SBG (Pérez y col., 2006), anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina (clon 4G10, Upstate, Lake Placid, NY, USA), anticuerpos monoclonales anti-anexina A1, A2 y A5 (cedidos por el Dr. George Igotz, Universidad de Cornell, USA), anticuerpos monoclonales HH7 anti-anexina A2 (cedidos por el Dr. Volker Gerke, Universidad de Münster, Alemania), anticuerpos monoclonales anti-S100A10 (cedidos por el Dr. Christian Melle, Universidad de Jena, Alemania), anticuerpos monoclonales anti-dermcidina (cedidos por el Dr. Akihiko Kimura, Universidad Medica Wakayama, Japón), anticuerpos policlonales anti-GST (cedidos por el Lic. en Biotecnología Enrique Morales, IBR-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Argentina), anticuerpos policlonales anti-AKAP 4 (cedidos por el Dr. Michael Eddy, NIH, USA), anticuerpos anti-S100A7 obtenidos en este trabajo de tesis, anticuerpos policlonales anti-S100A7 cedidos por el Dr. Peter Watson (Deeley Research Center, BC Cancer Agency, Canada), anticuerpos policlonales anti-DMBT1 (cedidos por Prof. Dr. Jan Mollenhauer, Universidad del Sudeste de Dinamarca, Dinamarca).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpos anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Amersham Life Sciences, San Francisco, CA, USA), anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Amersham Life Sciences, San Francisco, CA, USA), anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a Cy3 (Chemicon Internacional, Inc, USA), anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a Cy3 (Chemicon Internacional, Inc, USA), anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a fluoróforo verde Alexa 488 (Invitrogen, Argentina).

### **III.11. Preparación de columnas de afinidad.**

#### **III.11.1. Columnas de afinidad para purificación de SBG y anexinas.**

Para purificar SBG se utilizaron columnas construidas a partir de 1 g de Sepharose CL 4B (Sigma, Buenos Aires, Argentina). Luego de la hidratación de la resina, esta fue lavada con HCl 1 mM y posteriormente con NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,5 M

durante 1 h. Se agregaron las fracciones de membranas periacrosomales de espermatozoides obtenidas como se indicó anteriormente y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Los sitios reactivos remanentes se bloquearon incubando la resina con glicina 0,2 M pH 8. Luego de 5 ciclos de lavados alternados con  $\text{NaHCO}_3$  0,1M,  $\text{NaCl}$  0,5 M pH 8,3, y acetato de sodio 0,1 M pH 4 la resina fue empaquetada en columnas comerciales (Amersham Life Sciences, San Francisco, CA, EE.UU). Para la purificación de anexinas se utilizó el mismo procedimiento excepto que, las fracciones de membrana periacrosomales fueron resuspendidas en agua, pretratadas durante 30 min con dimetilpimelidato en una concentración final de 20 mM y luego se continuaron los pasos como se detalló anteriormente.

### **III.11.2. Columnas de afinidad para purificación de proteínas de unión a SBG.**

SBG purificada (véase sección III.12) fue acoplada a una matriz de Sepharose CL 4B. Luego de la hidratación de la resina, esta fue lavada con  $\text{HCl}$  1 mM y posteriormente con  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M,  $\text{NaCl}$  0,5 M, pH 8,3, durante 1 h. Se incubó la resina con 300  $\mu\text{g}$  de SBG durante 2 h en agitación y luego se bloquearon sitios activos con glicina 0,2 M pH 8. Se alternaron 5 ciclos de lavado con  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M,  $\text{NaCl}$  0,5 M, pH 8,3, y acetato de sodio 0,1 M, pH 4 y luego se empaquetó la resina en columnas comerciales de 0,7 cm de diámetro interno x 15 cm de largo (Thomas Scientific, Omnilab, Bs As, Argentina).

### **III.12. Purificación de SBG.**

Los extractos de proteínas de células oviductales preparados como se mencionó anteriormente fueron puestos en contacto con las fracciones de membranas de espermatozoides acopladas a la matriz de las columnas cromatográficas construidas como se indicó en la sección III.11.1. Luego de incubar los extractos durante 1 h dentro de la columna se procedió a lavar la columna con TALP hasta no observar proteínas en las fracciones de lavado. La elución fue llevada a cabo con Tris 10 mM,  $\text{NaCl}$  0,5 M pH 7,5 recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones correspondientes al único pico de absorbancia detectado a 280 nm fueron dializadas contra agua y resuspendidas en la solución a utilizar según el experimento. De esta manera SBG en forma nativa fue utilizada para los experimentos de coincubación con espermatozoides.

**III.13. Purificación de proteínas de unión a SBG.**

Para purificar proteínas de unión a SBG extractos proteicos de espermatozoides obtenidos a partir de la incubación de los mismos en Tris-HCl 10 mM, NaCl 145 mM (véase extractos proteicos de espermatozoides) fueron puestos en contacto con SBG acoplada a la matriz de Sepharose Cl 4B. Las proteínas de espermatozoides fueron dializadas contra agua, resuspendidas en TALP y sembradas en la columna. Luego de lavar la columna con TALP las proteínas unidas fueron eluidas con galactosa 200 mM disuelta en TALP. Las proteínas recogidas de dicha elución fueron dializadas contra agua, concentradas por liofilización y resueltas mediante electroforesis bidimensionales. Luego de la tinción con plata, los “spots” obtenidos fueron recortados del gel y enviados a secuenciar a través de espectrometría de masa a Prottech, Inc, Pennsylvania, USA.

**III.14. Evaluación de la morfología y vitalidad espermática.**

La morfología espermática se analizó mediante la tinción de Wells-Awa (1970). Los espermatozoides fueron fijados durante 15 min en solución formolada al 3%. Luego de centrifugar durante 5 min a 85000g los espermatozoides se resuspendieron en 1 ml de solución fisiológica. Después de centrifugar nuevamente la suspensión, el pellet fue resuspendido en 25 µl de citrato de sodio 2,9%. Se agregaron 50 µl de solución de tinción (véase anexo de soluciones) y se incubaron los espermatozoides durante 15 min. Luego se procedió a extender la suspensión en portaobjetos, se observaron los espermatozoides por inmersión y se contaron cien células espermáticas. Se consideraron espermatozoides con acrosomas intactos aquellos que mostraban los dos tercios anteriores de la cabeza teñidos de un color azul-verdoso con una región fina e intensamente teñida en el ápice de la cabeza y el tercio posterior de color rosa. Se contaron al menos cien espermatozoides.

La vitalidad se evaluó mediante la tinción con eosina-nigrosina (Althouse, 1997). Suspensiones espermáticas fueron mezcladas con un volumen igual de solución de eosina-nigrosina 0,5% y extendidas en portaobjetos atemperados. Los preparados se dejaron secar y se observaron en microscopio óptico convencional con un aumento de 400X contando al menos 100 células. La coloración rosa en la cabeza del espermatozoide era considerada como indicadora de espermatozoides muertos, así como también los espermatozoides con tinción parcial de la cabeza, generalmente observada en su región pos-acrosomal.

**III.15. Tinción con clortetraciclina (CTC)**

En un portaobjetos se mezclaron 5  $\mu$ l de suspensión de espermatozoides con 5  $\mu$ l de solución de tinción. Luego de 30 seg se agregaron 5  $\mu$ l de glutaraldeído 0,2 % en Tris 0,5 M pH 7,4. El cubreobjeto se montó con 5  $\mu$ l de una solución de montaje que reduce la pérdida de fluorescencia. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de epifluorescencia (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japan) y se contaron al menos cien espermatozoides en cada experimento.

**III.16. Detección de proteínas sobre células espermáticas.**

Para la detección de proteínas de espermatozoides sobre células espermáticas enteras, los espermatozoides fueron resuspendidos en solución fisiológica formolada al 4% en una concentración final de  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml. Se colocaron gotas de 5  $\mu$ l en portaobjetos comerciales preparados para tal fin (Frosted HiFix<sup>NH</sup>, TNT, Argentina) y se dejaron secar al aire. Se bloquearon sitios inespecíficos con PBS, BSA 2% y, según el caso, Tritón 0,2 %. Luego se incubaron con anticuerpos primarios en TBS en la concentración correspondiente durante toda la noche y luego de varios lavados con TBS se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos diluidos en TBS. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de epifluorescencia (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japan).

**III.17. Detección de proteínas sobre células epiteliales oviductales**

Para la detección de proteínas en raspados de células epiteliales oviductales se procedió a abrir longitudinalmente oviductos y raspar los mismos con el borde sin filo de un bisturí. Los raspados fueron disgregados mecánicamente por pasajes sucesivos a través de una aguja 21G. Las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación a 650g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS con o sin EGTA según los requerimientos del experimento en una concentración final de  $2 \times 10^7$  células/ml. Las células fueron fijadas en solución fisiológica formolada 4%, se colocaron gotas de 5  $\mu$ l en portaobjetos comerciales preparados para tal fin (Frosted HiFix<sup>NH</sup>, TNT, Argentina) y se dejaron secar al aire. Luego del secado se procedió a bloquear sitios inespecíficos con TBS, BSA 2%, Tritón 0,2 % durante 1 h y a continuación se incubó con anticuerpos primarios diluidos en TBS en la concentración correspondiente durante toda la noche. La detección posterior se llevó a cabo con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa y revelado con DAB.

**III.18. Detección de sitios de unión a SBG sobre espermatozoides.**

Para detectar los sitios de unión a SBG los espermatozoides fueron incubados durante 1 h a 37°C en TALP conteniendo 150 µg/ml de SBG. Las suspensiones fueron fijadas en formol 4 % en solución fisiológica y se colocaron gotas de 5 µl en portaobjetos optimizados para histoquímica. El bloqueo de sitios inespecíficos se llevó a cabo con PBS, BSA 2 %, Tritón 0,2 % durante 1 h y luego se incubó con anticuerpos anti-SBG (1:50) durante toda la noche a 4° C. Los controles se llevaron a cabo incubando los espermatozoides sin SBG. La inmunodetección se llevó a cabo mediante fluorescencia con anticuerpos secundarios conjugados a Cy3. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de epifluorescencia (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japan).

**III.19. Inmunohistoquímica****III.19.1. Preparación de criosecciones.**

Los oviductos fueron transportados en PBS mantenido en hielo hasta el laboratorio. Se cortaron secciones de istmo de 1 cm de longitud y se embebieron en criopreservante (Cryoplast, Biopack, Argentina). Secciones longitudinales de 5 µm de espesor fueron cortadas en criostato (Micron HM 500, Carl Zeiss, Buenos Aires, Argentina) y montadas en portaobjetos cubiertos de gelatina. Los cortes fueron fijados en acetona pura durante 10 min y secados al aire. Luego se lavaron con NaCl 135 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, Tritón 0,2% y se bloquearon sitios inespecíficos con TBS-BSA 2%. Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:100 para anti-anexina A1 y 1:50 para anti-anexinas A2 y A5. Luego de la incubación durante 1 h y lavados con PBS los cortes se incubaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugadas a Cy3. Las criosecciones fueron contrateñidas con hematoxilina y el cubreobjetos montado con 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano 0.22 M (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) disuelto en PBS: glicerol (9:1). Las observaciones se realizaron con microscopio de epifluorescencia (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japan) y los controles fueron hechos por omisión de anticuerpo primario.

**III.19.2. Preparación de cortes embebidos en parafina:**

Luego de la extracción de los órganos correspondientes, secciones de aproximadamente 1 cm x 1 cm fueron fijadas durante 24 h con formaldehído al 10% en PBS. Los pasos de deshidratación se llevaron a cabo de la siguiente manera:

1. alcohol etílico 70 % durante 1 h.

2. alcohol etílico 96 % durante 1 h
3. alcohol etílico 100 % durante 1 h, dos veces.
4. deshidratante durante 1 h, dos veces
5. tolueno durante 1 h, dos veces.
6. parafina durante 1 h
7. parafina durante toda la noche.

**Desparafinización de cortes:**

La desparafinización se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

1. dos incubaciones en xileno de 10 min cada una.
2. una incubación de 5 min en alcohol etílico 100 %.
3. una incubación de 5 min en alcohol etílico 95 %.
4. una incubación de 5 min en alcohol etílico 70 %.
5. dos incubaciones en agua destilada de 3 min cada una.
6. dos incubaciones en PBS de 10 min cada una.

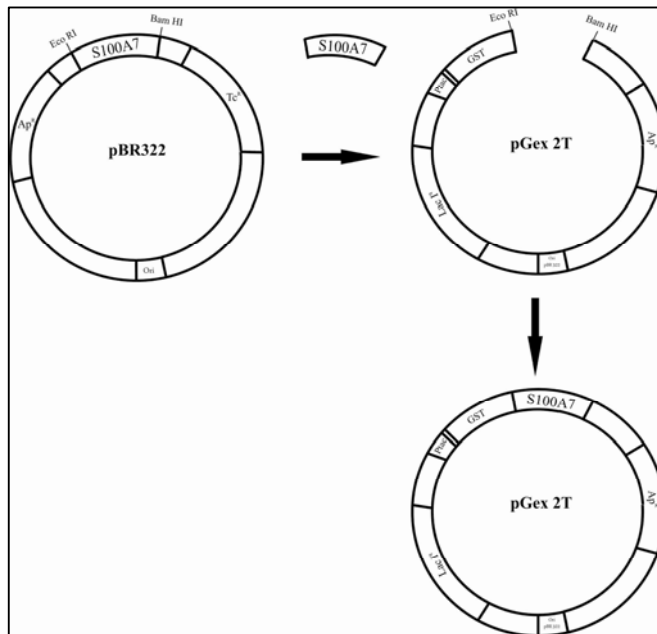
Luego de la desparafinización los cortes fueron bloqueados con TBS, BSA 2 %, Tritón 0,2 % durante 1 h. Después de realizar varios lavados con TBS los cortes fueron incubados con anticuerpos a la dilución adecuada durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos o a peroxidasa según el caso. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de epifluorescencia (BH2, Olympus Optical Company Ltd., Tokyo, Japan).

**III.20. Estadística**

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado en colaboración con la Cátedra de Estadística de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. En cada caso los datos fueron analizados mediante un ANOVA para un modelo de efectos fijos, balanceado, con dos factores: "tiempo" y "tratamiento" y posterior aplicación de LSD. El modelo fue validado mediante el análisis de residuos. El cumplimiento del supuesto de normalidad fue estudiado a través de los coeficientes de sesgo y kurtosis estandarizados, la prueba gráfica de normalidad y el test de Shapiro Wilks. En todos los casos se concluyó que no había suficiente evidencia para sustentar un alejamiento significativo de la normalidad. En aquellas situaciones en que se rechazó la hipótesis de aditividad, la presencia de interacción se tuvo en cuenta estudiando el efecto de un factor dentro de cada nivel del otro.

### III.21. Subclonado del ADNc que codifica para S100A7 humana.

El Dr. Peder Madsen de la Universidad Aarhus de Dinamarca gentilmente nos envió un clon correspondiente a la proteína S100A7. El mismo consiste de ADNc de S100A7 obtenido a partir de ARNm humano y clonado en el plásmido pBR322. Dicho plásmido carece de las secuencias necesarias para poder sobreexpresar la proteína en bacterias, por lo tanto, el inserto fue transferido al vector pGex-2T (Fig. 28) mediante el corte con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El inserto subclonado en el vector pGex-2T genera una proteína de fusión a glutathione S-transferasa (GST), la cual puede ser purificada por cromatografía de afinidad. La expresión de la proteína recombinante se encuentra bajo la influencia del promotor **tac**, de modo que es inducible por isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG). La construcción se utilizó para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGex-2T-GST-S100A7), seleccionando por resistencia a ampicilina. Luego del aislamiento de colonias, sus plásmidos fueron purificados y enviados a un servicio de secuenciación para confirmar la secuencia del inserto. Una vez verificados la secuencia y el marco de lectura, se procedió a analizar la inducción de la expresión de GST-S100A7 mediante IPTG. La inducción se llevó a cabo con IPTG 0,5 mM y se evaluó la expresión de la proteína recombinante durante 1, 2, 4 y 6 horas.



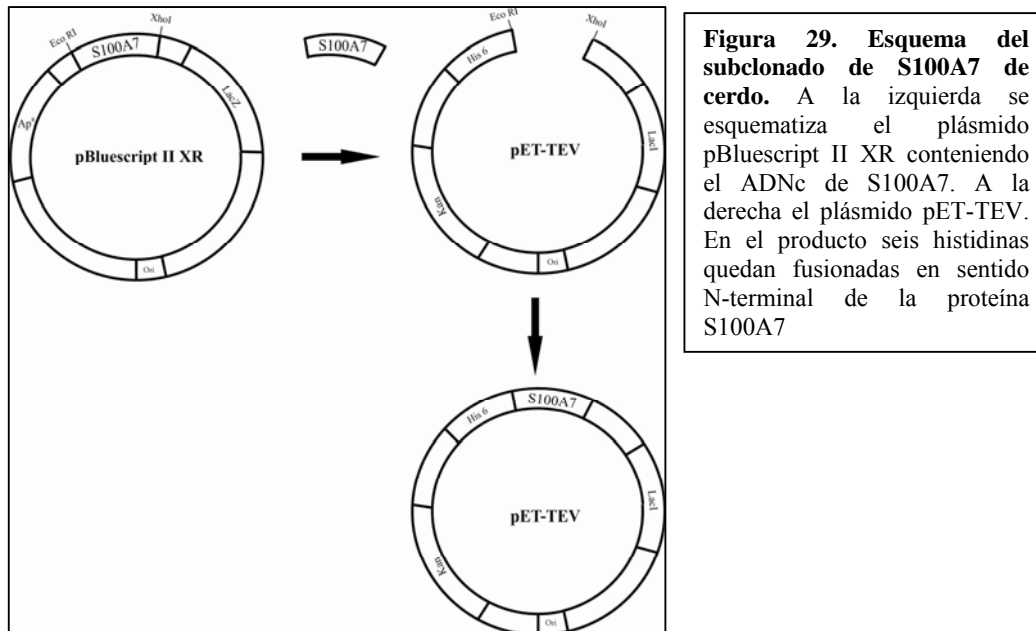
**Figura 28. Esquema del subclonado de S100A7 humana.**

A la izquierda se esquetiza el plásmido pBR322 conteniendo el ADNc de S100A7. A la derecha el plásmido pGex-2T. En el plásmido obtenido GST queda como proteína de fusión en sentido N-terminal de S100A7

### III. 22. Subclonado del ADNc que codifica para S100A7 porcina.

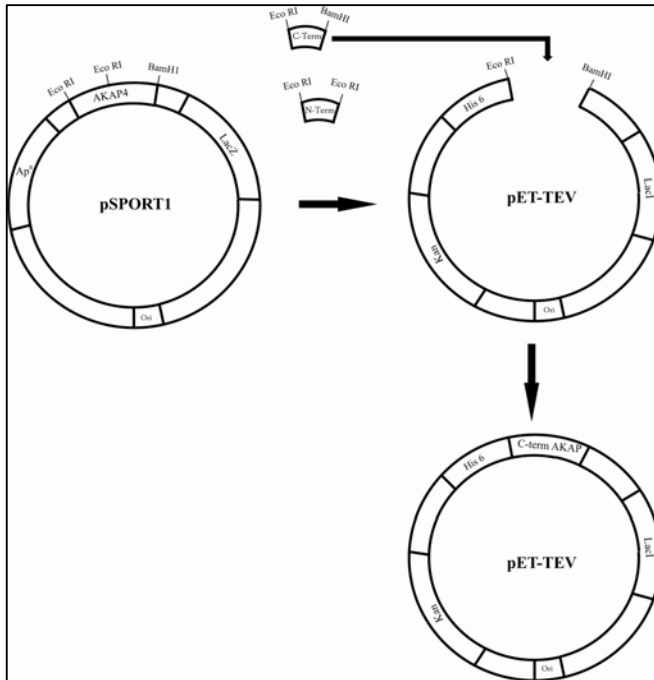
Un EST conteniendo el ADNc que codifica para S100A7 porcina fue cedido por el Dr. Claus B. Jørgensen (Universidad de Copenhague, Dinamarca). Dicho inserto había sido clonado a partir de ARNm porcino en el vector pBluescript® II XR. Se procedió a subclonar dicho inserto en el vector pET-TEV, un vector derivado del vector pET28-a, mediante el corte con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI.

La proteína recombinante generada contiene la secuencia completa de S100A7 porcina con seis histidinas fusionadas a su extremo aminoterminal. Con esta nueva construcción se transformó la cepa DH5α de *E.coli* y se seleccionaron las colonias por resistencia a kanamicina. Luego se procedió a transformar la cepa BL21(DE)3 de *E.coli* para poder expresar la proteína recombinante por medio de la inducción de IPTG. A continuación se presenta un esquema del subclonado (Fig. 29).



### III.23. Subclonado de la porción carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo

El ADNc correspondiente a AKAP4 de cerdo fue cedido gentilmente por el Dr. Wen-Chuan Lee (Instituto de Tecnología Animal, Taiwán). Éste había sido clonado en el vector pSPORT1 y el corte del mismo con las enzimas Bam HI y EcoRI genera dos fragmentos. Uno de los fragmentos fue subclonado en el vector pET-TEV por medio de las enzimas BamHI y EcoRI (Fig. 30). El fragmento subclonado corresponde a 387 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína, la cual quedó fusionada a una cola de 6 histidinas.



**Fig 30. Esquema del subclonado del dominio carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo.** A la izquierda se esquematiza el plásmido pSPORT1 conteniendo el ADNc de AKAP4. El corte con dos enzimas genera dos fragmentos, aquel que contiene el dominio carboxilo terminal del gen que codifica para AKAP4 porcina fue subclonado en el vector pET-TEV fusionado a 6 histidinas en el N-terminal

### III.24. Purificación de proteínas para obtención de anticuerpos

La purificación de GST-S100A7 se realizó a través de cromatografía de afinidad utilizando un matriz de Sepharose-glutathione® (Amersham, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Diez mililitros de cultivo se indujeron con IPTG 0,5 mM, luego se centrifugó a 2375g. durante 2 min y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS. El cultivo así resuspendido se sonicó con 6 pulsos de 5 segundos a 15% de la potencia. Luego de centrifugar el cultivo sonicado durante 20 min a 16000g el sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad y se procedió a eluir con glutatión reducido 10 mM pH 8. Para la purificación de S100A7 de cerdo y del fragmento C-terminal de AKAP4 se procedió a inducir la expresión de las proteínas en los cultivos correspondientes y el pellet de 1 ml de cultivo fue resuspendido en 100 µl de solución tampón de siembra sembrando una alícuota en un gel preparativo. La banda correspondiente a la proteína recombinante se cortó del gel y se procedió a electroeluir la proteína en un equipo de electroelución (Model 422, Electro-eluter, BioRad, Hercules, CA, USA).

### III.25. Generación de anticuerpos anti-S100A7 humana y porcina y anti-fragmento C-terminal de AKAP4.

Los métodos de purificación antes mencionados se utilizaron para obtener proteína recombinante a fin de ser utilizada para la generación de anticuerpos. Para la

inmunización de conejos se procedió según el protocolo estándar establecido por la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Se realizaron 3 inyecciones de 100 µg de proteína purificada y se utilizó el suero de los conejos inmunizados.

### **III.26. Inmunoprecipitación**

Se preparó un extracto de proteínas de células epiteliales oviductales como se mencionó en la sección III.3.1. Se tomaron 150 µg de proteínas del extracto, se disolvieron en una solución de NaCl y EGTA de modo que se llegara a una concentración final de NaCl 100 mM, EGTA 10 mM, Tritón 0,1% y se le agregaron 2 µl de anticuerpos HH7. La incubación del anticuerpo con el extracto proteico se realizó durante toda la noche a 4°C. Para la preparación de la resina de proteína A/G sepharose (Pierce®, Thermo Scientific, Rockford, USA) se procedió de la siguiente manera: se lavaron 100 µl de resina con TBS-BSA 1% 2 veces y se incubó con la misma solución durante 2 h a 4°C para bloquear sitios inespecíficos. Luego se lavó la matriz 3 veces con solución tampón IP y se la incubó 2h con el extracto de proteínas de células oviductales previamente incubado durante toda la noche con los anticuerpos. Finalizada la incubación, la matriz se lavó 3 veces con solución tampón IP usando 2 ml en cada lavado. Luego la resina se resuspendió en 25 µl de solución de siembra y se hirvió durante 3 min para resolver las proteínas inmunoprecipitadas en SDS-PAGE.

## Anexo de soluciones.

<b>Solución de Siembra 5X para proteínas</b>	Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
	SDS	5 % (P/v)
	Azul de bromofenol	0,025 % (P/v)
	Glicerol	25 % (V/v)
<b>Soluciones tampón para geles bidimensionales</b>	Solución de rehidratación	
	Urea	8 M
	Tiourea	2 M
	CHAPS	4 %
	DTT	100 mM
	Ampholites	2 %
	Solución de equilibrio I	
	Urea	6 M
	Tris-HCl (pH=8)	0,375 M
	SDS	2 %
	Glicerol	20 %
	DTT	2%
	Solución de equilibrio II	
	Urea	6 M
	Tris-HCl (pH=8)	0,375 M
	SDS	2 %
Glicerol	20 %	
Iodoacetamida	2,5 %	
<b>Solución de Corrida para geles de poliacrilamida</b>	Glicina	0,2 M
	Tris	25 mM
	SDS	0,1 % (P/v)
	pH	8,3-8,7
<b>Solución de Transferencia</b>	Tris	20 mM
	Glicina	150 mM
	Metanol	20 % (V/v)
<b>Solución PBS 10X</b>	NaCl	1,35 M

	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM
	pH	7,4
<b>Solución de Bloqueo Western Blot</b>	TBS	1X
	Leche en polvo descremada	5 % (P/v)
<b>Solución TBS 10X</b>	Na Cl	1,37 M
	Tris-HCl	0,2 M
	pH	7,5
<b>Solución IP</b>	Tris	25 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,2
<b>T-TBS</b>	TBS	0,5%
	Tween® 20	
<b>TALP (Tyrode's Albumin Lactate Piruvate)</b>	NaCl	114 mM
	KCl	3,2 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
	NaH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	0,3 mM
	Lactato de sodio	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2,0 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	Piruvato de sodio	0,2 mM
	Glucosa	5,0 mM
	BSA	6,0 mg/ml
<b>Tinción Wells-Awa modificado</b>	Citrato de sodio	2,9 %
	Etanol	95 %
	Eosina B	1 %
	Fast Green FCF	1 %
	Los colorantes deben estar disueltos en solución fisiológica	

<b>Solución de Tinción Wells-Awa</b>	1,7 partes de etanol 1,4 partes de Fast Green 0,7 partes de Eosina
<b>Solución de tinción CTC</b>	Clortetraciclina      750 $\mu$ M Tris                      20 mM NaCl                     130 mM D-L-cisteína          5 mM
<b>Solución de tinción rojo Ponceau</b>	Rojo Ponceau        0,1 g Acido acético        1 ml Agua destilada      99 ml
<b>Solución de montaje CTC</b>	Fenilendiamina 1%    100 $\mu$ l PBS 10 X              100 $\mu$ l Glicerol 87 %        500 $\mu$ l H <sub>2</sub> O destilada        300 $\mu$ l
<b>Ringer 10 X</b>	NaCl                     1,1 M KCl                      20 mM CaCl <sub>2</sub> 14 mM

## **Capítulo IV**

## **IV. PROTEÍNAS OVIDUCTALES QUE INTERACCIONAN CON ESPERMATOZOIDES**

### **IV.1. SPERM BINDING GLYCOPROTEIN (SBG)**

#### **IV.1.1. INTRODUCCIÓN.**

La formación de un reservorio de espermatozoides en el istmo del oviducto asegura que un número viable de espermatozoides esté disponible para la fecundación. La principal función de este reservorio podría ser la de mantener una población de espermatozoides viables, quiescentes y potencialmente fértiles por un período extendido de tiempo (más de 36 h en cerdo) (Hunter, 1981; Suarez, 1987). Los espermatozoides son liberados del reservorio en un número limitado, disminuyendo la polispermia (Hunter, 1995). Se propone además una función de selección de espermatozoides para este órgano.

Por otro lado, SBG es una glicoproteína que fue purificada por afinidad a membranas periacrosomales de espermatozoides a partir de extractos de células oviductales. Esta proteína conjugada al colorante fluorescente FITC tiene la capacidad de unirse a la cabeza de los espermatozoides. El análisis de los carbohidratos presentes en la glicoproteína nativa de masa molecular aparente 220 kDa revela que ésta expone residuos de Gal $\beta$ 1-3GalNac (Marini y Cabada, 2003). SBG se localiza en la región central del oviducto, limitándose a las dos terceras partes de la región superior de las criptas oviductales del istmo y a las células del lumen del ampulla (Pérez y col., 2006).

Considerando que SBG posee sitios de unión en la cabeza de los espermatozoides y que su localización en el oviducto le permitiría estar en contacto directo con los espermatozoides *in vivo*, resultó interesante evaluar la morfología de los espermatozoides que interaccionan con SBG. Además de estudiar si ésta ejercía algún efecto sobre la fisiología espermática, se estimó necesario continuar con la caracterización de la glicoproteína.

#### **IV.1.2. RESULTADOS.**

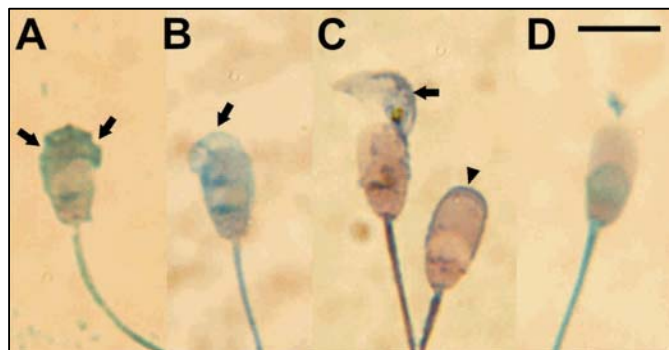
##### **IV.1.2.1. Rol biológico de SBG.**

###### **IV.1.2.1.1. Efecto de SBG sobre la morfología del espermatozoide.**

Para evaluar si SBG tenía algún efecto sobre la morfología espermática, los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes en medio TALP y en presencia de 150  $\mu$ g/ml de la glicoproteína durante 1 hora.

Al finalizar la incubación se analizó la morfología de los espermatozoides mediante tinción por la técnica de Wells-Awa (1970) y pudo observarse que un 93% de los mismos presentaban alteraciones morfológicas en sus acrosomas (AA) mientras que sólo un 4% presentaban AA en el medio control sin SBG. Estas AA estaban representadas en un 74% por espermatozoides con bordes irregulares en la región periacrosomal y con aparente pérdida de porciones de membrana (Fig. 32. A) y en un 16% por espermatozoides que presentaban hinchamiento en la región anterior de sus acrosomas (Fig. 32. B). Solamente un 6% de espermatozoides demostró tener sus acrosomas intactos (Fig. 32. C, cabeza de flecha) y la pérdida completa del acrosoma (Fig. 32. D) se observó en un 4% de los espermatozoides de la población. Sólo el 1% de los espermatozoides presenta sus membranas periacrosomales desprendidas del resto de la célula espermática (Fig. 32. C). Las proporciones de los distintos tipos de AA se encuentran resumidas en la tabla 1.

Al finalizar la incubación en presencia de SBG la motilidad de los espermatozoides estaba completamente abolida, mientras que la vitalidad la varió entre un 50% y un 55%.



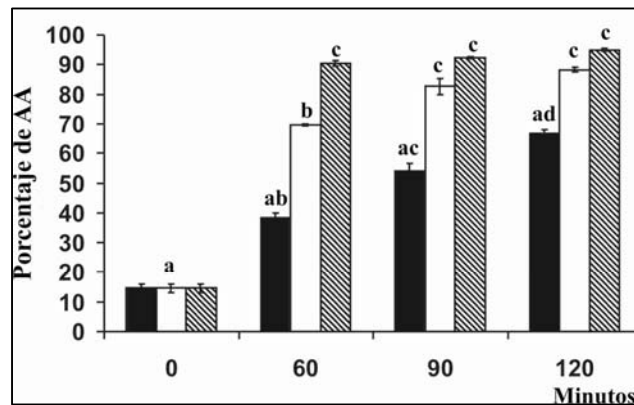
**Figura 32. Alteraciones acrosomales producidas por SBG.** Micrografía de espermatozoides de cerdo teñidos mediante la técnica de Wells-Awa. A- Irregularidades en los bordes de la región periacrosomal, B- hinchamiento del acrosoma, C- (flecha negra) membrana periacrosomal desprendida del resto del espermatozoide, (cabeza de flecha) espermatozoide con acrosoma intacto. D- Espermatozoide con pérdida total del acrosoma. La barra representa 10 µm.

Tipo de alteración	%
Bordes periacrosomales irregulares y pérdida de membrana	74,0 ± 1,7
Hinchamiento del acrosoma	16,6 ± 1,8
Membrana periacrosomal desprendida	1,0 ± 0,3
Sin acrosoma	4,6 ± 0,9
Acrosoma Intacto	6,6 ± 0,3

**Tabla 1.** Proporciones de los diferentes tipos de AA producidas por SBG. Los porcentajes de los valores están expresados como la media ± error estándar. n = 3

**IV.1.2.1.2. Efecto de SBG en función de la concentración y el tiempo.**

Se evaluó el efecto de SBG en función de la concentración y del tiempo en medio TALP, que promueve la capacitación de los espermatozoides. Se utilizaron concentraciones de 100 y 150 µg/ml de dicha glicoproteína y se evaluó el estatus acrosomal mediante la técnica de tinción Wells-Awa. Transcurridos 60 min de incubación, la proporción de espermatozoides con AA, contabilizada como los valores sumados de las cuatro alteraciones descritas y expresada en porcentaje, difiere significativamente ( $p < 0,001$ ) del medio control y existe una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre ambas concentraciones de la glicoproteína. A partir de los 90 minutos de incubación las diferencias entre ambas concentraciones de SBG no resultaron significativas (Fig. 33), pero sí se mantienen diferencias significativas con respecto al medio control. La tabla 2 muestra los valores obtenidos de alteraciones acrosomales en los distintos tiempos de incubación.



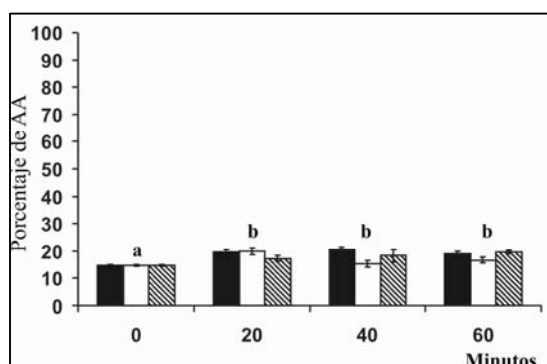
**Figura 33. Proporciones de espermatozoides con alteraciones acrosomales (AA) producidas por SBG en medio capacitante.** Los espermatozoides fueron incubados en TALP y en TALP con dos concentraciones diferentes de SBG. Se evaluó la morfología acrosomal mediante Wells-Awa. AA incluye las alteraciones de los espermatozoides indicados en la figura 1, incluidos los espermatozoides sin acrosoma. Los valores de AA en porcentaje se expresan como la media aritmética y las barras de error están representadas por el error estándar. Valores con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ).  $n=3$ . TALP (■), SBG 100 µg/ml (□) y SBG 150 µg/ml (▨)

	Tiempo de incubación (min)			
	0	60	90	120
Control	14,6 ± 1,4	38,3 ± 1,7	54,0 ± 2,4	66,6 ± 1,4
SBG 100 µg/ml	14,6 ± 1,4	69,6 ± 0,2	82,6 ± 2,7	88,3 ± 0,7
SBG 150 µg/ml	14,6 ± 1,4	90,3 ± 0,9	92,3 ± 0,2	95,3 ± 0,5

**Tabla 2.** Valores de AA obtenidos en la incubación de espermatozoides con SBG en medio capacitante. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar

**IV.1.2.1.3. Efecto de SBG en medio no capacitante**

Como se demostró en la sección IV.1.2.1.1 y IV.1.2.1.2, el efecto de SBG sobre espermatozoides se observó en un medio que promueve la capacitación. Con el fin de analizar si este efecto se mantiene en medios que no promueven la capacitación, es decir en un medio TALP que carece de calcio y bicarbonato, se realizaron experimentos coincubando la glicoproteína con los espermatozoides, evaluando su efecto a los 20, 40 y 60 min. En el medio no capacitante no se observó ningún efecto sobre la integridad de los acrosomas comparado con el medio que carece de glicoproteínas (Fig. 34). La tabla 3 resume los valores obtenidos en el experimento.



**Figura 34. Proporciones de AA producidas por SBG sobre espermatozoides en condiciones no capacitantes.** AA corresponde a las alteraciones mostradas en su conjunto. El porcentaje de AA está expresado como la media ± error estándar de la media. Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas, n=3. Medio que contiene 0 (■), 100 μg/ml de SBG (□) o 150 μg/ml SBG (▨)

	Tiempo de incubación (min)			
	0	20	40	60
Control	14,6 ± 0,1	19,6 ± 0,5	20,6 ± 0,4	19,0 ± 0,4
SBG 100 μg/ml	14,6 ± 0,1	20,0 ± 0,7	15,3 ± 0,6	16,6 ± 0,5
SBG 150 μg/ml	14,6 ± 0,1	17,3 ± 0,6	18,3 ± 1,3	19,6 ± 0,4

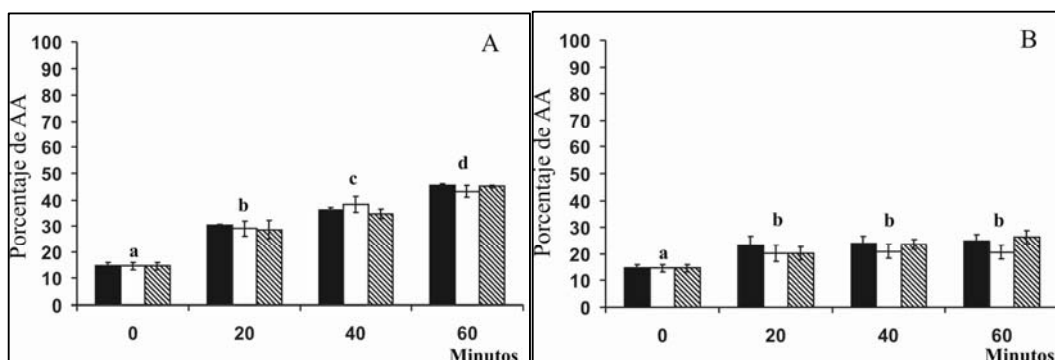
**Tabla 3.** Valores de AA obtenidos en la incubación de espermatozoides con SBG en medio no capacitante. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar

**IV.1.2.1.4. Requerimiento de calcio y bicarbonato para el efecto de SBG.**

Para establecer si alguno de estos componentes, el calcio o el bicarbonato, por si mismo era indispensable para la actividad de SBG, se realizaron experimentos en medios TALP sin calcio o sin bicarbonato conteniendo dos concentraciones diferentes de SBG.

En ausencia de calcio o en ausencia de bicarbonato no se observó un aumento de AA comparado con el control (Fig. 35. A y B). Esto indicaría que ninguno de los compuestos de forma independiente es capaz de desencadenar el efecto de SBG. En ausencia de bicarbonato (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) si bien se observa un aumento de la reacción acrosómica espontánea a través del tiempo, las diferencias no son significativas cuando se las compara con el control (Fig. 35. A).

Al igual que en los experimentos anteriores los valores de AA fueron recogidos y volcados en las tablas 4 y 5.



**Figura 35. Proporciones de AA producidas por SBG sobre espermatozoides en medio TALP sin  $\text{HCO}_3^-$  (A) y en TALP sin  $\text{Ca}^{++}$  (B).**

Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas,  $n=3$ . Medio que contiene 0 (■), 100  $\mu\text{g/ml}$  de SBG (□) o 150  $\mu\text{g/ml}$  SBG (▨).

	Tiempo de incubación (min)			
	0	20	40	60
Control	14,6 $\pm$ 0,8	30,3 $\pm$ 0,1	36,3 $\pm$ 0,4	45,3 $\pm$ 0,4
SBG 100 $\mu\text{g/ml}$	14,6 $\pm$ 0,8	29,0 $\pm$ 1,3	38,3 $\pm$ 1,7	43,3 $\pm$ 1,2
SBG 150 $\mu\text{g/ml}$	14,6 $\pm$ 0,8	28,6 $\pm$ 2,0	34,6 $\pm$ 1,1	45,0 $\pm$ 0,2

**Tabla 4.** Valores de los porcentajes de AA obtenidos en los experimentos de incubación de espermatozoides con SBG en medio no capacitante con el agregado de calcio. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media  $\pm$  error estándar

	Tiempo de incubación (min)			
	0	20	40	60
Control	14,6 $\pm$ 0,8	23,3 $\pm$ 1,9	24,0 $\pm$ 1,5	25,0 $\pm$ 1,2
SBG 100 $\mu\text{g/ml}$	14,6 $\pm$ 0,8	20,3 $\pm$ 1,7	21,0 $\pm$ 1,5	20,6 $\pm$ 1,4
SBG 150 $\mu\text{g/ml}$	14,6 $\pm$ 0,8	20,3 $\pm$ 1,3	23,6 $\pm$ 1,0	26,3 $\pm$ 1,4

**Tabla 5.** Valores de AA obtenidos en los experimentos de incubación de espermatozoides con SBG en medio no capacitante con el agregado de bicarbonato. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media  $\pm$  error estándar

**IV.1.2.1.5. Efecto de SBG sobre espermatozoides capacitados.**

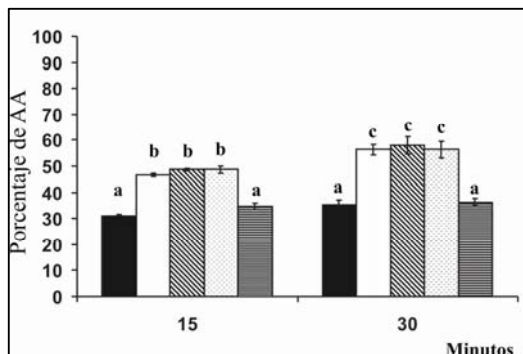
Dado que los efectos de SBG mencionados anteriormente se produjeron en condiciones que promueven la capacitación y que tanto el calcio como el bicarbonato por separado no son suficientes para que la glicoproteína produzca su efecto, se decidió evaluar el comportamiento de la misma sobre espermatozoides previamente capacitados.

Luego de la incubación de espermatozoides durante 1 hora en un medio capacitante, estos fueron puestos en contacto con SBG e incubados 15 y 30 minutos respectivamente (Fig. 36).

Los efectos de SBG sobre los acrosomas previamente observados sugerían que dicha proteína podría estar ejerciendo un efecto similar al que se observa cuando se desencadena la reacción acrosómica. Estas observaciones llevaron a que se diseñaran experimentos en los que se pudieran comparar los efectos de inductores de reacción acrosómica considerados fisiológicos con los efectos de SBG. De esta manera los espermatozoides capacitados durante una hora fueron tratados con progesterona (concentración final 1 µg/ml), como un inductor fisiológico de la reacción acrosómica (Melendrez y col., 1994; Roldan y col., 1994; Wu y col., 2006).

Puesto que SBG posee residuos terminales de Galβ1-3GalNac, en este experimento se utilizó fetuína como glicoproteína control ya que posee en su estructura residuos terminales de ácido siálico, diferentes de los de SBG, y que además se ha demostrado que no se une a espermatozoides en las mismas condiciones que SBG (Marini y Cabada, 2003).

Tanto SBG como la progesterona producen alteraciones acrosomales en proporciones similares y estadísticamente significativas (p< 0,001) respecto de las observadas en los medios control y en los medios que contienen fetuína. En la tabla 6 pueden observarse que los valores de AA producidos por progesterona son muy similares a los obtenidos para SBG en la mayor concentración utilizada.



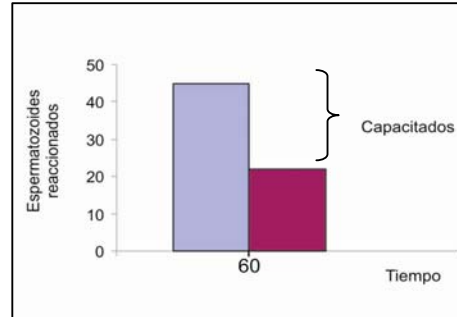
**Figura 36. Efecto de SBG sobre espermatozoides capacitados.** Los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante TALP durante 1 hora y se le agregó 100 µg/ml de SBG (□), 150 µg/ml de SBG (▨), progesterona (1 µg/ml) (▤) o 150 µg/ml de fetuina (▥). (■) corresponde a TALP. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas (p< 0,001).

	Tiempo de incubación (min)	
	15	30
Control	31,0 ± 0,2	35,3 ± 1,0
SBG 100 µg/ml	46,6 ± 0,4	56,3 ± 0,9
SBG 150 µg/ml	48,6 ± 0,31	58,0 ± 1,9
Progesterona 1 µg/ml	48,6 ± 0,8	56,3 ± 1,8
Fetuina 150 µg/ml	34,6 ± 0,6	36,6 ± 0,8

**Tabla 6.** Valores de AA obtenidos en la incubación de espermatozoides capacitados con progesterona, fetuina y SBG. Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar

**IV.1.2.1.6. Efecto de SBG evaluado mediante la técnica de tinción con CTC.**

La técnica de tinción Wells-Awa resultó útil para la evaluación de la morfología espermática y es utilizada para la estimación indirecta de capacitación a través de la inducción de la reacción acrosómica de espermatozoides capacitados. Cuando los espermatozoides se incuban en un medio capacitante y se induce la reacción acrosómica, sólo los espermatozoides capacitados tienen la habilidad de responder al inductor. Por diferencia entre los espermatozoides que sufrieron reacción acrosómica y los que sufrieron RA espontánea, se puede estimar el porcentaje de espermatozoides capacitados (Fig. 37).



**Figura 37.** Estimación de la proporción de espermatozoides capacitados a través de la inducción de la RA.

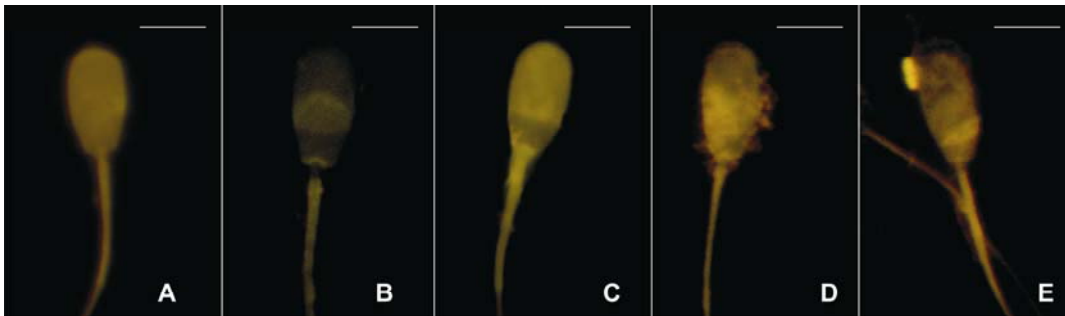
La diferencia entre los espermatozoides reaccionados en presencia del inductor (celeste) y los reaccionados espontáneamente (púrpura) en un tiempo dado indica el porcentaje de espermatozoides capacitados.

El efecto de SBG no permite evaluar capacitación de espermatozoides por el método antes descrito dado que produce alteraciones de los acrosomas. Este efecto impide observar la reacción acrosómica inducida enmascarando el efecto del inductor.

A fin de obtener más información sobre la dinámica de los procesos de capacitación conjuntamente con los de AA de la población de espermatozoides tratados con SBG se decidió utilizar la técnica de tinción con CTC.

Esta técnica permite asignar un patrón de tinción a un estado fisiológico particular sin la necesidad de modificar estructuras del espermatozoide para evidenciar su estado fisiológico con el agregado exógeno de sustancias.

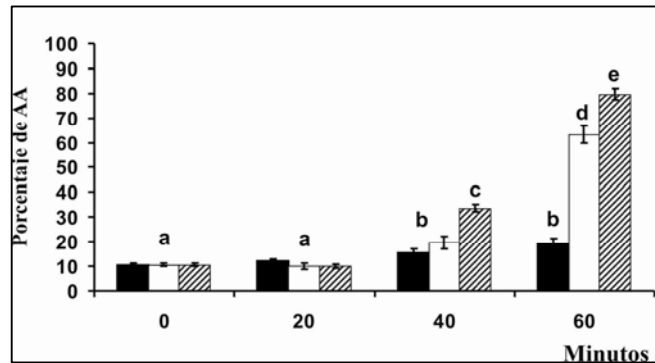
En la figura 38. A, se observa un patrón de tinción con fluorescencia uniforme sobre la cabeza del espermatozoide correspondiente a un espermatozoide que no sufrió modificaciones, un patrón con fluorescencia en la zona ecuatorial considerado espermatozoide reaccionado (Fig. 38. B) y un patrón de tinción con fluorescencia sólo en la región acrosomal indicando un espermatozoide capacitado (Fig. 38. C). Al tratar espermatozoides con SBG en condiciones capacitantes se observaron además dos patrones: uno sin fluorescencia en la región acrosomal, con parches fluorescentes todavía unidos a la célula espermática y mayor intensidad de fluorescencia en la región post-acrosomal (Fig. 38. D) y otro que demuestra un aparente hinchamiento de acrosoma en la región anterior (Fig. 38. E). Estos patrones son similares a los descritos anteriormente con la técnica de tinción Wells-Awa.



**Figura 38. Patrones de tinción de espermatozoides con CTC.** En la figura se observa un espermatozoide que no sufrió modificaciones (A) un espermatozoide reaccionado (B) y un espermatozoide capacitado (C). Espermatozoides tratados con SBG: con pérdida de membrana periacrosomal (D) y con aparente hinchamiento del acrosoma en la región anterior de la cabeza. La barra representa 5  $\mu$ m.

Al analizar el porcentaje de AA producidas por SBG mediante la tinción con CTC, los patrones observados en la figura 38. D y E alcanzaron un porcentaje promedio de 79,7% cuando los espermatozoides se incubaron durante 60 min con 150  $\mu$ g/ml de SBG en medio capacitante y se los denominó AA al igual que las alteraciones determinadas anteriormente. Diferencias estadísticamente significativas respecto del control se pueden observar a partir de los 40 min de incubación con la mayor concentración de SBG, sin embargo no hay diferencias significativas entre el control y la menor concentración de SBG. Las diferencias entre las concentraciones de SBG se evidencian a los 60 min (Fig. 39). Los recuentos de espermatozoides incubados con dos

concentraciones diferentes de SBG a distintos intervalos de tiempo y con una concentración de 150 µg/ml de fetuína como glicoproteína control son mostrados en la Tabla 7



**Figura 39. Proporciones de AA producidas por SBG sobre espermatozoides en medio TALP evaluados con CTC.**

Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar. Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas, n=3. Medio que contiene 150 µg/ml de fetuína (■), 100 µg/ml de SBG (□) o 150 µg/ml SBG (▨).

	Tiempo de incubación (min)			
	0	20	40	60
Fetuína 150 µg/ml	10, 7 ± 0,8	12 ± 0,9	15,7 ± 1,5	19,3 ± 2,0
SBG 100 µg/ml	10, 7 ± 0,8	10,0 ± 1,1	19,7 ± 2,3	63,3 ± 3,4
SBG 150 µg/ml	10, 7 ± 0,8	10,0 ± 0,9	33,7 ± 1,4	79,7 ± 2,3

**Tabla 7. Valores de AA obtenidos en los experimentos de incubación de espermatozoides con SBG en medio capacitante y teñidos con CTC.**

Los valores de porcentaje de AA están expresados como la media ± error estándar

La proporción de espermatozoides que muestran patrón de capacitados (Fig. 38.

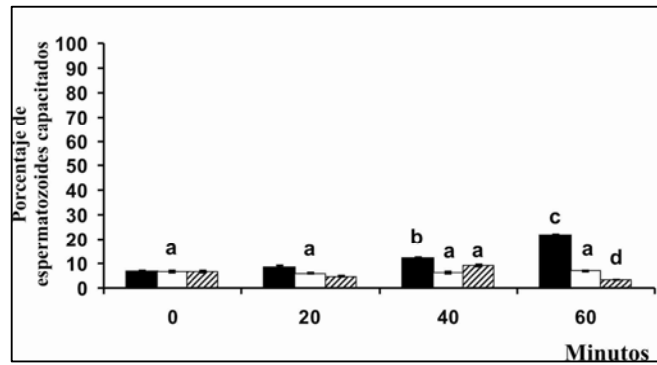
C) fue contada en el mismo experimento y volcada en la siguiente tabla.

	Tiempo de incubación (min)			
	0	20	40	60
Fetuína 150 µg/ml	6, 7 ± 0,3	8,3 ± 0,6	12,3 ± 0,3	21,7 ± 0,6
SBG 100 µg/ml	6, 7 ± 0,3	6,0 ± 0,2	6,3 ± 0,3	7,0 ± 0,2
SBG 150 µg/ml	6, 7 ± 0,3	4,6 ± 0,1	9,3 ± 0,4	3,3 ± 0,1

**Tabla 8. Valores de espermatozoides capacitados obtenidos en los experimentos de incubación de espermatozoides con SBG en medio capacitante y teñidos con CTC.**

Los valores de porcentaje de espermatozoides con patrón capacitados están expresados como la media ± error estándar

Estos datos se graficaron como se muestran en la figura 40.



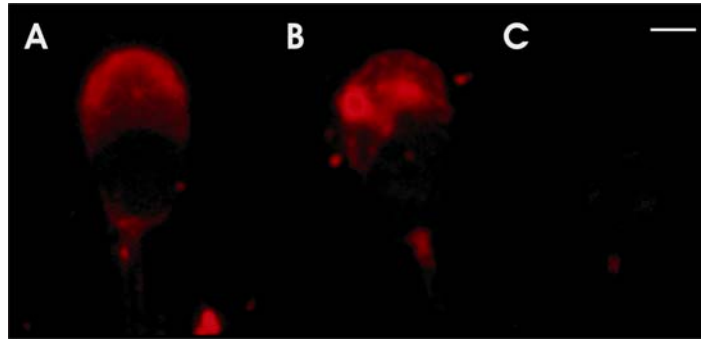
**Figura 40. Espermatozoides capacitados en TALP en presencia de SBG.** El porcentaje de espermatozoides capacitados está expresado como la media  $\pm$  error estándar de la media. Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas,  $n=3$ . Medio que contiene 150  $\mu\text{g/ml}$  de fetuína (■), 100  $\mu\text{g/ml}$  de SBG (□) o 150  $\mu\text{g/ml}$  SBG (▨).

Puede observarse que el porcentaje de espermatozoides capacitados incrementa leve pero significativamente a partir de los 20 min de incubación en medio capacitante suplementado con fetuína alcanzando valores de 21,7% a los 60 min, siendo estos los valores habituales para capacitar espermatozoides de cerdo. En los medios en los cuales SBG está presente el porcentaje de espermatozoides capacitados permanece sin cambios con la menor concentración de SBG, mientras que, con la mayor concentración SBG se observa un leve incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados a los 40 min de incubación pero hay un importante descenso posterior llegando a un 3,3%. Es de destacar que en todas las repeticiones del experimento se encontraron espermatozoides capacitados.

#### IV.1.2.2 Detección de sitios de unión de SBG sobre espermatozoides en medio capacitante.

Marini y Cabada (2003) informaron que SBG se unía a la cabeza de los espermatozoides, sin embargo, hasta el momento no se había establecido si los sitios de unión para SBG estaban disponibles para unir la glicoproteína luego de que el espermatozoide sufriera algún cambio fisiológico ni se había detallado un patrón de unión específico. Luego de incubar espermatozoides durante 1 hora con 150  $\mu\text{g/ml}$  SBG se detectó la glicoproteína unida al espermatozoide mediante anticuerpos específicos anti-SBG. Los espermatozoides fueron examinados mediante microscopía de fluorescencia, y pudo observarse que SBG se encontraba unida a la región periacrosomal de los espermatozoides con un aparente acrosoma intacto, o en zonas de

la región periacrosomal en forma de parches (Fig. 41). Este último patrón era el prevalente con una frecuencia de un 86,1%.



**Figura 41. Inmunolocalización de SBG unida a espermatozoides.** Micrografía de los diferentes patrones observados luego de incubar los espermatozoides 1 hora en TALP conteniendo 150µg/ml de SBG y revelado con anticuerpos anti-SBG seguido de anticuerpo secundario conjugado a Cy3. El patrón observado en B representa  $86,1 \pm 2,0\%$  de los espermatozoides de la población. La barra representa 2 µm.

#### **IV.1.2.3. Evaluación de fosforilación de proteínas de espermatozoides en presencia de SBG.**

##### **IV.1.2.3.1. Evaluación en medio capacitante**

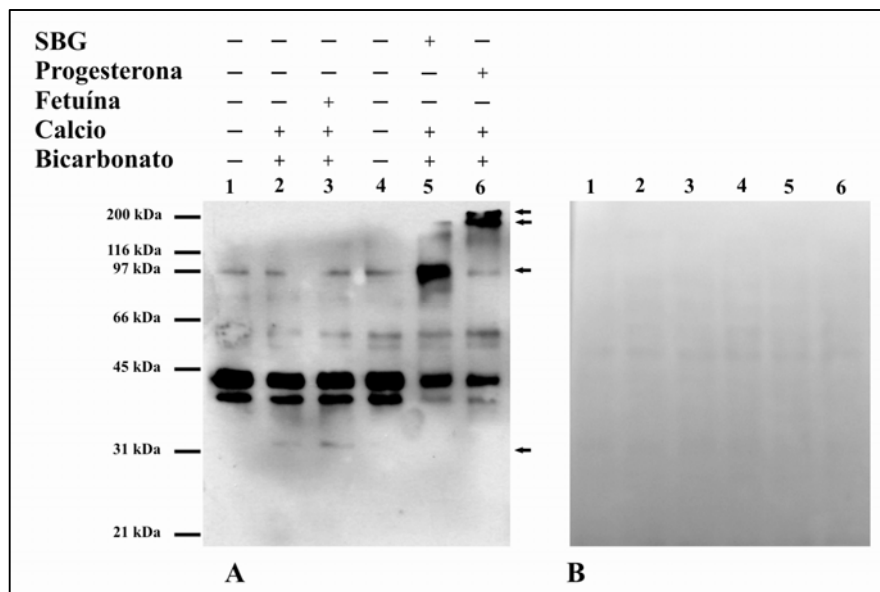
Una de las vías de señalización intracelular involucrada en fenómenos tales como capacitación, motilidad hiperactivada, unión a zona pelúcida, reacción acrosómica y unión y fusión del espermatozoide con el ovocito es la de fosforilación en residuos de tirosina (Urner y Sakkas, 2003). Dado que en cerdos la asociación de capacitación con la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina ha sido previamente estudiada (Flesch y col., 1999), surgió el interrogante de si el efecto de SBG observado sobre las células espermáticas podría estar relacionado con algún tipo de señalización intracelular. Por ello se decidió evaluar si ocurría algún cambio en el estado de fosforilación de proteínas espermáticas en sus residuos de tirosina cuando los espermatozoides eran incubados con SBG. Una de las formas aceptadas para determinar capacitación en espermatozoides de cerdos es la fosforilación de una proteína de 32 kDa (p32) y este parámetro fue tenido en cuenta como control del experimento.

Se incubaron  $1 \times 10^6$  espermatozoides durante 1 hora con SBG en una concentración final de 150 µg/ml en medio capacitante y mediante western blot se analizó si las proteínas espermáticas sufrían modificaciones en la fosforilación de los residuos de tirosina.

Pudo observarse un incremento en la fosforilación de una proteína de aproximadamente 97 kDa con una concomitante disminución en la fosforilación de otras proteínas que se presentan fosforiladas tanto en los espermatozoides que no fueron incubados como en espermatozoides que fueron incubados en medios capacitantes (Fig. 42). También puede observarse la fosforilación de una proteína de 32 kDa en espermatozoides capacitados en ausencia de SBG (Fig. 42, calles 2 y 3) que coincide con la proteína p32 descrita por otros autores como la proteína que aumenta el estado de fosforilación en espermatozoides capacitados.

El efecto de SBG sobre acrosomas fue comparado estadística y citológicamente con el de un inductor fisiológico de la RA como es la progesterona. En este caso también se comparo el efecto sobre la fosforilación de proteínas espermáticas.

Se pudo ver que la progesterona produce un incremento en la fosforilación de dos proteínas de masa molecular relativa aproximada de 200 kDa y 210 kDa (Fig. 42, calle 6) y que además hay una concomitante disminución del mismo grupo de proteínas que se defosforila cuando los espermatozoides son incubados con SBG.



**Figura 42. Fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de espermatozoides tratados con SBG y progesterona.**  $1 \times 10^5$  espermatozoides fueron usados para SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfotirosina (A) luego de ser teñida con rojo Ponceau (B). Los espermatozoides fueron incubados en: calle 2- TALP (medio capacitante), calle 3- TALP con 150  $\mu\text{g/ml}$  fetuína, 4- TALP sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{HCO}_3^-$ , calle 5- TALP con 150  $\mu\text{g/ml}$  de SBG. La calle 6 corresponde a espermatozoides incubados 1 hora en TALP capacitante y 15 minutos más con el agregado de progesterona. En la calle 1 se sembraron espermatozoides sin incubar. Las flechas indican las proteínas de 32 kDa (p32) que se fosforilan en espermatozoides capacitados, de 97 kDa (p97) que se fosforila en presencia de SBG y las dos proteínas con masa molecular superior a 200 kDa que se fosforilan en presencia de progesterona.

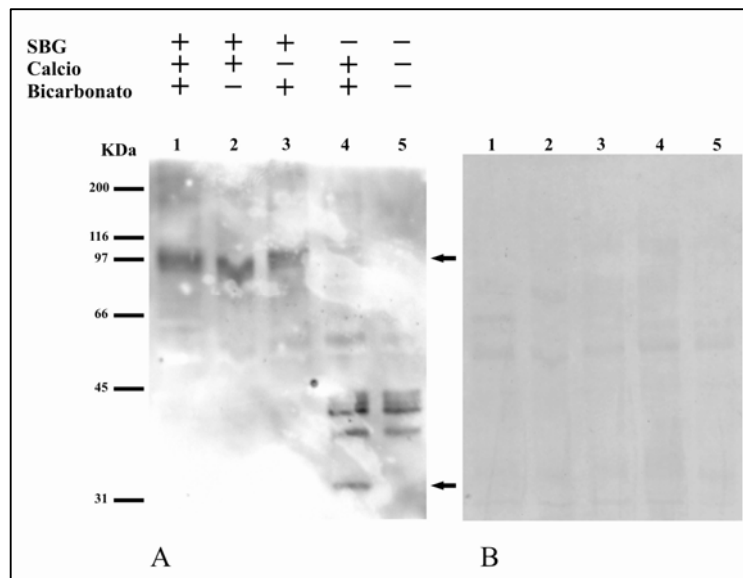
**IV.1.3.3.2. Dependencia de calcio y bicarbonato en la fosforilación de p97**

Resultados previos indicaban que el efecto de SBG era dependiente de calcio y bicarbonato. Ninguno de estos dos compuestos por separado era capaz de desencadenar las alteraciones observadas por SBG en medio capacitante.

Por otro lado, hay publicaciones que informan la correlación del calcio extracelular con la fosforilación de p32 (Dubé y col., 2003) y el efecto del bicarbonato en la fosforilación de residuos de tirosina durante la capacitación de espermatozoides de hámster (Visconti y col., 1999) y en la fosforilación de AKAP3, relacionada a la motilidad de espermatozoides humanos (Luconi y col., 2005).

Para evaluar si existía una dependencia de calcio o de bicarbonato en relación al estado de fosforilación de p97 se incubaron espermatozoides en medio TALP sin calcio o sin bicarbonato con 150 µg/ml de SBG y se evaluó el estado de fosforilación de las proteínas espermáticas.

En la figura 43 se ve un western blot revelado con anticuerpos anti-fosfotirosina en el cual se puede observar que p97 se fosforila tanto en ausencia de calcio como en ausencia de bicarbonato.



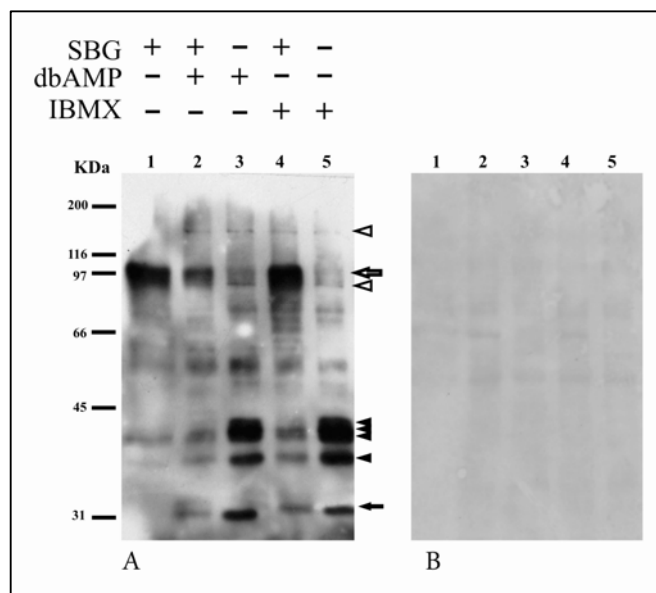
**Fig. 43. Evaluación del efecto del calcio y del bicarbonato en la fosforilación de p97.** A) Los espermatozoides fueron incubados con 150 µg/ml de SBG en presencia de calcio y bicarbonato (calle 1) y en presencia de calcio (calle 2) o de bicarbonato (calle 3). La flecha indica p97. En la calle 4 se sembraron espermatozoides incubados en medio capacitante sin agregado de proteína (la flecha indica p32) y en la calle 5 espermatozoides sin incubar. B) La membrana de nitrocelulosa fue teñida con rojo Ponceau antes de realizar el western blot para controlar la uniformidad en las cantidades contenidas en las calles.

#### IV.1.2.3.3. Efecto del AMPc en la fosforilación de p97

El incremento citoplasmático de AMPc activa a la proteína quinasa A, que cataliza la fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina. La fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina conduce a la fosforilación de otras proteínas en residuos de tirosina a través de proteínas quinasas y/o mediante la inactivación de proteínas fosfatasas. La vía de PKA ha sido involucrada en la expresión de la habilidad fecundante en espermatozoides de mamíferos (Visconti y col., 1998).

Para evaluar si la fosforilación de p97 estaba relacionado con el incremento en los niveles de AMPc se realizaron incubaciones de espermatozoides con dibutililAMP, análogo no hidrolizable del AMPc, o con inhibidores no específicos de fosfodiesterasas como el isobutilmetilxantina (IBMX).

La figura 44 muestra en la calle 1 que, la incubación de espermatozoides con SBG 150 µg/ml produce un incremento en fosforilación de p97 (flecha blanca) y defosforilación del grupo de proteínas de 44, 42, 38 y 34 kDa (cabeza de flecha negra), además de observarse ausencia de fosforilación de p32 (flecha negra). En la calle 2, la incubación de espermatozoides con SBG 150 µg/ml y dbAMPc 4 mM muestra fosforiladas p97 y p32, y una proteína de masa molecular aparente de 175 kDa (cabeza de flecha blanca) reportada previamente por Kalab y colaboradores (1998) y una parcial defosforilación del grupo de proteínas de 44, 42, 38 y 34 kDa. En la calle 3, espermatozoides incubados con dbAMPc 4 mM muestran un incremento en el estado de fosforilación de p32 comparado con los tratados con SBG y dbAMPc en conjunto y no se observa p97 fosforilada. Adicionalmente se observa fosforilación de una proteína de 175 kDa, al igual que en el tratamiento de la calle 2, observándose además una proteína de aproximadamente 93 kDa fosforilada (cabeza de flecha blanca) también reportada por Kalab y colaboradores (1998). La calle 4 muestra un patrón similar al de la calle 2, pero se observa una mayor intensidad de señal en p97 al incubar los espermatozoides con 150 µg/ml de SBG e IBMX 2 mM. La calle 5 muestra el mismo patrón de proteínas fosforiladas que la calle 3, cuando se incuban espermatozoides con el inhibidor no específico IBMX en una concentración final de 2 mM.



**Fig. 44. Efecto del AMPc en la fosforilación de p97.** A)  $1 \times 10^6$  espermatozoides fueron incubados con 150 µg/ml de SBG (calle 1), 150 µg/ml de SBG y dbAMPc 4 mM (calle2), dbAMPc 4 mM (calle 3), 150 µg/ml de SBG e IBMX 2 mM (calle 4) o IBMX 2 mM (calle 5). En B se muestra la membrana teñida con rojo Ponceau antes de la incubación con anticuerpos para observar las cantidades de proteínas contenidas en cada calle. La flecha blanca indica p97 y la flecha negra p32. Las cabezas de flecha negra indican proteínas con masa molecular aparente de 44, 42, 38 y 34 kDa. Las cabezas de flecha blanca señalan proteínas de masa molecular 175 y 93 kDa.

#### IV.1.2.4. Identificación de SBG.

##### IV.1.2.4.1. Identificación de SBG por espectrometría de masa

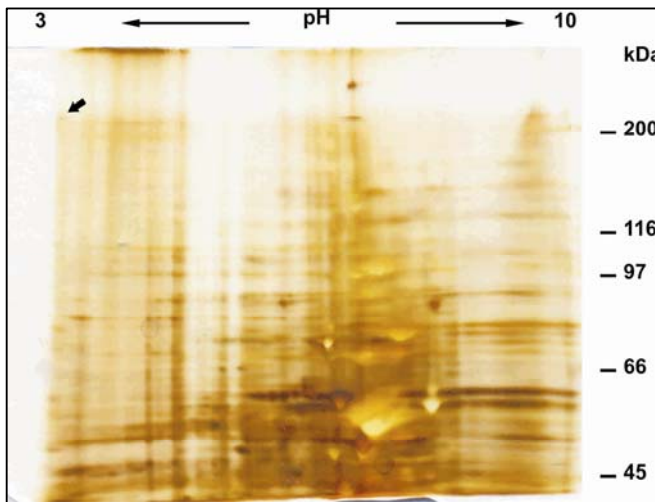
Para tratar de establecer la identidad de SBG se recurrió a la espectrometría de masa en tándem provista por un servicio privado (Prottech, Inc, Pensilvania. USA).

Para establecer si SBG se correspondía en secuencia con alguna proteína conocida o con algún marco de lectura abierto correspondiente a una secuencia presente en el genoma de cerdo, se realizaron geles bidimensionales de extracto de proteína de oviducto (Fig. 45) de los cuales, por medio de tinción con P.A.S, de datos masa molecular relativa y punto isoeléctrico y de western blot con anticuerpos específicos, se eligió un “spot” y se cortó para enviarlo para su secuenciación. En la tabla 9 se muestra la lista de péptidos informados por el servicio de secuenciación.

El análisis de los péptidos obtenidos de la espectrometría de masa indica que SBG compartiría dominios SRCR con la proteína DMBT1 (*Deleted in Malignant Brain Tumors 1*) (Fig 46). El gen *DMBT1* porcino abarca unos 54 kb del cromosoma 14 q28-q29 (Haase y col., 2006). El ADNc obtenido a partir de ARNm de vesícula seminal muestra un marco abierto de lectura de 4050 nucleótidos y produciría un polipéptido de

1349 aminoácidos con una masa molecular de 147,9 kDa y se sugiere la existencia de variantes secretadas y transmembrana (Haase y col., 2006) de DMBT1.

La proteína DMBT1 es una glicoproteína multidominio que contiene en su estructura dominios SRCR (dominios scavenger ricos en cisteína), ZP (dominio de zona pelúcida) y CUB (dominios de unión a carbohidratos), todos ellos involucrados en interacciones proteína-proteína.



**Fig. 45. Electroforesis bidimensional de extracto proteico de oviducto.** Se resolvieron 500 µg de proteína de extracto de células epiteliales de oviducto mediante isoelectroenfoque y la segunda dimensión en geles 8%. La flecha señala el spot elegido y enviado a secuenciar.

Masa del péptido	Número de péptidos	Péptido	Proteína
920.4		VEIYQGGR	>gi 85687558 sp Q4A3R3.1 DMBT1_PIG RecName: Full=Deleted in malignant brain tumors 1 protein;
1486.7	3	FGQGSGPILLDDL	AltName:Full=Hensin;Flags:Precursor
1486.7		FGQGSGPILLDDL	gi 73531021 emb CAJ27171.1  DMBT1 protein [Sus scrofa]

**Tabla 9.** Listado de péptidos obtenidos de la espectrometría de masa de SBG. Mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem se pudieron obtener solamente 3 péptidos. Dos de ellos presentan la misma secuencia y los tres pertenecen a dominios SCRC de la proteína.

```

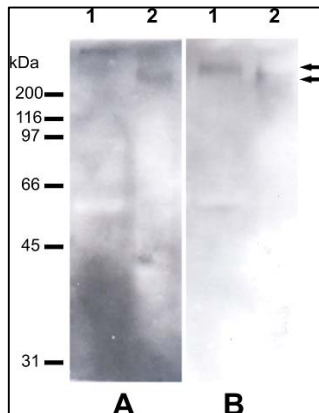
mgtsavilei clllsqvltt vssttqtest tedrtqitet afwetqtins vsesdlpgth
assfhteep1 ttiaaegtew dlalrlvngg drcqgrveil yqgswgtvcd dswdtdandv
vcrqlgcgwa vsapgsarfg qglgpilldd lrscghetyl wscphsgwkt hncghqedag
vicsgaqrss tvipdwyytt trsqtahirs tipawwhptt ttaartewdl alrlvnggdr
cqgrvevlyq gswgtvcdds wtdndanvvc rqlgcgwavs apgsarfggg sgpillddlr
csghetylws cphsgwnthn cghhedagvi csdaqrstsv ipdwyytttp sqtahirsti
pawwhptttt aartewdlal rlvnggdrcq grvevlyqgs wgtvcddswd tndanvvcrq
lgcgwavsap gsarfggg sgpillddlr cshetylwscp hsgwnthncg hhedagvics
daqrstsvip dwyyttttsq twwhptttta aspsspcggf ltsasgtfss psypglypnn
ancvweievn sgyrinlgfn nlqlevhinc iydyieifde spgsntslgk icnhtsqift
ssynrmtvrf rsdgsvqkpg fsawynsfpr daslrlvnsn ssypscagrveiyggg wgt
vcddgdwdiqd aqvvcrlgc gnavsapgna yfgpgsgpit lddvacsgte stlwqcrnrg
wfshncghse dagvicsvpa ftttppatny scggflsqaa ggfnsfpypg nypnnancvw
dievqnyrv tvvfrdvqle sgcndyiev fdgpyrssl larvcngasg sftsssnfms
irfisdsvt ragfranyys spssgstrlh clqnhmqasv stsylqslgy sardlvipgw
ewsyqcqqi tstqvtftip ysscgtiqr dndtitysns lraavssgii krkkdlmnyv
scrmlqntwv ntvyiandtl evqnvqygnf dvnisfftss sflypvrssp yyvdlnqnly
lqaellhana slalfvdte aspypndftt ltydlirsgc vkdetyqsys qpsprivrfk
fssfhflsrf psvylqckmv vcrafdsssr crrgcvvrsk rdvgsyqekv dvvlgpiqlq
tlhaekrsl d qpavdleeka saqgsydgaa isagiflvv lavaaftlgr rgraadgqpl
iskt
    
```

**Fig. 46. Secuencia de la proteína DMBT1.** Los péptidos obtenidos de la secuenciación de SBG por LC-MS/MS pertenecen a dominios SRCR presentes en DMBT1. Secuencia obtenida del banco de datos NCBI. N° de acceso gi|85687558

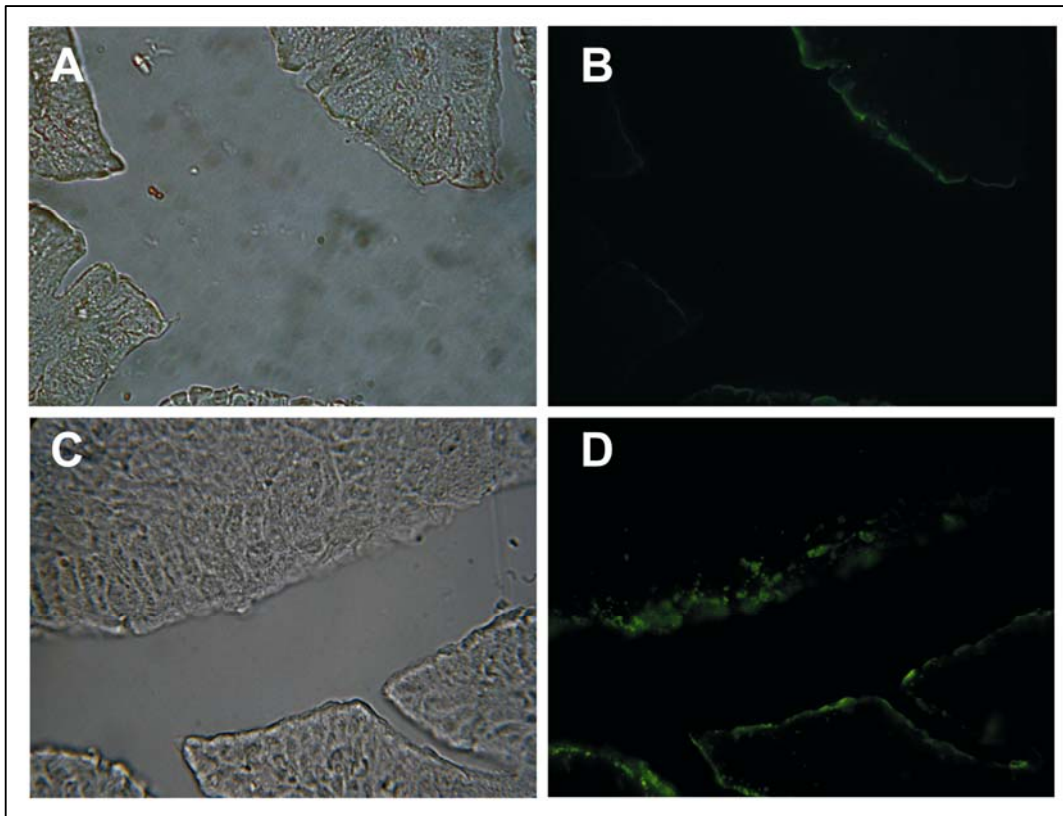
**IV.1.2.4.2. Detección de DMBT1 y SBG mediante anticuerpos específicos.**

Mediante anticuerpos policlonales que reconocen DMBT1 humana cedidos por el Dr. Mollenhauer se detectó la proteína en oviducto por western blot y en secciones de istmo oviductal (Fig. 47).

De forma comparativa se utilizaron anticuerpos para detectar SBG en las mismas membranas utilizadas para la detección de DMBT1. Puede verse en la figura 47 que cada anticuerpo reconoce una única proteína de masa molecular aparente equivalente en ambos casos. En la figura 48 se observa que ambos anticuerpos reconocen proteínas en la misma localización, en el borde luminal del epitelio oviductal del istmo.



**Fig. 47. Detección de SBG y DMBT1.** Se resolvieron 20 µg de proteínas de líquido de lavado de oviducto (calle 1) y 20 µg proteína de extracto de oviducto (calle 2). **A.** Detección con anticuerpos anti-SBG. **B.** La misma membrana se utilizó luego para incubarla con anti-DMBT1. Las flechas indican proteínas reconocidas por ambos anticuerpos de masa molecular relativa muy similar. Existe una pequeña diferencia en la migración relativa de las proteínas localizadas en el líquido de lavado y en el extracto completo.



**Fig. 48. Detección por inmunofluorescencia de SBG y DMBT1.** Secciones de istmo fueron incubadas con anticuerpos anti-SBG (B) o anti-DMBT1 (D). Puede verse una marca fluorescente en el borde luminal de las células epiteliales tanto en la inmunodetección con anti-SBG como anti-DMBT1. A y C micrografías de campo claro de las secciones B y D respectivamente. Controles fueron llevados a cabo omitiendo los anticuerpos primarios (no se muestran). La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

#### IV.1.3. DISCUSIÓN

Esta parte del trabajo de tesis estuvo abocado al estudio del rol biológico de SBG, así como también a su identificación molecular.

Los efectos producidos por SBG a nivel citológico son evidenciados como alteraciones estructurales en los acrosomas de los espermatozoides en condiciones capacitantes y de manera concentración y tiempo dependiente. Dados los efectos de la glicoproteína oviductal, se sugirió que ésta podría estar cumpliendo un rol de selección negativa de espermatozoides (Talevi y Gualtieri, 2009). Estos efectos presentan similitudes a los que se observan en la exocitosis acrosomal durante una RA fisiológica. Estudios más detallados a nivel ultraestructural mediante microscopía electrónica permitirían describir y comparar más ajustadamente estas alteraciones acrosomales. Sin embargo, la observación mediante microscopía óptica convencional permite especular que las AA se asemejan a los estadios iniciales de una RA o bien una RA incompleta.

Existe bibliografía que indica que el bicarbonato está involucrado en cambios estructurales de la membrana plasmática durante la capacitación de espermatozoides porcinos (Harrison y col., 1996; Harrison y Gadella, 2005), por ello se decidió estudiar si la presencia de este componente era necesaria o indispensable para que SBG produzca alteraciones acrosomales. No se observaron modificaciones en las regiones acrosomales de los espermatozoides que fueron incubados con 25 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , la concentración utilizada en medios capacitantes TALP, si bien en estas condiciones se observaron los efectos en el incremento de la fosforilación de p97.

Algunos autores han reportado que el calcio produce modificaciones en la membrana plasmática del espermatozoides (DasGupta y col., 1993) y está involucrado en la RA (Michaut y col., 2000), de modo que también se diseñaron experimentos para evaluar la relevancia de dicho catión en el efecto que SBG produce en condiciones capacitantes. Nuevamente, no se observaron efectos sobre los acrosomas en espermatozoides incubados en medio no capacitante con calcio, indicando que la presencia de este catión no es suficiente para que se desencadenen los efectos de SBG, pero de igual manera que para la presencia de bicarbonato (ausencia de calcio), se observa un incremento en la fosforilación de p97.

Dado que se necesita de la presencia de bicarbonato y de calcio y que ambos cationes son indispensables para que la capacitación suceda, es probable que SBG este actuando sobre espermatozoides capacitados. Si este fuera el caso, la comparación del efecto de SBG con el efecto producido por un inductor fisiológico de la RA produciría, al menos, resultados estadísticamente similares. Efectivamente, esta similitud estadística en los resultados se obtuvo cuando se comparó el efecto de SBG sobre espermatozoides capacitados con el de progesterona.

La unión de SBG a la cabeza del espermatozoide había sido reportada previamente, sin embargo, la distribución de sitios de unión de SBG durante la capacitación o la RA no habían sido estudiadas. En estos procesos una distribución de ciertas proteínas y carbohidratos a lo largo de la cabeza del espermatozoide ha sido reportado (Kan y Esperanzate, 2006). La inmunodetección establece que SBG se une a la región periacrosomal del espermatozoide y permanece unida luego de que se produce la alteración acrosomal o alternativamente estos sitios de unión a SBG permanecen disponibles luego de la alteración acrosomal.

Cuando se estudió el efecto de SBG en la fosforilación de proteínas de espermatozoides, se observó un incremento en la fosforilación de una proteína de

aproximadamente 97 kDa. Cuando espermatozoides humanos son tratados con progesterona se produce un incremento en la fosforilación de una proteína de aproximadamente 94 kDa y cuando se induce la RA con ZP en espermatozoides humanos (Naz y col., 1991) y de ratón (Leyton y Saling, 1989) se induce la fosforilación de una proteína de 95 kDa. Estos datos inducen a correlacionar los efectos sobre los acrosomas de progesterona, ZP y SBG, en cuanto a la fosforilación de proteínas de un rango de peso molecular de 94 a 97 kDa, cuyas mínimas diferencias en sus masas moleculares relativas podrían deberse a diferencias técnicas entre los autores, a diferencias de modificaciones postraduccionales de las proteínas o a diferencias entre especies.

Este efecto de SBG en la fosforilación de la proteína de 97 kDa no estaría asociado a la vía de fosforilación que involucra AMPc, dado que análogos de AMPc, dbAMP, e inhibidores de fosfodiesterasas, IBMX, fueron incapaces de elevar los niveles de fosforilación de dicha proteína. En contraste, el patrón de fosforilación de las demás proteínas coincide con lo reportado por otros autores (Kalab y col., 1998).

La ZP de humanos se une al espermatozoide desencadenando la RA e involucra la fosforilación de una proteína de 95 kDa (al igual que en ratones). La ZP porcina expone residuos de galactosa (Jaiswal y col., 1999; Yonezawa y col., 2005), como lo hace SBG. Por analogía se puede hipotetizar que SBG interacciona con espermatozoides capacitados de manera similar a la ZP. Resultará interesante analizar, fuera del alcance de esta tesis, la defosforilación del grupo de proteínas de 44, 42, 38 y 34 kDa inducida por la acción de SBG.

Los datos obtenidos de la secuenciación por espectrometría de masa indican que SBG comparte dominios SRCR con la proteína DMBT1. Anticuerpos anti-DMBT1 generados en conejo contra la proteína recombinante humana reconocen la proteína porcina, lo que estaría indicando que ambas proteínas poseen un alto grado de homología. Dado que DMBT1 es una proteína modular compuesta por varios dominios, incluyendo dominios SRCR (dominio scavenger rico en cisterna), CUB (dominio de unión a carbohidratos) y ZP (dominio zona pelúcida) (Haase y col., 2006), es probable que los anticuerpos policlonales reconozcan dominios SRCR comunes a ambas proteínas, SBG y DMBT1, más aún, los péptidos reportados por el servicio de secuenciación pertenecen al dominio SRCR.

Estudios realizados con anticuerpos anti-DMBT1 y anti-SBG demostraron que ambos reconocen proteínas de masas moleculares similares y localización similar en

epitelio oviductal, por lo tanto es altamente probable que SBG sea DMBT1. Se requerirá la secuencia del ARNm codificante para corroborar esta aseveración.

## **IV.2. ANEXINAS**

### **IV.2. 1. INTRODUCCIÓN**

En la interacción del espermatozoide con el oviducto que conlleva a la formación del reservorio participan proteínas espermáticas que se encuentran adsorbidas a la superficie de la cabeza del espermatozoide (Töpfer-Petersen y col., 2008). Estas proteínas han sido caracterizadas en ungulados (porcinos, bovinos, caprinos y equinos) exhibiendo en porcinos la más amplia diversidad dentro de los cinco miembros de la familia denominada espermadhesinas (Töpfer-Petersen y col., 1998).

En la metodología utilizada para purificar SBG las proteínas superficiales de las membranas de los espermatozoides eran descartadas en los pasos de lavado realizados en la preparación de las columnas de afinidad, de modo que no estaban disponibles para evaluar la interacción entre éstas y las proteínas oviductales. Son éstas proteínas las que están involucradas en la formación del reservorio espermático (Suarez, 1998; Suarez, 2001; Töpfer-Petersen y col., 2008).

A fin de conservar estas proteínas y mantener la topología que ellas presentan en la membrana plasmática, se realizaron cambios en la técnica de preparación de columnas de afinidad. Estos cambios se deben al agregado de un agente entrecruzante que mantiene las proteínas de superficie de membrana unidas con las proteínas integrales de membrana y entre sí, dejándolas así expuestas para la interacción con proteínas de extractos de células epiteliales de oviducto.

Con esta nueva estrategia se perseguía el objetivo de poder purificar e identificar proteínas oviductales que interaccionen con proteínas superficiales de membrana de espermatozoides y que podrían participar en la formación del reservorio.

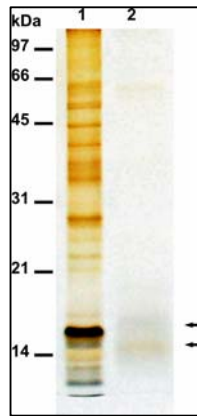
### **IV.2. 2. RESULTADOS**

#### **IV.2.2.1. Purificación e identificación de nuevas proteínas de unión a espermatozoides.**

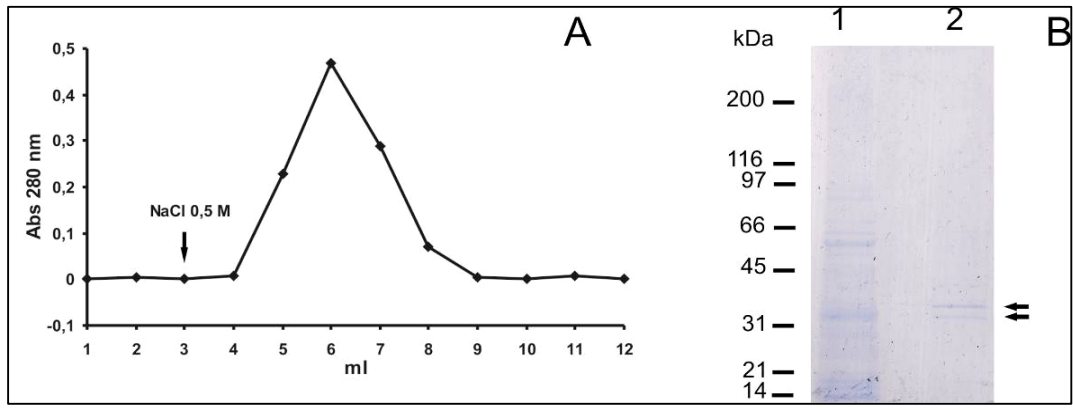
Las proteínas presentes en extractos de membranas periacrosomales de espermatozoides tratadas con DMP y sin tratar se muestran en la figura 49. En dicha figura se puede observar que las proteínas tratadas con DMP forman grandes complejos que impiden que se puedan resolver en SDS-PAGE.

Una vez construidas las columnas cromatográficas de membranas de espermatozoides tratadas con agentes entrecruzantes, se realizaron las corridas

cromatográficas con extractos de proteínas oviductales. En las mismas pudieron purificarse proteínas que se resolvieron en SDS-PAGE mostrando dos bandas (Fig. 50).



**Figura 49. Entrecruzamiento de proteínas de membrana de espermatozoides con DMP.** En la figura se muestran dos alícuotas con igual cantidad de proteínas de fracciones de membranas periplasmáticas de las cuales una, calle 2, fue sometida a tratamiento con DMP. Las flechas indican complejos proteicos difusos formados por el DMP que no están presentes en la alícuota sin tratar. Además se observa una cantidad de proteínas mucho menor en la calle 2, presumiblemente debido a que algunos grandes complejos formados por el DMP no logran ingresar en el gel de resolución



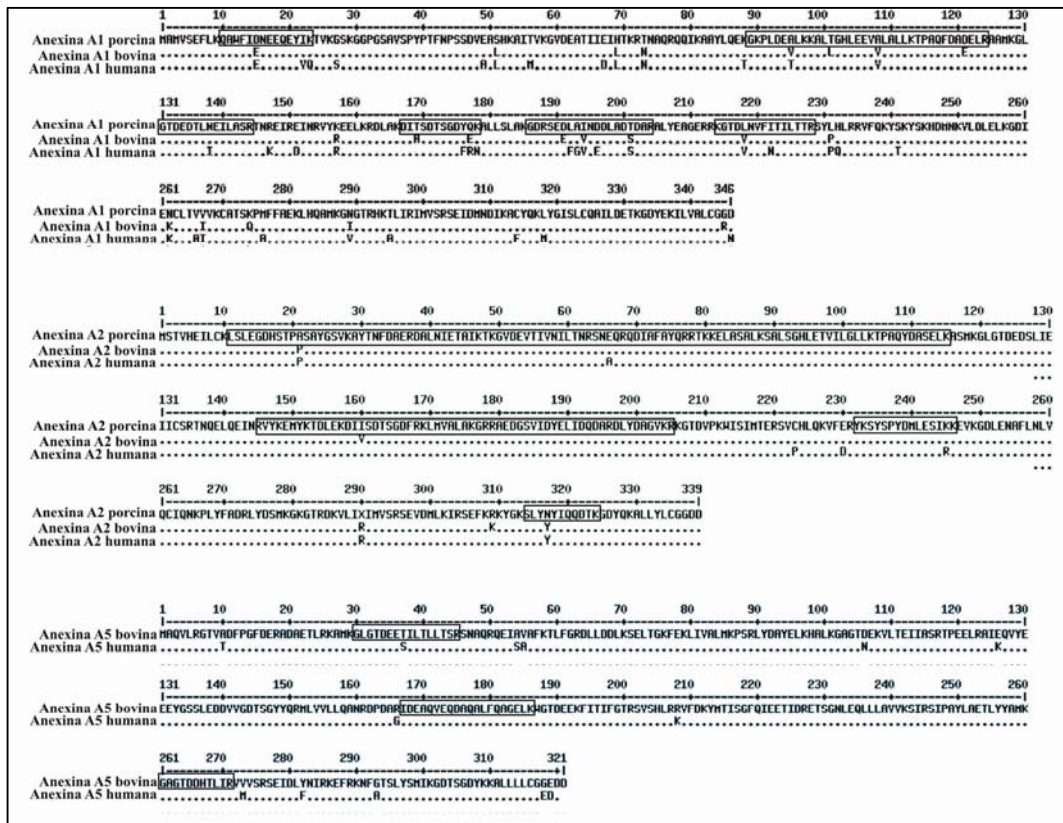
**Fig. 50. Cromatografía de afinidad de extractos de membrana de células epiteliales de istmo.** A: extractos de células epiteliales de istmo preparados como se describió en la sección III.3.1 fueron puestos en contacto con las fracciones de membrana de espermatozoides tratadas con entrecruzante y acopladas a Sepharose 4B. Luego de los lavados con 20 volúmenes de TALP las proteínas fueron eluidas con Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,5 M pH 7.5, colectándose fracciones de 1ml. El contenido de proteínas de las fracciones fue medido por absorbancia a 280 nm. B: resolución de las proteínas contenidas en las fracciones colectadas en SDS-PAGE y tinción con Coomassie Blue. Calle 1: 40 µg de extracto de células oviductales. Calle 2: proteínas purificadas.

La proteína de mayor peso molecular purificada se envió a secuenciar a través de espectrometría de masa en tándem arrojando el resultado que se muestra en la tabla 10.

Banda	Masa molecular	Nº de péptidos	Nº de banco de datos NIH
	40238.76	122	Anexina A2 ( <i>Sus scrofa</i> ) gi 54020966
38 kDa	38500.88	14	Anexina A1 ( <i>Sus scrofa</i> ) gi 1165145
	36122.55	3	AnexinaA5 ( <i>Bos taurus</i> ) gi 73586525

**Tabla 10. Identificación por LC-MS/MS de anexinas.** En la tabla se muestran los péptidos identificados y las cantidades relativas obtenidas de cada uno de ellos, así como también los números de acceso para el banco de datos de NCBI.

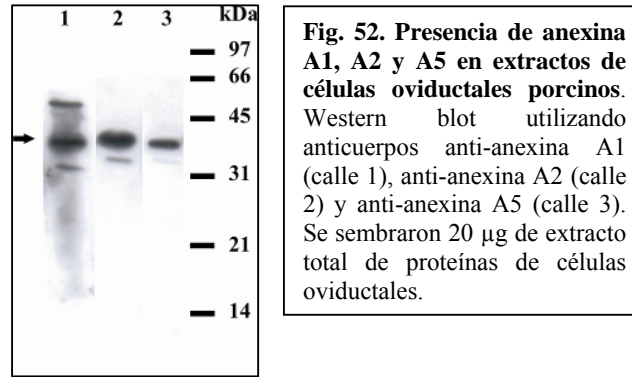
El componente principal de la banda de 38 kDa es la anexina A2. Aparecen también en menor cantidad las anexinas A1 y A5, estando esta última referida a homología a anexina A5 bovina, ya que no se dispone de una secuencia completa de dicha anexina para porcinos en los bancos de datos. Un apilamiento de secuencias muestra la homología entre las secuencias de las anexinas de humano, bovinas y porcinas, dando una idea de la homología que presentan estas proteínas entre las especies mencionadas (Fig. 51). Para anexina A2 el porcentaje de homología es del 98%, siendo de 97% para A5 y de 91% para A1.



**Figura 51. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de anexinas.** En la figura se ve el alineamiento de las secuencias de anexinas A1 y A2 porcina, vacuna y de humanos y el alineamiento de anexina A5 vacuna y de humanos. Las diferencias en las secuencias se indican sobre la línea de puntos. En recuadros se muestran los péptidos secuenciados.

#### IV.2.2.2. Identificación de anexinas mediante anticuerpos específicos.

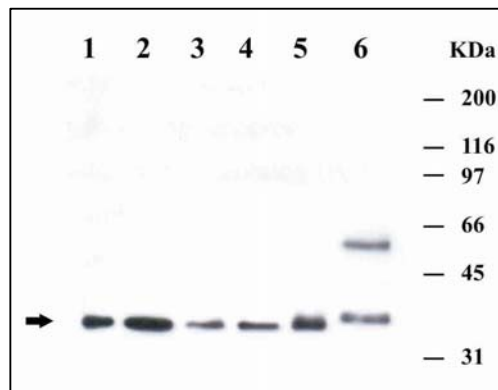
Para confirmar la presencia de anexinas en el oviducto porcino se procedió a realizar western blot enfrentado extractos proteicos de células epiteliales con anticuerpos específicos para cada una de las anexinas. Los resultados demostraron la presencia de las tres anexinas en estos extractos (Fig. 52).



**IV.2.2.3. Identificación de anexinas en extractos de proteínas oviductales de varias especies.**

Dada la alta homología presentada entre las anexinas de las tres especies comparadas anteriormente (mayor al 90%), se procedió a evaluar la presencia de la anexina mayoritariamente obtenida por espectrometría de masa, anexina A2, en diversas especies.

Extractos de proteínas de células oviductales de diferentes especies fueron enfrentados con anticuerpos anti-anexina A2 de ratón. Como puede verse en la figura 53, en las seis especies examinadas, humano, vaca, gato, perro, conejo y ratón, se evidenció la presencia de anexina A2, observándose que la proteína de ratón exhibe una motilidad electroforética ligeramente inferior.

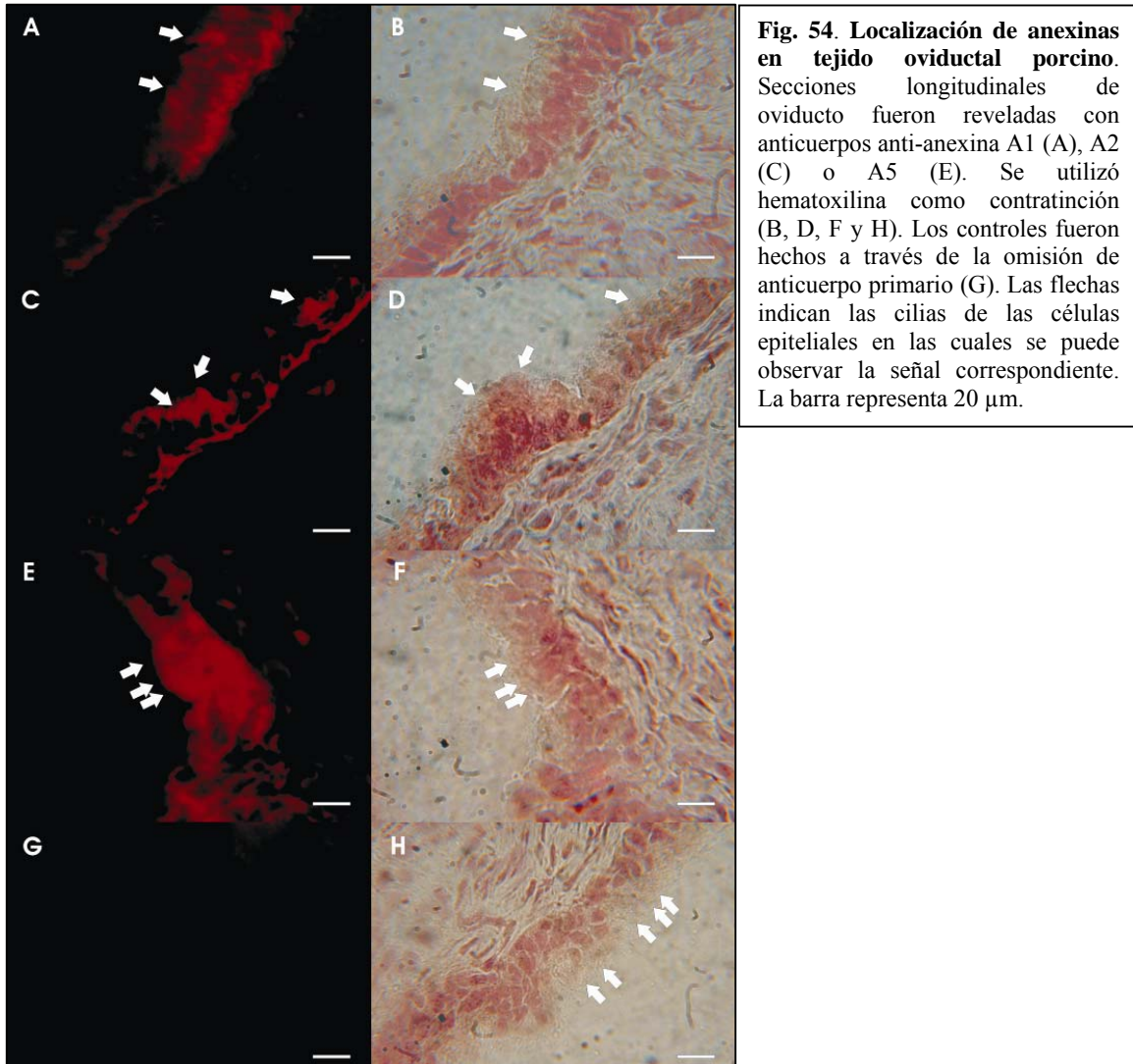


**Figura 53. Anexinas en extracto de oviducto de varias especies.** 40 µg de extracto de proteínas de oviducto de humano (1), vaca (2), gato (3), perro (4), conejo (5) y ratón (6) se resolvieron un SDS-PAGE, gel 12%. Luego se realizó un western blot utilizando anticuerpo anti-anexina A2 de ratón. La flecha indica anexina A2. En la calle 6 se observa una banda de peso molecular de aproximado de 55 kDa correspondiente a la inmunoglobulina de ratón.

#### IV.2.2.4. Localización.

Las anexinas de oviducto porcino fueron purificadas *in vitro* por su interacción con membranas periacrosomales de espermatozoides. Un requisito para que la misma interacción pueda darse *in vivo* es que éstas tengan una localización adecuada que permita la interacción.

La localización de las tres anexinas identificadas previamente se llevó a cabo en oviducto porcino mediante inmunohistoquímica. Criosecciones longitudinales de oviductos de cerdo hembra de 5  $\mu\text{m}$  de espesor fueron incubadas con anticuerpos anti-anexina A1, A2 o A5 y reveladas con anticuerpos secundarios conjugados al fluoroforo Cy3. Pudo detectarse anexina A2 preferentemente en las cilias de este epitelio mientras que para anexina A1 y A5 se observa señal en el citoplasma de las células epiteliales. Las tres anexinas también fueron detectadas en la membrana basal (Fig. 54).



**Fig. 54. Localización de anexinas en tejido oviductal porcino.** Secciones longitudinales de oviducto fueron reveladas con anticuerpos anti-anexina A1 (A), A2 (C) o A5 (E). Se utilizó hematoxilina como contratinción (B, D, F y H). Los controles fueron hechos a través de la omisión de anticuerpo primario (G). Las flechas indican las cilias de las células epiteliales en las cuales se puede observar la señal correspondiente. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .

Puede observarse también que anexina A1 se localiza en cilias (Fig. 54. A. flechas blancas).

#### IV.2.3. DISCUSIÓN

A través de cromatografía de afinidad se purificaron proteínas oviductales capaces de interaccionar, *in vitro*, con proteínas de superficie de membrana de espermatozoides. Las células epiteliales oviductales interaccionan *in vitro* (Green y col., 2001; Gualtieri y Talevi, 2000) e *in vivo* (Hunter y col., 1991; Rodriguez-Martinez y col., 2001) con la zona de membrana plasmática del espermatozoide que recubre el acrosoma (membrana periacrosomal).

Las fracciones de membranas periacrosomales utilizadas para purificar SBG son esencialmente las mismas que se utilizaron para purificar anexinas, excepto que éstas fueron tratadas con dimetilpimelimidato (DMP). Este tratamiento evitaría la pérdida de las proteínas superficiales presentes en estas fracciones de membrana y las mantendría unidas conservando la organización topográfica, incluyendo en este grupo de proteínas de superficie de membrana a las espermadhesinas. Esta familia de proteínas, en particular DQH (Manaskova y col., 2007) y AQN1 (Ekhlasi-Hundrieser y col., 2005) han demostrado tener un rol en la formación del reservorio. De este modo, la estrategia para la purificación de proteínas oviductales tenía el objetivo de aislar aquellas proteínas que interaccionen con espermadhesinas y que tal vez estén involucradas en la formación del reservorio.

La purificación seguida de la identificación por LC/MS-MS permitió determinar la presencia de anexina A2 y en menor medida A1 y A5, como proteínas candidatas a interaccionar con espermatozoides para la formación del reservorio.

La presencia de estas proteínas en células epiteliales oviductales se confirmó por western blot. La inmunohistoquímica revela la presencia de anexina A1 y A5 en el citoplasma de las células epiteliales ciliadas, mientras que anexina A2 se observa sólo en las cilias. También se puede observar localización de las tres anexinas en membrana basal (Fig. 54).

La localización de anexina A2 en la superficie celular ha sido previamente reportada en células endoteliales (Kim y Hajjar, 2002). Simultáneamente con la identificación de anexina A2 en oviducto de cerdo en relación a la formación del reservorio realizada en este trabajo de tesis, se publicó la identificación de anexina A1, A2, A4 y A5 en oviducto bovino y se las relacionó con la formación del reservorio en

este animal (Ignatz y col., 2007). Como se puede observar a través del apilamiento de secuencias, anexina A2 de cerdo comparte un 98,5% de identidad con anexina A2 bovina (Fig. 51).

Adicionalmente, anticuerpos generados contra el dominio amino terminal de anexina A2 (anticuerpos HH7) de cerdo son capaces de reconocer homólogos en extractos de proteínas de oviducto de humanos, vacas, gatos, perros, ratones y conejos.

El aislamiento de anexina A2 como proteína principal que interacciona con membranas periacrosomales de cerdo, su localización en las cilias de las células ciliadas del epitelio del istmo, su presencia en extractos proteicos oviductales de varias especies de mamíferos y la identificación como probable receptor de espermatozoides en bovinos, indican que probablemente anexina A2 forma parte de un mecanismo generalizado que media la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal durante la formación del reservorio.

### **IV.3. S100A10.**

#### **IV.3.1. INTRODUCCIÓN**

Las anexinas y las proteínas de la familia S100 constituyen grupos de proteínas de unión a calcio. Cada uno de estos grupos está compuesto por más de 10 miembros.

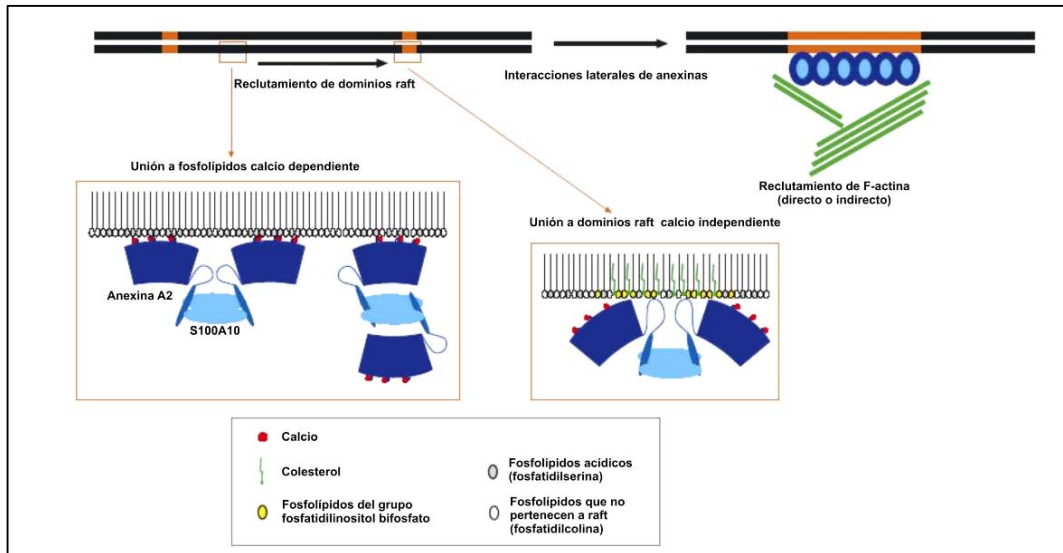
Las proteínas S100 son proteínas pequeñas, diméricas que contienen dominios EF-Hand de unión a calcio y ejercen funciones tanto intracelulares como extracelulares (Miwa y col., 2008). Esta familia representa el grupo más grande dentro de la superfamilia de proteínas de unión a calcio con dominios EF-hand.

S100A10, también llamada p11 o cadena liviana de anexina, pertenece a la familia de proteínas S100. S100 son proteínas de aproximadamente 10 kDa y contienen un dominio amino terminal y un dominio carboxilo terminal separados por una región no estructurada (Rescher y Gerke, 2008). Inicialmente fueron identificadas en cerebro y llamadas S100 a causa de su solubilidad en sulfato de amonio 100% saturado (Moore, 1965). S100A10 es única dentro de la familia, dado que ha sufrido mutaciones en ambos dominios EF-hand que le impiden unir calcio (Gerke y Weber, 1985).

La interacción entre proteínas S100A10 y anexina A2 fue inicialmente identificada en membranas plasmáticas derivadas de células epiteliales intestinales (Gerke y Weber, 1984). La presencia del complejo anexina A2-S100A10 se demostró por primera vez en compartimentos submembranosos unidos a componentes del citoesqueleto (Osborn y col., 1988). El complejo que forman es heterotetramérico, en él un dímero central S100A10 interacciona con dos cadenas de anexina A2 (Lewit-Bentley y col., 2000). Dentro de anexina A2 los sitios de unión a S100A10 residen exclusivamente en los 12 residuos de la región amino terminal que forman una  $\alpha$ -hélice antipática (Johnsson y col., 1990). La cara hidrofóbica de la hélice interacciona con una superficie hidrofóbica sobre el dímero de S100A10 que primariamente se encuentra en el carboxilo terminal y se extiende más allá del segundo EF-hand (Rety y col., 1999).

La característica bioquímica central de las anexinas es su unión, regulada por calcio, a la periferia de membranas que contienen fosfolípidos ácidos (Rescher y Gerke, 2004). Hay además varios modelos propuestos para la interacción del complejo anexina A2/S100A10 con superficies de membranas, que se muestran en la figura 55. En estos modelos los complejos proteicos jugarían un rol en la organización de la interfase citosólica entre la membrana y el citoesqueleto.

Por otro lado, el rol extracelular de anexina A2 (Hajjar y col., 1994) y S100A10 (Choi y col., 2003) ha sido estudiado. Ambas proteínas han sido identificadas como receptores extracelulares de plasminógeno y activador de plasminógeno tipo tisular.



**Fig. 55. Modelo de estabilización de dominios de membrana por anexina A2.** El modelo tiene en cuenta la unión dependiente de calcio de anexina A2/S100A10 a fosfolípidos ácidos, la cual está mediada por el núcleo anexina. La difusión lateral podría dirigir el complejo a dominios raft de membrana ricos en colesterol, glicoesfingolípidos y ciertos fosfatidilinositol fosfatos. Esto podría resultar en una fracción anexina A2/S100A10 que no requiere de calcio para la unión a dominios lipídicos raft. Seguido a este reclutamiento raft, interacciones laterales anexina-anexina, posiblemente reguladas por calcio, conducirían a la formación de un andamio en la membrana y la concomitante agregación de dominios raft y reclutamiento de F-actina. Adaptado de Rescher y Gerke (2004).

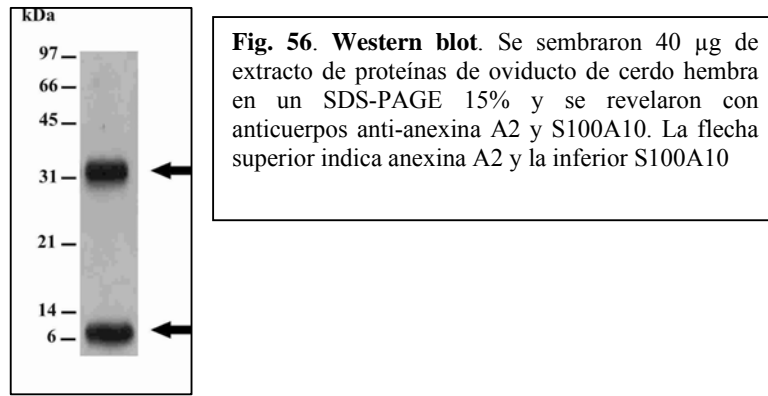
En el oviducto de cerdo hemos previamente informado la presencia de anexina A2, en esta parte del trabajo de tesis nos abocamos a investigar la posible presencia de S100A10 y su probable asociación con anexina A2 en esta localización.

#### IV.3.2. RESULTADOS.

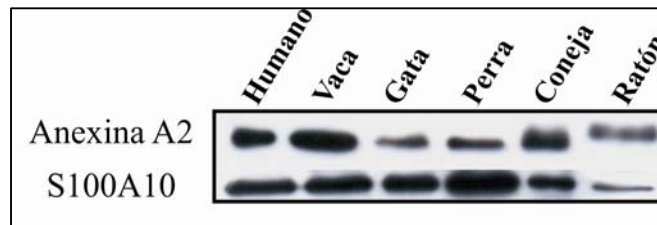
##### IV.3.2.1. Identificación de S100A10 en oviducto de cerdo y de varios mamíferos.

La primera aproximación para la identificación de S100A10 en oviducto de cerdo se llevó a cabo mediante western blot. Se evaluó la presencia de S100A10 incubando extractos de proteína de oviducto realizados con Tritón 0,2% con anticuerpos anti-anexina A2 y anti-S100A10 conjuntamente.

Pudo observarse un proteína de masa molecular relativa de 11 kDa correspondiente a S100A10 y anexina A2 en la misma calle del western blot (Fig. 56).



Dado que se había evaluado la presencia de anexina A2 en oviducto de varias especies de mamíferos y que S100A10 es su proteína ligando natural, resultó interesante evaluar la presencia de S100A10 en extractos de proteínas oviductales de las mismas especies en las que fue identificada anexina A2. Para ello se prepararon extractos de proteínas de células epiteliales oviductales y se enfrentaron en forma conjunta con anticuerpos anti-anexina A2 y S100A10. En la figura 57 se observa la presencia conjunta de ambas proteínas en extractos de oviducto de hembras de varias especies.

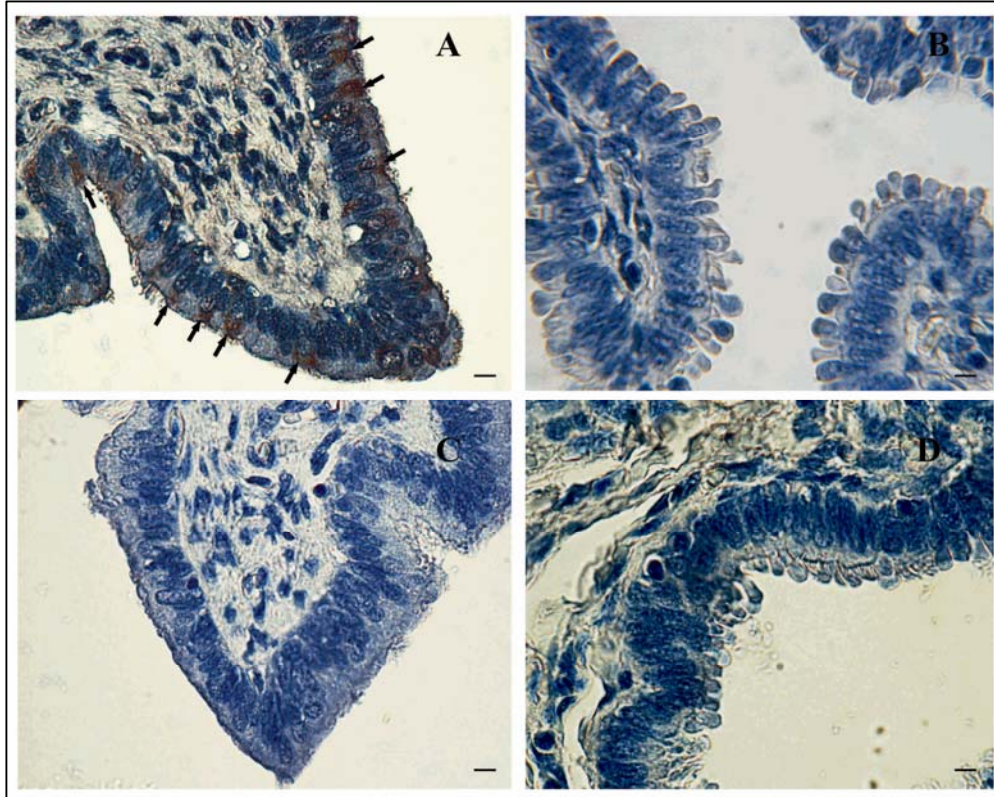


**Figura 57. Detección de anexina A2 y S100A10 en extractos de células epiteliales de oviducto.** Los oviductos fueron obtenidos por cirugía (humanos, gatos, perros, conejos y ratones) o de frigoríficos (vacas) y transportados al laboratorio en hielo. Las células epiteliales oviductales fueron obtenidos por raspado del oviducto con bisturí y los extractos proteicos preparados como se mencionó en la sección III.3.1. Veinte microgramos de proteína fueron analizadas mediante western blot usando anticuerpos HH7 anti-anexina A2, y anticuerpos anti-S100A10.

#### IV.3.2.2. Localización de S100A10 en oviducto de cerdo hembra.

Al igual que para anexina A2, la localización de S100A10 es de vital importancia para posteriormente poder evaluar su participación en la putativa interacción de anexina A2 con el espermatozoide *in vivo*.

Luego de verificar la presencia de S100A10 mediante western blot, se procedió a evaluar su localización en cortes de tejido oviductal (Fig. 58).



**Figura 58. Inmunolocalización de S100A10 en oviducto de cerdo hembra.** Secciones de istmo y de ampolla fueron incubadas con anticuerpos anti-S100A10 (A y B). En los cortes puede observarse una intensa señal de localización de S100A10 en el citoplasma apical de las células epiteliales ciliadas de istmo (A) (Indicadas con flechas). No se observa señal en cortes de ampolla (B). C y D: controles realizados por omisión de anticuerpo primario. La contratinción se realizó con hematoxilina. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

En los cortes de tejido se puede observar que la localización de S100A10 está restringida a la región del citoplasma apical de las células epiteliales ciliadas del istmo. Mediante esta técnica no se pudo evidenciar si S100A10 colocaliza con anexina A2 en las ciliadas de las células epiteliales. Además, no se observó la presencia de dicha proteína en cortes de ampolla.

#### **IV.3.2.3. Inmunoprecipitación con anticuerpos anti-anexina A2.**

Para evaluar la posible interacción entre anexina A2 y S100A10 en el oviducto, se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-anexina HH7 en extractos de proteínas de células epiteliales.

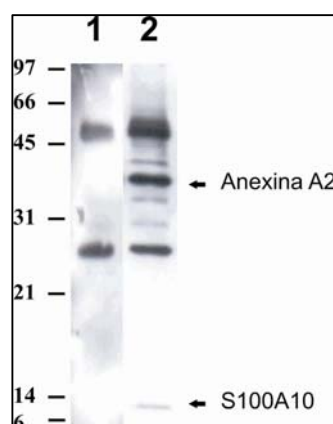
Los anticuerpos HH7 interaccionan con el extremo amino terminal de anexina A2, en presencia de EGTA (Thiel y col., 1992). En concordancia con los datos

previamente reportados, no fue posible obtener inmunoprecipitación de anexina A2 en ausencia de EGTA.

En el western blot de la figura 59 se puede observar, que mediante la utilización de anticuerpos HH7 anti-anexina A2, coinmunoprecipita su proteína ligando S100A10.

Esto demuestra la presencia del complejo anexina A2/S100A10 en extractos proteicos de membranas de células epiteliales de oviducto obtenidos con Tritón X-100 0,2% y con el agregado de EGTA 10 mM.

Puede observarse también que en la inmunoprecipitación la señal obtenida para S100A10 es menor que la correspondiente a anexina A2.

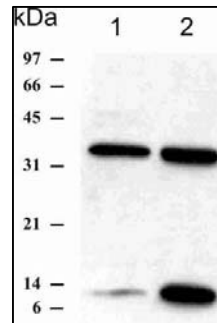


**Figura 59. SDS-PAGE del precipitado obtenido por tratamiento de extractos proteicos de membranas de células epiteliales con anticuerpos HH7.** En la figura se señalan anexina A2 y S100A10 que pudieron ser inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-anexina A2 (Calle 2) y detectadas en western blot. Calle 1 control con IgG de ratón.

#### **IV.3.2.4. Extracción diferencial del complejo anexina A2/S100A10 de fracciones de membrana plasmática.**

Los extractos proteicos de membranas de células epiteliales realizados con Tritón X-100 0,2% anteriormente mencionados brindaban información acerca del tipo de interacción del complejo anexina A2/S100A10 con las fracciones de membranas de los cuales se los extraía. Este tipo de interacción podría ser de tipo hidrofóbica a través de dominios lipídicos dado que los complejos anexina A2/S100A10 podían ser liberados con Tritón X-100 0,2%.

Para evaluar una posible interacción de tipo electrostática las fracciones de membrana de células epiteliales fueron incubadas con NaCl 0,5 M. En la figura 60 puede observarse que hay un leve incremento de la cantidad de anexina A2 y un incremento muy marcado de S100A10 en las extracciones realizadas con NaCl 0,5 M (calle 2) comparadas con las realizadas con Tritón X-100 (calle 1).



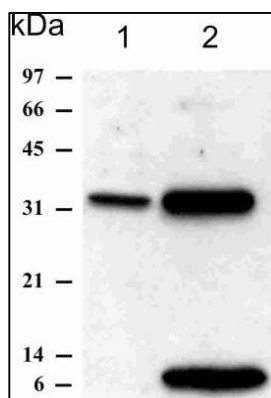
**Fig. 60. Extracción diferencial de anexina A2 y S100A10.** El western Blot muestra las cantidades relativas de anexina A2 y S100A10 obtenidas por los diferentes procedimientos de extracción. Puede verse mayor cantidad relativa de S100A10 en la extracción con NaCl (calle 2) que en los extractos realizados con Tritón X-100. La cantidad de anexina A2 también es mayor en la extracción con NaCl pero no tan marcadamente como S100A10.

**IV.3.2.5. Elución de anexina A2 y/o complejo anexina A2/S100A10 de la superficie de células epiteliales de oviducto.**

Una interacción entre anexina A2 o el complejo anexina A2/S100A10 y proteínas espermáticas requeriría una localización extracelular de estas proteínas. Para poder establecer si anexina A2 o el complejo anexina A2/S100A10 se encuentran en la localización requerida se procedió a incubar células epiteliales procedentes del raspado del epitelio oviductal en medios con EGTA. Esta metodología había sido utilizada debido a que la misma ha resultado eficiente para eluir anexina A2 de la superficie de células en cultivo demostrando que la interacción de estas proteínas con las membranas procede a través de calcio (Falcone y col., 2001; Hajjar y col., 1996).

Con este procedimiento se perseguía el objetivo de detectar, simultáneamente, cantidades relativas de proteínas liberadas en el medio de incubación mediante western blot y en las células epiteliales mediante inmohistoquímica (véase sección IV.3.2.6).

En los western blot realizados con el total de los sobrenadantes de las incubaciones de las células epiteliales ( $2 \times 10^7$  células/ml) se pudo observar que en los sobrenadantes de células incubadas con PBS sólo se detecta anexina A2, mientras que en los sobrenadantes de las células incubadas con PBS y EGTA se observa una mayor cantidad de anexina A2 y también se observa S100A10 (Fig. 61).



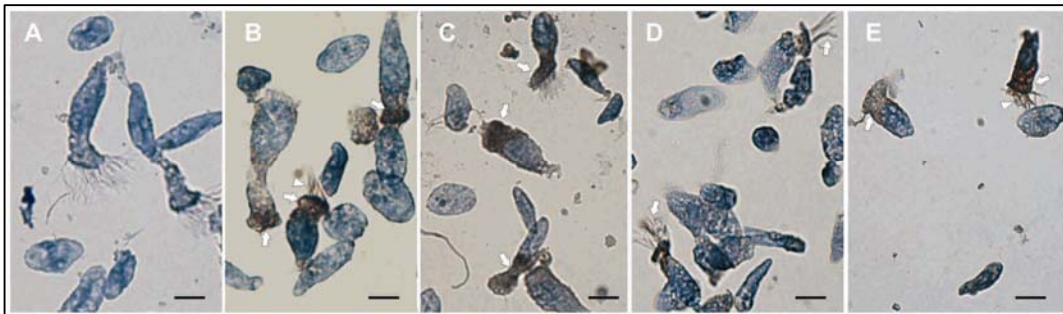
**Fig. 61. Elución del complejo anexina A2/S100A10 de la superficie de células epiteliales.** Western Blot de los sobrenadantes obtenidos de las incubaciones de células epiteliales en PBS (calle 1) o PBS/EGTA (calle 2). Se muestran las cantidades relativas de anexina A2 y S100A10 obtenidas por los diferentes procedimientos de extracción. Puede verse S100A10 en los tratamientos con EGTA (calle 2), mientras que no se observa S100A10 en los sobrenadantes de células epiteliales incubadas en PBS. La cantidad de anexina A2 también es mayor en los sobrenadantes de células tratadas con EGTA.

#### IV.3.2.6. Detección de anexina A2 y S100A10 en células epiteliales incubadas en PBS y PBS- EGTA.

Las células epiteliales utilizadas en los experimentos de elución de anexina A2-complejo anexina A2/S100A10 de la superficie celular fueron utilizadas para observar la localización celular de dichas proteínas luego de la incubación.

Las micrografías de la figura 62 muestran una localización de S100A10 en citoplasma apical de células ciliadas en las incubaciones de las células con PBS o con PBS-EGTA. Si bien no se puede asegurar mediante la técnica de detección empleada, parece observarse la presencia de S100A10 en las ciliadas además de la localización en el citoplasma apical. La misma no coincide con lo observado por inmunohistoquímica, probablemente, debido a los diferentes métodos de preparación.

En cambio, anexina A2 muestra una localización diferente en células incubadas con PBS de las incubadas con PBS-EGTA. Esta localización se manifiesta en ciliadas en células incubadas con PBS y en citoplasma apical, y aparentemente ciliadas, en PBS-EGTA.



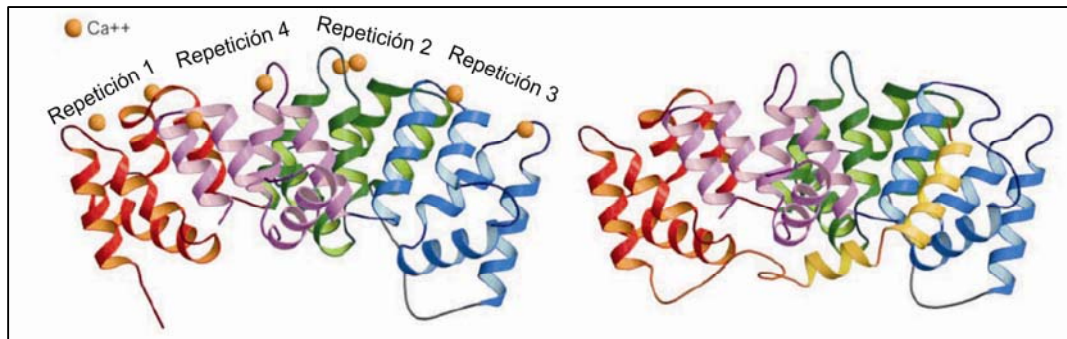
**Figura 62. Detección de anexina A2 y S100A10 en células epiteliales incubadas en PBS o PBS-EGTA.** Las células liberadas del epitelio oviductal por medio de raspados fueron incubadas en PBS (B y D) o PBS-EGTA (C y E) seguido de incubación con anticuerpos anti-S100A10 (B y C) o anticuerpos anti-anexina A2 (D y E). S100A10 puede verse en la misma localización, citoplasma apical, después de incubar las células en ambos medios (B y C, flechas) aunque es probable que también se localice en ciliadas, al menos, en células incubadas en PBS (B, cabeza de flecha). Anexina A2 mostró localización en ciliadas de células incubadas en PBS (D) y en citoplasma apical en células incubadas con PBS-EGTA (E), aunque puede verse señal en ciliadas de las mismas células (E, cabeza de flecha). El control se llevó a cabo por omisión de anticuerpo primario (A). Contratinción se realizó con hematoxilina. La barra representa 10  $\mu\text{m}$

#### IV.3.3. DISCUSIÓN.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo en cerdo y por otros grupos en bovinos, indican que anexina A2 es una de las principales proteínas involucradas en la formación del reservorio en estos mamíferos. En este capítulo se demuestra la presencia

de S100A10 en células epiteliales oviductales de humanos y hembras de bovinos, de carnívoros (gato y perro) y roedores y lagomorfos (ratón y conejo), además de cerdo (Fig. 57) y su interacción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con anexina A2, al menos en cerdo, por inmunoprecipitación. Esto apoya la idea de su posible rol en la formación del reservorio de espermatozoides formado parte de un mecanismo ubicuo.

Las discrepancias encontradas en cuanto a la localización de anexina A2 y S100A10 en las condiciones ensayadas podrían deberse por un lado a la imposibilidad de los anticuerpos anti-anexina A2 para detectar anexina A2 en ausencia de EGTA debido a un estado conformacional dependiente de calcio, en el cual el extremo amino terminal (el cual es reconocido por los anticuerpos) se encuentra enmascarado. Esto es apoyado por estudios estructurales de proteínas anexinas que indican que el dominio amino terminal (40 aminoácidos) se observa desordenado en estructuras obtenidas por rayos X en ausencia de calcio. Cuando el calcio se une, este dominio (hélice amarilla) se pliega sobre la repetición 3 de la estructura proteica (Rescher y Gerke, 2004) (Fig. 63).



**Figura 63. Estructura molecular de las anexinas.** El dominio amino terminal (40 aminoácidos) se observa desordenado en la estructura de rayos X en ausencia de calcio. Cuando el calcio se une, este dominio (hélice amarilla) se pliega sobre la repetición 3 (tomado de Rescher y Gerke, 2004)

Si este fuera el caso, es posible que anexina A2 este presente en el citoplasma apical de las células epiteliales pero no sea detectada por inmunohistoquímica a menos que el calcio sea depletado. Anticuerpos generados contra otra región de la proteína deberían ser usados para evaluar esta posibilidad. Otra posibilidad es que la depleción de calcio produzca un cambio conformacional que le permita a anexina A2 desplazarse desde la cara citosólica de la membrana plasmática hacia el citoplasma. Cuando los extractos de membrana de células epiteliales fueron tratados con alta fuerza iónica se observó mayor cantidad de anexina A2 y S100A10 que con los extractos tratados con detergentes como el Tritón X-100 (Fig. 60, calle 2). Esta diferencia fue mayor para S100A10 que para

anexina A2 (Fig. 60, calle 1 y 2). Esto indicaría que ambas proteínas están interaccionando con la membrana plasmática a través de interacciones electrostáticas, pudiendo ser dependientes de calcio, de forma mayoritaria, pero que a su vez existe una población de moléculas que lo hace a través de interacciones hidrofóbicas y está en menor cantidad.

El incremento en la liberación de anexina A2 y S100A10 a partir de células por depleción de calcio sugiere que las proteínas están unidas de manera calcio dependiente al dominio extracelular de las células epiteliales. Este controversial resultado podría ser debido a disrupción de células durante el tratamiento o a perfusión desde el citoplasma, aunque la cantidad de proteína detectada es muy elevada para sostener esta hipótesis. Es posible que anexina A2 y S100A10 interaccionen en el citoplasma apical y unidas a membrana plasmática como se interpreta en las inmunohistoquímicas de raspados de células epiteliales tratados con EGTA y los experimentos de inmunoprecipitación. Experimentos posteriores podrían ayudar a elucidar la relación entre ambas proteínas y la presencia de calcio en epitelio oviductal. Con respecto a la posible interacción entre S100A10 y proteínas espermáticas en el oviducto, su localización no apoya la propuesta, pero podría formar parte de un mecanismo que permita que anexina A2 acceda al exterior celular e interaccione con espermatozoides.

## **Capítulo V**

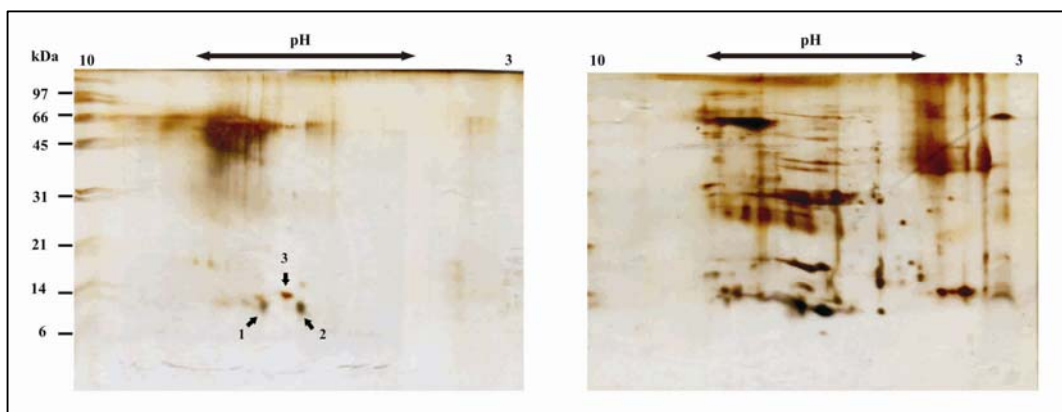
## V. PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS QUE INTERACCIONAN CON SBG.

Con el fin de evaluar cual o cuales proteínas de espermatozoides interaccionan con SBG, la misma fue purificada, como se indicó en la sección III.12, y fue utilizada para construir una columna de afinidad.

Se permitió interaccionar proteínas débilmente asociadas a membrana de espermatozoides (obtenidas según III.3.2.1) con SBG unida a la matriz y las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas por competencia con 20 ml de galactosa 200 mM. Este azúcar fue seleccionado debido a que es un residuo terminal presente en la estructura de SBG. Las proteínas eluidas fueron dializadas contra agua y concentradas por liofilización.

Como resultado de la elución se pudieron resolver en electroforesis bidimensional al menos 9 polipéptidos (Fig. 64), de los cuales los 3 mayoritarios fueron identificados a través de espectrometría de masa (LC-MS/MS).

Dos de los péptidos identificados (Fig. 64. 1 y 2) presentan homología con S100A7 y el tercero corresponde a una proteína homóloga a dermcidina (Fig. 64. 3).



**Figura 64. Electroforesis bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoide que interaccionan con SBG.** A la izquierda se puede observar que al menos 9 péptidos son eluidos de la columna de afinidad de SBG. 1 y 2 corresponden a péptidos que presentan homología con S100A7 y 3 corresponde a un péptido que presenta homología con dermcidina. A la derecha se muestra una electroforesis bidimensional de 400 µg del extracto proteico que se hizo interaccionar con SBG. La tinción de ambos geles se realizó con plata.

### V.1. S100A7

#### V.1.1. INTRODUCCION

S100A7, también conocida como psoriasina, es una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio S100. Fue identificada por primera vez en células epiteliales descamadas de piel con lesiones psoriáticas (Madsen y col., 1991).

Se trata de una proteína de masa molecular de 11,4 kDa y, como los otros miembros de la familia S100, posee dominios EF-hand.

En cuanto a sus actividades se le asignan funciones como quimioattractante de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y neutrófilos en concentraciones de 10<sup>-11</sup> M (Jinquan y col., 1996), en la progresión de tumores de mama (Krop y col., 2005), y de vejiga (Celis y col., 1996) y como proteína antimicrobiana (Glaser y col., 2005).

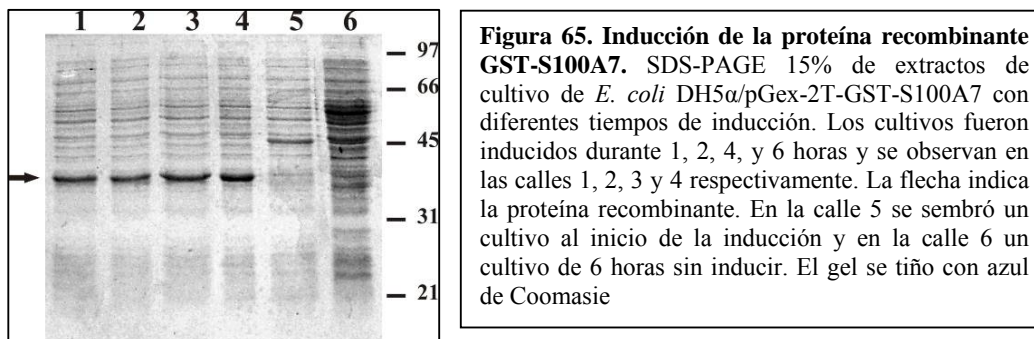
Aunque carece de secuencias específicas para secreción, se sabe que existen formas citoplasmáticas y secretadas (Madsen y col., 1991) y estudios de expresión en fluido cerebrospinal proponen que esta proteína podría ser usada como biomarcador en la enfermedad de Alzheimer (Qin y col., 2009).

### V.1.2. RESULTADOS

#### V.1.2.1. Expresión de GST-S100A7 humana.

El ADNc correspondiente a S100A7 humana fue obtenido por donación del Dr. Madsen y subclonado en el vector pGex-2T para su expresión. Una vez confirmada la secuencia de la nueva construcción se procedió a evaluar la inducción de la proteína de fusión.

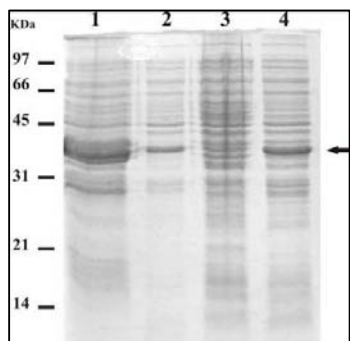
En la figura 65 puede observarse la expresión de la proteína recombinante con un aparente incremento de la cantidad desde la hora de inducción hasta las 6 horas.



#### V.1.2.2. Evaluación de la solubilidad de GST-S100A7 humana

Una vez optimizada la inducción de GST-S100A7 se evaluó la solubilidad de la proteína recombinante. Se procedió a inducir 1 ml de cultivo de *E. coli* DH5α/pGex-2T-GST-S100A7 con IPTG 1 mM durante 6 horas. Luego de producir la ruptura celular mediante sonicación, alícuotas del sobrenadante y del pellet fueron resueltas en geles SDS-PAGE. En la calle 2 de la figura 66 se puede apreciar que la proteína recombinante

GST-S100A7 es soluble en el citoplasma bacteriano, lo que facilitaría su purificación a través de cromatografía de afinidad.

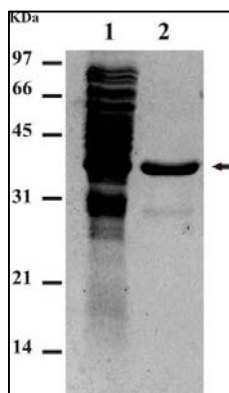


**Figura 66. Evaluación de la solubilidad de la proteína GST-S100A7.** En SDS-PAGE se evaluó la solubilidad de GST-S100A7. En la calle 1 se sembró una alícuota de pellet del cultivo bacteriano inducido durante 6 horas y sonicado. En la calle 2 una alícuota del sobrenadante del cultivo inducido y sonicado. Calle 3: alícuota de cultivo sin inducir. Calle 4: alícuota de cultivo inducido. La flecha indica la GST-S100A7. Gel 15% teñido con azul de Coomassie

#### V.1.2.3. Purificación de GST-S100A7 humana.

Una vez verificado que la proteína recombinante expresada permanecía en el sobrenadante de un cultivo bacteriano sonicado se comenzó la purificación de la misma.

El proceso de purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a glutatión. En la figura 67 puede observarse el resultado del proceso de purificación. El rendimiento obtenido fue de 748  $\mu$ g de proteína recombinante a partir de 1 ml de cultivo bacteriano. Esta proteína fue utilizada para la preparación de anticuerpos específicos en conejo.

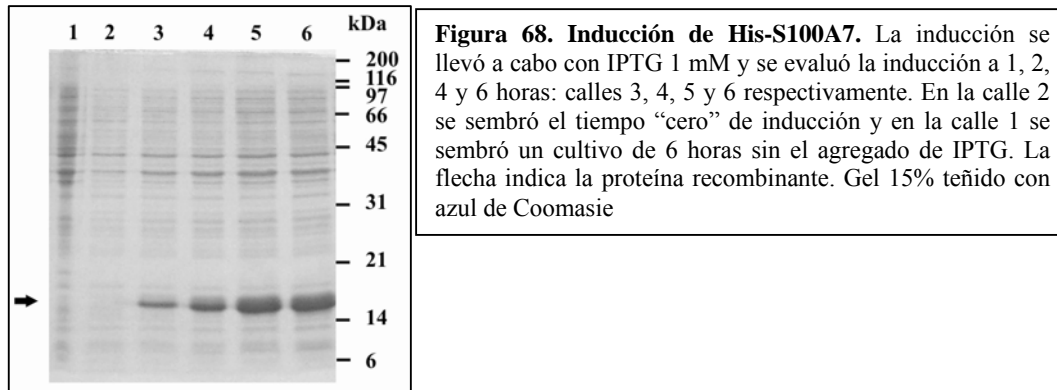


**Figura 67. Purificación de GST-S100A7.** Calle 1: sobrenadante de cultivo sonicado, calle 2: proteína purificada. La flecha indica la GST-S100A7. Gel 15% teñido con azul de Coomassie

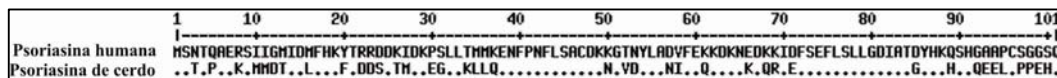
#### V.1.2.4. Expresión de His-S100A7 de cerdo.

A fin de obtener proteína recombinante S100A7 porcina y utilizarla para la producción de anticuerpos, el ADNc de S100A7 de cerdo cedido por el Dr. Jørgesen, fue subclonado en el vector pET-tev. Este vector fusiona 6 histidinas al extremo amino terminal de la proteína.

Una vez obtenida la nueva construcción se procedió a evaluar la expresión a través de la inducción con 1 mM de IPTG. En la figura 68 se observa una expresión de la proteína recombinante dependiente del tiempo de inducción.



Una vez obtenidas las secuencias de los ADNc para ambas proteínas, S100A7 humana y de cerdo, las secuencias proteicas deducidas fueron comparadas por apilamiento. En la figura 69 se muestra el apilamiento de secuencias de S100A7 humana y S100A7 de cerdo, lo que demuestra un 60% de homología entre éstas.



**Figura 69. Apilamiento de secuencias de S100A7 humana y S100A7 de cerdo.** La secuencia de S100A7 humana obtenida del banco de datos de NCBI y la secuencia de S100A7 de cerdo obtenida de la secuenciación del clon enviado por el Dr. Jørgesen fueron alineadas. En la línea de puntos se indican las diferencias en aminoácidos de ambas secuencias.

**V.1.2.5 Detección de S100A7 en extractos de proteínas de espermatozoides y plasma seminal.**

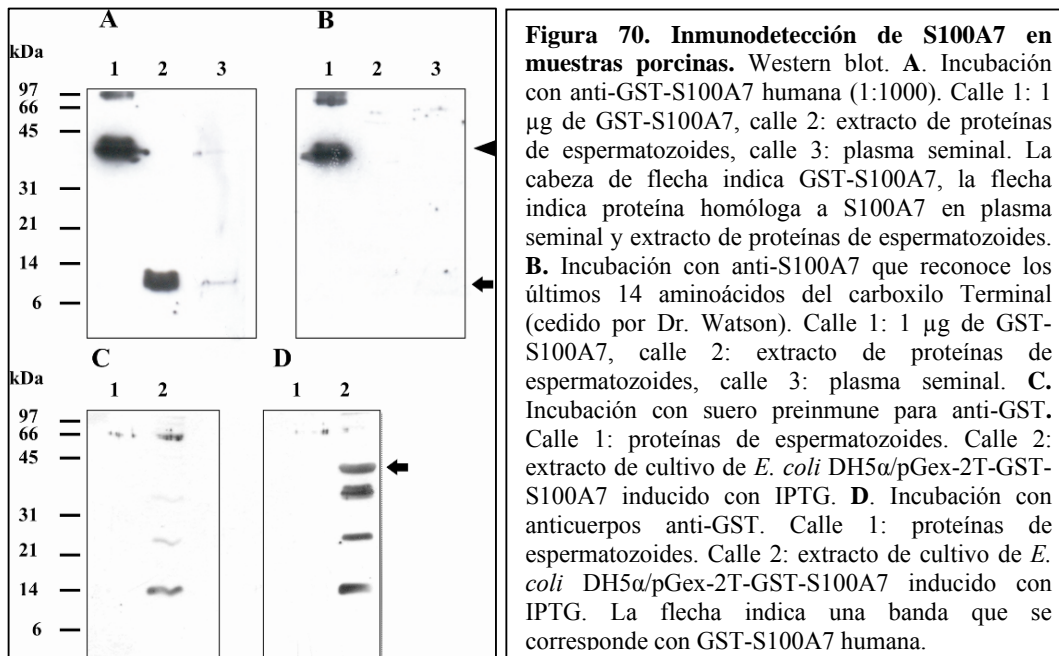
La presencia de S100A7 en extractos de proteínas de espermatozoides porcinos se confirmó mediante western blot. Dado que las proteínas adsorbidas a los espermatozoides durante su tránsito por el tracto reproductivo masculino suelen estar presentes en plasma seminal, también se enfrentaron muestras de plasma seminal con anticuerpos anti-S100A7. La figura 70. A muestra un ejemplo de los resultados obtenidos

Se utilizaron también para la detección de S100A7 anticuerpos generados contra el dominio carboxilo terminal de S100A7 humana (cedidos por el Dr. Peter Watson) (Fig. 70. B). Finalmente, se realizaron controles con anticuerpos anti-GST (Fig. 70. C y D). En la parte A de la figura 70, se puede apreciar, en la calle 1, una proteína de masa

molecular aparente de 40 kDa correspondiente a GST-S100A7 (indicada con cabeza de flecha). En extractos de proteínas de espermatozoides (calle 2) se observa una proteína que abarca de 10 a 12 kDa y en plasma seminal (calle 3) una banda de aproximadamente 11 kDa, indicadas con una flecha. Estas proteínas se corresponden con proteínas homólogas a S100A7 humana presentes en extractos proteicos de espermatozoides y plasma seminal porcino.

En el panel B se muestra un western blot en el cual se enfrentaron las mismas proteínas que en el panel A excepto que se utilizaron anticuerpos que reconocen la secuencia de aminoácidos KQSHGAAPCSGGSQ del extremo carboxilo terminal de S100A7 humana. En este caso no se detectaron bandas apreciables en extractos proteicos de espermatozoides porcinos ni en plasma seminal, indicando que S100A7 carece de esta secuencia. Esto está en concordancia con la baja homología encontrada entre las proteínas humana y porcina en la región carboxilo terminal (Fig. 69).

En los paneles C y D se enfrentaron sueros generados contra GST (D) y su correspondiente suero preinmune (C) contra extractos de proteínas de espermatozoides (calle 1) y extractos de cultivos bacterianos inducidos que expresan GST-S100A7 (calle 2). Se puede observar que tanto el suero preinmune como los sueros obtenidos contra GST no reconocen proteínas presentes en extractos proteicos de espermatozoides. La flecha indica GST-S100A7.



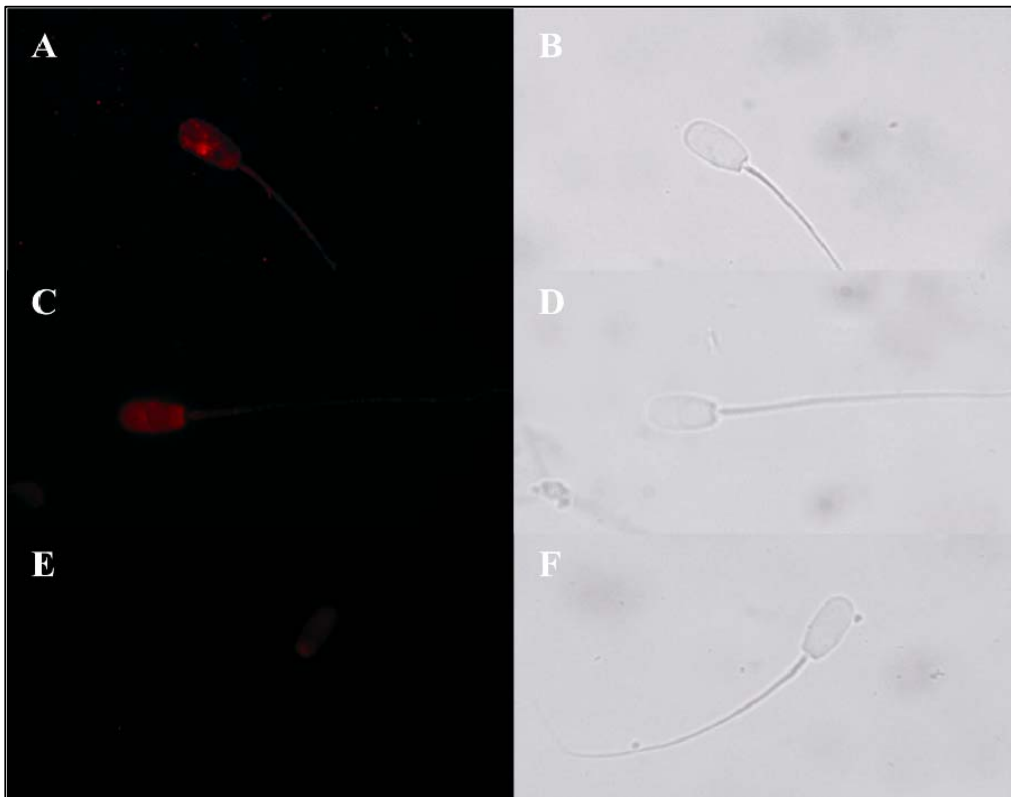
**V.1.2.6. Inmunolocalización de S100A7.**

A partir del antisuero anti-GST-S100A7 humana obtenido como se describió anteriormente (ver sección V.1.2.3) y utilizado para western blot (ver sección V1.2.5), se purificaron anticuerpos anti-S100A7 por afinidad a la proteína porcina.

Proteínas de extractos de espermatozoides porcinos fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y fueron incubadas con el antisuero. Los anticuerpos fueron despegados de dichas membranas y utilizados para localizar la proteína homóloga en espermatozoides de cerdo.

Dado que el interés por estudiar S100A7 surgió de su interacción con SBG, y que las membranas periacrosomales de espermatozoides utilizadas para la purificación de SBG estarían despojadas de las proteínas de superficie de membrana, la localización de S100A7 podría ser en las primeras capas de proteínas que se asocian al espermatozoide cuando este atraviesa el tracto reproductivo masculino. Las proteínas más externas se liberan de los espermatozoides durante el proceso de capacitación y considerando esto, se decidió evaluar la presencia y localización de S100A7 en espermatozoides capacitados y no capacitados.

Para ello, muestras de espermatozoides incubados en medio capacitante y sin incubar fueron preparadas para inmunohistoquímica como se indica en la sección III.16. Se incubaron los preparados con anticuerpo anti-S100A7 (dilución 1:50) durante toda la noche. La inmunolocalización fue revelada con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados al fluoróforo Cy3. El control negativo se llevó a cabo omitiendo el anticuerpo primario. En la figura 71 se muestran espermatozoides incubados con anticuerpos anti-S100A7. Se observa señal en la cabeza del espermatozoide, evidenciándose varios patrones según los tratamientos que sufrieron los espermatozoides. En las muestras de espermatozoides que no fueron incubados en ningún medio muestran un patrón punteado sobre la cabeza (Fig. 71. A). Los espermatozoides que fueron incubados en medio capacitante, además del patrón punteado antes mencionado, muestran una señal uniforme sobre la región acrosomal en un porcentaje similar al de espermatozoides capacitados determinado por inducción de RA por progesterona (figura 71. C).



**Figura 71. Immunolocalización de S100A7 en el espermatozoide.** Micrografía de los patrones observados en espermatozoides no incubados **A** e incubados en medio capacitante **C**. Los espermatozoides fueron incubados con anticuerpos anti-S100A7 purificados por afinidad y luego revelados con anti-IgG de conejo conjugados a Cy3. **A**- puede observarse un patrón punteado en el espermatozoide que no fue incubado en medio capacitante. **C**- la región acrosomal de espermatozoide se tiñe uniformemente luego de que éste fuera incubado en medio capacitante durante 1 h. **E**- control sin anticuerpo primario. **B**, **D** y **F**, micrografía de campo claro. Aumento 1000 X

### V.1.3. DISCUSIÓN.

Durante la búsqueda de proteínas que interaccionan con SBG se pudo identificar S100A7. Dos isoformas de esta proteína estarían presentes en espermatozoides de cerdo. Actualmente se acepta que complejas interacciones como la del espermatozoide y el oviducto son debidas a la relación entre varias proteínas (Ramirez y col., 2007). De acuerdo con esto, se pudieron resolver en geles bidimensionales varias proteínas, además de S100A7, obtenidas a partir de la interacción *in vitro* con SBG, eluidas por competencia con galactosa.

El hecho de que S100A7 pudo ser eluida por competencia con galactosa podría ser evidencia de que en la interacción de SBG con S100A7 y en consecuencia la

interacción espermatozoide-oviducto mediada por SBG, están involucrados residuos de carbohidratos.

S100A7 pertenece a la familia de proteínas S100 compuesta por proteínas de unión a calcio, las cuales existen sólo en vertebrados (Shang y col., 2008). S100A7 funciona como sustrato de transglutaminasa, como proteína de transducción de señales, como quimoquina y como proteína antibacteriana en la epidermis normal y su expresión se ve incrementada en desordenes epidermicos hiperproliferativos (Eckert y Lee, 2006). Esta sería la primera vez que se describe a esta proteína en espermatozoides, pero no la primera vez que se describe una proteína de la familia, ya que S100A8 y S100A9 fueron descritas en espermatozoides humanos (Martinez-Heredia y col., 2006). Es también, hasta donde conocemos, el primer informe de la detección de la proteína S100A7 porcina. Comparaciones de secuencias y los resultados de western blot con anticuerpos específicos indican falta de homología en la región carboxilo terminal de S100A7 entre ambas especies.

La inmunolocalización de S100A7 muestras diferencias luego de la incubación de espermatozoides en medios capacitantes, observándose una exposición uniforme sobre la cabeza del espermatozoide luego de la capacitación. Este resultado está de acuerdo con el modelo de Töpfer-Petersen y col (2008), en el cual se propone que las espermadhesinas son liberadas de la cabeza del espermatozoide en los eventos tempranos de capacitación, exponiendo así proteínas previamente enmascaradas. El hecho de que SBG actúe sobre espermatozoides capacitados y que S100A7 sea expuesta a la superficie del espermatozoide cuando éste se capacita, está de acuerdo con la interacción de la glicoproteína y S100A7. Más aún, SBG es purificada por interacción con membranas periacrosomales de espermatozoides que han perdido sus proteínas de superficie y probablemente S100A7 colabore en el proceso de purificación.

## **V.2 DERMICIDINA**

### **V.2.1. INTRODUCCION.**

La proteína dermcidina fue identificada por primera vez como producto de un gen que se expresa específicamente en glándulas sudoríparas y que codifica para una proteína de 110 aminoácidos que sufre procesamiento proteolítico pos-secreción (Schitteck y col., 2001). Su expresión es constitutiva en epidermis humana y no es inducida en condiciones inflamatorias (Rieg y col., 2004), estando también asociada a cáncer de próstata (Stewart y col., 2007). Recientemente se publicaron trabajos que indican la presencia de dermcidina en placenta (Lee Motoyama y col., 2007) y tejido cervico-vaginal (Shaw y col., 2007). La presencia de esta proteína no ha sido informada en otros organismos.

El estudio de su función estuvo orientado principalmente hacia la actividad antimicrobiana en lo referente a los péptidos que se derivan de su procesamiento pos-secretorio, no habiendo sido asignadas funciones para la proteína completa que justifiquen su presencia en tejidos distintos del epitelial epidérmico donde fue encontrada.

### **V.2.2. RESULTADOS**

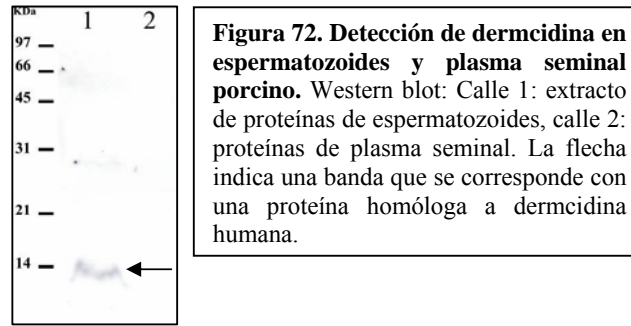
#### **V.2.2.1. Presencia de una proteína homóloga a dermcidina en extractos proteicos de espermatozoides y plasma seminal.**

A fin de corroborar la presencia de dermcidina en extractos de proteínas de espermatozoides y su posible presencia en plasma seminal, se realizaron western blot enfrentado extractos de proteína con anticuerpos monoclonales anti-dermcidina cedidos por el Dr. Akihiko Kimura de la Universidad de Wakayama, Japón.

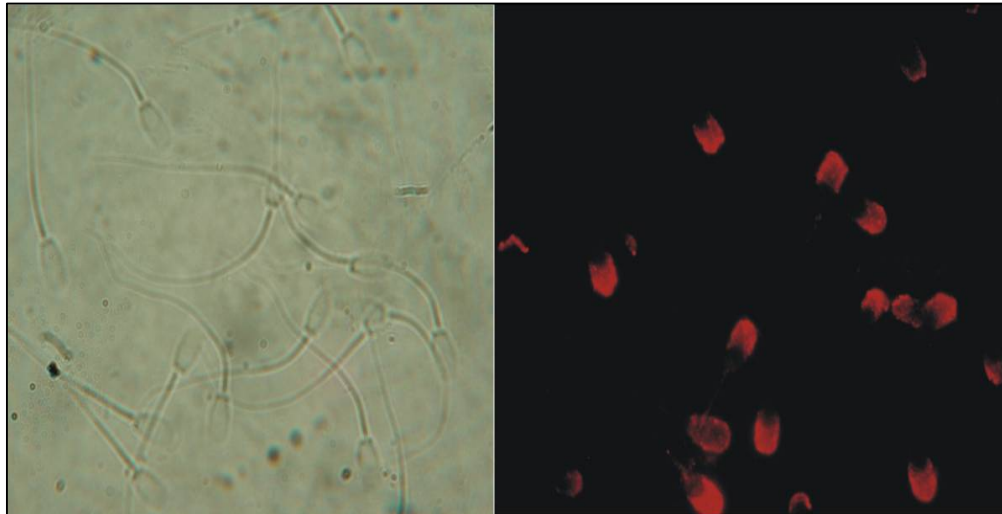
Las proteínas fueron preparadas de la misma manera que para los ensayos realizados con anticuerpos anti-S100A7. Puede verse en la figura 72 que pudo detectarse una proteína homóloga a dermcidina en extractos de proteínas de espermatozoides. No se pudo detectar señal en proteínas de plasma seminal.

#### **V.2.2.2. Inmunolocalización de dermcidina.**

Espermatozoides porcinos fijados y depositados en portaobjetos optimizados para inmunohistoquímica fueron incubados con anticuerpos monoclonales anti-dermcidina durante toda la noche y posteriormente fueron incubados 1 hora con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados al fluoróforo Cy3.



El ensayo control fue realizado por omisión del anticuerpo primario y no se muestra en la figura 73. Puede verse en la figura 73 que los anticuerpos monoclonales localizan una proteína homóloga a dermcidina humana en la región acrosomal de los espermatozoides.



**Figura 73. Inmunolocalización de dermcidina.** Espermatozoides incubados con anticuerpos anti-dermcidina. A la izquierda: micrografía de espermatozoides en campo claro. A la derecha: micrografía de espermatozoides observados con fluorescencia. Puede observarse una marca intensa en la región acrosomal correspondiente a una proteína homóloga a dermcidina. Aumento 1000 X

### V.2.3. DISCUSIÓN

El uso de anticuerpos monoclonales contra dermcidina humana permitió la detección de una proteína homóloga en extractos de proteínas de espermatozoides porcinos y sobre las células espermáticas. Estos anticuerpos fueron generados contra un fragmento de la proteína humana.

Resta evaluar la posible redistribución de dermcidina ante cambios en el estado fisiológico de los espermatozoides.

Este es el primer reporte acerca de la presencia de dermcidina fuera de tejidos humanos, y en espermatozoides.

### **V.3. AKAP4**

#### **V.3.1. INTRODUCCIÓN**

Resultados previos indican que la incubación de espermatozoides con SBG desencadena la fosforilación de una proteína espermática de aproximadamente 97 kDa.

Esta proteína fue purificada de un gel de poliacrilamida y enviada a secuenciar. Los péptidos resultantes de la secuenciación coinciden con AKAP4 de *Canis familiaris*. *AKAP4* (A-kinase anchor protein 4) es codificada por un gen ligado al cromosoma X en mamíferos.

AKAP es una familia de proteínas de andamiaje o adaptadoras que unen quinasas dependiente de AMPc, y que juegan un rol esencial en el ensamble de la pieza media durante la espermatogénesis y en la función flagelar del espermatozoide (Hu y col., 2009). Se asume que AKAP4 recluta PKA en la pieza media y facilita la fosforilación local para regular las funciones del flagelo (Brown y col., 2003).

Complejos de señalización ligados a AKAP y asociados con el citoesqueleto son fundamentales para regular propiedades celulares tales como forma, movimiento y división (Diviani y Scott, 2001).

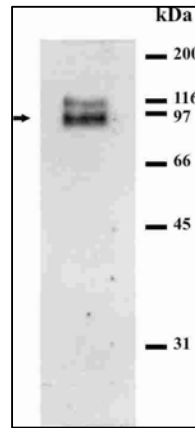
Las AKAPs también pueden servir como proteínas de andamiaje para los complejos de transducción de señal que contienen quinasas y fosfatasas que modulan el estatus de fosforilación de proteínas diana (Colledge y Scott, 1999; Edwards y Scott, 2000).

#### **V.3.2. RESULTADOS**

##### **V.3.2.1. Identificación de AKAP4 mediante anticuerpos específicos.**

Anticuerpos específicos anti-AKAP4 de ratón fueron cedidos por el Dr. Michael Eddy del National Institute of Health (NIH), USA. Estos anticuerpos fueron usados para reconocer homólogos de AKAP4 en espermatozoides de cerdo mediante western blot.

En la figura 75 se puede observar una banda de aproximadamente 97 kDa correspondiente al homólogo de AKAP4 en espermatozoides de cerdo.



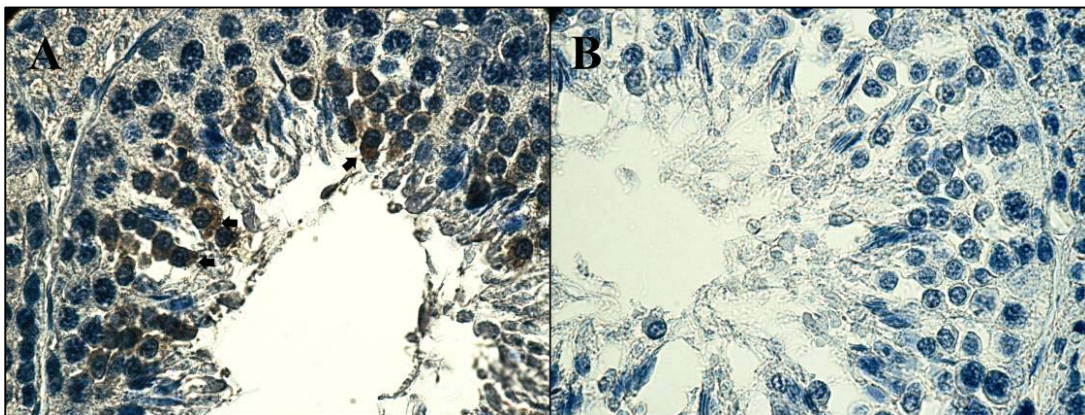
**Figura 75. Identificación de AKAP4 en extractos de espermatozoides de cerdo.**  $1 \times 10^6$  espermatozoides fueron sembrados en un SDS-PAGE 12%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y enfrentados con anticuerpos anti-AKAP4. La flecha indica AKAP4.

### V.3.2.2. Localización de AKAP4 en tejido testicular.

Una vez establecida la presencia de un homólogo de AKAP4 de ratón en extractos de espermatozoides de cerdo, se procedió a estudiar la localización de la proteína en tejidos del tracto reproductivo del macho.

Dado que la proteína AKAP4 estaría involucrada en el ensamble de la pieza media durante la espermatogénesis y que en ratón se pudo localizar en citoplasma de espermátidas del estadio II y III, se decidió evaluar la presencia de dicha proteína en cortes de testículo.

En estos cortes la proteína fue localizada en el citoplasma de células espermáticas en formación (Fig. 76). La localización se registra en espermátides en estadios avanzados de diferenciación, en la zona del citoplasma que formará parte de la pieza principal del flagelo del espermatozoide.

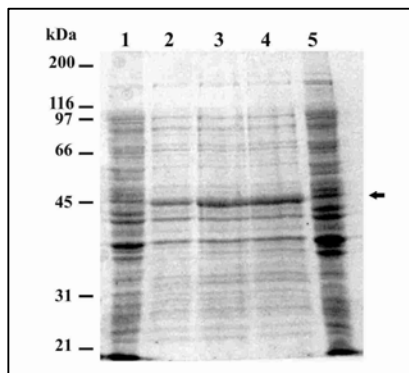


**Figura 76. Localización de AKAP4 en testículo de cerdo.** Secciones de tejido incluidas en parafina fueron utilizadas para la localización de AKAP4 mediante inmunohistoquímica. En **A** la flecha indica la localización de AKAP4 en el citoplasma de los espermatozoides en formación. **B.** control sin anticuerpos primarios.

**V.3.2.3. Expresión de un fragmento carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo.**

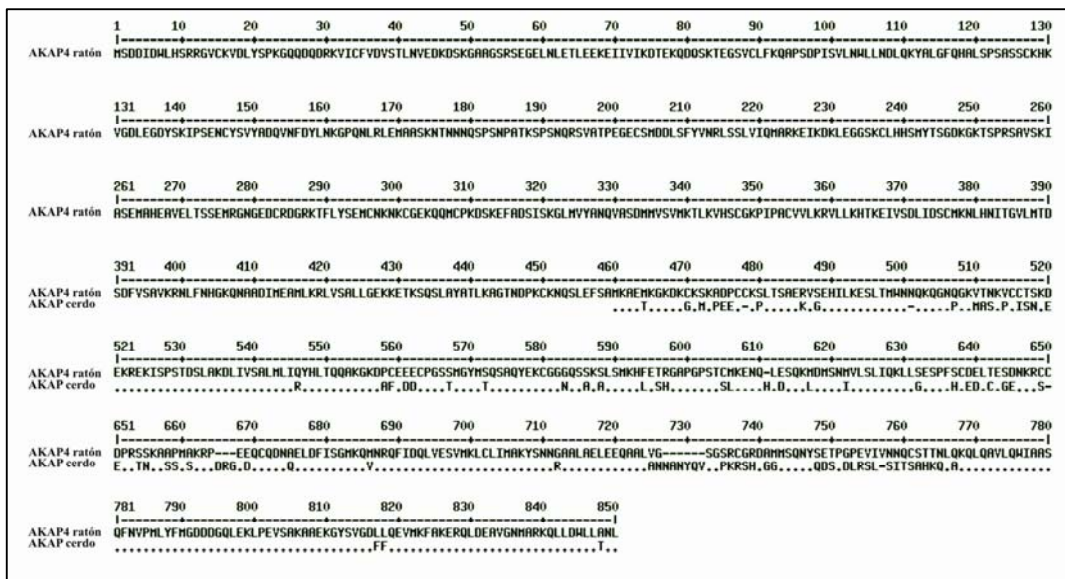
Un EST correspondiente a un homólogo porcino de AKAP4, proveniente de una biblioteca de ADN obtenida a partir de ARNm de testículo de cerdo, fue cedido por el Dr. Lee del Instituto de Tecnología Animal de Taiwán y fue subclonado en el vector pET-tev como se indicó en la sección III.24.

El fragmento de 387 aminoácidos fusionado a 6 histidinas en la región amino terminal fue expresado mediante la inducción con IPTG 1 mM durante 2, 4 y 6 horas obteniéndose un perfil de expresión como el que se muestra en la figura 77. La proteína recombinante será utilizada para la producción de anticuerpos específicos.



**Figura 77. Perfil de expresión de fragmento carboxilo terminal de AKAP4.**  
 En las calles 2, 3 y 4 se observa un cultivo bacteriano inducido 2, 4 y 6 horas. La flecha indica la expresión de la proteína recombinante. En la calle 1 se observa el tiempo “cero” de inducción y en la calle 5 un cultivo de 6 horas sin inducir

La figura 78 muestra un alineamiento de las secuencias de AKAP4 de ratón y la secuencia del extremo carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo clonada, las mismas presentan un 75% de homología



**Figura 78. Alineamiento de la secuencia de AKAP4 de ratón y el carboxilo terminal de AKAP4 de cerdo.** Sobre la línea de puntos se muestran las diferencias en las secuencias de aminoácidos.

En la figura 78 puede verse una zona de baja homología entre los aminoácidos 725 y 768.

### V.3.3. DISCUSIÓN

Durante la espermiogénesis de ratón, AKAP4 es sintetizada como un precursor, pro-AKAP4 (1-840 aminoácidos), el cual es escindido produciendo la forma madura de la proteína (180-840 aminoácidos) durante el ensamble de la pieza principal del flagelo. El dominio pro (1-180 aminoácidos) de la proteína, una vez escindido, aparece con un patrón difuso en el citoplasma, mientras que la forma madura se localiza en la pieza principal del flagelo (Nipper y col., 2006). Los anticuerpos utilizados para realizar el western blot de la figura 75 son policlonales y se puede observar en dicho western dos bandas que probablemente correspondan a pro-AKAP4 y AKAP4.

Las inmunohistoquímicas realizadas mostraron una localización de AKAP4 en espermátides tardías ubicadas hacia la luz del túbulo seminífero (Fig. 76), lo que es congruente con la función previamente asignada en cuanto al ensamble y formación de la pieza principal del flagelo. No fue posible localizar AKAP4 en espermatozoides, pero se espera producir anticuerpos contra el fragmento carboxilo terminal de AKAP4 porcina y así poder localizar AKAP4 en el mismo.

Es interesante destacar que no se conoce la secuencia de AKAP4 de cerdo, de modo que, gracias a la colaboración del Dr. Lee y con el apoyo de más experimentos, es probable que en un futuro cercano podamos reportar la secuencia de dicha proteína.

Los experimentos realizados para evaluar las posibles vías involucradas en la fosforilación de AKAP4 fueron realizados antes de que se conociera la identidad de la proteína. De modo que ahora se cuenta con más información y se pueden diseñar experimentos mejor proyectados hacia la dilucidación de las vías involucradas en la fosforilación de AKAP4 en espermatozoides.

## **Capítulo VI**

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

- SBG produce alteraciones acrosomales sobre espermatozoides en condiciones capacitantes. Estas alteraciones consisten en hinchamiento del acrosoma, desprendimiento del acrosoma del resto de la célula y alteración de los bordes de los acrosomas con aparente pérdida de membrana plasmática, y son concentración y tiempo dependientes.
- SBG se une a sitios localizados en la membrana periacrosomal aún luego de que la alteración acrosomal ha ocurrido o, alternativamente, SBG puede unirse a sitios localizados en membranas periacrosomales y permanecer unida luego de la alteración acrosomal.
- SBG estaría probablemente asociada a un proceso de selección negativa de espermatozoides
- SBG produce un incremento en el estado de fosforilación de residuos de tirosina de una proteína de 97 kDa identificada como AKAP4 y un descenso concomitante en el estado de fosforilación de proteínas fosforiladas en espermatozoides maduros de 44, 42, 38 y 34 kDa.
- SBG induce la fosforilación de AKAP4 tanto en ausencia de calcio como de bicarbonato pero no en ausencia de ambos, indicando que su fosforilación corresponde a una etapa temprana del proceso de la alteración acrosomal, y que se requieren señales adicionales para producir el efecto sobre los acrosomas.
- La fosforilación de AKAP4 inducida por SBG no se encuentra influenciada por AMPc.
- Se pudo localizar una proteína homóloga a AKAP4 de ratón en extractos de espermatozoides de cerdo, y en cortes de testículo se la localizó en el citoplasma de células espermáticas en formación.
- El patrón de fosforilación de proteínas de espermatozoides tratados con progesterona es diferente del patrón producido por SBG. La progesterona muestra un descenso en el estado de fosforilación de proteínas que se hallan fosforiladas en el espermatozoide maduro (44, 42, 38 y 34 kDa) al igual que SBG, pero también un incremento en el estado de fosforilación de dos proteínas de peso molecular aproximado de 200 kDa y 210 kDa. Por lo tanto, las vías de señalización que involucran a progesterona y a SBG son distintas.

## CONCLUSIONES GENERALES

- La identificación de SBG por LC/MS-MS, la masa molecular de SBG y DMBT1 y la localización de ambas proteínas indican que SBG es probablemente DMBT1. Alternativamente, ambas proteínas poseen dominios SRCR y masas moleculares similares.
- Anexina A2 está probablemente vinculada a la formación del reservorio espermático en cerdos.
- Anexina A2 se encuentra en forma extracelular unida a membrana plasmática de forma independiente de calcio. Además, habría complejos anexina A2/S100A10 extracelulares unidos por medio de calcio.
- Anexina A2 y S100A10 se encuentran tanto en el citoplasma apical como en las cilias de las células epiteliales de oviducto porcino.
- Entre las proteínas espermáticas que interaccionan con SBG se identificó a S100A7 y a dermcidina.
- Se clonó, expresó y secuenció el ADNc de S100A7 de cerdo, confirmando además la presencia de dicha proteína en espermatozoides y plasma seminal porcino.
- La exposición de S100A7 se presenta en forma de parches y cambia hacia una exposición uniforme en la superficie del acrosoma cuando los espermatozoides son incubados en un medio capacitante.
- Los ensayos de western blot y de inmunolocalización indican que existe una proteína homóloga a dermcidina humana localizada en la región acrosomal de espermatozoides de cerdo.

## **Capítulo VII**

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

En animales de fecundación interna, el punto de encuentro de ambas gametas, en el cual ocurre la fecundación, está restringido al tracto reproductivo femenino (Töpfer-Petersen, 2008).

La interacción entre el espermatozoide y el oviducto resulta en un mecanismo por el cual el espermatozoide puede ser almacenado en el oviducto por varios días y permite la selección de espermatozoides con ciertas cualidades (Talevi y Gualtieri, 2004).

Los métodos *in vitro* son herramientas excelentes para evaluar los efectos biológicos de las secreciones de oviductos y de células epiteliales oviductales sobre gametas, fecundación y desarrollo embrionario. El establecimiento de bioensayos para capacitación de espermatozoides, reacción acrosómica (RA), unión espermatozoide-ovocito y unión del espermatozoide al oviducto, fecundación, proporciones de divisiones mitóticas y desarrollo de blastocitos hace posible evaluar la influencia de las secreciones y células de oviducto en puntos específicos de dicho órgano (Killian, 2004).

En este trabajo de tesis se han diseñado experimentos *in vitro* para tratar de establecer el rol biológico de una glicoproteína purificada de células epiteliales de oviducto contando con datos previos de unión de la glicoproteína, conjugada a FITC, a la cabeza de los espermatozoides.

En el estudio del establecimiento del rol de SBG resultaba importante evaluar la morfología espermática, dado que se sabe que existe una correlación negativa entre el índice de unión de los espermatozoides a explantes de oviducto *in vitro* y espermatozoides morfológicamente anormales (Petrunkina y col., 2004). En los experimentos realizados en tal sentido, se pudo establecer que SBG presenta un efecto de alteración sobre los acrosomas de los espermatozoides incubados en medio capacitante.

El efecto producido por SBG comprendía espermatozoides con bordes irregulares en la región periacrosomal y con aparente pérdida de porciones de membrana, y espermatozoides que presentaban hinchamiento en la región anterior de sus acrosomas. Se encontraron también, aunque en porcentajes menores, espermatozoides con pérdida total del acrosoma. Estas observaciones hacen que exista una tendencia a comparar este efecto con una RA, o bien con los estadios iniciales de una RA (por ejemplo, hinchamiento o *swelling* del acrosoma), pero al momento no existe una correlación morfológica que la verifique. Esta tendencia de comparación se

debe tanto a la observación citológica como a la comparación estadística de porcentajes de espermatozoides que sufren RA inducida por progesterona y alteración acrosomal por SBG, y además a que el efecto de la glicoproteína se manifiesta en condiciones capacitantes.

Experimentos realizados *in vivo* indican que, en cerdos, luego de 30 minutos de completada la inseminación se observa presencia de espermatozoides en la región caudal del istmo. Estos espermatozoides son capaces de fecundar los ovocitos recién ovulados. Luego se observa una colonización progresiva del istmo, estableciéndose en una hora una población de espermatozoides que aseguraría el 100% de fecundación (Hunter, 1981). Esta colonización depende del estadio del estro (celo) en el cual se encuentre la hembra, refiriéndose ésto a los estadios pre-ovulatorio, peri-ovulatorio y post-ovulatorio como estadios anteriores a la ovulación, durante la ovulación y posteriores a la ovulación, respectivamente. Observaciones en conejos (Harper, 1973a,b), y murciélagos (Racey, 1979) y detallados estudios quirúrgicos en ovejas (Hunter y col., 1982; Hunter y Nichol, 1983; Hunter y Nichol, 1986; Hunter y col., 1980), cerdos (Flechon y Hunter, 1981; Hunter, 1981; Hunter, 1984) y vacas (Hunter y Wilmut, 1984) han demostrado que la porción caudal del istmo sirve como un reservorio pre-ovulatorio de espermatozoides viables. Se ha demostrado en cerdos que en este estadio pre-ovulatorio los espermatozoides no sufren capacitación (Tienthai y col., 2004). Esto indicaría que en ese ambiente y en ese estadio del estro en particular, SBG presente en el istmo, no tendría efecto sobre los espermatozoides *in vivo*. Los espermatozoides recuperados del reservorio del istmo caudal en el estadio pre-ovulatorio y peri-ovulatorio presentan un porcentaje de 1-5% de capacitación comparado con un 14% de los espermatozoides recuperados del estadio post-ovulatorio. Si los espermatozoides recuperados del istmo en los estadios pre y peri-ovulatorio se incuban en medios con bicarbonato, sufren capacitación (Tienthai y col., 2004), indicando que el aumento del porcentaje de espermatozoides capacitados se debe a las condiciones del ambiente oviductal.

La sola presencia de bicarbonato no alcanza para desencadenar el efecto de SBG, aunque sí se produce fosforilación de AKAP4. Esto supondría que concentraciones crecientes de bicarbonato en el oviducto podrían capacitar espermatozoides sin que SBG altere los acrosomas de los mismos.

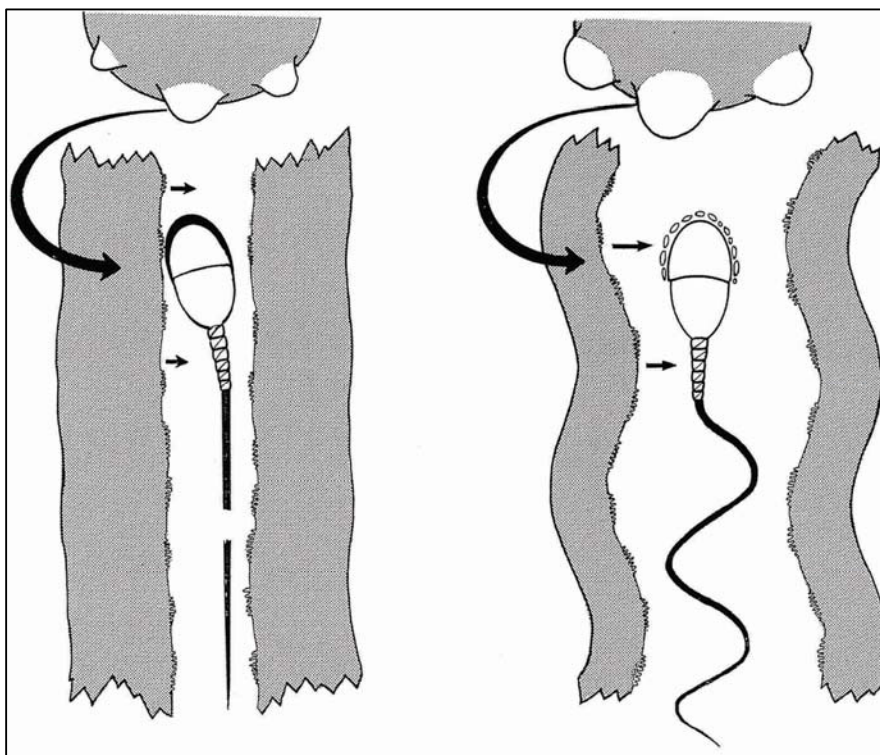
Los niveles de bicarbonato contenidos en el oviducto *in vivo* no han sido determinados con exactitud, pero estudios preliminares y evidencia circunstancial de la

presencia de anhidrasa carbónica, sugieren que son más bajos en el reservorio que en la unión istmo-ampolla y en la ampolla (Rodríguez-Martínez y col., 1991). Esto podría colaborar a que el espermatozoide en el reservorio no se capacite y necesite ser liberado hacia segmentos superiores del oviducto donde los niveles de bicarbonato son comparativamente similares a los utilizados en experimentos de capacitación *in vitro* (Tienthai y col., 2004), para lograr este cambio fisiológico.

Los espermatozoides unidos al epitelio parecen mantener bajos niveles de calcio (Petrunkina y col., 2001) disminuyendo el riesgo de capacitación prematura y/o hiperactivación por reducción del metabolismo espermático o activación de vías específicas (Ho y Suarez, 2001). El calcio presente en los medios no capacitantes de coincubación de espermatozoides con SBG no es suficiente para que la glicoproteína produzca su efecto. El incremento de calcio en el reservorio, regulado por control endocrino, está involucrado en la liberación de espermatozoides unidos al epitelio (Hunter y col., 1999). Esto traería como consecuencia que la presencia de SBG en el istmo no produzca efectos deletéreos sobre los espermatozoides que están unidos al epitelio, dado que los niveles de calcio y bicarbonato en estadios pre o peri-ovulatorios necesarios para capacitar esos espermatozoides no son suficientes. En un estadio post-ovulatorio los espermatozoides en el reservorio presentan porcentajes de capacitación mayores a los que se encuentran en los estadios pre y peri-ovulatorio y en este caso SBG estaría actuando sobre ellos alterando sus membranas periacrosomales. En esta situación los espermatozoides que ya se liberaron del epitelio oviductal por efecto del calcio liberado por acción hormonal durante la ovulación, habrán sufrido capacitación en sitios cercanos al de fecundación, esto es en la unión istmo-ampolla, y posteriormente habrán fecundado al ovocito (Hunter, 2002). Un modelo en el cual el oviducto modula la configuración de la membrana de los espermatozoides y su motilidad es presentado por Hunter (2005) (Fig. 79). Este modelo no incluye un agente específico que produzca la vesiculación de membranas acrosomales, sino que está basado en observaciones realizadas en rumiantes, en los cuales se encuentran altas proporciones de espermatozoides reaccionados en sitios cercanos a la ampolla en el momento de o posteriormente a la ovulación. SBG encajaría en este modelo como el agente proteico que produce la vesiculación de membranas acrosomales. Los espermatozoides que se capacitaron prematuramente durante su trayecto por el tracto genital femenino habrán sufrido el efecto impuesto por SBG al llegar el istmo, así como

también los que se capacitaron prematuramente en el istmo. Este efecto deletéreo contribuiría a la eliminación de espermatozoides en el oviducto.

Si bien el rol de las secreciones oviductales (ver revisión de Killian 2004) y la influencia de células epiteliales en la vitalidad y capacitación de espermatozoides de varias especies ha sido estudiado (Ellington y col., 1999; Fazeli y col., 1999; Gualtieri y Talevi, 2000; Lefebvre y Suarez, 1996; Pollard y col., 1991; Suarez, 1987) SBG sería la primera glicoproteína de células epiteliales de oviducto que interacciona con espermatozoides con una función asignada.



**Figura 79. Modelo para ilustrar la forma en la cual la actividad endócrina pre y peri ovulatoria de los folículos de Graaf actúa sobre la configuración de la membrana y la motilidad del espermatozoide en el lumen de la trompa de Falopio. a)** espermatozoide intacto y relativamente quiescente bajo la influencia de folículos preovulatorios. La vesiculación de la membrana en la cabeza está suprimida, así como el movimiento del flagelo. El lumen del oviducto es estrecho y contiene secreciones viscosas. Los espermatozoides están unidos al epitelio. **B)** un espermatozoide hiperactivado y con acrosoma reaccionado bajo la influencia del folículo de Graaf en el momento de la ovulación. Adaptado de Hunter (2005).

Los espermatozoides que han sufrido daño acrosomal o reacción acrosómica no pueden responder al estímulo de la ZP, quedando así eliminados de la carrera hacia la fecundación (Fazeli y col., 1997). La reducción en el número de espermatozoides unidos a la ZP podría servir para reducir la incidencia de la polispermia (Killian, 2004).

Si SBG elimina los espermatozoides capacitados prematuramente en el istmo o los espermatozoides que se encuentran con fluido post-ovulatorio en el istmo, entonces estaría indirectamente incidiendo sobre el control de la polispermia al eliminar estos espermatozoides capacitados, evitando así que más espermatozoides se unan a la ZP. El principal factor que influencia la polispermia, al menos en cerdos, es el número de espermatozoides capacitados en el sitio de fecundación (Hunter, 1972; Hunter, 1976; Hunter y col., 1991). Esta afirmación proviene de estudios quirúrgicos de ligación y remoción del istmo (Hunter y Leglise, 1971) que demuestran que el istmo limita el pasaje de espermatozoides, y de estudios de inyección de progesterona en el istmo (Hunter, 1972) e inseminación de espermatozoides directamente en las trompas de Falopio 12 h después de la ovulación (Hunter, 1973). Desde una perspectiva fisiológica, el número de espermatozoides que alcanzan el sitio de fecundación en el oviducto debe ser estrictamente controlado en el momento de la ovulación e inmediatamente luego de ella, para reducir la posibilidad de penetración polispermica (Hunter, 1993). El estricto control del número de espermatozoides podría ser llevado a cabo por SBG, involucrando así a esta proteína en el control de la polispermia por un mecanismo distinto del clásicamente concebido para cerdos, como es la reacción de la zona (Hunter, 1991). Esto llevaría a proponer un nuevo mecanismo prefecundación de reducción de la polispermia. Hay evidencias de que glicoproteínas específicas secretadas por oviducto de cerdo se encuentran involucradas en la reducción de la polispermia *in vitro*. Este efecto es observado por la reducción del número de espermatozoides unidos a la ZP ante el agregado de dicha glicoproteína, denominada pOSP, en concentraciones de hasta 100 µg/ml, similares a las utilizadas en este estudio para SBG, en experimentos de fecundación *in vitro*. El efecto puede ser revertido por el agregado de anticuerpos contra la glicoproteína (Kouba y col., 2000).

El oviducto, descrito por Gabriel Fallopius en 1561, fue considerado por mucho tiempo como una simple conexión entre el ovario y el útero. Hoy, el oviducto es considerado como uno de los órganos reproductivos más dinámicos, cuyos aspectos funcionales aún no son completamente comprendidos (Brussow y col., 2008).

La histoarquitectura es muy simple, con una mucosa no glandular cubierta por un epitelio compuesto de células no ciliadas (secretoras) y ciliadas, una capa doble de músculo liso y una capa serosa que la recubre y es continua a la peritoneal. Mientras la capa más gruesa del músculo liso circular se vuelve más fina, los pliegues longitudinales de la mucosa ganan complejidad (con pliegues secundarios y terciarios) y

el número de células ciliadas incrementa dramáticamente hacia cranial (Rodríguez-Martínez y col., 2001). Esta histoarquitectura define la presencia de compartimentos tubarios cada uno con función específica, todos con un ambiente óptimo con respecto a pH, presión osmótica, nutrientes, productos secretados específicos y moléculas señal (Rodríguez-Martínez, 2007). Tales compartimentos tubarios definen también un gradiente de temperatura entre el istmo y la ampolla (Hunter y Nichol, 1986). La distancia entre istmo caudal y el sitio de fecundación es de 6 a 8 cm en cerdos, una trayectoria relativamente grande por la cual el espermatozoide capacitado no podría recorrer debido a su membrana particularmente inestable. Parece más probable que un espermatozoide pueda progresar a través de compartimentos en una condición fisiológicamente “intacta”, hasta alcanzar la unión istmo-ampolla, y que allí se complete la capacitación del espermatozoide activado en la vecindad del ovocito (Hunter, 2002). La presencia de SBG está limitada a las dos terceras partes superiores de las criptas del istmo y en células localizadas cercanas al lumen oviductal de la ampolla (Perez, 2006). Es en esta zona donde se han realizado observaciones de espermatozoides con sus membranas acrosomales dañadas, similares a las de los espermatozoides que sufren reacción acrosómica durante el período post-ovulatorio *in vivo* (Mburu y col., 1997). Esta coincidencia en la localización de SBG, su efecto *in vitro* y las observaciones realizadas por Mburu y colaboradores (1997) a través de microscopía electrónica en monta natural de cerdos, refuerzan las proposiciones sobre la función de la glicoproteína. Una población de espermatozoides que se unen al oviducto en la formación del reservorio lo hacen en las criptas que forman los pliegues del mismo manteniendo su morfología intacta (Mburu y col., 1996; Mburu y col., 1997), sitio donde no se detecta SBG. Estos pliegues podrían tal vez formar los compartimentos propuestos por Hunter (2002) para el pasaje de los espermatozoides con fisiología “intacta” a través de ellos. El istmo sirve como un órgano de reserva de espermatozoides y la ampolla provee el ambiente para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Suarez, 2008), adicionalmente se sugiere que el istmo actuaría como regulador del pasaje de espermatozoides capacitando y liberando espermatozoides de forma secuencial para evitar la llegada de un número excesivo de espermatozoides al sitio de fecundación y así evitar la polispermia (Hunter, 1984; Hunter, 2005; Hunter, 2008; Suarez, 2008; Tienthai y col., 2004). Si bien esta es la hipótesis más aceptada, la propuesta de una eliminación de espermatozoides capacitados en el reservorio podría explicar a su vez las observaciones de los espermatozoides con características similares

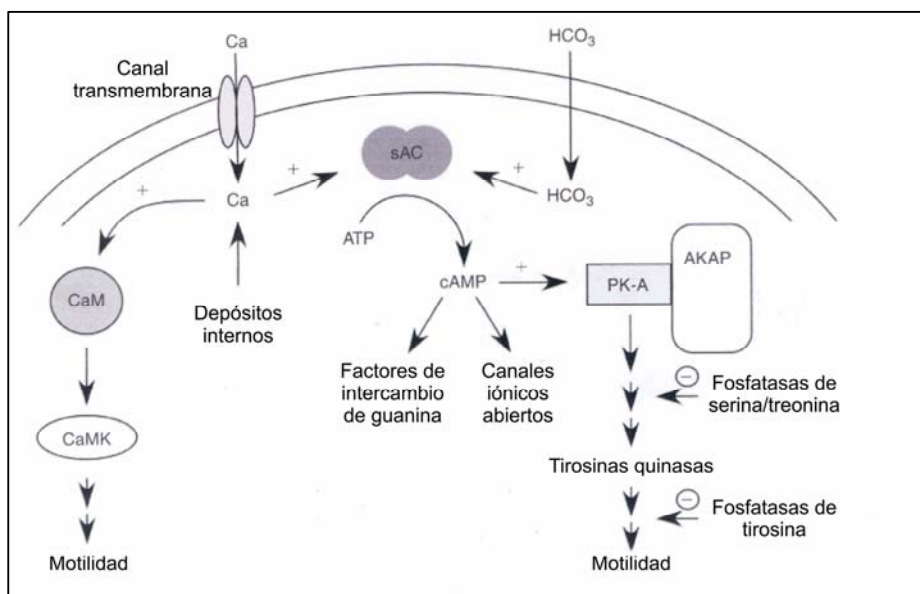
a los espermatozoides que han sufrido RA en el istmo y SBG sería al menos, una glicoproteína involucrada en este proceso.

SBG expone residuos terminales de Gal $\beta$ 1-3GalNac (Marini y Cabada, 2003). Es de notar que son los mismos residuos de carbohidratos del componente de la ZP de cerdo, en su momento denominado componente 55K, que son necesarios para que se produzca la RA en espermatozoides (Berger y col., 1989). Es interesante resaltar que se ha demostrado que azúcares específicos pueden inducir la RA sólo cuando están acoplados covalentemente a las cadenas de proteínas (neoglicoproteínas) (Benoff y col., 1997; Brandelli y col., 1995; Loeser y col., 1999) y este podría ser el caso también para los residuos de Gal $\beta$ 1-3GalNac hallados en SBG.

Por otro lado, el hecho de observar patrones C de tinción CTC, que indican espermatozoides capacitados, en los medios que contienen SBG en su concentración más alta, parecería ser contradictorio con el efecto de la misma, pero estaría indicando, tal vez, que técnicamente no se ha llegado a saturar el sistema en el cual todos los espermatozoides estarían en contacto con la glicoproteína. Estas concentraciones de SBG son equivalentes a las concentraciones de ZP utilizadas en ensayos de RA con ZP solubilizada (Melendrez y col., 1994). *In vivo*, la glicoproteína podría presentarse a los espermatozoides de manera ligeramente diferente a su forma soluble y/o acompañada de otros componentes.

Se sabe que en espermatozoides se producen fosforilaciones en residuos de serina/treonina y tirosina de proteínas como parte de las vías de señalización que modulan sus funciones, pero sólo unas pocas proteínas fosforiladas han sido identificadas (Urner y Sakkas, 2003). La regulación de la vía de fosforilación que procede a través de AMPc ha sido previamente estudiada en cerdos (Kalab y col., 1998; Tardif y col., 2004) y se ha logrado identificar una proteína que se fosforila a través de la cascada de señalización AMPc/proteína quinasa A en flagelo de cerdo (Harayama y Miyake, 2006; Harayama y col., 2004). Si bien los experimentos de fosforilación de proteínas espermáticas por acción de SBG y las aproximaciones farmacológicas desarrolladas con IBMX y dbAMPc fueron realizados antes del conocimiento de la identidad de p97, estos arrojan luz sobre las vías involucradas en la fosforilación de AKAP4. Un hecho interesante que se destaca en los experimentos de fosforilación de proteínas espermáticas realizados en presencia de SBG es que, mientras que AKAP se fosforila en ausencia de calcio o en ausencia de bicarbonato, no se observa un efecto citológico de SBG sobre los acrosomas de los espermatozoides en estas condiciones.

Esto estaría indicando que la fosforilación de AKAP4 estaría al inicio de la cascada de eventos que conducen al efecto sobre los acrosomas de los espermatozoides y no sería suficiente para lograr el efecto sobre los acrosomas. La fosforilación sería un evento temprano en la secuencia de desencadenantes del efecto de la glicoproteína e indirectamente evidenciaría que SBG estaría interaccionando con espermatozoides en ausencia de calcio o de bicarbonato. La fosforilación de AKAPs juega un rol central en la motilidad espermática (Turner, 2006; Turner y col., 1999) (Fig. 80) y la fosforilación de AKAP4 ha sido relacionada con la motilidad de espermatozoides de hámster (Si y Okuno, 1999) y la capacitación de espermatozoides humanos (Ficarro y col., 2003). La fosforilación de AKAP82 en residuos de tirosina estaría relacionada al proceso de capacitación y/o motilidad de espermatozoides humanos (Carrera y col., 1996) y se ha demostrado que la ausencia de AKAP4 conduce a la ausencia o pérdida de motilidad en espermatozoides humanos (Miki y col., 2002; Moretti y col., 2007). Aunque estudiado en menos detalle, SBG produce un efecto de supresión de la motilidad de los espermatozoides, lo que podría estar relacionado con el efecto sobre la fosforilación de AKAP4. Según el esquema de la figura 78 habría proteínas tirosinas quinasas involucradas en los últimos pasos de la cascada de señalización que regula la motilidad espermática.



**Figura 80. Representación esquemática de las vías conocidas o supuestas involucradas en la regulación de la motilidad espermática.** Tomado de Turner, 2006

En el reservorio se ha descrito una supresión de la motilidad de los espermatozoides (Hunter, 1981; Suarez, 1998). *In vivo*, la interacción de espermatozoides con SBG haría que estos pierdan su motilidad en primera instancia, dado que SBG fosforila AKAP4 en presencia de calcio, y debido a la llegada de calcio liberado por el epitelio, en el estadio periovulario. Luego, con la llegada de fluido post-ovulatorio, que contiene factores estimuladores de la capacitación, y el incremento de bicarbonato (Hunter, 2002), se completaría el efecto de alteración acrosomal. Así, de los 4000 a 5000 espermatozoides que alcanzan el istmo, en el estadio pre-ovulatorio (Hunter, 2002), se eliminarían los que estuvieran unidos a la superficie del epitelio donde se localiza SBG en los estadios peri y/o post-ovulatorio. En los experimentos de evaluación de fosforilación de proteínas espermáticas por acción de SBG se utilizó progesterona a fin de comparar su efecto, dado que la progesterona actúa también sobre los acrosomas de los espermatozoides capacitados en proporciones estadísticamente similares. La progesterona no actúa incrementando la fosforilación de AKAP4, pero si un subconjunto diferente de proteínas con mayor peso molecular (200 y 210 kDa), indicado que la progesterona actúa sobre los acrosomas de los espermatozoides por un mecanismo diferente del de SBG. A su vez, el hecho de que aparentemente el subconjunto de proteínas que sufren defosforilación sea el mismo para SBG y progesterona indica que, probablemente, estén actuando un grupo de fosfatasa comunes que se activarían tanto por progesterona como por SBG. Se ha demostrado que proteínas tirosinas fosfodiesterasas son requeridas para la actividad exocítica de espermatozoides humanos (Tomes y col., 2004) y probablemente la exocitosis desencadenada por la progesterona y la liberación del contenido acrosomal por parte de SBG converjan en un mecanismo utilizando un grupo de fosfatasa en común. Los intentos por clarificar la vía de señalización a través de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina hicieron que se diseñen experimentos a fin de evaluar la vía que involucra AMPc. Los incrementos intracelulares de AMPc fueron modulados por un análogo dbAMP o por inhibición de fosfodiesterasas con IBMX. Se observó en estos experimentos que mientras hay un incremento en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como consecuencia del incremento de AMPc o por inhibición de fosfatasa, no se vio un incremento en la fosforilación de AKAP4. El incremento en el estado de fosforilación de algunas proteínas coincidiría con el reportado por otros autores, lo que lleva a sugerir que la vía que conduce a la fosforilación de AKAP4 no sería una vía dependiente de AMPc.

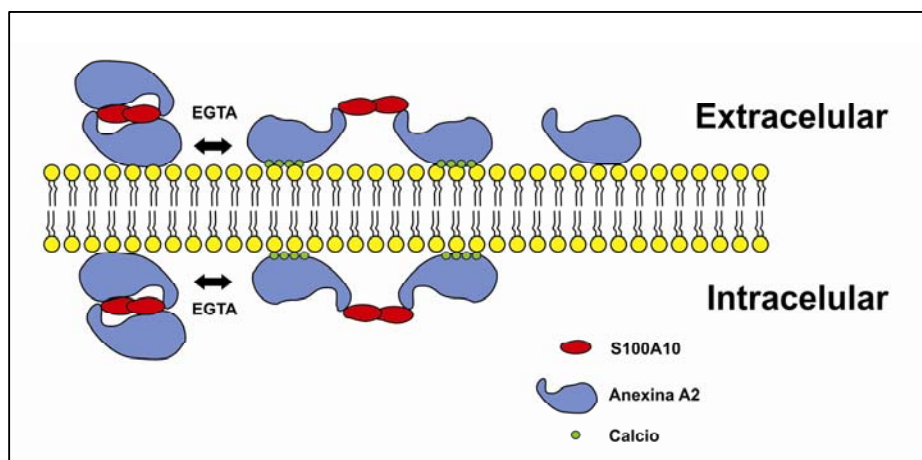
Los resultados de los experimentos que condujeron a la purificación e identificación de anexinas porcinas fueron obtenidos simultáneamente con la publicación del trabajo de Igotz y colaboradores (2007), en los que se involucra a las anexinas bovinas en la interacción espermatozoide-oviducto. Los experimentos de ambos trabajos demostraron que, *in vitro*, membranas de espermatozoides de cerdo con sus proteínas de superficie unidas y proteínas de superficie de espermatozoides de toro aisladas, interaccionan con proteínas oviductales de la familia de las anexinas. Estos experimentos, junto con los datos recopilados de la búsqueda de anexinas en extractos de oviducto de varias especies y de alineamiento de secuencias, permiten proponer a las anexinas como candidatos a receptores oviductales involucrados en un mecanismo general para dicha interacción.

La asociación de anexina A2 con S100A10 forma un complejo heterotetramérico en superficies citoplasmáticas de membranas plasmáticas (Gerke y Weber, 1984) y tanto anexina A2 (Hajjar y col, 1994) como S100A10 (Choi y col., 2003) han sido propuestas como receptores extracelulares para la activación de plasminógeno tipo tisular. Algunos experimentos indican que el complejo heterotetramérico extracelular podría unir activador de plasminógeno con mayor afinidad que sus componentes por separado (Macleod y col, 2003). Hasta donde conocemos, no ha sido demostrada la presencia de este complejo extracelular en otros tejidos que no sea el endotelial, más aún, no ha sido identificado como receptor extracelular en otros tejidos. En la búsqueda de S100A10 en oviducto se pudo establecer su presencia en citoplasma apical de células epiteliales ciliadas mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, los experimentos de incubación de células epiteliales en PBS con EGTA evaluados mediante western blot, indican que podría existir este complejo en el exterior de las células. Estos experimentos de incubación de células epiteliales demostraron también que hay una localización de anexina A2 que varía con el tratamiento aplicado. En células tratadas con EGTA pudo observarse anexina A2 localizada en el citoplasma apical de células epiteliales ciliadas, localización que coincide con la localización de S100A10. Esta localización puede deberse a cambios conformacionales debidos a la extracción de  $\text{Ca}^{++}$  de la estructura de anexina A2 por parte de EGTA que exponen epitopes antes enmascarados para los anticuerpos. Los anticuerpos HH7 anti-anexina A2 utilizados fueron producidos contra los 18 aminoácidos del extremo aminoterminal de la proteína (Thiel y col., 1992). Se sabe que el extremo aminoterminal tiene una conformación plegada en ausencia de calcio (Rescher y Gerke, 2004) y que es el sitio de interacción con S100A10. Las

inmunohistoquímicas demostraron la presencia de anexina A2 solamente en las cilias y también en células epiteliales aisladas incubadas en PBS, lo que estaría indicando que probablemente exista una población de moléculas en forma monomérica en esos sitios. El tratamiento con EGTA podría haber provocado un cambio conformacional en el complejo anexina A2/S100A10 citosólico que hizo que se exponga el epítipo y el anticuerpo HH7 lo pueda reconocer. La coimmunoprecipitación con anticuerpos HH7 en solución demostró la existencia del complejo anexina A2/S100A10 además de demostrar que se debe producir un cambio conformacional asociado a la extracción de calcio con EGTA para que el anticuerpo pueda reconocer el complejo, dado que la coimmunoprecipitación sólo se produce en presencia de EGTA en solución. Se sabe además que la translocación hacia el dominio extracelular de anexina A2 es dependiente de la asociación con S100A10 (Deora y col., 2004) y esto estaría de acuerdo con la interpretación anterior de la localización de anexina y el complejo heterotetramérico. La elución del complejo anexina A2/S100A10 de la superficie celular sería coincidente con publicaciones anteriores sobre la localización del receptor para plasminógeno conformado por el complejo anexina A2/S100A10 (Macleod y col, 2003) y las cantidades de anexina A2/S100A10 eluidas con EGTA comparadas con las eluidas con PBS indicarían que en el dominio extracelular hay una población de moléculas de anexina A2/S100A10 unidas a través de calcio a la membrana plasmática y una población de moléculas de anexina A2 individuales unidas a la membrana de forma independiente de calcio. La aparente localización de anexina A2 y S100A10 en las cilias de las células epiteliales incubadas con EGTA (fig. 62 D y E) sería evidencia de que el tratamiento con EGTA hace disponible el epítipo para el anticuerpo HH7 apoyando además la hipótesis de la existencia del complejo en el dominio extracelular unido a membrana a través de calcio. Sin embargo, hacen falta más experimentos que confirmen esta hipótesis. En la figura 81 se esquematiza una hipótesis de trabajo basada en las evidencias encontradas hasta el momento para la localización de las diferentes poblaciones de moléculas.

En este trabajo de tesis se evaluó mediante cromatografía de afinidad qué proteínas podrían interactuar con SBG. La resolución de las proteínas obtenidas en electroforesis bidimensional y su posterior identificación a través de espectrometría de masa hizo posible identificar a dermcidina y a S100A7 como las proteínas mayoritarias que interactúan directa o indirectamente con SBG

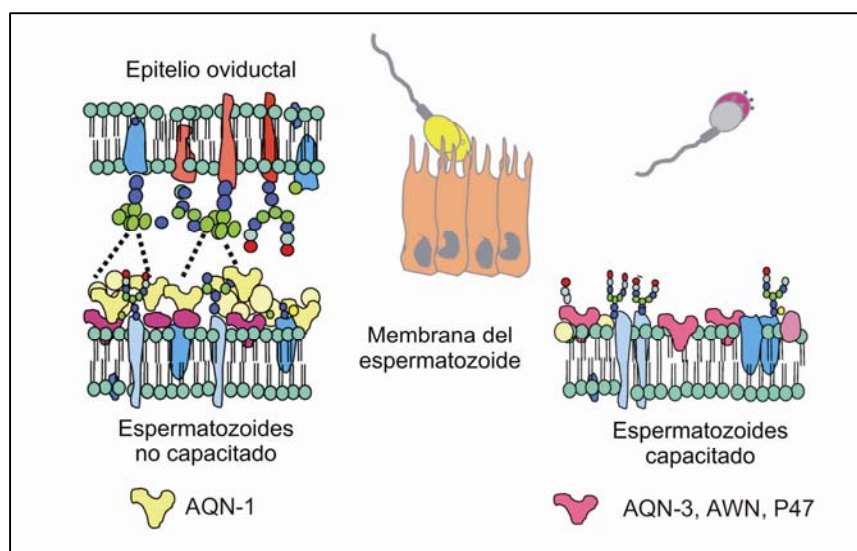
Para dermcidina no se han obtenido anticuerpos hasta el momento, pero anticuerpos provistos por el Dr. Kimura indican una localización en la cabeza del espermatozoide lo que la hace candidata a participar en una interacción con proteínas oviductales. Deben diseñarse experimentos a fin de poder establecer estas posibles interacciones, así como determinar si su exposición en la cabeza del espermatozoide varía con el estado fisiológico del mismo.



**Figura 81. Posible localización de moléculas de anexina A2 y anexina A2/S100A10 en células epiteliales oviductales.** Según este esquema existirían complejos anexina A2/S100A10 intracelulares y extracelulares unidos a través de calcio a la membrana. Además se propone la existencia de anexina A2 como perteneciente al dominio extracelular. Los tratamientos con EGTA influyen en la conformación de los complejos en los dominios intra y extracelular produciendo en ellos cambios de conformación que permiten evidenciar su presencia mediante anticuerpos

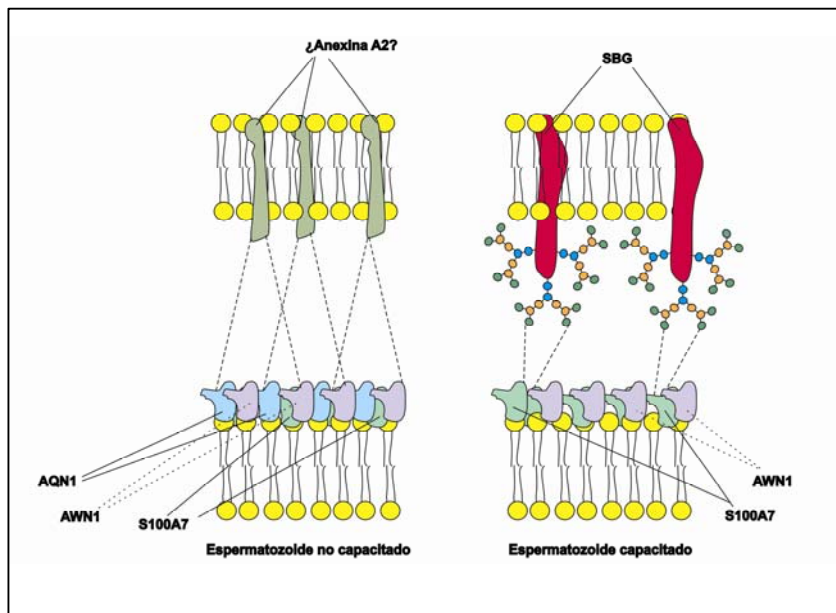
La obtención de anticuerpos anti-S100A7 hizo posible la localización de dicha proteína en el espermatozoide porcino y se pudo establecer un patrón de exposición según el estado fisiológico del espermatozoide. S100A7 no sería la primera proteína de la familia S100A descrita en espermatozoides, dado que en espermatozoides humanos han sido detectadas S100A8 y S100A9 (Martinez-Heredia y col., 2006). A S100A7 se le han otorgado funciones antimicrobianas y se han descrito otras proteínas con estas funciones en la superficie de espermatozoide. Proteínas antimicrobianas de la familia de las catelicidinas (hCAP-18), han sido descritas como proteínas de plasma seminal humano secretadas por el epidídimo que se unen al espermatozoide (Andersson y col., 2002; Malm y col., 2000) y también han sido descritas proteínas antimicrobianas de la familia de las beta defensinas, DEFB126, en la superficie del espermatozoide de macaco. Es de remarcar que DEFB126 es una proteína secretada por el epidídimo y juega un rol principal en la unión del espermatozoide a las células epiteliales del

oviducto (Tollner y col., 2008). De este modo, estaría compartiendo con S100A7, además de las probables funciones antimicrobianas asignadas, las de interacción con el epitelio oviductal. También es de destacar que estas proteínas se irían adsorbiendo al espermatozoide en etapas tempranas del trayecto por el tracto reproductivo masculino. Es decir, que proteínas provenientes de vesícula seminal, glándulas de Cowper y próstata se irían adsorbiendo luego de las epididimarias y probablemente sobre ellas. Esto coincidiría con la observación de que las espermadhesinas secretadas por vesículas seminales se liberan del espermatozoide cuando este se capacita (Dostalova y col., 1994), pero AWN, que es secretada por epidídimo, se mantiene firmemente unida al espermatozoide por uniones con fosfolípidos (Töpfer-Petersen y col., 1998) (Fig. 82). S100A7 se expone homogéneamente en la cabeza del espermatozoide luego de que este se incubó en medio capacitante. Aunque no se ha comprobado exactamente que S100A7 se exponga homogéneamente en espermatozoides capacitados, es válido pensar que si éste fuera el caso, proteínas como AQN1 se estarían liberando de la superficie de la cabeza del espermatozoide y probablemente dejarían expuesta a S100A7. En la purificación por afinidad de SBG se utilizan membranas de espermatozoides que han sido tratadas con diversas soluciones salinas para luego unirse a una matriz y estas membranas carecerían de las proteínas más superficiales. Es probable que en este tratamiento proteínas como S100A7 hayan quedado expuestas para la interacción con SBG y colaboren a purificar SBG en las columnas cromatográficas.



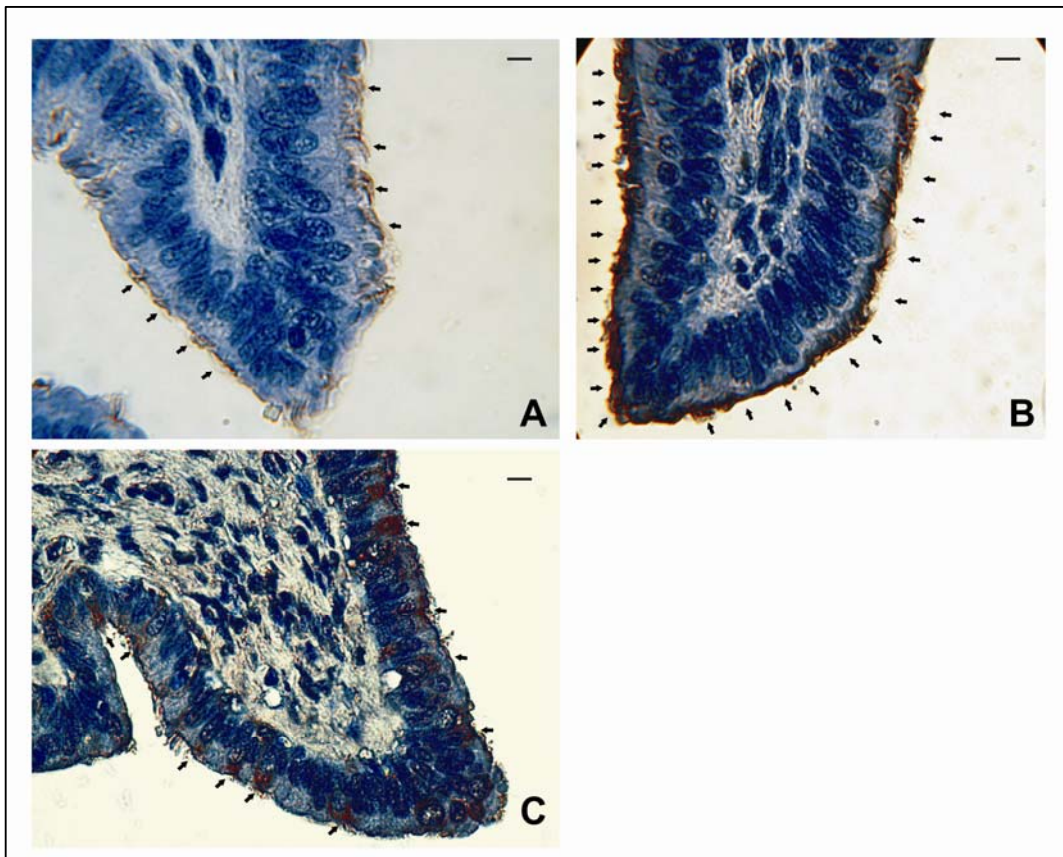
**Figura 82. Eventos mediados por carbohidratos durante la fecundación en cerdos.** Proteínas de unión a carbohidratos asociadas al espermatozoide tales como AQN1 se unen a glicoproteínas oviductales. Cuando se inicia la capacitación las proteínas de cubierta se disocian de la superficie del espermatozoide exponiendo AWN, AQN-3, P47 y otras. Adaptado de Töpfer-Petersen (2008).

Si bien no se sabe qué tejido puede estar secretando S100A7 en el tracto reproductivo del cerdo macho, existe la probabilidad de que sea un tejido como el epidídimo ya que la exposición en la superficie del espermatozoide de la proteína parecería ocurrir luego de que las proteínas más superficiales, secretadas por vesícula seminal como AQN1, se hayan liberado en el proceso de capacitación. Un modelo integrado que explicaría la exposición de proteínas espermáticas y su interacción con las proteínas oviductales estudiadas en este trabajo sería el siguiente (Fig 83).



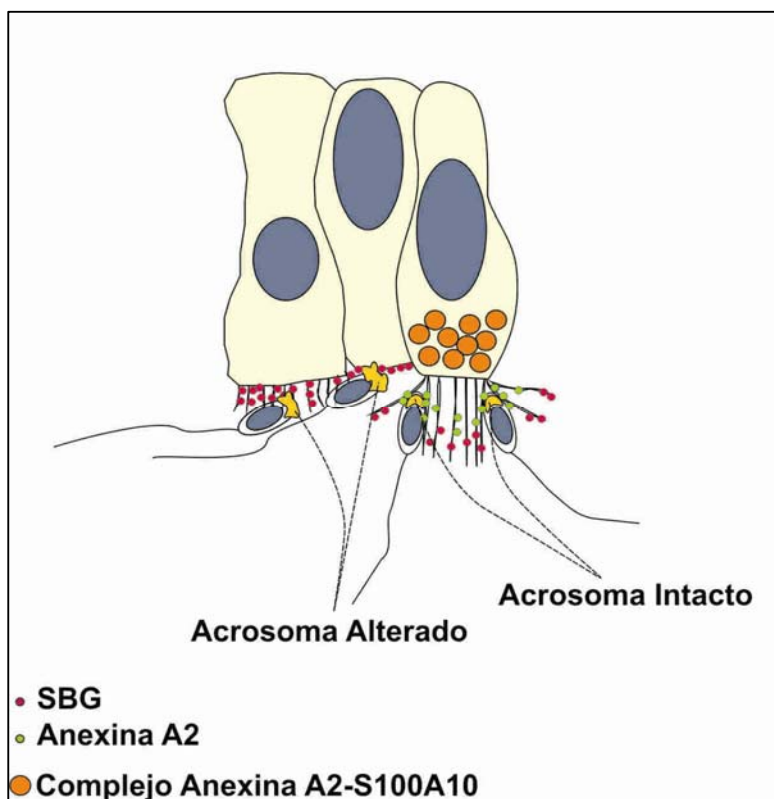
**Figura 83. Modelo que propone exposición de proteínas de espermatozoides a la superficie y su interacción con proteínas del oviducto.** En el modelo se muestra que AQN1, proteína de superficie de membrana esta presente en el espermatozoide no capacitado y disponible para la interacción con proteínas del istmo para formar el reservorio. Al capacitarse el espermatozoide libera AQN1 dejando expuestas a AWN1 que se mantiene unida a los fosfolípidos de membrana del espermatozoide y a S100A7. Una vez capacitado el espermatozoide en el istmo, SBG interaccionaría con S100A7 provocando el efecto sobre los acrosomas. Alternativamente, si el espermatozoide se capacita en la vecindad del ovocito AWN1 podría ser el receptor para la ZP.

Una evaluación histológica conjunta presenta a las tres proteínas oviductales estudiadas en este trabajo de tesis en la siguiente micrografía (Fig. 84). En esta figura se observa que SBG tiene una distribución más homogénea sobre la superficie del epitelio comparada con anexina A2. La localización de anexina A2 está restringida solo a las células ciliadas donde se ha descrito una preferencia de la unión de los espermatozoides.



**Figura 84. Localización de tres proteínas oviductales estudiadas en este trabajo de tesis. A.** localización de anexina A2: puede verse la proteína localizada sobre las cilias de algunas células ciliadas presentes en el epitelio. **B.** localización de SBG: puede verse que SBG esta localizada a lo largo de la superficie de todo el epitelio. **C.** S100A10: esta proteína se localiza principalmente en el dominio citosólico de células epiteliales ciliadas. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, un esquema representaría un modelo propuesto para la localización de estas tres proteínas y su posible interacción y acción sobre los espermatozoides (Fig. 85).



**Figura 85. Esquema de un modelo que integra la localización de las proteínas oviductales y su putativa interacción con espermatozoides.** En el esquema se observa a SBG localizada a lo largo de todo el epitelio sobre los diferentes tipos celulares. La interacción de SBG con los espermatozoides capacitados haría que estos sufran alteración acrosomal. Si estos espermatozoides no están capacitados podrían interaccionar con anexina A2 presente en las células ciliadas y formarían parte de una población de espermatozoides en el reservorio aguardando una señal que los libere para dirigirse al sitio de fecundación.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abeydeera, L. R.** (2001). *In Vitro* Fertilization and Embryo Development in Pigs. *Reprod Suppl* 58, 159-173.
- Abou-Haila, A. y Tulsiani, D. R.** (2009). Signal Transduction Pathways That Regulate Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction. *Arch Biochem Biophys* 485, 72-81.
- Aitken, R. J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M. y Irvine, S.** (1998). On the Cellular Mechanisms by Which the Bicarbonate Ion Mediates the Extragenomic Action of Progesterone on Human Spermatozoa. *Biol Reprod* 58, 186-196.
- Althouse, G.** (1997). Evaluating Porcine Semen for Artificial Insemination: Standar Tests. Vol. 19. 30-35.
- Andersson, E., Sorensen, O. E., Frohm, B., Borregaard, N., Egesten, A. y Malm, J.** (2002). Isolation of Human Cationic Antimicrobial Protein-18 from Seminal Plasma and Its Association with Prostatosomes. *Hum Reprod* 17, 2529-2534.
- Ashworth, P. J., Harrison, R. A., Miller, N. G., Plummer, J. M. y Watson, P. F.** (1995). Flow Cytometric Detection of Bicarbonate-Induced Changes in Lectin Binding in Boar and Ram Sperm Populations. *Mol Reprod Dev* 40, 164-176.
- Austin, C. R.** (1951). Observations on the Penetration of the Sperm in the Mammalian Egg. *Aust J Sci Res (B)* 4, 581-596.
- Badia, E., Briz, M. D., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., Casas, I. y Bonet, S.** (2006). Structural and Ultrastructural Features of Boar Seminal Vesicles. *Tissue Cell* 38, 79-91.
- Bedford, J. M.** (2008). Puzzles of Mammalian Fertilization and Beyond. *Int J Dev Biol* 52, 415-426.
- Beil, R. E. y Hart, R. G.** (1973). Cowper's Gland Secretion in Rat Semen Coagulation. II. Identification of the Potentiating Factor Secreted by the Coagulating Glands. *Biol Reprod* 8, 613-617.
- Benoff, S., Hurley, I. R., Mandel, F. S., Cooper, G. W. y Hershlag, A.** (1997). Induction of the Human Sperm Acrosome Reaction with Mannose-Containing Neoglycoprotein Ligands. *Mol Hum Reprod* 3, 827-837.
- Berger, T., Turner, K. O., Meizel, S. y Hedrick, J. L.** (1989). Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Boar Sperm. *Biol Reprod* 40, 525-530.
- Boerke, A., Tsai, P. S., Garcia-Gil, N., Brewis, I. A. y Gadella, B. M.** (2008). Capacitation-Dependent Reorganization of Microdomains in the Apical Sperm Head Plasma Membrane: Functional Relationship with Zona Binding and the Zona-Induced Acrosome Reaction. *Theriogenology* 70, 1188-1196.
- Bork, P. y Sander, C.** (1992). A Large Domain Common to Sperm Receptors (ZP2 and ZP3) and tgf-Beta Type III Receptor. *FEBS Lett* 300, 237-240.
- Brandelli, A., Miranda, P. V., Anon-Vazquez, M. G., Marin-Briggiler, C. I., Sanjurjo, C., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J. A. y Tezon, J. G.** (1995). A New Predictive Test for in-Vitro Fertilization Based on the Induction of Sperm Acrosome Reaction by N-acetylglucosamine-neoglycoprotein. *Hum Reprod* 10, 1751-1756.
- Breitbart, H., Rubinstein, S. y Lax, Y.** (1997). Regulatory Mechanisms in Acrosomal Exocytosis. *Rev Reprod* 2, 165-174.
- Brewis, I. A., Van Gestel, R. A., Gadella, B. M., Jones, R., Publicover, S. J., Roldan, E. R., Frayne, J. y Barratt, C. L.** (2005). The Spermatozoon at Fertilisation: Current Understanding and Future Research Directions. *Hum Fertil (Camb)* 8, 241-251.
- Brewis, I. A. y Wong, C. H.** (1999). Gamete Recognition: Sperm Proteins That Interact with the Egg Zona Pellucida. *Rev Reprod* 4, 135-142.
- Brown, P. R., Miki, K., Harper, D. B. y Eddy, E. M.** (2003). A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins

in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol Reprod* 68, 2241-2248.

**Brussow, K. P., Ratky, J. y Rodriguez-Martinez, H.** (2008). Fertilization and Early Embryonic Development in the Porcine Fallopian Tube. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 245-251.

**Carrera, A., Moos, J., Ning, X. P., Gerton, G. L., Tesarik, J., Kopf, G. S. y Moss, S. B.** (1996). Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of a Kinase Anchor Proteins as Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation. *Dev Biol* 180, 284-296.

**Celis, J. E., Rasmussen, H. H., Vorum, H., Madsen, P., Honore, B., Wolf, H. y Orntoft, T. F.** (1996). Bladder Squamous Cell Carcinomas Express Psoriasis and Externalize It to the Urine. *J Urol* 155, 2105-2112.

**Chang, M. C.** (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* 168, 697-698.

**Choi, K. S., Fogg, D. K., Yoon, C. S. y Waisman, D. M.** (2003). p11 Regulates Extracellular Plasmin Production and Invasiveness of Ht1080 Fibrosarcoma Cells. *FASEB J* 17, 235-246.

**Chughtai, B., Sawas, A., O'malley, R. L., Naik, R. R., Ali Khan, S. y Pentyala, S.** (2005). A Neglected Gland: A Review of Cowper's Gland. *Int J Androl* 28, 74-77.

**Claver, J., Sanchez, A., Juega Sicardi, A. y Von Lawzewitsch, I.** (1984). Lecciones De Histología Veterinaria. Vol. 7. Editorial Hemisferio Sur S.A.

**Colledge, M. y Scott, J. D.** (1999). AKAP's: From Structure to Function. *Trends Cell Biol* 9, 216-221.

**Cross, N. L.** (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.

**Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W. y Hanson, F. W.** (1988). Induction of Acrosome Reactions by the Human Zona Pellucida. *Biol Reprod* 38, 235-244.

**Cummins, J. y Yanagimachi, R.** (1986). Development of Ability to Penetrate the Cumulus Oophorus by Hamster Spermatozoa Capacitated *In Vitro*, in Relation to the Timing of the Acrosome Reaction. *Gamete Res* 15, 187-212.

**Dacheux, J. L., Castella, S., Gatti, J. L. y Dacheux, F.** (2005). Epididymal Cell Secretory Activities and the Role of Proteins in Boar Sperm Maturation. *Theriogenology* 63, 319-341.

**Dasgupta, S., Mills, C. L. y Fraser, L. R.** (1993). Ca<sup>2+</sup>-Related Changes in the Capacitation State of Human Spermatozoa Assessed by a Chlortetracycline Fluorescence Assay. *J Reprod Fertil* 99, 135-143.

**De Lamirande, E., Leclerc, P. y Gagnon, C.** (1997). Capacitation as a Regulatory Event That Primes Spermatozoa for the Acrosome Reaction and Fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.

**Dean, J.** (1992). Biology of Mammalian Fertilization: Role of the Zona Pellucida. *J Clin Invest* 89, 1055-1059.

**Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T. y Hajjar, K. A.** (2004). An Annexin 2 Phosphorylation Switch Mediates p11-Dependent Translocation of Annexin 2 to the Cell Surface. *J Biol Chem* 279, 43411-43418.

**Diviani, D. y Scott, J. D.** (2001). AKAP Signaling Complexes at the Cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1431-1437.

**Dostalova, Z., Calvete, J. J., Sanz, L. y Töpfer-Petersen, E.** (1994). Quantitation of Boar Spermadhesins in Accessory Sex Gland Fluids and on the Surface of Epididymal, Ejaculated and Capacitated Spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1200, 48-54.

**Dubé, C., Tardif, S., Leclerc, P. y Bailey, J. L.** (2003). The Importance of Calcium in the Appearance of P32, a Boar Sperm Tyrosine Phosphoprotein, During *In Vitro* Capacitation. *J Androl* 24, 727-733.

**Eckert, R. L. y Lee, K. C.** (2006). S100A7 (Psoriasis): A Story of Mice and Men. *J Invest Dermatol* 126, 1442-

1444.

**Eddy, M. E. y O'Brien, D A.** (1994). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. a. Neil. JD (Raven Press, Ltd).

**Edwards, A. S. y Scott, J. D.** (2000). A-Kinase Anchoring Proteins: Protein Kinase A and Beyond. *Curr Opin Cell Biol* 12, 217-221.

**Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A. y Töpfer-Petersen, E.** (2005). Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig. *Biol Reprod* 73, 536-545.

**Ellington, J. E., Evenson, D. P., Wright, R. W., Jr., Jones, A. E., Schneider, C. S., Hiss, G. A. y Brisbois, R. S.** (1999). Higher-Quality Human Sperm in a Sample Selectively Attach to Oviduct (Fallopian Tube) Epithelial Cells *In Vitro*. *Fertil Steril* 71, 924-929.

**Evans, J. P. y Florman, H. M.** (2002). The State of the Union: The Cell Biology of Fertilization. *Nat Cell Biol* 4 *Suppl*, s57-63.

**Falcone, D. J., Borth, W., Khan, K. M. y Hajjar, K. A.** (2001). Plasminogen-Mediated Matrix Invasion and Degradation by Macrophages Is Dependent on Surface Expression of Annexin II. *Blood* 97, 777-784.

**Fazeli, A., Duncan, A. E., Watson, P. F. y Holt, W. V.** (1999). Sperm-Oviduct Interaction: Induction of Capacitation and Preferential Binding of Uncapacitated Spermatozoa to Oviductal Epithelial Cells in Porcine Species. *Biol Reprod* 60, 879-886.

**Fazeli, A., Hage, W. J., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M. y Colenbrander, B.** (1997). Acrosome-Intact Boar Spermatozoa Initiate Binding to the Homologous Zona Pellucida *In Vitro*. *Biol Reprod* 56, 430-438.

**Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V. A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J. A., Shabanowitz, J., Herr, J. C., Hunt, D. F. y Visconti, P. E.** (2003). Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. Evidence of Tyrosine Phosphorylation of a Kinase-Anchoring Protein 3 and Valosin-Containing Protein/P97 During Capacitation. *J Biol Chem* 278, 11579-11589.

**Flechon, J. E. y Hunter, R. H.** (1981). Distribution of Spermatozoa in the Utero-Tubal Junction and Isthmus of Pigs, and Their Relationship with the Luminal Epithelium after Mating: A Scanning Electron Microscope Study. *Tissue Cell* 13, 127-139.

**Flesch, F. M., Colenbrander, B., Van Golde, L. M. y Gadella, B. M.** (1999). Capacitation Induces Tyrosine Phosphorylation of Proteins in the Boar Sperm Plasma Membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 787-792.

**Florman, H. M., Jungnickel, M. K. y Sutton, K. A.** (2008). Regulating the Acrosome Reaction. *Int J Dev Biol* 52, 503-510.

**Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. y Niwa, K.** (1995). Ca(2+)-Regulating Mechanisms That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis. *Mol Reprod Dev* 40, 233-241.

**Funahashi, H.** (2003). Polyspermic Penetration in Porcine IVM-IVF Systems. *Reprod Fertil Dev* 15, 167-177.

**Gadella, B. M. y Harrison, R. A.** (2002). Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biol Reprod* 67, 340-350.

**Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E. y Kopf, G. S.** (1997). Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation During Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphate-Dependent Pathway. *Biol Reprod* 56, 707-719.

**Gerke, V. y Weber, K.** (1984). Identity of p36k Phosphorylated Upon Rous Sarcoma Virus Transformation

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

with a Protein Purified from Brush Borders; Calcium-Dependent Binding to Non-Erythroid Spectrin and F-Actin. *EMBO J* 3, 227-233.

**Gerke, V. y Weber, K.** (1985). The Regulatory Chain in the P36-Kd Substrate Complex of Viral Tyrosine-Specific Protein Kinases Is Related in Sequence to the S-100 Protein of Glial Cells. *EMBO J* 4, 2917-2920.

**Gilbert, S.** (2005). *Biología Del Desarrollo*. Séptima Edición ed Sinauer Associates, Inc

**Glaser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E. y Schroder, J. M.** (2005). Antimicrobial Psoriasin (S100A7) Protects Human Skin from Escherichia Coli Infection. *Nat Immunol* 6, 57-64.

**Gore-Langton, R. y Armstrong, D.** (1994). Follicular Stereoidogenesis and Its Control. In *The Physiology of Reproduction* K. E. a. N. JD (Raven Press, Ltd).

**Gradilone, S., Arranz, S., y Cabada, M.** (1998). Detection of highly glycosylated proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 261, 224-227.

**Green, C. E., Bredl, J., Holt, W. V., Watson, P. F. y Fazeli, A.** (2001). Carbohydrate Mediation of Boar Sperm Binding to Oviductal Epithelial Cells *In Vitro*. *Reproduction* 122, 305-315.

**Greenwald, G. y Roy, S.** (1994). Follicular Development and Its Control. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. a. Neil. JD (Raven Press, Ltd).

**Greve, J. M. y Wassarman, P. M.** (1985). Mouse Egg Extracellular Coat Is a Matrix of Interconnected Filaments Possessing a Structural Repeat. *J Mol Biol* 181, 253-264.

**Gualtieri, R. y Talevi, R.** (2000). *In Vitro*-Cultured Bovine Oviductal Cells Bind Acrosome-Intact Sperm and Retain This Ability Upon Sperm Release. *Biol Reprod* 62, 1754-1762.

**Haase, B., Humphray, S. J., Lyer, S., Renner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J. y Leeb, T.** (2006). Molecular Characterization of the Porcine Deleted in Malignant Brain Tumors 1 Gene (Dmbt1). *Gene* 376, 184-191.

**Hafez, E. S. E.** (1985). *Reproducción E Inseminación Artificial En Animales*. Vol. 1. 5 edn Oficina Sanitaria Panamericana.

**Hajjar, K. A., Guevara, C. A., Lev, E., Dowling, K. y Chacko, J.** (1996). Interaction of the Fibrinolytic Receptor, Annexin II, with the Endothelial Cell Surface. Essential Role of Endonexin Repeat 2. *J Biol Chem* 271, 21652-21659.

**Hajjar, K. A., Jacovina, A. T. y Chacko, J.** (1994). An Endothelial Cell Receptor for Plasminogen/Tissue Plasminogen Activator. I. Identity with Annexin II. *J Biol Chem* 269, 21191-21197.

**Handrow, R. R., First, N. L. y Parrish, J. J.** (1989). Calcium Requirement and Increased Association with Bovine Sperm During Capacitation by Heparin. *J Exp Zool* 252, 174-182.

**Harayama, H. y Miyake, M.** (2006). A Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase C Activation Is Involved in the Hyperactivation of Boar Spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73, 1169-1178.

**Harayama, H., Muroga, M. y 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, 436-447.

**Harper, M. J.** (1973a). Relationship between Sperm Transport and Penetration of Eggs in the Rabbit Oviduct. *Biol Reprod* 8, 441-450.

**Harper, M. J.** (1973b). Stimulation of Sperm Movement from the Isthmus to the Site of Fertilization in the Rabbit Oviduct. *Biol Reprod* 8, 369-377.

**Harrison, R. A., Ashworth, P. J. y Miller, N. G.** (1996). Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an Effector of Capacitation,

Induces a Rapid and Reversible Change in the Lipid Architecture of Boar Sperm Plasma Membranes. *Mol Reprod Dev* 45, 378-391.

**Harrison, R. A. y Gadella, B. M.** (2005). Bicarbonate-Induced Membrane Processing in Sperm Capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351.

**Hedrick, J. L.** (2008). Anuran and Pig Egg Zona Pellucida Glycoproteins in Fertilization and Early Development. *Int J Dev Biol* 52, 683-701.

**Ho, H. C. y Suarez, S. S.** (2001). Hyperactivation of Mammalian Spermatozoa: Function and Regulation. *Reproduction* 122, 519-526.

**Hu, Y., Yu, H., Pask, A. J., O'brien, D. A., Shaw, G. y Renfree, M. B.** (2009). A-Kinase Anchoring Protein 4 Has a Conserved Role in Mammalian Spermatogenesis. *Reproduction* 137, 645-653.

**Hunter, M. G.** (2000). Oocyte Maturation and Ovum Quality in Pigs. *Rev Reprod* 5, 122-130.

**Hunter, R. H.** (1972). Local Action of Progesterone Leading to Polyspermic Fertilization in Pigs. *J Reprod Fertil* 31, 433-444.

**Hunter, R. H.** (1973). Polyspermic Fertilization in Pigs after Tubal Deposition of Excessive Numbers of Spermatozoa. *J Exp Zool* 183, 57-63.

**Hunter, R. H.** (1976). Sperm-Egg Interactions in the Pig: Monospermy, Extensive Polyspermy, and the Formation of Chromatin Aggregates. *J Anat* 122, 43-59.

**Hunter, R. H.** (1981). Sperm Transport and Reservoirs in the Pig Oviduct in Relation to the Time of Ovulation. *J Reprod Fertil* 63, 109-117.

**Hunter, R. H.** (1984). Pre-Ovulatory Arrest and Peri-Ovulatory Redistribution of Competent Spermatozoa in the Isthmus of the Pig Oviduct. *J Reprod Fertil* 72, 203-211.

**Hunter, R. H.** (1991). Oviduct Function in Pigs, with Particular Reference to the Pathological Condition of Polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29, 385-391.

**Hunter, R. H.** (1993). Sperm:Egg Ratios and Putative Molecular Signals to Modulate Gamete Interactions in Polytoxic Mammals. *Mol Reprod Dev* 35, 324-327.

**Hunter, R. H.** (1995). Ovarian Endocrine Control of Sperm Progression in the Fallopian Tubes.

**Hunter, R. H.** (2002). Vital Aspects of Fallopian Tube Physiology in Pigs. *Reprod Domest Anim* 37, 186-190.

**Hunter, R. H.** (2005). The Fallopian Tubes in Domestic Mammals: How Vital Is Their Physiological Activity? *Reprod Nutr Dev* 45, 281-290.

**Hunter, R. H.** (2008). Sperm Release from Oviduct Epithelial Binding Is Controlled Hormonally by Peri-Ovulatory Graafian Follicles. *Mol Reprod Dev* 75, 167-174.

**Hunter, R. H., Barwise, L. y King, R.** (1982). Sperm Transport, Storage and Release in the Sheep Oviduct in Relation to the Time of Ovulation. *Br Vet J* 138, 225-232.

**Hunter, R. H., Flechon, B. y Flechon, J. E.** (1991). Distribution, Morphology and Epithelial Interactions of Bovine Spermatozoa in the Oviduct before and after Ovulation: A Scanning Electron Microscope Study. *Tissue Cell* 23, 641-656.

**Hunter, R. H. y Leglise, P. C.** (1971). Polyspermic Fertilization Following Tubal Surgery in Pigs, with Particular Reference to the Role of the Isthmus. *J Reprod Fertil* 24, 233-246.

**Hunter, R. H. y Nichol, R.** (1983). Transport of Spermatozoa in the Sheep Oviduct: Preovulatory Sequestering of Cells in the Caudal Isthmus. *J Exp Zool* 228, 121-128.

- Hunter, R. H. y Nichol, R.** (1986). Post-Ovulatory Progression of Viable Spermatozoa in the Sheep Oviduct and the Influence of Multiple Mating on Their Pre-Ovulatory Distribution. *Br Vet J* 142, 52-58.
- Hunter, R. H., Nichol, R. y Crabtree, S. M.** (1980). Transport of Spermatozoa in the Ewe: Timing of the Establishment of a Functional Population in the Oviduct. *Reprod Nutr Dev* 20, 1869-1875.
- Hunter, R. H., Petersen, H. H. y Greve, T.** (1999). Ovarian Follicular Fluid, Progesterone and Ca<sup>2+</sup> Ion Influences on Sperm Release from the Fallopian Tube Reservoir. *Mol Reprod Dev* 54, 283-291.
- Hunter, R. H. y Wilmot, I.** (1984). Sperm Transport in the Cow: Peri-Ovulatory Redistribution of Viable Cells within the Oviduct. *Reprod Nutr Dev* 24, 597-608.
- Ignotz, G. G., Cho, M. Y. y Suarez, S. S.** (2007). Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. *Biol Reprod* 77, 906-913.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. y Okabe, M.** (2005). The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required for Sperm to Fuse with Eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Jaiswal, B. S., Eisenbach, M. y Tur-Kaspa, I.** (1999). Detection of Partial and Complete Acrosome Reaction in Human Spermatozoa: Which Inducers and Probes to Use? *Mol Hum Reprod* 5, 214-219.
- Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., Garcii, A., Betancourt, M. y Fierro, R.** (2003). Changes in the Distribution of Lectin Receptors During Capacitation and Acrosome Reaction in Boar Spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1171-1180.
- Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C. G., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Gesser, B., Etzerodt, M., Honore, B., Celis, J. E. y Thestrup-Pedersen, K.** (1996). Psoriasin: A Novel Chemotactic Protein. *J Invest Dermatol* 107, 5-10.
- Johnsson, N., Gerke, V. y Weber, K.** (1990). P36, Member of the Ca<sup>2+</sup>/Lipid Binding Proteins (Annexins, Calpactins, Lipocortins) and Its Complex with p11; Molecular Aspects. *Prog Clin Biol Res* 349, 123-133.
- Kalab, P., Peknicova, J., Geussova, G. y Moos, J.** (1998). Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Boar Sperm through a cAMP-Dependent Pathway. *Mol Reprod Dev* 51, 304-314.
- Kan, F. W. y Esperanzate, P. W.** (2006). Surface Mapping of Binding of Oviductin to the Plasma Membrane of Golden Hamster Spermatozoa During *In Vitro* Capacitation and Acrosome Reaction. *Mol Reprod Dev* 73, 756-766.
- Killian, G. J.** (2004). Evidence for the Role of Oviduct Secretions in Sperm Function, Fertilization and Embryo Development. *Anim Reprod Sci* 82-83, 141-153.
- Kim, J. y Hajjar, K. A.** (2002). Annexin II: A Plasminogen-Plasminogen Activator Co-Receptor. *Front Biosci* 7, d341-348.
- Kondracki, S., Banaszewska, D., Wysokinska, A. y Chomicz, J.** (2006). Sperm Morphology of Cattle and Domestic Pigs. *Reprod Biol* 6 *Suppl* 2, 99-104.
- Kouba, A. J., Abeydeera, L. R., Alvarez, I. M., Day, B. N. y Buhi, W. C.** (2000). Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *In Vitro*. *Biol Reprod* 63, 242-250.
- Kretser, D. A. K. J.** (1994). The Cytology of the Testis. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. a. Neil. JD (Raven Press, Ltd).
- Krop, I., Marz, A., Carlsson, H., Li, X., Bloushtain-Qimron, N., Hu, M., Gelman, R., Sabel, M. S., Schnitt, S., Ramaswamy, S. y col.** (2005). A Putative Role for Psoriasin in Breast Tumor Progression. *Cancer Res* 65, 11326-11334.

- Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lee Motoyama, J. P., Kim-Motoyama, H., Kim, P., Nakagama, H., Miyagawa, K. y Suzuki, K.** (2007). Identification of Dermcidin in Human Gestational Tissue and Characterization of Its Proteolytic Activity. *Biochem Biophys Res Commun* *357*, 828-833.
- Lefebvre, R., Chenoweth, P. J., Drost, M., Leclear, C. T., Maccubbin, M., Dutton, J. T. y Suarez, S. S.** (1995). Characterization of the Oviductal Sperm Reservoir in Cattle. *Biol Reprod* *53*, 1066-1074.
- Lefebvre, R. y Suarez, S. S.** (1996). Effect of Capacitation on Bull Sperm Binding to Homologous Oviductal Epithelium. *Biol Reprod* *54*, 575-582.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S., Sopkova-De Oliveira Santos, J. y Gerke, V.** (2000). S100-Annexin Complexes: Some Insights from Structural Studies. *Cell Biol Int* *24*, 799-802.
- Leyton, L. y Saling, P.** (1989). Evidence That Aggregation of Mouse Sperm Receptors by Zp3 Triggers the Acrosome Reaction. *J Cell Biol* *108*, 2163-2168.
- Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K., Selstam, G. y Reddy, P.** (2006). Control of Mammalian Oocyte Growth and Early Follicular Development by the Oocyte PI3 Kinase Pathway: New Roles for an Old Timer. *Dev Biol* *299*, 1-11.
- Loeser, C. R., Lynch, C., 2nd y Tulsiani, D. R.** (1999). Characterization of the Pharmacological-Sensitivity Profile of Neoglycoprotein-Induced Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa. *Biol Reprod* *61*, 629-634.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N., Farr, A., y Randal, R.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.
- Lösel, R., Dorn-Beineke, A., Falkenstein, E., Wehling, M. y Feuring, M.** (2004). Porcine Spermatozoa Contain More Than One Membrane Progesterone Receptor. *Int J Biochem Cell Biol* *36*, 1532-1541.
- Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G. y Baldi, E.** (2005). Tyrosine Phosphorylation of the a Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol Reprod* *72*, 22-32.
- Lyons, R. A., Saridogan, E. y Djahanbakhch, O.** (2006). The Reproductive Significance of Human Fallopian Tube Cilia. *Hum Reprod Update* *12*, 363-372.
- Macleod, T. J., Kwon, M., Filipenko, N. R. y Waisman, D. M.** (2003). Phospholipid-Associated Annexin A2-S100A10 Heterotetramer and Its Subunits: Characterization of the Interaction with Tissue Plasminogen Activator, Plasminogen, and Plasmin. *J Biol Chem* *278*, 25577-25584.
- Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., Basse, B. y Et Al.** (1991). Molecular Cloning, Occurrence, and Expression of a Novel Partially Secreted Protein "Psoriasin" That Is Highly up-Regulated in Psoriatic Skin. *J Invest Dermatol* *97*, 701-712.
- Malm, J., Sorensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A., Lilja, H., Stahle-Backdahl, M., Borregaard, N. y Egesten, A.** (2000). The Human Cationic Antimicrobial Protein (Hcap-18) Is Expressed in the Epithelium of Human Epididymis, Is Present in Seminal Plasma at High Concentrations, and Is Attached to Spermatozoa. *Infect Immun* *68*, 4297-4302.
- Manaskova, P., Peknicova, J., Elzeinova, F., Ticha, M. y Jonakova, V.** (2007). Origin, Localization and Binding Abilities of Boar Dqh Sperm Surface Protein Tested by Specific Monoclonal Antibodies. *J Reprod Immunol* *74*, 103-113.
- Manaskova, P., Rylava, H., Ticha, M. y Jonakova, V.** (2002). Characterization of Proteins from Boar Prostate. *Am J Reprod Immunol* *48*, 283-290.

- Marini, P. E. y Cabada, M. O.** (2003). One Step Purification and Biochemical Characterization of a Spermatozoa-Binding Protein from Porcine Oviductal Epithelial Cells. *Mol Reprod Dev* 66, 383-390.
- Marquez, B. y Suarez, S. S.** (2004). Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation and Hyperactivation. *Biol Reprod* 70, 1626-1633.
- Martinez-Heredia, J., Estanyol, J. M., Balleca, J. L. y Oliva, R.** (2006). Proteomic Identification of Human Sperm Proteins. *Proteomics* 6, 4356-4369.
- Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P. y Seren, E.** (1996). Identification of Capacitation in Boar Spermatozoa by Chlortetracycline Staining. *Theriogenology* 45, 373-381.
- Mburu, J. N., Einarsson, S., Lundeheim, N. y Rodriguez-Martinez, H.** (1996). Distribution, Number and Membrane Integrity of Spermatozoa in the Pig Oviduct in Relation to Spontaneous Ovulation. *Anim Reprod Sci* 45, 109-121.
- Mburu, J. N., Rodriguez-Martinez, H. y Einarsson, S.** (1997). Changes in Sperm Ultrastructure and Localisation in the Porcine Oviduct around Ovulation. *Anim Reprod Sci* 47, 137-148.
- Melendrez, C. S. y Meizel, S.** (1995). Studies of Porcine and Human Sperm Suggesting a Role for a Sperm Glycine Receptor/Cl<sup>-</sup> Channel in the Zona Pellucida-Initiated Acrosome Reaction. *Biol Reprod* 53, 676-683.
- Melendrez, C. S., Meizel, S. y Berger, T.** (1994). Comparison of the Ability of Progesterone and Heat Solubilized Porcine Zona Pellucida to Initiate the Porcine Sperm Acrosome Reaction *In Vitro*. *Mol Reprod Dev* 39, 433-438.
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J. y Tesarik, J.** (1992). Distinction between True Acrosome Reaction and Degenerative Acrosome Loss by a One-Step Staining Method Using Pisum Sativum Agglutinin. *J Reprod Fertil* 95, 755-763.
- Michaut, M., Tomes, C. N., De Blas, G., Yunes, R. y Mayorga, L. S.** (2000). Calcium-Triggered Acrosomal Exocytosis in Human Spermatozoa Requires the Coordinated Activation of Rab3a and N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9996-10001.
- Miki, K., Willis, W. D., Brown, P. R., Goulding, E. H., Fulcher, K. D. y Eddy, E. M.** (2002). Targeted Disruption of the AKAP4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Dev Biol* 248, 331-342.
- Miwa, N., Uebi, T. y Kawamura, S.** (2008). S100-Annexin Complexes--Biology of Conditional Association. *FEBS J* 275, 4945-4955.
- Moore, B. W.** (1965). A Soluble Protein Characteristic of the Nervous System. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 739-744.
- Moretti, E., Scapigliati, G., Pascarelli, N. A., Baccetti, B. y Collodel, G.** (2007). Localization of AKAP4 and Tubulin Proteins in Sperm with Reduced Motility. *Asian J Androl* 9, 641-649.
- Nagai, T. y Moor, R. M.** (1990). Effect of Oviduct Cells on the Incidence of Polyspermy in Pig Eggs Fertilized *In Vitro*. *Mol Reprod Dev* 26, 377-382.
- Naz, R. K., Ahmad, K. y Kumar, R.** (1991). Role of Membrane Phosphotyrosine Proteins in Human Spermatozoal Function. *J Cell Sci* 99 ( Pt 1), 157-165.
- Nipper, R. W., Jones, B. H., Gerton, G. L. y Moss, S. B.** (2006). Protein Domains Govern the Intracellular Distribution of Mouse Sperm AKAP4. *Biol Reprod* 75, 189-196.
- Osborn, M., Johnsson, N., Wehland, J. y Weber, K.** (1988). The Submembranous Location of p11 and Its Interaction with the p36 Substrate of pp60 Src Kinase *In Situ*. *Exp Cell Res* 175, 81-96.
- O'toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A. y Florman, H. M.** (2000). Ca<sup>2+</sup> Entry through

Store-Operated Channels in Mouse Sperm Is Initiated by Egg ZP3 and Drives the Acrosome Reaction. *Mol Biol Cell* *11*, 1571-1584.

**Pérez, F. A., Roma, S. M., Cabada, M. O. y Marini, P. E.** (2006). Sperm Binding Glycoprotein Is Differentially Present Surrounding the Lumen of Isthmus and Ampulla of the Pig's Oviduct. *Anat Embryol (Berl)* *211*, 619-624.

**Petrunkina, A. M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D. y Töpfer-Petersen, E.** (2001). Kinetic Characterization of the Changes in Protein Tyrosine Phosphorylation of Membranes, Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Concentration and Viability in Boar Sperm Populations Selected by Binding to Oviductal Epithelial Cells. *Reproduction* *122*, 469-480.

**Petrunkina, A. M., Gropper, B., Gunzel-Apel, A. R. y Töpfer-Petersen, E.** (2004). Functional Significance of the Cell Volume for Detecting Sperm Membrane Changes and Predicting Freezability in Dog Semen. *Reproduction* *128*, 829-842.

**Petrunkina, A. M., Volker, G., Weitze, K. F., Beyerbach, M., Töpfer-Petersen, E. y Waberski, D.** (2005). Detection of Cooling-Induced Membrane Changes in the Response of Boar Sperm to Capacitating Conditions. *Theriogenology* *63*, 2278-2299.

**Pollard, J. W., Plante, C., King, W. A., Hansen, P. J., Betteridge, K. J. y Suarez, S. S.** (1991). Fertilizing Capacity of Bovine Sperm May Be Maintained by Binding of Oviductal Epithelial Cells. *Biol Reprod* *44*, 102-107.

**Qin, W., Ho, L., Wang, J., Peskind, E. y Pasinetti, G. M.** (2009). S100A7, a Novel Alzheimer's Disease Biomarker with Non-Amyloidogenic Alpha-Secretase Activity Acts Via Selective Promotion of Adam-10. *PLoS One* *4*, e4183.

**Rabillond, T. B., Gilly, C. y Lawrence, J.** (1994). Silver-staining of proteins in polyacrilamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology*, *40*: 57-75.

**Racey, P. A.** (1979). The Prolonged Storage and Survival of Spermatozoa in Chiroptera. *J Reprod Fertil* *56*, 391-402.

**Ramirez, F., Schlicker, A., Assenov, Y., Lengauer, T. y Albrecht, M.** (2007). Computational Analysis of Human Protein Interaction Networks. *Proteomics* *7*, 2541-2552.

**Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T. A., Bevers, M. M. y Gadella, B. M.** (2003). Progesterone Induces Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa Via a Protein Tyrosine Kinase Dependent Pathway. *Mol Reprod Dev* *64*, 120-128.

**Rescher, U. y Gerke, V.** (2004). Annexins--Unique Membrane Binding Proteins with Diverse Functions. *J Cell Sci* *117*, 2631-2639.

**Rescher, U. y Gerke, V.** (2008). S100A10/p11: Family, Friends and Functions. *Pflugers Arch* *455*, 575-582.

**Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. y Lewit-Bentley, A.** (1999). The Crystal Structure of a Complex of p11 with the Annexin II N-Terminal Peptide. *Nat Struct Biol* *6*, 89-95.

**Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H. y Schitteck, B.** (2004). Dermcidin Is Constitutively Produced by Eccrine Sweat Glands and Is Not Induced in Epidermal Cells under Inflammatory Skin Conditions. *Br J Dermatol* *151*, 534-539.

**Rintala-Dempsey, A. C., Rezvanpour, A. y Shaw, G. S.** (2008). S100-Annexin Complexes--Structural Insights. *FEBS J* *275*, 4956-4966.

**Rodriguez-Martinez, H.** (2007). Role of the Oviduct in Sperm Capacitation. *Theriogenology* *68 Suppl 1*, S138-146.

- Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E. y Ridderstrale, Y.** (1991). Histochemical Localization of Carbonic Anhydrase in the Female Genitalia of Pigs During the Oestrous Cycle. *Acta Anat (Basel)* 140, 41-47.
- Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J. M., Martinez, E., Roca, J., Sanz, L. y Calvete, J. J.** (2005). Boar Spermatozoa in the Oviduct. *Theriogenology* 63, 514-535.
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H. y Johannisson, A.** (2001). Involvement of Oviduct in Sperm Capacitation and Oocyte Development in Pigs. *Reprod Suppl* 58, 129-145.
- Roldan, E. R., Murase, T. y Shi, Q. X.** (1994). Exocytosis in Spermatozoa in Response to Progesterone and Zona Pellucida. *Science* 266, 1578-1581.
- Roldan, E. R. y Vazquez, J. M.** (1996). Bicarbonate/CO<sub>2</sub> Induces Rapid Activation of Phospholipase A2 and Renders Boar Spermatozoa Capable of Undergoing Acrosomal Exocytosis in Response to Progesterone. *FEBS Lett* 396, 227-232.
- Saacke, R. G. y Marshall, C. E.** (1968). Observations on the Acrosomal Cap of Fixed and Unfixed Bovine Spermatozoa. *J Reprod Fertil* 16, 511-514.
- Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J. y Visconti, P. E.** (2007). Signalling Pathways Involved in Sperm Capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 245-259.
- Saling, P. M. y Storey, B. T.** (1979). Mouse Gamete Interactions During Fertilization *In Vitro*. Chlorotetracycline as a Fluorescent Probe for the Mouse Sperm Acrosome Reaction. *J Cell Biol* 83, 544-555.
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F. y col.** (2001). Dermcidin: A Novel Human Antibiotic Peptide Secreted by Sweat Glands. *Nat Immunol* 2, 1133-1137.
- Schmidt, H. y Kamp, G.** (2004). Induced Hyperactivity in Boar Spermatozoa and Its Evaluation by Computer-Assisted Sperm Analysis. *Reproduction* 128, 171-179.
- Schultz, R. y Williams, C.** (2005). Developmental Biology: Sperm-Egg Fusion Unscrambled. *Nature* 434, 152-153.
- Scott, M. A.** (2000). A Glimpse at Sperm Function in Vivo: Sperm Transport and Epithelial Interaction in the Female Reproductive Tract. *Anim Reprod Sci* 60-61, 337-348.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A. y Jones, R.** (2004). Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution During Capacitation of Boar Spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 253-265.
- Shang, X., Cheng, H. y Zhou, R.** (2008). Chromosomal Mapping, Differential Origin and Evolution of the S100 Gene Family. *Genet Sel Evol* 40, 449-464.
- Shaw, J. L., Smith, C. R. y Diamandis, E. P.** (2007). Proteomic Analysis of Human Cervico-Vaginal Fluid. *J Proteome Res* 6, 2859-2865.
- Si, Y. y Okuno, M.** (1999). Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation. *Biol Reprod* 61, 240-246.
- Stetchell, B. M., S y Brooks, D** (1994). Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. a. Neil. JD (Raven Press, Ltd).
- Stewart, G. D., Lowrie, A. G., Riddick, A. C., Fearon, K. C., Habib, F. K. y Ross, J. A.** (2007). Dermcidin Expression Confers a Survival Advantage in Prostate Cancer Cells Subjected to Oxidative Stress or Hypoxia. *Prostate* 67, 1308-1317.
- Suarez, S. S.** (1987). Sperm Transport and Motility in the Mouse Oviduct: Observations *in Situ*. *Biol Reprod* 36, 203-210.

- Suarez, S. S.** (1998). The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: Mechanisms of Formation. *Biol Reprod* 58, 1105-1107.
- Suarez, S. S.** (2001). Carbohydrate-Mediated Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in Mammals. *Cells Tissues Organs* 168, 105-112.
- Suarez, S. S.** (2002). Formation of a Reservoir of Sperm in the Oviduct. *Reprod Domest Anim* 37, 140-143.
- Suarez, S. S.** (2008). Regulation of Sperm Storage and Movement in the Mammalian Oviduct. *Int J Dev Biol* 52, 455-462.
- Suarez, S. S., Dai, X. B., Demott, R. P., Redfern, K. y Mirando, M. A.** (1992). Movement Characteristics of Boar Sperm Obtained from the Oviduct or Hyperactivated *In Vitro*. *J Androl* 13, 75-80.
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B. y Powell, R. L.** (1991). Evidence for the Function of Hyperactivated Motility in Sperm. *Biol Reprod* 44, 375-381.
- Talevi, R. y Gualtieri, R.** (2004). *In Vivo* Versus *In Vitro* Fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115 Suppl 1, S68-71.
- Talevi, R. y Gualtieri, R.** (2009). Molecules Involved in Sperm-Oviduct Adhesion and Release. *Theriogenology* (en prensa).
- Tardif, S., Dube, C., Chevalier, S. y Bailey, J. L.** (2001). Capacitation Is Associated with Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase-Like Activity of Pig Sperm Proteins. *Biol Reprod* 65, 784-792.
- Tardif, S., Lefievre, L., Gagnon, C. y Bailey, J. L.** (2004). Implication of Camp During Porcine Sperm Capacitation and Protein Tyrosine Phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 69, 428-435.
- Thiel, C., Osborn, M. y Gerke, V.** (1992). The Tight Association of the Tyrosine Kinase Substrate Annexin II with the Submembranous Cytoskeleton Depends on Intact p11- and Ca(2+)-Binding Sites. *J Cell Sci* 103 ( Pt 3), 733-742.
- Tienthai, P., Johannisson, A. y Rodriguez-Martinez, H.** (2004). Sperm Capacitation in the Porcine Oviduct. *Anim Reprod Sci* 80, 131-146.
- Tollner, T. L., Yudin, A. I., Tarantal, A. F., Treece, C. A., Overstreet, J. W. y Cherr, G. N.** (2008). Beta-Defensin 126 on the Surface of Macaque Sperm Mediates Attachment of Sperm to Oviductal Epithelia. *Biol Reprod* 78, 400-412.
- Tomes, C. N., Roggero, C. M., De Blas, G., Saling, P. M. y Mayorga, L. S.** (2004). Requirement of Protein Tyrosine Kinase and Phosphatase Activities for Human Sperm Exocytosis. *Dev Biol* 265, 399-415.
- Töpfer-Petersen, E.** (1999). Carbohydrate-Based Interactions on the Route of a Spermatozoon to Fertilization. *Hum Reprod Update* 5, 314-329.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Leeb, T., Kirchhoff, C. y Muller, P.** (2005). Structure and Function of Secretory Proteins of the Male Genital Tract. *Andrologia* 37, 202-204.
- Töpfer-Petersen, Edda, Julia Friedrich, Anna Petrunkina, Mahnaz Ekhlesi-Hundrieser, Dagmar Waberski, Wolfgang Drommer** (2002). Function of the Mammalian Oviductal Sperm Reservoir. *J Exp Zool* 292, 210-215.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M. y Tsoлова, M.** (2008). Glycobiology of Fertilization in the Pig. *Int J Dev Biol* 52, 717-736.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoлова, M., Leeb, T., Kirchhoff, C. y Muller, P.** (2005). Structure and Function of Secretory Proteins of the Male Genital Tract. *Andrologia* 37, 202-204.
- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L. y Calvete, J. J.** (1998). Spermadhesins: A New Protein Family. Facts, Hypotheses and Perspectives. *Andrologia* 30, 217-

224.

**Towbin, H., Staechelin, T., Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.

**Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. y Pereira, B. M.** (1998). The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Exp Cell Res* 240, 151-164.

**Tulsiani, D. R., Yoshida-Komiya, H. y Araki, Y.** (1997). Mammalian Fertilization: A Carbohydrate-Mediated Event. *Biol Reprod* 57, 487-494.

**Tummaruk, P., Sumransap, P., Techakumphu, M. y Kunavongkrit, A.** (2007). Distribution of Spermatozoa and Embryos in the Female Reproductive Tract after Unilateral Deep Intra Uterine Insemination in the Pig. *Reprod Domest Anim* 42, 603-609.

**Turner, R. M.** (2006). Moving to the Beat: A Review of Mammalian Sperm Motility Regulation. *Reprod Fertil Dev* 18, 25-38.

**Turner, R. M., Eriksson, R. L., Gerton, G. L. y Moss, S. B.** (1999). Relationship between Sperm Motility and the Processing and Tyrosine Phosphorylation of Two Human Sperm Fibrous Sheath Proteins, Pro-HAKAP82 and HAKAP82. *Mol Hum Reprod* 5, 816-824.

**Urner, F. y Sakkas, D.** (2003). Protein Phosphorylation in Mammalian Spermatozoa. *Reproduction* 125, 17-26.

**Vanderhyden, B.** (2002). Molecular Basis of Ovarian Development and Function. *Front Biosci* 7, 2006-2022.

**Varner, D. D., Ward, C. R., Storey, B. T. y Kenney, R. M.** (1987). Induction and Characterization of Acrosome Reaction in Equine Spermatozoa. *Am J Vet Res* 48, 1383-1389.

**Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G. S.** (1995). Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.

**Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M. y Kopf, G. S.** (1998). The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *J Androl* 19, 242-248.

**Visconti, P. E. y Kopf, G. S.** (1998). Regulation of Protein Phosphorylation During Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.

**Visconti, P. E., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G. S. y Tezon, J. G.** (1999). Roles of Bicarbonate, Camp, and Protein Tyrosine Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm. *Biol Reprod* 61, 76-84.

**Waberski, D., Magnus, F., Ardon, F., Petrunkina, A. M., Weitze, K. F. y Töpfer-Petersen, E.** (2006). Binding of Boar Spermatozoa to Oviductal Epithelium *In Vitro* in Relation to Sperm Morphology and Storage Time. *Reproduction* 131, 311-318.

**Wassarman, P. M.** (1987). The Biology and Chemistry of Fertilization. *Science* 235, 553-560.

**Wassarman, P. M.** (1995). Towards Molecular Mechanisms for Gamete Adhesion and Fusion During Mammalian Fertilization. *Curr Opin Cell Biol* 7, 658-664.

**Wassarman, P. M.** (1999). Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell* 96, 175-183.

**Wassarman, P. M.** (2002). Channels of Communication in the Ovary. *Nat Cell Biol* 4 *Suppl*, s7-9.

**Wassarman, P. M.** (2008). Zona Pellucida Glycoproteins. *J Biol Chem* 283, 24285-24289.

**Wassarman, P. M. y Litscher, E. S.** (2001). Towards the Molecular Basis of Sperm and Egg Interaction

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

During Mammalian Fertilization. *Cells Tissues Organs* 168, 36-45.

**Wassarman, P. M. y Litscher, E. S.** (2008). Mammalian Fertilization: The Egg's Multifunctional Zona Pellucida. *Int J Dev Biol* 52, 665-676.

**Watson, P. H., Leygue, E. R. y Murphy, L. C.** (1998). Psoriasin (S100A7). *Int J Biochem Cell Biol* 30, 567-571.

**Wells, M. E. y Awa, O. A.** (1970). New Technique for Assessing Acrosomal Characteristics of Spermatozoa. *J Dairy Sci* 53, 227-232.

**Wu, J. T., Chiang, K. C. y Cheng, F. P.** (2006). Expression of Progesterone Receptor(S) During Capacitation and Incidence of Acrosome Reaction Induced by Progesterone and Zona Proteins in Boar Spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 93, 34-45.

**Yanagimachi, R.** (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. a. Neil. JD (Raven Press, Ltd).

**Yonezawa, N., Amari, S., Takahashi, K., Ikeda, K., Imai, F. L., Kanai, S., Kikuchi, K. y Nakano, M.** (2005). Participation of the Nonreducing Terminal Beta-Galactosyl Residues of the Neutral N-Linked Carbohydrate Chains of Porcine Zona Pellucida Glycoproteins in Sperm-Egg Binding. *Mol Reprod Dev* 70, 222-227.

**Zeng, Y., Clark, E. N. y Florman, H. M.** (1995). Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization During Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion. *Dev Biol* 171, 554-563.

**Zou, C.-X. y Yang, Z.-M.** (2000). Evaluation on Sperm Quality of Freshly Ejaculated Boar Semen During *In Vitro* Storage under Different Temperatures. *Theriogenology* 53, 1477-1488.