



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

“Cambios fisiológicos del espermatozoide de vertebrados: bases moleculares
de su activación”

Presentada por Emma O’Brien

Rosario, Argentina

2011

**“Cambios fisiológicos del espermatozoide de vertebrados:
bases moleculares de su activación”**

Emma D. O’Brien

Licenciada en Ciencias Biológicas, UBA

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 esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigación llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET-UNR) y Área Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril de 2007 y Agosto de 2011, bajo la dirección de Silvia E. Arranz.

Dedicada a Martín Mecchia,

especialmente a Oscar y a "los tres mosqueteros".

“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda”

Voltaire. 1694-1778.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. *Silvia Arranz* por darme la oportunidad de realizar mis estudios y por todos estos años de aprendizaje. Un especial agradecimiento a *Marcelo Cabada*, por adoptarme en los comienzos y a *Pablo Visconti* y *Ana María Salicioni*, colaboradores de nuestro grupo de investigación y co-autores de nuestros trabajos.

Agradezco a las instituciones provinciales, nacionales e internacionales que hicieron posible el desarrollo de ésta tesis. Gracias por las ayudas económicas para la realización de mis estudios y para los viajes a reuniones científicas.

Estoy en deuda con mi compañero de proyecto *Darío Krapf* y con los chicos del lab. O: *Ceci, Vani, Pau, Vanina, Mati, Nacho, Pablo, Quique, Andrés y Juan*.

Gracias por las instrucciones y discusiones constructivas de los doctores: *Patricia, Claudia, Gabriela, Nora, Pablo, Andrea, Juan y Angel*.

Gracias a *Ana, Matías, Emilia* y a *Guiliana* por proveerme de los batracios y a *Sebastián* por asistirme en sus cuidados.

Gracias a *Alejandra Martínez, Alejandra Sánchez, Beatriz Winik* y a *Sonia Scarpeci*, por auxiliarme en las nuevas técnicas. Gracias a *Boti, Hebe, Agustina* y *Andrés Zuchetti* por proporcionarme generosamente reactivos.

Especialmente quiero agradecer a *Ceci, Vero, Agos, Marian, Clau-“Gelen”, Martín, Vale, Lore, Anto, Emilse, Tati, Jime, Luchi, Boti, Pablito, Mati, Juan Manuel, Ezequiel, Colo* y *Seba* por los momentos divertidos e inolvidables y, fundamentalmente, por su generosidad.

Gracias a los jóvenes docentes del Area Biología (*A₂A*).

Gracias a todos.

DIVULGACIÓN

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

- **O'Brien, E.D.**, Krapf, D., Cabada, M.O., Visconti, P.E. and Arranz, S.E. 2011. *Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through Protein Kinase A activation*. Dev. Biol. 350: 80-88.
- **O'Brien, E.D.**, Salicioni, A.M., Cabada, M.O. and Arranz, S.E. 2010. *Vitellogenesis in Bufo arenarum: Identification, characterization and immunolocalization of High Lipovitellin during oogenesis*. Comparative Biochemistry and Physiology (B). 155(3): 256-265.
- Krapf, D., **O'Brien, E.D.**, Cabada, M.O., Visconti, P.E. y Arranz, S.E. 2009. *Acrosome reaction in spermatozoa of the amphibian Bufo arenarum involves two calcium influxes and depends both on extracellular calcium, and egg jelly components*. Biology of Reproduction. 80:311-319.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido publicados en el siguiente libro:

Krapf, D., **O'Brien, E.D.** and Arranz S.E. 2011. *Physiological Modifications to be considered in Amphibian Sperm Cryopreservation*. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and C.C. Green, Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 100-106.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **O'Brien, E.D.**, Krapf, D., Visconti, P.E. y Arranz, S.E. 2011. *“Activity of calcineurin governs the phosphorylated state of PKC substrates involved in Amphibian sperm motility”*. Gordon Research Conference. Fertilization and Activation of Development. Holderness, NH, USA.
- **O'Brien, E.D.**, Krapf, D., Visconti, P.E., Cabada, M.O y Arranz, S.E. 2010. *“Mechanism involved in amphibian sperm motility activation”*. 11th International Symposium on Spermatology. Okinawa, Japón.

- **O'Brien, E.D.**, Krapf, D., Visconti, P.E., Cabada, M.O. y Arranz, S.E. 2009. "*Molecular mechanism involved in the activation of Amphibian sperm motility*". Gordon Research Conference. Fertilization and Activation of Development. Holderness, NH, USA.
- **O'Brien, E.D.**, Krapf, D., Cabada, M.O. y Arranz, S.E. 2008. "*Physiological modification of Bufo arenarum sperm during motility activation*". XLIV Annual Meeting – Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology (SAIB). Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Krapf, D., **O'Brien, E.D.**, Visconti, P.E., Arranz, S.E. and Cabada, M.O. 2007. "*Effect of Sperm Capacitation on Calcium Mobilization during Acrosome Reaction in Amphibian*". EMBO International Symposium on Calcium and the Cytoskeleton, Punta del Este, Uruguay.
- **O'Brien E. D.**, Salicioni, A.M., Arranz, S. E., Cabada, M.O. 2007. "*Lpvl Immunolocalization during oogenesis in Bufo arenarum*". I Meeting of the Biology Societies of Argentine. Huerta Grande, Córdoba, Argentina.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DIVULGACIÓN	ii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
La Fecundación	1
El modelo de estudio: <i>Bufo arenarum</i>	1
El espermatozoide	3
La activación de la motilidad del espermatozoide	9
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
Reactivos	17
Animales	19
Espermatozoides	19
Concentración espermática	20
Obtención de plasma testicular	20
Medición de concentración de iones y osmolaridad	20
Composición de los medios	20
Egg Water (EW) o Agua de huevo	21
Precipitación y concentración de proteínas de EW	21
Determinación de la concentración proteica	22
Ensayos farmacológicos	22
Obtención de extractos de espermatozoides y electroforesis unidimensional de proteínas	22
Electroforesis bidimensional de proteínas	23
Transferencia de proteínas	23
Ensayos de Western Blot	24
Inmunocitoquímica de fluorescencia	24
Análisis de la motilidad	25
Estimación de la velocidad de nado de los espermatozoides	26

Análisis densitométrico de las bandas.....	27
Análisis estadístico	27
Análisis de la secuencia de aminoácidos	27
RESULTADOS.....	28
CAPITULO I: Estudio de los factores extracelulares que regulan la activación de la motilidad de los espermatozoides de <i>Bufo arenarum</i>	29
INTRODUCCIÓN	29
RESULTADOS.....	30
Activación de la motilidad de los espermatozoides inducida en un medio hiposmótico	30
Caracterización del plasma testicular	30
Diseño de los medios de incubación y su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides	31
Estudio del efecto de la osmolaridad y concentración iónica del medio extracelular sobre la motilidad de los espermatozoides	34
Caracterización de EW y su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides	37
DISCUSION PARCIAL.....	40
CAPÍTULO II: Activación de la motilidad de los espermatozoides de <i>B. arenarum</i> dependiente de una vía de señalización tmAC/AMPc/PKA.....	45
INTRODUCCIÓN	45
RESULTADOS.....	46
Aumento en el patrón de fosforilación de proteínas espermáticas asociado a la activación de la motilidad	46
Rol del AMPc y PKA durante la activación de la motilidad inducida por hipotonicidad	51
Caracterización del tipo de enzima adenilato ciclasa involucrada en la activación de la motilidad.	55
DISCUSION PARCIAL.....	62
CAPÍTULO III: Motilidad de los espermatozoides de <i>B. arenarum</i> regulada por PKC y serina/treonina fosfatasas.	68
INTRODUCCIÓN	68
RESULTADOS.....	69

Cambio en el patrón de fosforilación por PKC de proteínas espermáticas asociada a la activación de la motilidad	69
Activación flagelar: análisis de la vía de señalización dependiente de PKC.....	73
Activación flagelar: análisis de la vía dependiente de Serina/Treonina fosfatasas	82
Identificación de proteínas blanco de PKC.....	90
DISCUSION PARCIAL.....	100
CONCLUSIONES	105
RESUMEN	109
BIBLIOGRAFÍA	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hembra adulta de sapo argentino (<i>Bufo arenarum</i>)	2
Figura 2: Fotografía de una tira de ovocitos de <i>B. arenarum</i>	3
Figura 3: Estructura del axonema.....	5
Figura 4: Espermatozoide de sapo <i>Bufo arenarum</i>	6
Figura 5: Microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides de la familia Bufonidae.....	7
Figura 6: Cambios en la motilidad del espermatozoide previos a la fecundación.....	10
Figura 7: Esquema de los patrones de motilidad de los espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	25
Figura 8: Estimación de la velocidad de nado de los espermatozoides.....	26
Figura 9: Análisis de la motilidad de espermatozoides en soluciones Rg st. y Rg 10%.....	30
Figura 10: Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP, EW ASP, ASP 10% y EW.....	32
Figura 11: Efecto de la osmolaridad sobre la motilidad de los espermatozoides.....	34
Figura 12: Efecto de la concentración de iones del medio extracelular sobre la motilidad de los espermatozoides.....	36
Figura 13: Inmunodetección de proteínas del tipo allurin en EW de <i>Bufo arenarum</i>	38
Figura 14: Análisis de la motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en ASP 10% y EW en función del tiempo.....	39
Figura 15: Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en AEW y EW.....	39
Figura 16: Inducción de la fosforilación por PKA en espermatozoides incubados en medios hipotónicos.....	47
Figura 17: Patrón de las fosfoproteínas sustratos de PKA de espermatozoides incubados en AEW y EW.....	48
Figura 18: Patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides incubados en ASP, ASP 10% y EW.....	49
Figura 19: Efecto de la osmolaridad del medio sobre el patrón de fosfoproteínas sustratos de PKA.....	50
Figura 20: Localización de las fosfoproteínas (pPKA-sustratos).....	51
Figura 21: Efecto del inhibidor H-89 sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	52
Figura 22: Análisis de densitometría de las bandas de la Fig. 21.....	53
Figura 23: Efecto de agonistas de PKA sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides....	54
Figura 24: Efecto de Forskolina sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	56
Figura 25: Inmunodetección de proteína $G_{s\alpha}$ en espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	58
Figura 26: Efecto del inhibidor de tmAC (MDL) sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	59
Figura 27: Análisis de densitometría de las bandas de la Fig. 26.....	60
Figura 28: Efecto del inhibidor de sAC (KH7) sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	61
Figura 29: Análisis de densitometría de las bandas de la Fig. 28.....	62
Figura 30: Los medios hipotónicos inducen cambios en el patrón de proteínas fosforiladas por PKC.....	69
Figura 31: Los medios ASP10% y EW inducen cambios en el patrón de fosforilación por PKC.....	70
Figura 32: Efecto de la osmolaridad del medio sobre el patrón de fosforilación por PKC.....	71
Figura 33: Localización de las fosfoproteínas (pPKC-sustratos).....	72
Figura 34: Efecto del inhibidor chelerythrine (Chel), sobre los niveles de fosforilación de espermatozoides incubados en ASP.....	74
Figura 35: Efecto del inhibidor chelerythrine (Chel) sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10%.....	75
Figura 36: Efecto del inhibidor Gö 6983 sobre los niveles de fosforilación de espermatozoides incubados en ASP.....	77

Figura 37: Efecto del inhibidor Gö 6983 sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10%.....	78
Figura 38: Efecto del activador Thymeleatoxina (TXA) sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP.....	79
Figura 39: Efecto del activador Thymeleatoxina (TXA) sobre los niveles de fosforilación de espermatozoides incubados en ASP10%.....	80
Figura 40: Efecto del inhibidor Gö 6983 y activador TXA sobre los niveles de fosforilación de espermatozoides incubados en ASP.....	81
Figura 41: Inmunodetección de las fosfatasa PPI y PP2A en extractos proteicos de espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	83
Figura 42: Efecto del inhibidor de serina/treonina fosfatasa, ácido okadaico (OA), sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	85
Figura 43: Efecto del inhibidor de serina/treonina fosfatasa, Cyclosporin (CsA), sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides.....	86
Figura 44: Efecto de EGTA sobre los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides....	88
Figura 45: Inmunodetección de calcineurina (PP2B) en extractos proteicos de espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	89
Figura 46: Análisis del cambio en el patrón de fosforilación en Western Bolt de geles bidimensionales...	90
Figura 47: Superposición de las figuras correspondientes a los ensayos de WB de la Fig. 46 B.....	91
Figura 48: Gel bidimensional teñido con Azul de Coomassie correspondiente a una extracto proteico de espermatozoides de sapo.....	92
Figura 49: Esquema del complejo Fo F1 - ATP sintetasa.....	94
Figura 50: Comparación de secuencias de ATPsyn- β de mamíferos, aves, anfibios y teleósteos.....	96
Figura 51. Secuencia aminoacídica de la enzima ATPsyn- β de <i>Xenopus laevis</i>	99
Figura 52: Inmunodetección de ATPsyn- β en extractos proteicos de espermatozoides de <i>B. arenarum</i> .	100
Figura 53: Modelo de estudio propuesto sobre las vías regulatorias de la activación motilidad espermática en <i>Bufo arenarum</i>	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Listado de fármacos utilizados.....	18
Tabla 2: Composición de las soluciones ASP, ASP10%, EW ASP y EW.....	21
Tabla 3: Velocidad de nado de los espermatozoides de <i>B. arenarum</i>	33
Tabla 4: Listado de proteínas obtenidas durante la búsqueda en la base de datos de NCBI.....	93
Tabla 5: Listado de los péptidos que mostraron el 100% de identidad con la secuencia de la enzima ATPsyn- β de <i>Xenopus laevis</i>	97
Tabla 6: Análisis <i>in silico</i> de los sitios putativos de fosforilación en residuos de serina presentes en ATPsyn- β de <i>Xenopus laevis</i>	98

ABREVIATURAS

8-Br-AMPC	8-Bromo- AMPC
AC	adenilato ciclasa
AEW	EW artificial
AKAP	de "A-kinase anchor protein" o proteína de aclaje a PKA
AMPC	AMP cíclico
ASP	de "artificial seminal plasma"
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPsyn-β	ATP sintetasa beta
CaM	poteína Calmodulina
CaMK	poteína quinasa CaM
Ca ²⁺	cálcio intracelular
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonato
Chel	Chelerythrine
CsA	Cyclosporin A
DAG	diacilglicerol
db-AMPC	dibutiril-AMPC
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	Dithiothreitol
EW	de "egg water" o agua de huevo
FK	Forskolina
Gö 6983	3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-
H-89	N-[2-(pbromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IOD	densidad óptica integrada
kDa	kilodalton
KH7	E-2-(1H-Benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene) propanehydra
mA	miliampere
MDL	N-(cis-2-phenyl-cyclopentyl) azacyclotridecan-2-imine-hydrochloride
min	minutos
OA	acido ocadaico
PDE	fosfodiesterasas
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PPs	serina/treonina fosfatasas
SAC O SACY	AC soluble
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg.	segundos
tmAC	AC transmembrana
Tris	N-tris(hidroximetil) aminometano
TXA	Thymeleatoxina

INTRODUCCIÓN

La Fecundación

La posibilidad de recombinación genética y la probabilidad de que las especies subsistan en el tiempo depende del éxito de la comunicación entre gametos. El espermatozoide y el óvulo tienen que dialogar para que ocurra la fecundación, quizá el evento biológico más importante en las especies con reproducción sexual. A pesar de que los estudios sobre la interacción entre ambos gametos se originaron casi un siglo atrás (Lillie, 1919), los mecanismos moleculares involucrados no han sido completamente descifrados.

La fecundación es un proceso por el cual dos gametos se fusionan para crear un nuevo individuo con genoma derivado de ambos progenitores (Guilbert, 2000). Existen diferencias claramente establecidas entre las distintas especies animales determinadas, principalmente, por el lugar donde ocurre la fecundación. En la mayoría de los casos existen cuatro etapas comunes a todas las especies animales:

1. Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino
2. Regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino
3. Fusión del material genético de ambos gametos
4. Activación del metabolismo del cigoto para dar comienzo al desarrollo.

La fecundación puede darse en el medio externo (fecundación externa) o dentro del cuerpo de la hembra (fecundación interna). La fecundación externa implica que óvulos y espermatozoides sean vertidos al agua, donde ocurre su encuentro. Es propia de los animales acuáticos, como los peces o anfibios.

El modelo de estudio: *Bufo arenarum*

Los anfibios son vertebrados primitivos, los primeros en vivir fuera del agua (Duellman and Trueb, 1986). Teniendo en cuenta la ubicación taxonómica de los anfibios anuros, el estudio de estos organismos aporta datos indispensables para la comprensión y análisis evolutivos de los procesos de estudio. En este trabajo de tesis se propone como modelo de estudio al Anfibio Anuro, *Bufo*

arenarum, Hensel 1867 (Fig. 1), el cual pertenece a la familia *Bufo* *arenarum*. La amplia revisión taxonómica de anfibios realizada en el año 2006 (Frost et al., 2006) ha reclasificado a esta especie como perteneciente al género *Rhinella* (*Rhinella arenarum*). Este animal, al presentar fecundación externa, posee aspectos metodológicos ventajosos por sobre los animales de fecundación interna, como ser la mayor disponibilidad de gametos y la facilidad de obtener embriones *in vitro*.



Figura 1: Hembra adulta de sapo argentino (*Bufo arenarum*). Tomado de <http://www.flickr.com/groups/frogsandtoads>

Los ejemplares adultos de *Bufo arenarum* varían entre 10 y 14 cm de longitud, su peso oscila entre 120 a 180 g, siendo las hembras por lo general de mayor tamaño que los machos. Su piel es gruesa, cornificada, glandular, con aspecto verrugoso. Presentan coloración dorsal marrón verdoso con manchas claras y ventralmente son amarillo-grisáceos. Los machos son reconocibles por sus miembros anteriores robustos y por los callos nupciales en sus dedos.

Los anfibios son animales poiquiloterms y su actividad reproductora se encuentra adaptada fundamentalmente a las condiciones ambientales del medio en el que se desarrollan. Los factores más influyentes en el comportamiento sexual están representados por la temperatura, los fotoperiodos, la humedad e inclusive la disponibilidad de alimentos (Paniagua et al., 1990). El éxito de la reproducción en estos animales requiere de una perfecta sincronización de procesos fisiológicos y patrones de comportamiento en respuesta a una amplia variedad de estímulos ambientales. En época reproductiva (septiembre a noviembre del hemisferio sur) el macho y la hembra

de *B. arenarum* se encuentran en cuerpos de agua estancada de baja profundidad. Durante el amplexus (abrazo dorsal del macho sobre la hembra), ambos deponen sus gametos simultáneamente. La hembra libera los ovocitos rodeados por su matriz extracelular, la cual está compuesta por la envoltura vitelina y la cubierta gelatinosa (Fig. 2). Es decir que, la interacción entre gametos es inicialmente establecida entre los espermatozoides y moléculas presentes en la cubierta gelatinosa de los ovocitos.

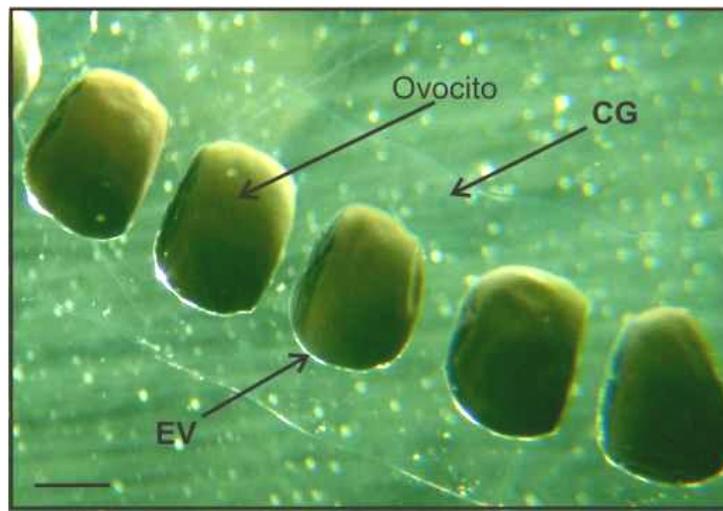


Figura 2: Fotografía de una tira de ovocitos de *B. arenarum*. Los ovocitos están cubiertos por la envoltura vitelina (EV) y la cubierta gelatinosa (CG). La barra representa 500 μm .

El espermatozoide

La visión actual que tenemos del gameto masculino se aleja de la que tenía el microscopista holandés Anton van Leeuwenhoek (1678). Inicialmente planteó que eran “animales parásitos” y unos años más tarde dijo que eran “semillas” “plantadas” sobre el suelo nutritivo que simplemente proporcionaba la mujer. El otro co-descubridor del espermatozoide, Nicolás Hartsoeker, esperaba encontrar minúsculos humanos preformados dentro del espermatozoide (“homúnculo” del latín *homunculus*, ‘hombrecillo’). En 1700, Lazzaro Spallanzani demostró, por primera vez, que el semen de sapo filtrado, carente de espermatozoides, no podía fecundar al gameto femenino. La combinación de mejores lentes para los microscopios y la teoría celular llevaron a una nueva apreciación de la función de los espermatozoides. Recién en 1824, Jean Louis Prevost y Jean Baptiste Dumas afirmaron que los espermatozoides no eran

parásitos, sino “agentes activos de la fecundación”. Ellos observaron la existencia universal del espermatozoide en machos sexualmente maduros y su ausencia en individuos inmaduros y ancianos. Propusieron, por primera vez, que el espermatozoide ingresaba al gameto femenino y contribuía materialmente a la generación siguiente. Estas afirmaciones fueron ignoradas hasta que en 1840 Albert von Kölliker describió la formación de los espermatozoides en los testículos. En 1876, Oscar Hertwig y Herman Fol demostraron, de manera independiente y utilizando como modelo el invertebrado marino erizo de mar, que el espermatozoide entraba al gameto femenino y que se producía la unión de ambos pronúcleos (Guilbert, 2000).

Los espermatozoides maduros se producen en las gónadas de los machos (testículos) durante la gametogénesis. La mayoría de los espermatozoides están formados por una cabeza y un flagelo, ambos unidos por una pieza media. La cabeza contiene al núcleo, el acrosoma y un reducido citoplasma. El núcleo es haploide y presenta su cromatina altamente condensada. Por delante se aloja el acrosoma, una vesícula membranosa que contiene enzimas hidrolíticas (está ausente en la mayoría de los espermatozoides de peces óseos pertenecientes a la subclase *Neopterygii*). En la pieza media se encuentran las mitocondrias las cuales otorgan la energía necesaria para la motilidad flagelar (Eddy and O’Brien, 1995). El movimiento del espermatozoide está gobernado por el axonema, la maquinaria activa del flagelo. Es una estructura muy sofisticada formada por citoesqueleto, proteínas motoras, chaperonas moleculares, proteínas de unión a calcio, y enzimas quinasas y fosfatasas. La estructura y composición molecular están muy conservadas entre los cilios y flagelos eucariotas desde los protistas hasta los humanos. La arquitectura molecular del axonema ha sido muy estudiada en algas *Chlamydomonas sp* (Mitchell, 2000). Consiste en 9 pares de microtúbulos periféricos y 1 par central (9+2) (Fig. 3).

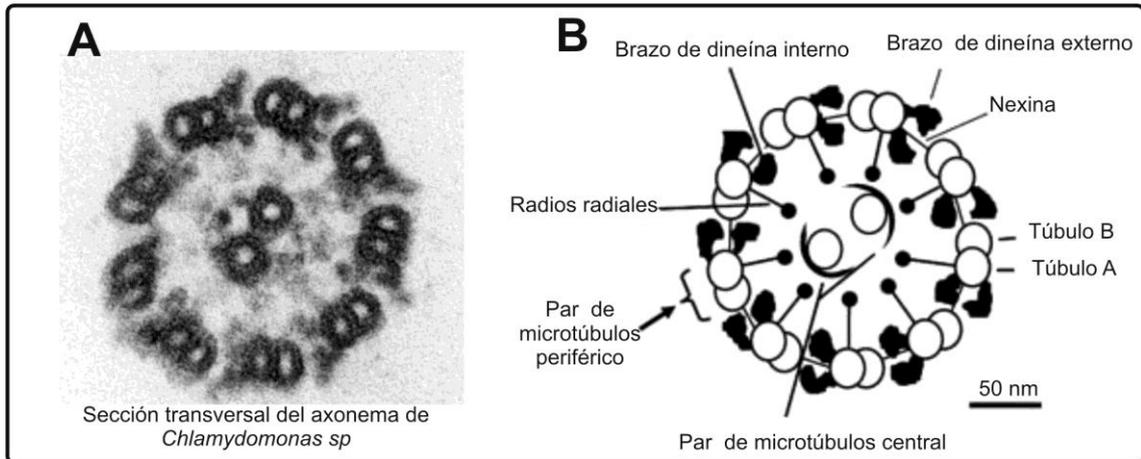


Figura 3: Estructura del axonema. **A.** Microscopía electrónica de transmisión de la sección transversal del axonema de *Chlamydomonas sp.* Tomado de www.sciencerevolution.net. **B.** Diagrama del corte transversal de un axonema. Adaptado de www.king.uchc.edu.

Los pares de microtúbulos periféricos, numerados de 1 a 9, están formados por los túbulo A y B y están unidos por la proteína nexina. Cada uno de estos pares constituye una unidad que contiene brazos de dineínas (interno y externo). Las dineínas son las proteínas motoras de los microtúbulos que convierten la energía química contenida en el ATP en la energía mecánica del movimiento a través de su actividad ATPasa (Gibbons, 1981). Existen evidencias que apoyan la idea de que el par central de microtúbulos determina el plano de batido flagelar a través de la acción de los radios radiales (Nakano et al., 2003; Smith and Lefebvre, 1996). Se postula también que los radios radiales regulan el brazo de dineínas interno a través de fosforilación/desfosforilación de proteínas (Porter and Sale, 2000).

Como se ha descrito, el espermatozoide es una célula completamente polarizada y su diversidad morfológica dentro del Reino Animal asombra. Es necesario destacar algunas particularidades morfológicas de nuestro modelo de estudio: el espermatozoide de *B. arenarum*. Presenta una cabeza alargada con aspecto de flecha y un único flagelo. La cabeza contiene al núcleo que la ocupa casi en su totalidad y por adelante, como si fuera la punta de la flecha, se encuentra el acrosoma (Fig. 4).

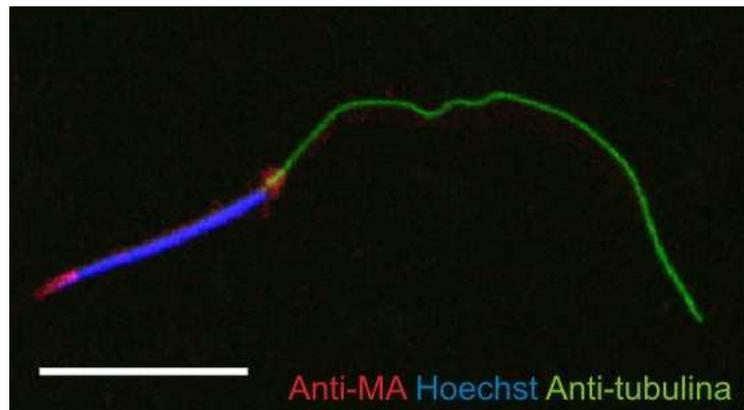


Figura 4: Espermatozoide de sapo *Bufo arenarum*. Inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-.matriz acrosomal (tiñe acrosoma de rojo), anti-tubulina (tiñe flagelo de verde) y colorante de ADN Hoechst (azul). La barra representa 10 μm .

Burgos y Fawcett (1956) describieron la ultra-estructura de los espermatozoides pertenecientes a la familia Bufonidae. Se destaca un acrosoma alargado que cubre la región anterior del núcleo. El núcleo posee una fosa nuclear pequeña. Se distingue el cuello con los centriolos proximal y distal orientados perpendicularmente. La cola presenta una “membrana ondulante” como estructura accesoria y una fibra axial que corre paralela al axonema de estructura 9+2 (Fig. 5). Se piensa que la fibra axial (homóloga a las fibras densas externas de flagelos de espermatozoides de mamíferos) proporcionaría mayor rigidez al flagelo, facilitando su batido (Fawcett, 1975; Lindemann et al., 1992).

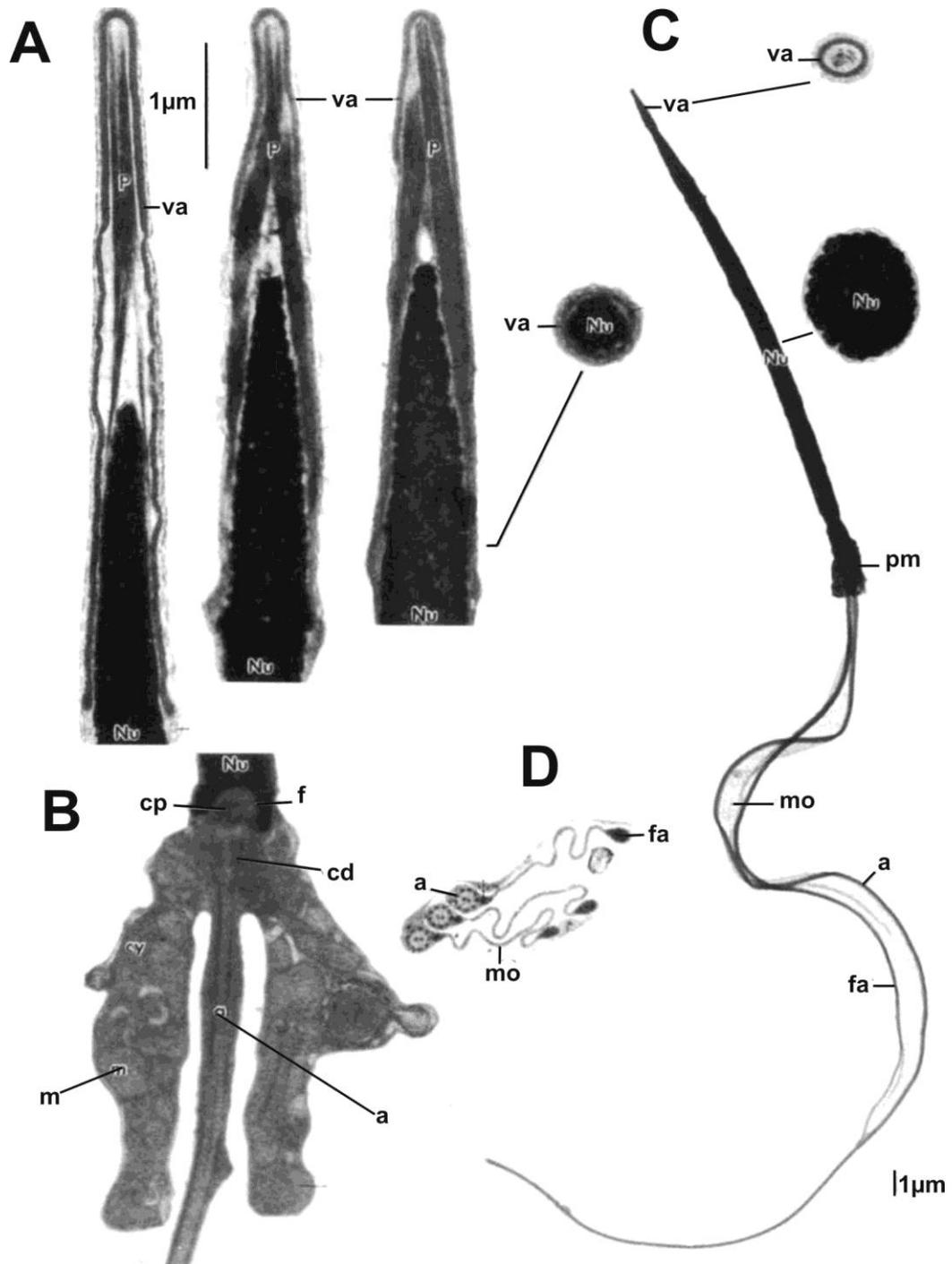


Figura 5: Microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides de la familia Bufonidae. **A.** Sección longitudinal de la vesícula acrosomal (va) de espermatozoides de *Ansonia sp.*, *Bufo boreas* y *Bufo marinus* (de izquierda a derecha). Se muestra además una vista transversal de la base de la cabeza. **B.** Sección longitudinal de la pieza media (pm) de espermatozoide de *Bufo marinus*. Se observa la fosa nuclear (f) y los centriolos proximal y distal (cp y cd respectivamente). **C.** Espermatozoide entero de *B. arenarum*. Se muestra un corte transversal a la altura de la vesícula acrosomal (va) y otro a la mitad de la cabeza. El flagelo con su membrana ondulante (mo) muestra el axonema (a) y perpendicularmente, la fibra axial (fa). **D.** Corte transversal del flagelo. Abreviaturas: m: mitocondria, nu: núcleo, P: perforatium. Adaptado de Burgos y Fawcett (1956).

Se supone que el aumento de la superficie prevista por la membrana ondulante facilita la natación de los espermatozoides bajo ciertas condiciones del medio acuoso (Burgos and Fawcett, 1956). Por otro lado se postula que el flujo transmembrana de agua se da más rápidamente en los espermatozoides con membrana ondulante, ya que la misma provee una superficie mayor de contacto y el influjo de agua se daría rápidamente (Cosson, 2010).

Para que la fecundación sea exitosa deben ocurrir varios eventos. Los espermatozoides deben nadar para llegar hasta el ovocito. Deben unirse a él y penetrar sus cubiertas extracelulares, fusionar sus membranas plasmáticas para que, finalmente y dentro del ovocito, se unan los pronúcleos y se origine un nuevo individuo. Así contado parece sencillo, sin embargo, el camino que debe recorrer el espermatozoide es mucho más complejo de lo que imaginamos. Los espermatozoides de mamíferos recién eyaculados carecen de capacidad fecundante. Esta cualidad es adquirida luego de un período de permanencia en el tracto reproductor de la hembra, como ha sido sugerido hace más de 50 años (Austin, 1952; Chang, 1951). Los cambios que ocurren durante este período le confieren al espermatozoide la capacidad para desencadenar la reacción acrosómica en respuesta a la unión con la *zona pellucida*, con el objeto de iniciar finalmente la fusión de membranas. Este proceso de cambios que ocurren en el tracto reproductor de la hembra, conocido como “capacitación del espermatozoide”, involucra la modificación del pH intracelular, alteraciones de la arquitectura lipídica (remoción de colesterol) y proteica de la membrana plasmática, y el inicio de complejas cascadas de señalización intracelular (cambio en el estado fosforilado de proteínas) (Baldi et al., 2002; Visconti and Kopf, 1998; Visconti et al., 2002). Como se mencionó anteriormente, en animales de fecundación externa, como la mayoría de los Anfibios Anuros, la interacción entre gametos se establece, inicialmente, entre los espermatozoides y moléculas presentes en la cubierta gelatinosa de los ovocitos. Esta cubierta recubre a la envoltura vitelina (análogo de *zona pellucida* de mamíferos), y es formada por el oviducto durante el tránsito de los ovocitos por el mismo. En ovocitos del sapo *Bufo arenarum*, la cubierta gelatinosa se encuentra constituida por una mucina formadora de gel y proteínas solubles (Arranz et al., 1997). Los ovocitos que son mecánica o

químicamente desprovistos de esta cubierta no son fecundables (Barbieri and Cabada, 1969). El pasaje de los espermatozoides a través de la cubierta gelatinosa ha sido considerado un paso fundamental durante el proceso de fecundación, y ha sido propuesto como un requisito “capacitante” de espermatozoides de Anfibios en analogía con el concepto desarrollado en mamíferos (Shivers and James, 1970). En concordancia, los factores difusibles de la cubierta gelatinosa (recuperados en una solución denominada EW, del inglés Egg Water) fueron propuestos como “activadores” de espermatozoides de *Bufo arenarum*, al ser requeridos durante el proceso de fecundación (Barbieri, 1976; Barbieri and Cabada, 1969). Más aún, la preincubación de espermatozoides en EW le confiere a éstos la capacidad de fecundar ovocitos sin cubierta gelatinosa, en un medio desprovisto de estos factores (Krapf et al., 2007). En *Bufo arenarum*, los espermatozoides deben atravesar la cubierta gelatinosa y alcanzar la cubierta vitelina con un acrosoma intacto. Resultados de nuestro laboratorio indican que los espermatozoides que no han sido expuestos a EW no desencadenan la reacción acrosómica ante el contacto con la envoltura vitelina (Krapf et al., 2009). Esto indicaría que, de forma similar a lo observado en mamíferos (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b), los espermatozoides no capacitados no pueden completar la reacción acrosómica, requerimiento para la penetración de la *zona pellucida* y, por ende, para la fecundación.

La activación de la motilidad del espermatozoide

Inmediatamente luego de la espermatogénesis los espermatozoides no se mueven. Durante la fecundación, sin embargo, su motilidad cambia dramáticamente. Por ejemplo, los espermatozoides de animales que presentan fecundación externa, muestran una activación de la motilidad inducida por cambios en la composición iónica de los medios extracelulares, por cambios en la osmolaridad o por sustancias que son liberadas por los ovocitos (Fig. 6 A). Los espermatozoides de animales que presentan fecundación interna, sin embargo, muestran una activación por factores presentes en el tracto reproductor femenino o por moléculas liberadas por los ovocitos (Inaba, 2003). En el caso particular de los espermatozoides de mamíferos, la habilidad de tornarse móviles se da durante su paso por el epidídimo (maduración). Este

proceso de maduración ha sido estudiado principalmente en los mamíferos, pero existen datos que revelan que los pájaros (Clulow and Jones, 1982; Howarth, 1983), reptiles (Depeiges and Dacheux, 1985) e incluso ciertos tipos de peces (Ohta et al., 2001) poseen características similares. Los espermatozoides eyaculados en el tracto reproductor femenino en mamíferos se “capacitan” experimentando, entre otros eventos, un cambio en el patrón de la motilidad llamado “hiperactivación” (Yanagimachi, 1970) (Fig. 6 B).

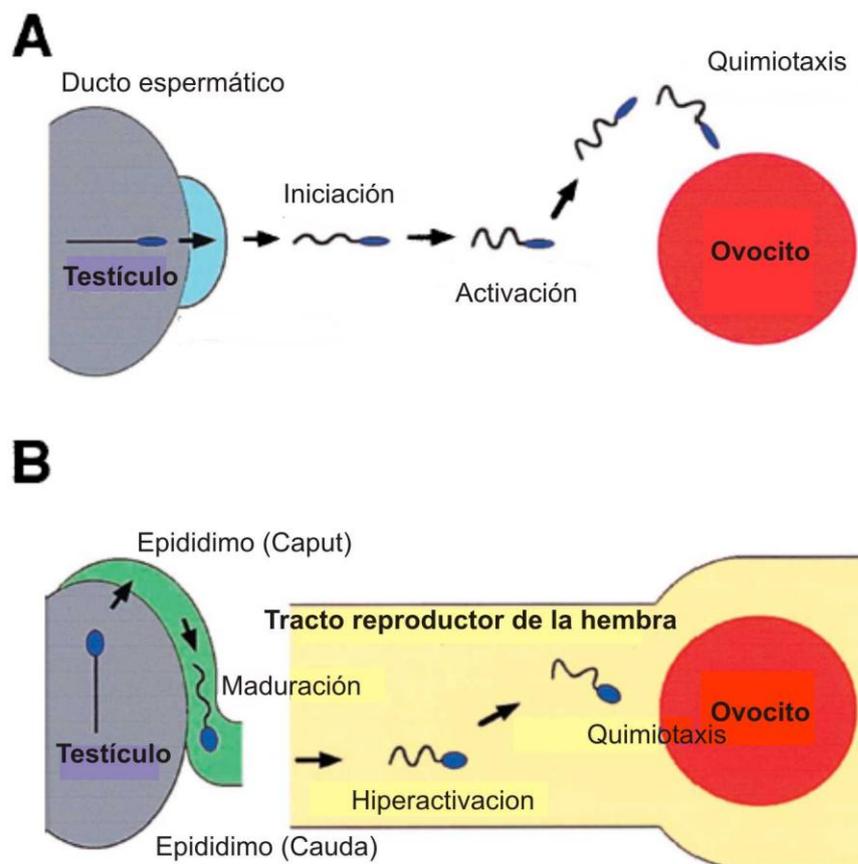


Figura 6: Cambios en la motilidad del espermatozoide previos a la fecundación. **A.** Los espermatozoides de animales de fecundación externa inician su motilidad durante su liberación al medio acuoso de fecundación. Esta iniciación está determinada por cambios en la osmolaridad y concentración iónica extracelular. Las sustancias liberadas por los ovocitos (o por su matriz extracelular) influyen sobre la motilidad de los espermatozoides, atrayéndolos (quimiotaxis). **B.** Los espermatozoides de especies de fecundación interna adquieren la capacidad de moverse durante la maduración y el paso por el epidídimo. Una vez depositados en el tracto reproductor de la hembra, la motilidad cambia drásticamente durante la capacitación (hipermotilidad). Los espermatozoides capacitados experimentan un tipo de contacto (químico) a distancia (quimiotaxis). Adaptado de Inaba (2003).

Curiosamente, en las aves y reptiles, la “capacitación” del espermatozoide no es un prerrequisito para fecundar al ovocito (Esponda, 1991). Si bien estos grupos de animales vertebrados (junto con los anfibios urodelos) presentan

fecundación interna, la misma no ocurre instantáneamente pos-cópula. Los espermatozoides son almacenados en el tracto reproductor de la hembra durante días, meses e incluso años (Brillard, 1990; Gist and Jones, 1987; Sever and Hamlett, 2002; Zalisko and Larsen, 1989). El almacenamiento de espermatozoides es una estrategia reproductiva que permite el encuentro de los gametos en aquellas especies que: a) presentan ciclo reproductor asincrónico entre los sexos; b) los machos presentan baja movilidad o hábitos solitarios; c) las hembras presentan una estación reproductora prolongada o múltiples puestas y d) presentan desigualdad en la proporción de sexos (menos machos que hembras) (Birkhead and Moller, 1993).

¿Cómo es regulada la activación de la motilidad de los espermatozoides de los distintos grupos de animales vertebrados?

Las investigaciones sobre la fisiología flagelar en mamíferos ha seducido mayormente a la comunidad científica. La generación de conocimiento en este área ha tenido y tiene un gran impacto sobre las tecnologías de producción animal y clínica reproductiva humana. Por un lado existen pruebas que sugieren la dependencia de adenosina mono-fosfato cíclico (AMPc) en la fosforilación de proteínas flagelares asociadas a la iniciación y el mantenimiento de la motilidad espermática (Tash and Means, 1982, 1983). La quinasa PKA, dependiente de AMPc, es muy probable que juegue un papel central en estos eventos de fosforilación (Visconti et al., 1997). Se ha demostrado que los ratones que carecen de la subunidad catalítica de PKA ($C\alpha_2$) son infértiles debido a varias anomalías, incluyendo aberraciones de la motilidad (Nolan et al., 2004). Se propone además que existiría una activación posterior de tirosina quinasas que fosforilarían proteínas asociadas al flagelo. Una de las proteínas fosforiladas en tirosina identificada es la proteína quinasa de anclaje 4 (AKAP4; "A-kinase anchor protein" en inglés) (Carrera et al., 1994).

Por otro lado, el calcio extracelular es requerido en muestras de espermatozoides de epidídimo y regula la activación e hiperactivación de la motilidad (Lindemann and Goltz, 1988; Tash and Means, 1987; White and Aitken, 1989). Ha sido también vinculado directamente con la función flagelar a

través de la regulación de una adenilato ciclasa soluble (sAC o SACY) (Buck et al., 1999), cuya actividad es sensible a este catión junto con el bicarbonato. La identificación de canales de calcio en la membrana plasmática del flagelo sugiere que el movimiento de calcio extracelular hacia el interior de la célula estaría involucrado en la regulación de la motilidad. Más aún, el calcio aumenta el movimiento asimétrico del batido flagelar en espermatozoides permeabilizados o “desmembrados” (tratados con tritón x-100) (Tash and Means, 1982). La proteína Calmodulina (CaM), es una proteína receptora de Ca^{2+} y activa a la quinasa dependiente de CaM (CaMK). De manera interesante, se ha observado que la inhibición de CaM disminuye la motilidad de los espermatozoides (Si and Olds-Clarke, 2000) y se han identificado diferentes isoformas de CaMK en el flagelo de espermatozoides de bovinos y humanos (Ignotz and Suarez, 2005; Marin-Briggiler et al., 2005).

Por último, vías mediadas por proteína G y cambios en el pH intracelular han sido también sugeridas como alternativas de regulación de la motilidad de espermatozoides de mamíferos (Baxendale and Fraser, 2003b; Wang et al., 2003), sin embargo, estos mecanismos no han sido completamente dilucidados.

Existen varios estudios realizados sobre la motilidad de los espermatozoides en gallos y curiosamente se ha descrito que el factor exógeno más importante que influiría sobre la iniciación de la motilidad sería la temperatura (Ashizawa and Nishiyama, 1978). Los espermatozoides de gallo se mantienen inmóviles en soluciones salinas a 41° C (la temperatura corporal del macho) y se activan cuando la temperatura desciende a 30°C (Takeda, 1982) o cuando son incubados en soluciones salinas conteniendo calcio y bicarbonato. Ashizawa y colaboradores (1989) afirmaron que los espermatozoides permeabilizados e incubados a temperaturas menores a 40°C restablecían su motilidad, sugiriendo que el axonema por sí mismo podría estar involucrado en este proceso regulatorio. En relación a la regulación por segundos mensajeros observaron que el agregado de AMPc a espermatozoides permeabilizados no producía un incremento en la motilidad. Concluyeron que una vía regulada por la quinasa PKA no cumpliría un rol fundamental en la iniciación de la motilidad. Sin embargo, observaron que espermatozoides íntegros a 40°C iniciaban su

motilidad por el agregado de calcio (Wishart and Ashizawa, 1987). Algunos años más tarde, Ashizawa y colaboradores (1995) demostraron que la motilidad estaría gobernada por una vía de señalización comandada por quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMK).

Poco se sabe sobre la regulación flagelar en reptiles. En trabajos realizados con espermatozoides de tortugas observaron que el agregado del inhibidor de fosfodiesterasa (IBMX) incrementaba los porcentajes de motilidad y la velocidad lineal de nado de los espermatozoides (Gist et al., 2000). Estos resultados sugieren la importancia de AMPc en la regulación de la motilidad, no obstante no se ha avanzado sobre los estudios de los mecanismos regulatorios en estas especies.

Los anfibios urodelos, como la salamandra *Cynops pyrrhogaster*, presentan fecundación interna. La hembra recibe el espermatóforo que emerge de la cloaca del macho y lo almacena en su spermateca (receptáculo en forma de bolsa ubicado en la pared dorsal de la cloaca de la hembra) (Sever and Brizzi, 1998; Watanabe and Onitake, 2002). Los espermatozoides quedan almacenados quiescentes hasta el momento de la ovulación. Se ha demostrado que la motilidad espermática es iniciada sobre la superficie de la cubierta gelatinosa de los ovocitos y estaría regulada por factores presentes en la misma (Watanabe et al., 2003). Las capas más externas de la cubierta gelatinosa de los ovocitos son cruciales para la fecundación en salamandras. Se han identificado factores desencadenantes de la reacción acrosómica (ARIS de “acrosome reaction-inducing substance” en inglés) (Watanabe et al., 2009) y factores inductores de la motilidad, SMIS (del inglés “sperm motility – initiating substance”) (Mizuno et al., 1999; Onitake et al., 2000). Los mecanismos regulatorios de estos factores no han sido completamente dilucidados. Recientemente Watanabe y colaboradores (2011) han monitoreado por fluorometría los niveles intracelulares de calcio en respuesta a SMIS, observado incrementos significativos durante la activación flagelar.

La activación espermática en peces puede depender de la presencia extracelular de cationes como Na^+ , Ca^{2+} o K^+ , y, en algunos casos, sólo de la

variación de la osmolaridad extracelular (Krasznai et al., 2000; Morisawa et al., 1983a; Morisawa et al., 1983b; Morita et al., 2006; Perchec Poupard et al., 1997). Una vez terminada la espermatogénesis, los espermatozoides de la mayoría de los peces son liberados al conducto espermático y son bañados por un fluido testicular donde permanecen inmóviles y con un bajo metabolismo. Se han descrito algunos de los factores de inhibición de la motilidad en los conductos espermáticos en peces de agua dulce, como por ejemplo la presión osmótica en ciprínidos, concentración de K^+ , concentración de glucosa, y pH del plasma seminal menor a 7 en salmónidos y una proteína de peso molecular de 120 kDa específica del plasma seminal en algunos cíclidos (Krasznai et al., 2000; Marian et al., 1993; Morisawa et al., 1983b; Perchec Poupard et al., 1997).

En peces dulceacuícolas, el choque hiposmótico genera la señal inicial para los eventos que conducen a la activación (Cosson et al., 1999), y que en la mayoría de los peces de agua dulce tiene un rango de duración de pocos segundos. En salmónidos, la disminución en la concentración de K^+ extracelular da inicio a la activación de la motilidad espermática. En este caso, la disminución del K^+ extracelular causa un eflujo de K^+ intracelular originando una hiperpolarización de la membrana, incremento de Ca^{2+} intracelular (Tanimoto et al., 1994) y finalmente la síntesis de AMPc acoplada a la activación de la adenilato ciclasa (Morisawa and Ishida, 1987). El AMPc juega un papel importante en la activación de espermatozoides en algunas especies de peces. Se ha observado que en espermatozoides de trucha tanto las concentraciones intracelulares de AMPc como las de Ca^{2+} aumentan durante de la activación flagelar (Cosson et al., 1989).

Como se puede apreciar y según lo descrito anteriormente, la regulación de la motilidad en los espermatozoides está gobernada por varios factores extracelulares los cuales inducen una respuesta intracelular, desencadenando la motilidad flagelar. Hace casi 25 años atrás Inoda y Morisawa (1987) demostraron que la hiposmolaridad es la señal de iniciación de la motilidad de espermatozoides en ranas (Anfibia, Anura). Sin embargo, hasta el momento no han sido descritas las vías de señalización asociadas a este proceso en anfibios. Resulta muy interesante avanzar en el conocimiento en este aspecto

ya que aportará datos relevantes para el desarrollo de biotecnologías apropiadas en el mantenimiento y conservación del germoplasma de anfibios (Krapf et al., 2011).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis es ahondar en el conocimiento de los eventos tempranos de la fecundación en animales de fecundación externa, especialmente en la identificación de procesos involucrados en la adquisición de la motilidad del espermatozoide. El flagelo del espermatozoide le permite nadar y cumplir con su principal cometido: fecundar al ovocito e introducir en él su material genético. Este conocimiento aportaría datos para explicar los mecanismos moleculares por los cuales los espermatozoides se tornan "aptos" para la fecundación.

En este trabajo de tesis se delinearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los factores externos que influyen sobre la motilidad de los espermatozoides. Este análisis proveerá información esencial para optimizar el diseño de un medio de incubación que simule las condiciones del testículo (en cuanto a su osmolaridad y concentración iónica), donde los espermatozoides son inmóviles.
- Analizar el efecto de los factores difusibles de la cubierta gelatinosa de los ovocitos sobre la motilidad de los espermatozoides.
- Avanzar en el conocimiento de las vías de señalización que regulan la iniciación y mantenimiento del movimiento flagelar.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

AMPc dibutilado (db-AMPc), 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-AMPc), Gö 6983 (2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide) e IBMX fueron obtenidos de Sigma. H-89 (N-[2-(p-bromocinamilamino) etil]-5-isoquinolinosulfonamida) y chelerythrine fueron comprados en BioSource International, Inc. Forskolina (FK) fue comprada a Calbiochem (San Diego, CA, USA). Cyclosporina A y ácido okadaico fueron adquiridos de LC laboratorios y E-2-(1H-Benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene) propanehidrazida (KH7) de Cayman Chemicals. El inhibidor N-(cis-2-phenyl-cyclopentyl) azacyclotridecan-2-imine-hydrochloride (MDL) fue gentilmente provisto por el Sr. Andrés Zuchetti (Ifise-CONICET). El activador Thymeleatoxina (TXA o TXX) fue gentilmente provisto por el Sra. Agustina Arias (Ifise-CONICET). Los activadores o inhibidores de diferentes enzimas utilizados se detallan en la tabla lista de reactivos (Tabla 1). Otras drogas y reactivos fueron de máximo grado analítico.

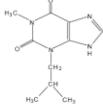
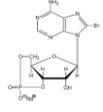
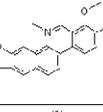
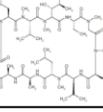
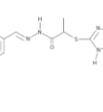
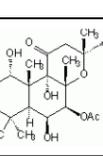
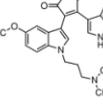
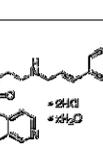
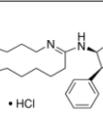
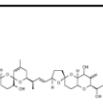
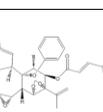
Substancia	Código	Tipo de acción	
	3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma (28822-58-4)	Inhibidor de fosfodiesterasas
	8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-AMPC)	Sigma (B7880)	Activador de PKA
	Chelerythrine Chohide (Chel)	Sigma (C2932)	Inhibidor de PKC
	Cyclosporin A (CsA)	LC laboratories (C-6000)	Inhibidor ser/thr fosfatasas
	E-2-(1H-Benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)propanehydrazide (KH7)	Cayman Chemicals (13243)	Inhibidor de sAC
	Forskolin (FK)	Calbiochem (344270)	Activador de tmACs
	3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (Gö 6983)	Sigma (G1918)	Inhibidor de PKC
	N-[2-(pbromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89)	BioSource International, Inc., USA (PHZ1114)	Inhibidor de PKA
	N-(cis-2-phenyl-cyclopentyl)azacyclotridecan-2-imine hydrochloride (MDL)	Sigma (M182)	Inhibidor de tmACs
	N ⁶ ,O ² -dibutyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate (db-AMPC o db-AM)	Sigma (D0627)	Activador de PKA
	Okadaic Acid (OA)	LC laboratories (O-2220)	Inhibidor ser/thr fosfatasas
	Thymeleatoxin (TXA o TXX)	Sigma (T 7068)	Activador de PKC

Tabla 1: Listado de fármacos utilizados.

El anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (clon 4G10) fue obtenido de Upstate (Lake Placid, NY, USA). Los anticuerpos anti-fosfo-PKA sustrato (#9621) (anti-pPKAs), los anti-fosfoserina-PKC sustrato (#2261) (anti-pPKCs) y los anticuerpos anti-PP2A (#2038) fueron obtenidos de Cell Signaling (Danvers, MA), los anticuerpos anti-actina (I-19) de Santa Cruz Biotechnology (SCB; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos anti-proteína Gas (06-237) y anti – ATP sintetasa subunidad beta (MAB 3494) de Millipore (Temecula, CA). Los anti-conejo-IgG fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. (West Grove, PA, USA). Los anticuerpos anti-PP1 gamma (#H00005501-A01) fueron obtenidos de Novus Biologicals (Littleton, Co). Los anticuerpos monoclonales anti-calcineurina (610259) fueron obtenidos de BD Biosciences Transduction Laboratories (Lexington, KY). El anticuerpo anti-allurin Rockland y su correspondiente suero preinmune fueron gentilmente donados por el Dr. Doug Chandler y el Dr. Hitoshi Sugiyama (Molecular and Cellular Biology Program, Department of Chemistry and Biochemistry, School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA).

Las soluciones de los reactivos fueron preparadas en agua destilada, en dimetilsulfóxido (DMSO) o en etanol, según lo indican las instrucciones del fabricante. La concentración de DMSO o etanol en los medios de incubación fue mantenida constante entre los tratamientos y nunca excedió el 1% v/v, condición que no afecta la vitalidad ni la motilidad de los espermatozoides.

Animales

Especímenes adultos de *Bufo arenarum* de aproximadamente 150g fueron recolectados en las cercanías de las ciudades de Rosario y Santa Fe (provincia de Santa Fe, Argentina), entre los meses de marzo y noviembre. Los animales fueron mantenidos en condiciones saturantes de humedad y a una temperatura de entre 15 a 17° C. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la guía para el uso y mantenimiento de animales de laboratorio de la facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Espermatozoides

Las suspensiones de espermatozoides fueron preparadas por dilaceración testicular como fuera previamente informado (Valz-Gianinet et al., 1991).

Brevemente, testículos extirpados de un macho adulto de *Bufo arenarum*, previamente sacrificado por destrucción medular, fueron dilacerados en solución ASP en una placa de Petri sobre hielo. La suspensión original se centrifugó a 130 g durante 10 min. a 4°C para descartar glóbulos rojos y restos tisulares. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 650 g durante 10 min. a 4°C y el pellet, conteniendo los espermatozoides, se resuspendió en ASP frío hasta concentración final de aprox. 2×10^8 células/ml. La suspensión se conservó en hielo por un período máximo de 3 hr.

Concentración espermática

La concentración de células fue medida con un hemocitómetro o Cámara de Neubauer.

Obtención de plasma testicular

Se procedió según protocolo de Inoda y Morisawa (1987). Brevemente, dos testículos de macho de *B. arenarum* fueron cortados en secciones de aproximadamente 2 mm y posteriormente centrifugados durante 10 min. a máxima velocidad. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado durante 10 min. a la misma velocidad y el sobrenadante final fue utilizado para determinar osmolaridad, y concentración de $[K^+]$ y $[Na^+]$.

Medición de concentración de iones y osmolaridad

El analizador automático Roche Hitachi 902 con módulo ISE con unidad de medición de electrolitos perteneciente al Laboratorio Central del Hospital Centenario fue utilizado para la determinación de la concentración de Na^+ y K^+ de las muestras de plasma seminal y agua de huevo (EW). La osmolaridad de las soluciones y medios fue registrada con el Osmómetro crioscópico Osmommat 030 (Gonotec, Alemania).

Composición de los medios

Fueron diseñados cuatro medios cuya composición se detalla en la Tabla 2. ASP fue preparada según las concentraciones de K^+ y Na^+ registradas en plasma testicular, ASP10% es una dilución 1:10 de ASP, EW ASP es una solución de EW llevada a concentraciones finales de ASP. Se preparó utilizando 80% de EW en vez de agua destilada para llevar a concentración

final. En un medio isosmótico similar (Rg st 80% v/v EW) se han identificado cambios fisiológicos del espermatozoide de sapo asociados a la capacitación (Krapf et al., 2007). EW fue obtenida al incubar tiras de ovocitos en agua destilada durante 10 min. La misma contiene los factores difusibles pertenecientes a la cubierta gelatinosa de los ovocitos.

	ASP	ASP 10%	EW ASP	EW
Na⁺ (mM)	105*	10,5	108,76	4,7*
K⁺ (mM)	40*	4	40,67	0,84*
Ca²⁺ (mM)	1,4	0,14	1,62	0,28*
cc. proteica (ug/ml)	0	0	54,4	68*
pH	Tris 10mM 7.4	Tris 10mM 7.4	Tris 10mM 7.4	8,2*
osmolaridad (Osm/Kg)	292	30	302	13

Tabla 2: Composición de las soluciones ASP, ASP10%, EW ASP y EW. Se muestra la concentración de sodio, potasio y calcio, concentración proteica, valor de pH y de osmolaridad. Los asteriscos corresponden a la concentración de cationes y pH medidos en plasma testicular y EW.

Egg Water (EW) o Agua de huevo

El difundido total (EW, de las siglas en inglés Egg Water) fue obtenido como se describió previamente (Diaz Fontdevila et al., 1991). Brevemente, las tiras de ovocitos obtenidas de ovisacos se incubaron durante 10 min. con agua destilada (peso equivalente de agua y ovocitos), con agitación ocasional a 20-22 °C. Las fracciones conteniendo los factores que difundieron al agua pertenecientes a 20 hembras fueron homogeneizadas, alicuotadas y guardadas a -20 °C. Se determinó su concentración proteica y la concentración de los cationes Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (ver Tabla 2).

EW de *Xenopus laevis* fue gentilmente donada por los Drs. Doug Chandler y Hitoshi Sugiyama (Molecular and Cellular Biology Program, Department of Chemistry and Biochemistry, School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA).

Precipitación y concentración de proteínas de EW

La precipitación de proteínas de EW se realizó con 4 volúmenes de etanol frío, incubación toda la noche a -20° C y una posterior centrifugación a máxima velocidad. El pellet de proteína fue lavado con etanol al 80% v/v en agua destilada dos veces y finalmente se resuspendió en buffer de siembra 1X. EW

se concentró utilizando filtros centricom de límite de corte de 5 kDa de peso molecular.

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry et al. (1951), usando albúmina sérica bovina como estándar. También se utilizó el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA).

Ensayos farmacológicos

Suspensiones de espermatozoides fueron incubados en los medios apropiados dependiendo de los experimentos. Para el caso de incubaciones con inhibidores o activadores de enzimas en el medio ASP, las incubaciones fueron a 20°C durante 15 a 60 min. dependiendo del experimento. Para el caso de las incubaciones con fármacos en los medios hipotónicos, se realizó una preincubación en ASP durante un tiempo, según el experimento y luego se pasó al medio ASP 10% (o EW) manteniendo la concentración constante del fármaco. La concentración de DMSO o Etanol (solvente de algunos fármacos) se mantuvo constante entre los tratamientos y nunca superó el 1% v/v. Para todos los casos se verificó la vitalidad de los espermatozoides mediante la tinción supravital con eosina Y 0,5% p/v en ASP.

Obtención de extractos de espermatozoides y electroforesis unidimensional de proteínas

Luego del período de incubación, los espermatozoides (entre $0,7 - 1 \times 10^7$ células por tratamiento) fueron recolectados por centrifugación durante 3 min. a 650 g a 4°C. Los pellets de células fueron resuspendidos en 10 µl de buffer de lisis (1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1% cóctel de inhibidores de proteasas, e inhibidores de fosfatasa: 1 mM vanadato de sodio, 100 nM ácido okadaico, 30 mM β-glicerofosfato, 5 mM pNPP en 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4) e incubados en hielo por un período de 5 min. durante el cual se practicaron tres veces 10 seg. de vortex. Las muestras fueron centrifugadas 10 min. a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante fue incubado durante 2 min. a 90°C en solución de siembra (SDS 2%; azul de bromofenol 60 mg/l; glicerol 8,7 %; tris-HCl 80 mM pH 6,8) conteniendo 10 mM DTT y fue sembrado en un minigel. La

electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según Laemmli (1970). Se utilizaron minigeles verticales del sistema MiniProtean III (BioRad, CA, USA) de 0,75 ó 1 mm de espesor, según el experimento. Los geles de concentración se prepararon al 5% de acrilamida y los de separación al 8% o 10 %, según el experimento. Las corridas se llevaron a cabo a temperatura ambiente a 10 mA.

Electroforesis bidimensional de proteínas

Luego del período de incubación, los espermatozoides ($1-5 \times 10^7$ células por gel) fueron recolectados por centrifugación durante 3 min. a 650 g a 4°C. Los pellets de células fueron resuspendidos en 50 μ l de buffer para 2D (7M Urea, 2M tio-urea, 0,1M DTT, 2% p/v CHAPS, 1% cóctel de inhibidores de proteasas) e incubados en hielo por un período de 5 min. durante el cual se practicaron tres veces 10 seg. de vortex. Se llevó la muestra con Buffer para 2D conteniendo 0,2 % v/v de anfilitos (BioLyte 3-10) y 0,2% p/v de azul de bromofenol a un volumen final de 125 μ l, según cantidad necesaria. La muestra fue rehidratada de forma pasiva en “strips” de rango lineal de pH 3-10 o alternativamente de rango lineal de pH 5-8 (ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad, Tecnolab, Argentina) durante toda la noche a temperatura ambiente. Las proteínas fueron resueltas a 10 000 Vh. (1 h. a 500V, 1 h a 1000 V y 3 hs a 4000 V) usando Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Las tiras fueron equilibradas primero con 6 M urea, 2% p/v SDS, 130 mM DTT, 20% glicerol y 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 durante 15 min. a temperatura ambiente y luego 15 min. con el buffer anterior pero reemplazando el DTT por 135 mM de iodoacetamida. La segunda dimensión se llevó a cabo según la electroforesis unidimensional anteriormente descripta.

Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas por SDS/PAGE o geles 2D se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Life Sciences, CA, USA) según el procedimiento descripto por Towbin et al. (1979). Los geles fueron previamente equilibrados con solución de transferencia (metanol 20%, glicina 192 mM, Tris 25 mM) durante 10 min., y luego transferidos con intensidad constante de 250 mA. durante dos horas a 4°C. A las membranas se las tiñó

con Rojo Ponceau para corroborar la transferencia y carga proteica. Finalmente fueron enjuagadas en agua destilada y secadas a temperatura ambiente hasta su uso.

Ensayos de Western Blot

La inmunodetección fue realizada utilizando una dilución 1/1000 (0,5 µg/ml concentración final) de anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (clon 4G10) o policlonal anti-pPKA sustrato (#9621, Cell Signaling, Danvers, MA) o anti-pPKC sustrato (#2261, Cell Signaling, Danvers, MA), según recomendaciones del fabricante. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a HRP provisto en el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific SuperSignal West Femto o Pico Substrate). Como control de carga de siembra de los ensayos de Western Blot las membranas fueron reutilizadas previo lavado con 0,2 N NaOH durante 5 min. ("striping") y utilizadas para inmunodetectar actina (anti-actina I-19, Santa Cruz Biotechnology, CA). La inmunodetección anti- proteína Gαs fue realizada según recomendaciones del fabricante a una dilución de 1/1000. Los ensayos realizados con anti-fosfatasa fueron realizados a las siguientes diluciones: anti-PP2A 1/1000, anti-PP1γ 1/1000 y anti-PP2B o anti-calcineurina 1/500. La dilución utilizada para los anti-ATPsynβ fue de 1/500. Por último, las inmunodetecciones realizadas con los anticuerpos anti-allurin fueron realizadas según Xiang y colaboradores (2004).

Inmunocitoquímica de fluorescencia

Luego de la incubación correspondiente, 10 µl de suspensión 1×10^6 esp/ml fueron depositados sobre portaobjetos cubiertos con poli-lisina. Luego fueron fijados con 10 µl de formaldehído 3% en TBS e incubados 20 min. Las células inmovilizadas fueron lavadas con TBS y permeabilizadas con 0,2% de Tritón X-100. Las inmunolocalizaciones se realizaron utilizando el anticuerpo primario específico, según experimento, a una dilución 10 veces más concentrada que el título utilizado en los ensayos de Western Blot. Finalmente se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (Chemicon, International) a una dilución de 1/800. Para visualizar los núcleos de los espermatozoides se realizó una tinción posterior a la inmunofluorescencia con Hoechst (33258). Las

muestras fueron analizadas con microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 (Natick, MA).

Análisis de la motilidad

Un volumen de espermatozoides fue diluido en 20 volúmenes de un medio específico, según el experimento. Luego, 10 μl de la suspensión fueron utilizados para cargar la cámara de Neubauer. Las trayectorias fueron filmadas durante 30 segundos utilizando el software (Nis-Elements, Nikon) de la cámara Nikon DS-Fi1 (Natick, MA) asociada a un microscopio óptico Olympus BH-2. Los índices de motilidad determinados se esquematizan en la Figura 7 y fueron: inmóviles (no presentaron movimiento), movimiento *in situ* (solo batido flagelar) y movimiento progresivo (incluye a todos los espermatozoides que mostraron un cambio de posición de la cabeza en el período de un segundo).

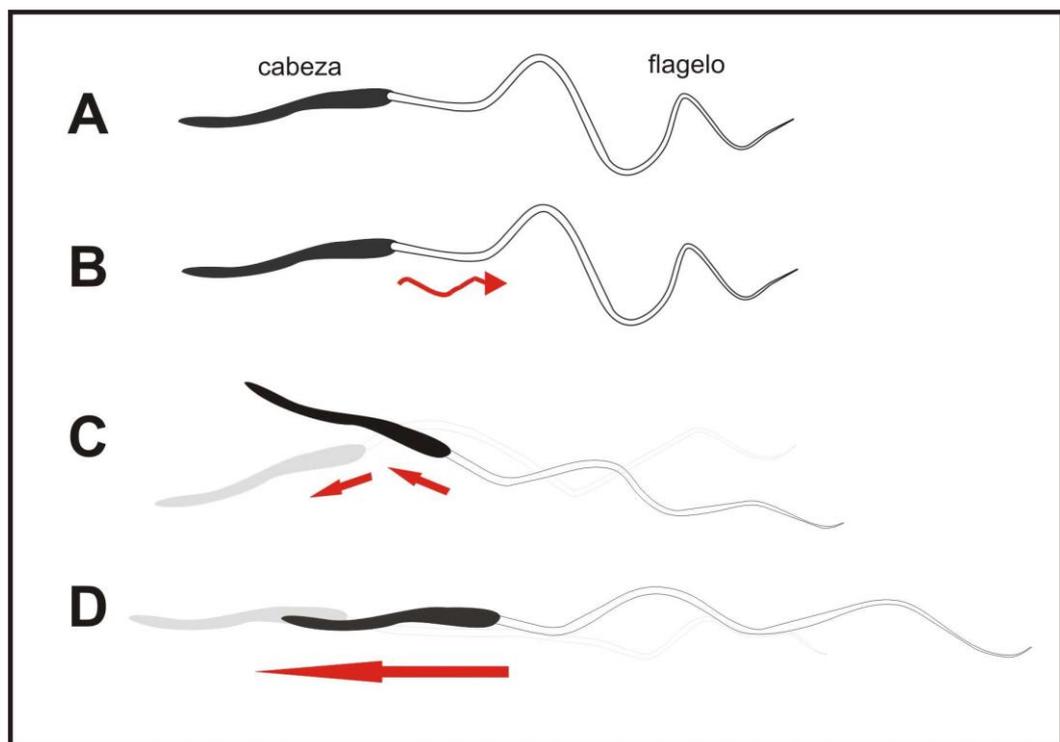


Figura 7: Esquema de los patrones de motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*. Presentan una cabeza y un flagelo con membrana ondulante (A). Las flechas rojas esquematizan el movimiento. Inmóvil: no presenta movilidad, con movimiento flagelar (B: mov. *in situ*) y movimiento progresivo incluye movimiento en zig-zag (C) o lineal (D).

Los espermatozoides se consideraron móviles al presentar movimiento *in situ* o progresivo. Se calcularon los porcentajes de motilidad a partir de la transformación de los videos a secuencia de imágenes mediante el uso del

software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Al menos tres experimentos independientes fueron realizados y se analizaron más de 100 espermatozoides para cada tratamiento realizado.

Estimación de la velocidad de nado de los espermatozoides

A partir de la superposición de las imágenes obtenidas de los videos se estimó la distancia recorrida en el período de un segundo de los espermatozoides incubados en ASP10% o EW que experimentaron movimiento progresivo. Las distancias se estimaron manualmente con el software Corel Draw 12 (Windows). Ya que los patrones de motilidad progresiva observados fueron varios (movimiento en zig-zag, movimiento lineal) se adoptó como criterio seleccionar la mitad de la cabeza como extremo de los vectores de distancia (Fig. 8). Notar que en la figura $X_1 > X_2 > X_3$. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados para cada tratamiento y se analizaron más de 100 espermatozoides en cada caso.

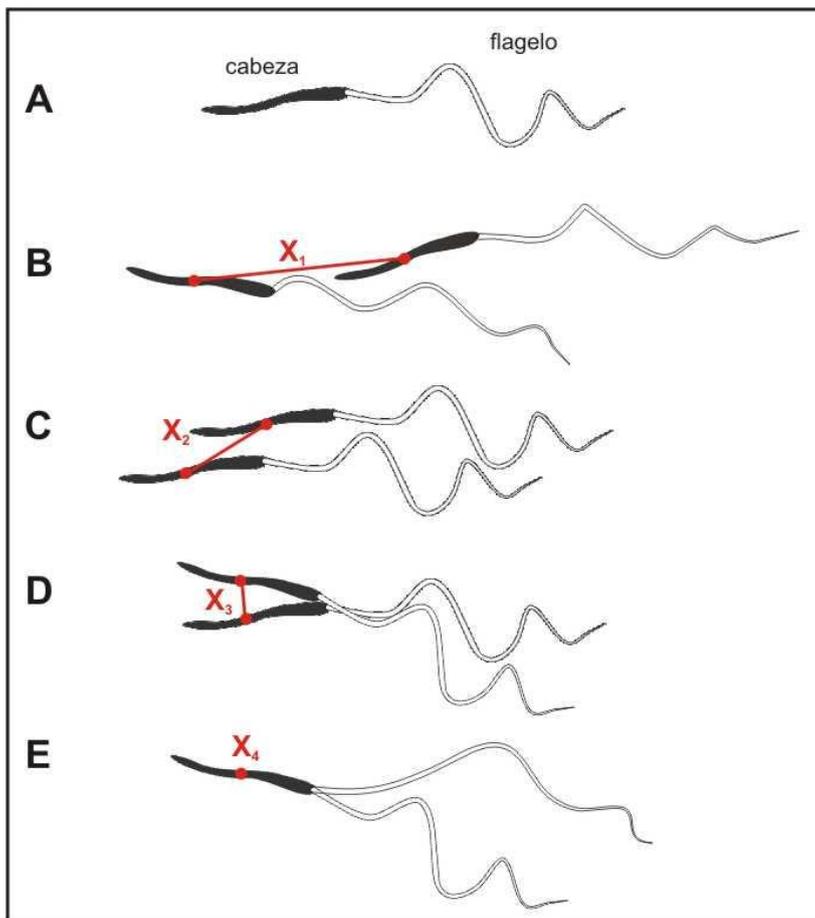


Figura 8: Estimación de la velocidad de nado de los espermatozoides. Representación del espermatozoide con una cabeza y un flagelo con membrana ondulante (A). Esquema de los patrones observados a partir de la superposición de las imágenes, obtenidas a partir de los videos, separadas por un segundo donde X_1 , X_2 y X_3 son las distancias entre cabezas (B-D). Notar que $X_1 > X_2 > X_3$. (E) Esquema para el caso de espermatozoides que sólo presentan motilidad *in situ* (solo batido flagelar) donde $X_4=0$.

Análisis densitométrico de las bandas

Se analizaron las bandas correspondientes a las fosfoproteínas mediante análisis densitométrico (Gel Pro Analyzer v4.0, Media Cybernetics, Inc). En los ensayos de Western Blot con inhibidores se graficó, en porcentaje, la banda en función de la densidad óptica integrada (IOD). Los datos fueron relativizados a actina. $I_1 = (IOD_1 * 100 / IOD_0) * (IOD_{actina\ de\ 1} / IOD_{actina\ de\ 0})$, donde I_1 : % intensidad de la banda 1, IOD_1 : IOD del tratamiento 1 y IOD_0 del control (banda correspondiente al control, sin inhibidor).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante test t-student para comparar medias y mediante el test de Mann-Whitney para comparar medianas. Se realizaron test de ANOVA para comparación de grupos. La significancia estadística está indicada en el texto de cada análisis.

Análisis de la secuencia de aminoácidos

A partir del análisis de las imágenes de los geles teñidos con azul Coomassie junto con las imágenes de los ensayos de Western Blot de los geles bidimensionales (software Delta 2D www.decodon.com/solutions/Delta2D.html) se procedió a seleccionar y cortar la proteína correspondiente. La misma fue enviada a secuenciar al Departamento de Proteómica y Espectrometría de Masa de la Universidad de Massachussets (Worcester, MA, USA). Se utilizó un espectrómetro de masas acoplado al detector de ionización por spray ("ESI - nano-LC MS/MS").

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se han organizado en tres capítulos. En el Capítulo I se muestran los resultados relacionados al estudio de los factores externos que determinan la activación de la motilidad de los espermatozoides. En los capítulos II y III se muestran los estudios de las vías de señalización involucradas en regulación de la activación flagelar. Particularmente en el capítulo II se muestran los estudios de la vía regulatoria dependiente de la quinasa PKA y en el capítulo III se desarrollan los resultados correspondientes a los estudios de la vía dependiente de la quinasa PKC y ser/thr fosfatasas.

CAPITULO I: Estudio de los factores extracelulares que regulan la activación de la motilidad de los espermatozoides de *Bufo arenarum*.

INTRODUCCIÓN

La activación de la motilidad de los espermatozoides es un prerequisite para que se dé con éxito la fecundación. En el caso de *Bufo arenarum*, los espermatozoides permanecen inmóviles dentro del órgano reproductor del macho y la activación de su motilidad se da en el charco de agua, medio natural de la fecundación. Se sabe que en ranas, las soluciones hipotónicas garantizan la activación de la motilidad de los espermatozoides (Inoda and Morisawa, 1987) y por ende, altas tasas de fecundación (Raisman and Pisano, 1970; Wolf and Hedrick, 1971). Estos hechos muestran que la osmolaridad extracelular se relaciona con la activación de la motilidad de los espermatozoides. En el presente capítulo, se describe el análisis del efecto de la osmolaridad y la concentración de iones sobre la motilidad de los espermatozoides del sapo *Bufo arenarum*. Además, se analiza y describe el diseño de los cuatro medios de estudio que son utilizados durante todo este trabajo de tesis.

En animales de fecundación externa, como la mayoría de los Anfibios Anuros, la interacción entre gametos es inicialmente establecida entre los espermatozoides y moléculas presentes en la cubierta gelatinosa de los ovocitos. Los factores difusibles de la cubierta gelatinosa (recuperados en una solución denominada EW, del inglés Egg Water) fueron propuestos como “activadores” de espermatozoides de *Bufo arenarum*, al ser requeridos durante el proceso de fecundación (Barbieri, 1976; Barbieri and Cabada, 1969). Más aún, la preincubación de espermatozoides en EW le confiere a estos la capacidad de fecundar ovocitos sin cubierta gelatinosa, en un medio desprovisto de estos factores (Krapf et al., 2007). En este capítulo se intentará determinar si la motilidad espermática está condicionada por dichos factores difusibles (EW).

RESULTADOS

Activación de la motilidad de los espermatozoides inducida en un medio hiposmótico

Los espermatozoides de *Bufo arenarum* permanecen inmóviles dentro del testículo. En nuestro laboratorio se han obtenido los espermatozoides a partir de dilaceración de testículos en una solución informada como isosmótica, llamada solución Ringer estandar (Rg st) para anfibios (Ringer and Morshead, 1877), de composición: 110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,4 mM CaCl₂ en Tris 10mM pH 7,4 (236 mOsm/kg). En esta solución, aproximadamente el 60% de los espermatozoides permanecen inmóviles (Fig. 9). Cuando la solución Ringer estándar se diluye 10 veces (Ringer 10%-Tris 10 mM), el 100% de los espermatozoides presentan algún tipo de motilidad (*in situ* o progresiva).

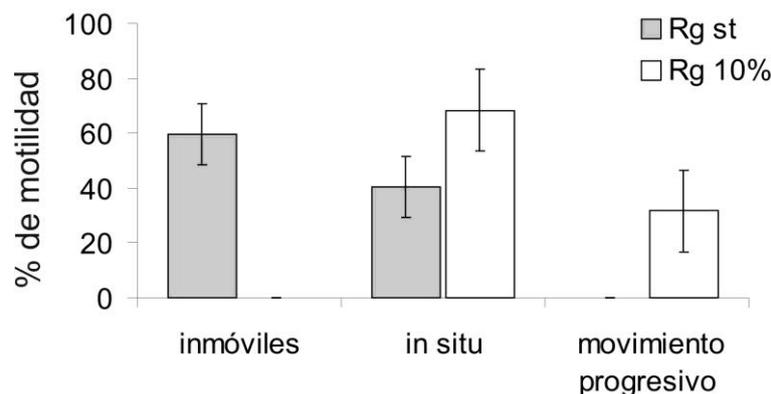


Figura 9: Análisis de la motilidad de los espermatozoides. Suspensiones de espermatozoides fueron incubados en solución Ringer estandar (Rg st: 110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,4 mM CaCl₂ en Tris 10mM pH7,4) o en solución Ringer 10% (Rg 10%, dilución 1:10 de Rg st) durante 5 minutos a 20°C. Los patrones de motilidad identificados fueron *in situ* (solo movimiento flagelar) o movimiento progresivo (indica nado del espermatozoide). Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=3.

Estos resultados confirman que la disminución de la osmolaridad del medio extracelular induce la activación de la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*.

Caracterización del plasma testicular

Con el objetivo de diseñar una solución que simule las condiciones del testículo del macho, donde los espermatozoides de *Bufo arenarum* permanezcan completamente inmóviles, se obtuvo el plasma testicular según el protocolo

propuesto por Inoda y Morisawa (1987) para obtener plasma testicular en rana *Xenopus laevis*. Una vez obtenido el plasma testicular se midió la osmolaridad, y las concentraciones de potasio $[K^+]$ y sodio $[Na^+]$. La osmolaridad del plasma testicular fue de 303 mOsm/kg, la $[K^+] = 40$ mM y la $[Na^+] = 105$ mM. Cabe destacar que la $[K^+]$ del plasma testicular fue de 40 mM, 20 veces mayor que la $[K^+]$ de la solución Rg st.

Diseño de los medios de incubación y su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides

En la Figura 9 se observa que, pese a que los espermatozoides están incubados en la solución Rg st., un 40% de los mismos presenta motilidad *in situ*, con un batido flagelar lento. Para mantener los espermatozoides en un medio similar al plasma testicular, se diseñó la solución ASP (de “artificial seminal plasma” en inglés). La misma es una solución Ringer estándar modificada en cuanto a las concentraciones de NaCl y KCl. Las concentraciones utilizadas para su diseño fueron los valores previamente medidos de ambos iones en el plasma testicular (ver Tabla 2 de MyM). En esta solución, el porcentaje de espermatozoides con motilidad *in situ* se redujo a 7%, sugiriendo que no sólo la osmolaridad sino probablemente la concentración de K^+ son determinantes para mantener a los espermatozoides inmóviles.

EW es un medio complejo el cual está compuesto por componentes iónicos y glicoprotéicos derivados del oviducto de la hembra (Arranz et al., 1997; Arranz and Cabada, 2000). Este medio simula las condiciones naturales de fecundación de *B. arenarum* y provoca cambios fisiológicos en los espermatozoides que son requisito para la fecundación exitosa (Krapf et al., 2009; Krapf et al., 2007).

Para poder estudiar por separado el efecto de la tonicidad y el efecto de los factores difusibles sobre la motilidad de los espermatozoides, se diseñaron cuatro soluciones: dos soluciones isotónicas que no contienen (ASP) y contienen (EW ASP) factores difusibles y dos soluciones hipotónicas las cuales no contienen (ASP 10%) o contienen (EW) factores difusibles (ver composición en Tabla 2 MyM). Se analizó la motilidad de los espermatozoides en las cuatro soluciones (Fig. 10).

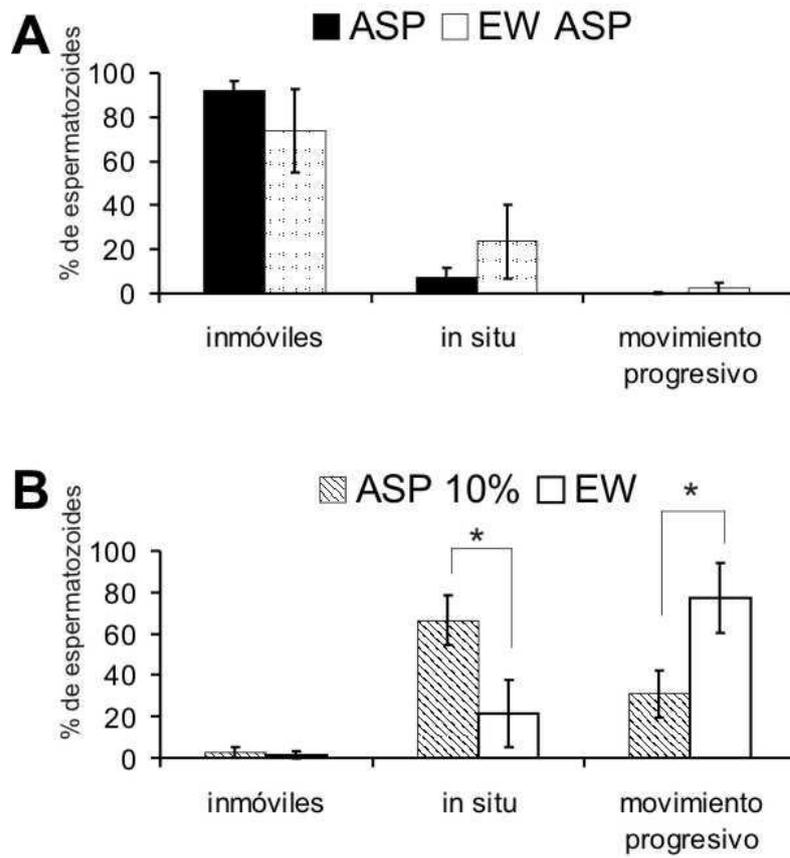


Figura 10: Análisis de la motilidad de los espermatozoides. Suspensiones de espermatozoides fueron incubados en soluciones isotónicas (A) (ASP y EW ASP) y en soluciones hipotónicas (B) (ASP10% y EW) durante 5 minutos a 20°C. Los patrones de motilidad identificados fueron; inmóviles, con *movimiento in situ* (solo movimiento flagelar) o movimiento progresivo (nado del espermatozoide). Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=10. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,001$).

En ambos medios isotónicos, ASP y EW ASP (medio ASP suplementado con EW), la mayoría de los espermatozoides permanecieron inmóviles (Fig. 10 A). Sin embargo, en EW ASP, un 20% presentaron motilidad *in situ* (diferencia estadísticamente no significativa). Cuando los espermatozoides fueron incubados en las soluciones hipotónicas (ASP10% o EW), la mayoría de los espermatozoides activaron su motilidad. De manera interesante, el valor promedio del porcentaje de espermatozoides que presentaron motilidad progresiva fue significativamente mayor en EW que en ASP10% ($p < 0,001$). Este resultado sugiere que los factores que difunden de la cubierta gelatinosa de los ovocitos tendrían un efecto sobre la motilidad de los espermatozoides en soluciones hipotónicas.

Durante el análisis de la motilidad se observó que, además de existir una diferencia en los porcentajes de motilidad *in situ* y progresiva en ambos medios hipotónicos, las distancias recorridas por segundo de los espermatozoides fueron diferentes. Pese a que no contamos con un software de análisis de la motilidad de espermatozoides para anfibios que permita calcular de manera automática los distintos parámetros asociados a la motilidad (frecuencia de batido, velocidad lineal, velocidad curvilínea, etc.), se estimó de manera manual la distancia promedio recorrida de los espermatozoides en el lapso de un segundo (ver “Estimación de la velocidad de nado en MyM). En la siguiente tabla se muestran los valores (Tabla 3).

	ASP 10%	EW
% motilidad progresiva	42,42 ± 12,16	78,70 ± 10,14
velocidad $\mu\text{m}/\text{seg}$	3,23 ± 1,31	9,70 ± 3,80

Tabla 3: Velocidad de nado de los espermatozoides de *B. arenarum*. Suspensiones de espermatozoides fueron incubados en soluciones hipotónicas (ASP10% y EW) durante 5 minutos a 20°C. Se analizó por medio de la superposición de imágenes obtenidas a partir de videos de análisis de motilidad de los espermatozoides. Se muestran los porcentajes promedio de motilidad progresiva y los valores de la velocidad promedio en $\mu\text{m}/\text{segundo}$ para ambos tratamientos. Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=3.

Según se muestra en la Tabla 3, los valores promedio de la distancia recorrida por segundo de los espermatozoides incubados en EW fue significativamente mayor respecto al valor en ASP10% ($p < 0,001$).

¿Es posible revertir el estado de motilidad activada de los espermatozoides aumentando la osmolaridad del medio?

Para responder esta pregunta se incubaron espermatozoides en el medio ASP10% y se tomaron dos alícuotas, una para analizar la motilidad y a la otra se le agregó un volumen necesario de ASP10X (solución ASP concentrada 10 veces) para llegar a una concentración final de ASP 1X. Pasados los cinco minutos, se realizó el análisis de la motilidad de ambas alícuotas. Efectivamente, la motilidad de los espermatozoides disminuyó hasta un $10 \pm 2\%$, mientras que la motilidad total observada en la alícuota no expuesta a ASP10X fue del $96 \pm 4\%$. Estos resultados sugieren que la motilidad en

espermatozoides de anfibios es un fenómeno reversible y asociado a la osmolaridad.

Estudio del efecto de la osmolaridad y concentración iónica del medio extracelular sobre la motilidad de los espermatozoides

En el momento de la liberación de los espermatozoides de especies de fecundación externa, los espermatozoides son diluidos en el agua, desencadenándose una serie de eventos que llevan a la activación de la motilidad. Esta activación podría estar regulada por cambios en la presión osmótica, balance iónico, pH, etc.

Los resultados obtenidos hasta el momento señalan que la disminución de la osmolaridad del medio extracelular induce la activación de la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*. Para estudiar más en detalle este efecto, se analizó la motilidad de los espermatozoides incubados en soluciones de cloruro de colina a distintas concentraciones (Fig. 11). Esta droga provee osmolaridad al medio pero no difunde al interior celular.

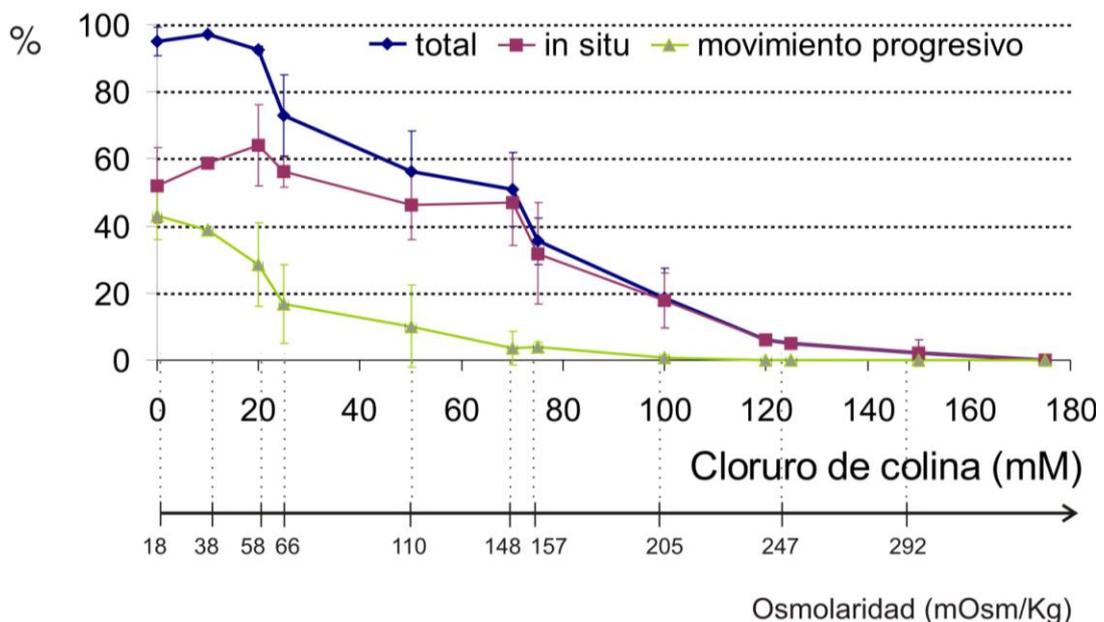


Figura 11: Efecto de la osmolaridad sobre la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*. Los espermatozoides fueron incubados en soluciones de cloruro de colina de diferentes concentraciones (0, 10, 20, 25, 50, 70, 75, 100, 120, 125, 150 y 175 mM) en Tris 10 mM a pH 7,4 durante 5 minutos a 20°C. Se muestran los porcentajes de motilidad *in situ* (rojo), movimiento progresivo (verde) y la total (azul, sumatoria de *in situ* y progresiva). Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=5. Los valores de osmolaridad (mOsm/Kg) para cada solución registrados con osmómetro se muestran en el eje inferior.

En estas gráficas se puede observar que en soluciones iguales o menores a 20 mM de cloruro de colina, el porcentaje de espermatozoides móviles fue de casi el 100%. La motilidad progresiva a estos valores de osmolaridad nunca superó el 40%. A medida que la concentración de cloruro de colina aumenta (y aumenta la osmolaridad del medio), se observa una disminución del porcentaje de la motilidad total. A osmolaridades iguales o mayores a 250 mOsm/Kg se registró sólo un 5% de espermatozoides móviles.

Estos resultados muestran que la activación de la motilidad está gobernada por un cambio en la presión osmótica, incluso en soluciones de cloruro de colina, donde el intercambio de cationes entre la célula y el medio exterior no existe.

La concentración iónica contribuye a la osmolaridad final de cualquier solución, sin embargo nos propusimos analizar si existe un efecto específico de los cationes sodio y potasio sobre la motilidad. Para ello se incubaron alícuotas de espermatozoides en soluciones con concentraciones variables de NaCl y KCl y se analizaron los porcentajes de motilidad de los espermatozoides (Fig. 12).

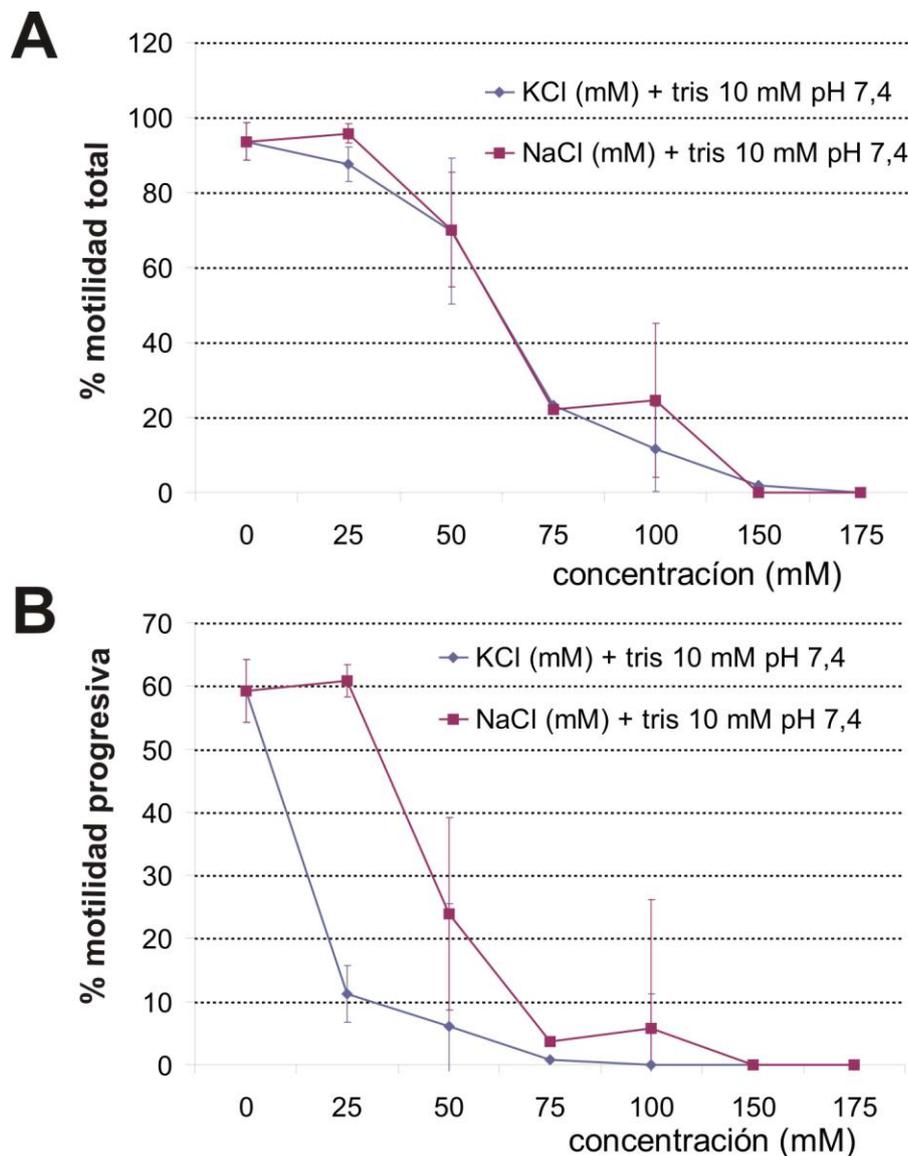


Figura 12: Efecto de la concentración de iones en el medio extracelular sobre la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*. Los espermatozoides fueron incubados en soluciones de cloruro de potasio (azul) o cloruro de sodio (rojo) de distintas concentraciones (0, 25, 50, 75, 100, 150 y 175 mM) en Tris 10 mM a pH 7,4 durante 5 minutos a 20°C. Se muestran los porcentajes de motilidad total (A) y motilidad progresiva (B). Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=3.

Los porcentajes de motilidad total observados fueron similares para las soluciones de ambos cationes (Fig. 12 A). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides que presentan motilidad progresiva en presencia de bajas concentraciones de Na^+ (25 mM) fue marcadamente mayor que el observado en soluciones con K^+ de igual concentración (Fig. 12 B). Estos últimos resultados sugieren que el Na^+ podría requerirse para la activación de la motilidad progresiva de los espermatozoides.

Caracterización de EW y su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides

El medio EW es muy complejo. Está formado por componentes inorgánicos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , ver Tabla 2 MyM) y componentes orgánicos como glicoproteínas (Arranz et al., 1997; Arranz and Cabada, 2000). Ya en los años 70, Barbieri y Cabada (1969) informaron que el EW sería “activador” de los espermatozoides de *B. arenarum* y existen evidencias recientes de que los componentes de EW afectarían la fisiología de los espermatozoides del sapo (Krapf et al., 2009; Krapf et al., 2007).

Desde los años 80 se han comenzado a identificar varios factores activadores y/o quimioattractantes de los espermatozoides en varias especies, incluyendo invertebrados marinos (Garbers et al., 1982; Nishigaki et al., 2000; Ward et al., 1985), peces (Oda et al., 1998), anfibios (Al-Anzi and Chandler, 1998; Olson et al., 2001) e incluso mamíferos (Giojalas and Rovasio, 1998). Específicamente en las ranas *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* se ha informado la existencia de un factor llamado allurin (Al-Anzi and Chandler, 1998; Burnett et al., 2008a; Olson et al., 2001), una proteína de 21 kDa, que es secretada por el oviducto, difunde rápidamente de la cubierta gelatinosa de los ovocitos cuando los mismos tienen contacto con soluciones acuosas y tendría un efecto quimioattractante sobre los espermatozoides homólogos. Allurin pertenece a la familia de proteínas CRISP y presenta homología con las proteínas de unión a espermatozoides de mamíferos (Burnett et al., 2008b).

En función de estos antecedentes se analizó la existencia de proteínas tipo allurin en el EW de *Bufo arenarum*. Se realizaron ensayos de Western Blot sobre EW de *B. arenarum*, utilizando anticuerpos anti-allurin. Las proteínas de EW fueron, por un lado precipitadas con etanol y posteriormente resuspendidas en buffer de siembra (llamada EW_T , 102 μ g) y por otro lado, fueron concentradas mediante el uso de filtros centricom (llamada EW_{cc}). Como control positivo se utilizó agua de huevo de *Xenopus laevis* (EW_X) y como control negativo del ensayo de Western Blot se utilizó el suero preinmune (Fig. 13).

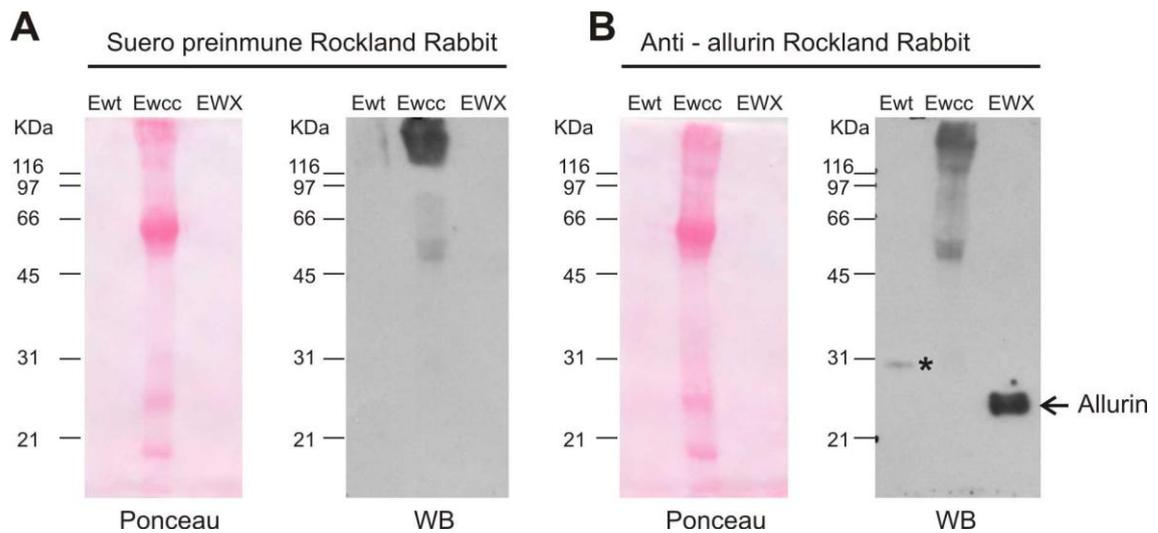


Figura 13: Inmunodetección de proteínas del tipo allurin en EW de *Bufo arenarum*. Las proteínas de EW (precipitadas con etanol EW_T o concentradas con centrífuga EW_{CC}), fueron analizadas en un SDS/PAGE al 12% por duplicado y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó una tinción de rojo ponceau y se las sometió a un ensayo de Western Blot. Ensayo utilizando A) suero preinmune (1:2500) - como control negativo- o B) Anti - allurin (1:2500). Como control positivo se sembró EW de *Xenopus laevis* (EW_X). La flecha muestra la proteína allurin de 21 kDa y el asterisco señala la proteína reconocida por el anticuerpo anti- allurin perteneciente a EW_T. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Pese a que existe señal inespecífica en la calle correspondiente a EW_{CC}, los anticuerpos anti-allurin detectaron una banda de peso molecular aparente de 29 kDa correspondiente a EW_T (indicada con * en la Fig. 13). Este resultado sugiere la presencia de una proteína del tipo allurin en EW de *Bufo arenarum*.

Los resultados de este capítulo de tesis mostraron que los factores difusibles de la cubierta gelatinosa de los ovocitos modularían la motilidad de los espermatozoides. Se observó un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, en comparación con el medio hipotónico sin estos factores (ASP10%). Se analizó, posteriormente, la cinética de la motilidad en ambos medios (Fig. 14). Se incubaron los espermatozoides en las soluciones ASP10% y EW y se registró la motilidad a distintos tiempos hasta un tiempo final de 15 minutos.

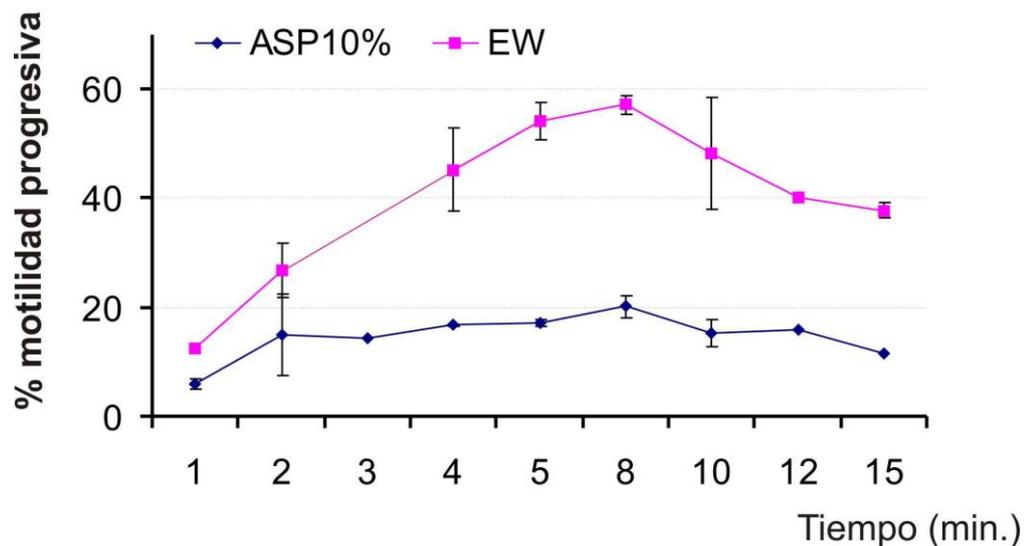


Figura 14: Análisis de la motilidad progresiva en dos medios hipotónicos en función del tiempo. Los espermatozoides fueron incubados en ASP10% o EW y se analizó la motilidad a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 y 15 minutos). Los datos representan la media de la motilidad progresiva \pm desvío estándar; $n=2$.

La gráfica muestra que los porcentajes de motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en EW fueron mayores para todos los tiempos analizados.

Para determinar si la composición iónica de EW influye sobre la motilidad se diseñó una solución EW artificial (AEW) que contiene la misma composición iónica y pH de EW y se compararon los patrones de motilidad en esas condiciones (Fig.15).

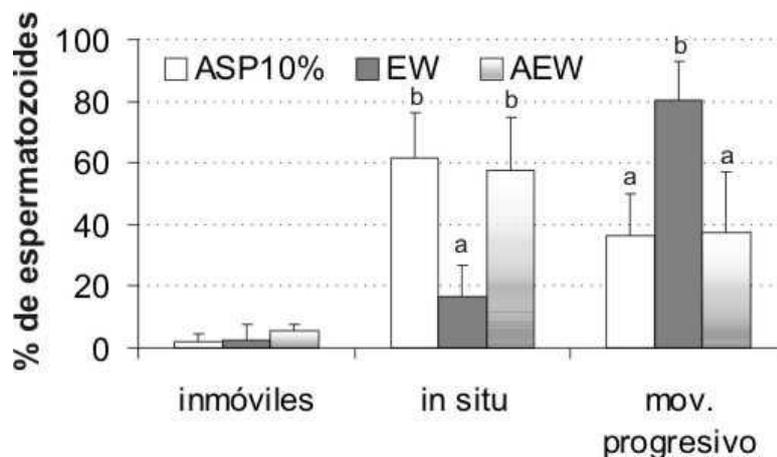


Figura 15: Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en medios hipotónicos. Los espermatozoides fueron incubados en ASP10%, EW o AEW (EW artificial: 4,7 mM de NaCl, 0,84 mM de KCl y 0,28 CaCl₂ en Tris 10 mM pH 8,2) durante 5 min. a 20° C. Los patrones de motilidad identificados fueron; inmóviles, con movimiento *in situ* o movimiento progresivo. Los datos representan la media de la motilidad progresiva \pm desvío estándar; $n=5$. Las medias de los grupos que presentan diferentes letras difieren significativamente (ANOVA, $p<0,001$).

Como se puede observar en la figura, los valores promedio de los porcentajes de motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en EW son significativamente mayores que los observados tanto para ASP10% como para AEW ($p < 0,001$). Estos resultados sugieren que existirían factores en el EW no inorgánicos que regularían la motilidad de los espermatozoides de *Bufo*.

Debido a que medio EW contiene componentes proteicos, a continuación se suplementó el medio AEW con una glicoproteína, fetuina, a una concentración igual a la registrada en EW (68 $\mu\text{g/ml}$). Tampoco se observaron los porcentajes de motilidad progresiva observados para EW (resultados no mostrados).

DISCUSION PARCIAL

La osmolaridad del medio de incubación de los espermatozoides es uno de los factores más importantes durante la activación de la motilidad en especies de fecundación externa. Cambios de presión osmótica desencadenan la iniciación de la motilidad de espermatozoides de peces ciprínidos, peces marinos y ranas como *Xenopus laevis*. Inoda y Morisawa (1987) informaron que los espermatozoides de rana permanecían inmóviles cuando se los incubaba en soluciones de la misma osmolaridad que el plasma testicular (o plasma seminal) de osmolaridad de 240 mOsm/kg. Los espermatozoides de rana activan su motilidad a medida que la osmolaridad de la solución de incubación disminuye. En este trabajo de tesis se obtuvo plasma testicular de sapo con el fin de determinar la osmolaridad (303 mOsm/Kg) y concentración de los cationes potasio y sodio (40 mM y 105 mM respectivamente). Con estos datos se optimizó el medio de obtención de los espermatozoides utilizado durante años para anfibios, Ringer estándar (Ringer and Morshead, 1877), y se redefinió un nuevo medio al que se denominó ASP (“artificial seminal plasma” en inglés). En el medio ASP la mayoría de los espermatozoides permanecen inmóviles. Cabe destacar que la solución ASP contiene veinte veces más potasio que la solución Ringer st. ($[\text{K}^+]$ de ASP= 40mM y $[\text{K}^+]$ de Ringer st.=2mM). En referencia a esto, en la bibliografía se han informado valores de $[\text{K}^+]$ de plasma seminal de peces teleósteos de agua dulce que van desde 20 a 80 mM (Alavi and Cosson, 2006). Para el caso del plasma seminal de la rana

Xenopus laevis, se ha reportado un valor de $[K^+] = 72,9 \pm 1,3$ mM (Inoda and Morisawa, 1987).

La motilidad de espermatozoides de trucha es inhibida por altas concentraciones de K^+ contenidas en plasma seminal. Se ha sugerido que la disminución de este catión durante la espermiación produciría un cambio en el potencial de membrana provocado por la salida de K^+ , que desencadenaría una cascada de señalización intracelular y la consecuente activación flagelar (Gatti et al., 1990; Morisawa and Morisawa, 1986). Este no sería el caso de espermatozoides de sapo ya que soluciones hiposmóticas de concentraciones de K^+ iguales a las registradas en plasma testicular (40 mM) no afectan los porcentajes de motilidad total (ver Fig. 12).

En pez carpa (*Cyprinus carpio*) se ha descrito que ocurriría una hiperpolarización de la membrana de los espermatozoides causada por la apertura de canales de K^+ , la cual removería la inactivación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y luego produciría su apertura frente a una depolarización. Esto causaría un aumento en los niveles de Ca^{2+}_i que modularía el batido flagelar (Krasznai et al., 2000). También se ha descrito que la activación de la motilidad de espermatozoides de carpa, inducida por choque hiposmótico, es seguida por una alcalinización del medio intracelular mediado por intercambiadores Na^+/H^+ (NHE) (Marian et al., 1997). Por otra parte, se ha informado la existencia de un tipo de NHE específico (sNHE) en espermatozoides de ratón (Wang et al., 2003). Ratones que carecen del gen de sNHE presentan infertilidad asociada a la pérdida completa de la motilidad de los espermatozoides. Nuestros resultados muestran un mayor porcentaje de motilidad progresiva en espermatozoides incubados en soluciones hipotónicas en presencia de sodio. Probablemente los espermatozoides de sapo presenten canales de sodio que participan en la modulación de la motilidad progresiva.

Cuando se analizó la motilidad de los espermatozoides en el medio ASP10% (dilución 1:10 de ASP), cerca del 100% de los espermatozoides fueron móviles, confirmando, una vez más, que es la disminución de la osmolaridad el efecto desencadenante de la activación de la motilidad de espermatozoides de *B.*

arenarum. Ésta es una adaptación que comparte con los peces de agua dulce, como algunos peces ciprínidos como la carpa o el “goldfish” *Carassius auratus* (Morisawa and Suzuki, 1980).

Hace aproximadamente sesenta años Astrada (1953) realizó estudios a partir de espermatozoides de *B. arenarum* obtenidos por inducción hormonal en machos. Los espermatozoides obtenidos a partir de orina de machos estimulados fueron sometidos al agregado de soluciones salinas de NaCl al 0,5 y 0,7 %p/v logrando la inmovilidad de los mismos (solución salina 0,7 %p/v fue informada como isotónica respecto a los fluidos tisulares del sapo). Observaron también que luego de agregar unas gotas de agua, se restablecía la motilidad de los espermatozoides. Efectivamente, en este trabajo de tesis se pudo activar y luego inhibir la motilidad de las células, al aumentar la osmolaridad del medio de incubación. Los espermatozoides deben reaccionar ante los estímulos externos adaptando su metabolismo en función de las condiciones extracelulares. Además, deben ser capaces de detectar los cambios que se producen en el medio extracelular mediante quizás proteínas “sensoras” que se encuentran en la superficie celular. Los resultados sugieren la existencia de proteínas de membrana que son sensibles a cambios de presión osmótica.

Estudios de más de 40 años indican que la cubierta gelatinosa de los ovocitos de anfibios contiene factores importantes y esenciales para la fecundación exitosa (Katagiri, 1966). La cubierta gelatinosa de *Bufo arenarum* ha sido estudiada durante décadas (Barbieri et al., 1977; Cabada, 1975; Diaz Fontdevila et al., 1991) y se han caracterizado algunos componentes glicoproteicos como HGP (“highly glycosylated protein”) y L-HGP (“lower-molecular-mass highly glycosylated protein”) (Arranz et al., 1997; Arranz and Cabada, 2000). Se ha informado que la proteína L-HGP preserva la integridad de los acrosomas de espermatozoides homólogos incubados en medios hipotónicos (Arranz and Cabada, 2000).

El agua de huevo (EW) o difundido total, contiene los factores que difunden rápidamente al agua destilada durante los 10 primeros minutos de su incubación. De manera interesante, el valor de pH final del agua destilada que se convierte en EW al incubar las tiras de ovocitos, aumenta de un valor de 5,5

hasta 8,2. Esto sugiere la liberación de compuestos de la cubierta gelatinosa hacia el agua que alcalinizan el medio. En relación a esto último, Barbieri y Cabada (1969) informaron que el difundido total de las cubiertas gelatinosas de los ovocitos de *B. arenarum* activarían a los espermatozoides a través de un efecto alcalinizante sobre el medio de fecundación.

En los últimos años se ha descrito el efecto de EW sobre la fisiología espermática (Krapf et al., 2007). La incubación de espermatozoides en medio isosmótico pero en presencia de factores difusibles de la cubierta gelatinosa provoca pérdida de colesterol de la membrana plasmática y produce un aumento en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, ambos eventos asociados a la capacitación de espermatozoides de mamíferos (Visconti et al., 2002). En este medio (EW ASP) la mayoría de los espermatozoides son inmóviles y sólo un 20% presentaron movimiento flagelar lento (*in situ*). Este resultado muestra que los factores difusibles de la cubierta gelatinosa en un medio isosmótico no son suficientes para desencadenar la motilidad progresiva de la mayoría de los espermatozoides y que las vías de señalización involucradas en la capacitación y en la motilidad son diferentes.

En el medio hiposmótico EW, que representa las condiciones naturales de fecundación, se registró un máximo de motilidad progresiva, en comparación con el medio hipotónico sin estos factores (ASP10%). La diferencia de motilidad progresiva observada entre ASP10% y EW no estaría relacionada con la osmolaridad ni con la composición salina ya que éstas no varían sustancialmente entre soluciones. La Figura 10 muestra claramente que los mayores porcentajes de motilidad, en condiciones de hiposmolaridad sin EW (ASP10%), corresponden siempre a motilidad *in situ*.

De manera muy interesante, recientemente se ha informado que la proteína allurin tendría un efecto sobre la motilidad de los espermatozoides pero no actuaría como un factor quimioattractante (Burnett et al., 2011). Los investigadores repitieron los ensayos de quimiotaxis utilizando cámaras Zigmond y demuestran que no hay cambios en las trayectorias de los espermatozoides entre los controles y el gradiente de EW. No obstante, observaron un incremento en el porcentaje de nado y en la distancia recorrida

en los gradientes de EW. Estos resultados coinciden con las observaciones de este trabajo.

Los ensayos realizados suplementando EW artificial con glicoproteínas o sin ellas no producen los mismos patrones de activación flagelar. Esto sugiere la existencia de moléculas de la cubierta gelatinosa que regularían la motilidad espermática. En referencia a esto último se han identificado varios componentes de la cubierta gelatinosa que modulan la motilidad de los espermatozoides en organismos de fecundación externa (Burnett et al., 2008a; Hansbrough and Garbers, 1981; Ward et al., 1985; Yoshida et al., 2002). En este trabajo de tesis fue posible detectar, con anticuerpos anti-allurin (*X. laevis*), una proteína de 29 kDa en extractos proteicos de EW. Es probable que existan otras moléculas activadoras de los espermatozoides de *Bufo arenarum* que no han sido descritas aún.

CAPÍTULO II: Activación de la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum* dependiente de una vía de señalización tmAC/AMPc/PKA.

INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado y discutido en el capítulo anterior la motilidad de los espermatozoides se inicia por cambios en el medio extracelular, los cuales desencadenan una serie de eventos intracelulares que producen la activación del flagelo.

La regulación de la activación flagelar ha sido relacionada con vías de señalización dependientes de AMPc en varias especies de animales, como por ejemplo, en invertebrados marinos como el erizo de mar (Bracho et al., 1998), en peces salmónidos (Morisawa and Okuno, 1982), en espermatozoides de mamíferos como cerdo (Okamura et al., 1985) y humanos (Tash and Bracho, 1994). Se ha informado fosforilación dependiente de AMPc en proteínas dineínas de espermatozoides de peces salmónidos (Morisawa and Okuno, 1982), erizo de mar (Bracho et al., 1998), ascidia (Nomura et al., 2000) y mamíferos (Tash and Bracho, 1998).

El rol fundamental de la quinasa PKA durante la capacitación de espermatozoides de ratones (Visconti et al., 1997) y humanos (Lefievre et al., 2002) ha sido documentado hace varios años. La capacitación de los espermatozoides y el consecuente aumento de la fosforilación en residuos de tirosina puede perderse mediante el uso de inhibidores específicos de PKA. Por el contrario, el uso de inhibidores de fosfodiesterasas (hidrolizan AMPc) junto con análogos de AMPc promueven la capacitación (Leclerc et al., 1996; Visconti et al., 1995b). Todos estos estudios sugirieron que PKA está involucrada en la regulación de la capacitación de los espermatozoides de mamíferos. De manera interesante, el agregado del inhibidor de fosfodiesterasas (IBMX) incrementa los porcentajes de motilidad y la velocidad lineal de nado de los espermatozoides de tortuga (Gist et al., 2000) sugiriendo la importancia de AMPc, a su vez, en la regulación de la motilidad.

El AMPc también juega un papel importante en la activación de la motilidad de espermatozoides en algunas especies de fecundación externa. Se ha observado que en espermatozoides de trucha tanto las concentraciones

intracelulares de AMPc como las de Ca^{2+} aumentan después de la activación (Cosson et al., 1989). Sin embargo los mecanismos implicados no se han descrito aún.

Poco se sabe hasta el momento sobre las vías de señalización involucradas en la activación flagelar en anfibios. En este capítulo de tesis se demuestra que la motilidad de los espermatozoides del sapo *Bufo arenarum* está regulada por una vía de señalización dependiente de AMPc. Además, se presentan evidencias que señalan a una enzima adenilato ciclasa del tipo transmembrana como participante en esta vía de transducción de señal.

RESULTADOS

Aumento en el patrón de fosforilación de proteínas espermáticas asociado a la activación de la motilidad

La respuesta más importante al aumento de AMPc intracelular es la activación de la quinasa PKA. Con el objetivo de investigar si PKA estaría involucrada en la vía de transducción de señales durante la activación flagelar en espermatozoides de *Bufo arenarum* se analizaron los niveles de fosforilación en residuos de ser/thr de los espermatozoides incubados en los cuatro medios de estudio: isosmóticos sin (ASP) y con (EW ASP) factores difusibles, y medios hipotónicos sin (ASP 10%) y con (EW) factores difusibles. Extractos proteicos de espermatozoides preincubados en los cuatro medios de estudio fueron analizados por ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos comerciales (anti-pPKA-sustrato). Estos anticuerpos detectan péptidos y proteínas que contengan los motivos fosforilados RRXpS/RXXpT (motivos consenso de fosforilación de PKA) y han sido utilizados previamente en espermatozoides de otras especies (Krapf et al., 2010; O'Flaherty et al., 2004). Luego de la incubación de los espermatozoides en ASP se detectaron tres fosfoproteínas mayoritarias de pesos moleculares aparentes de 90, 25 y 23 kDa (Fig. 16A). La incubación en el medio isotónico con factores difusibles (EW ASP) no modificó sustancialmente el estado de fosforilación de las proteínas observado en ASP. Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron incubados en ambos medios hipotónicos (ASP10% y EW), se detectaron otras fosfoproteínas de 120 y 28

kDa, sugiriendo la activación de PKA. Además, en el medio hipotónico EW se observaron dos bandas adicionales de aproximadamente 20 y 110 kDa (Fig. 16 A). Como control se analizaron las proteínas de EW mediante un Western Blot anti-pPKA sustrato (Fig. 16 B). Se observaron fosfoproteínas de bajo peso molecular (~25-47 kDa), lo cual comprueba que las bandas adicionales observadas en espermatozoides incubados en EW son proteínas espermáticas.

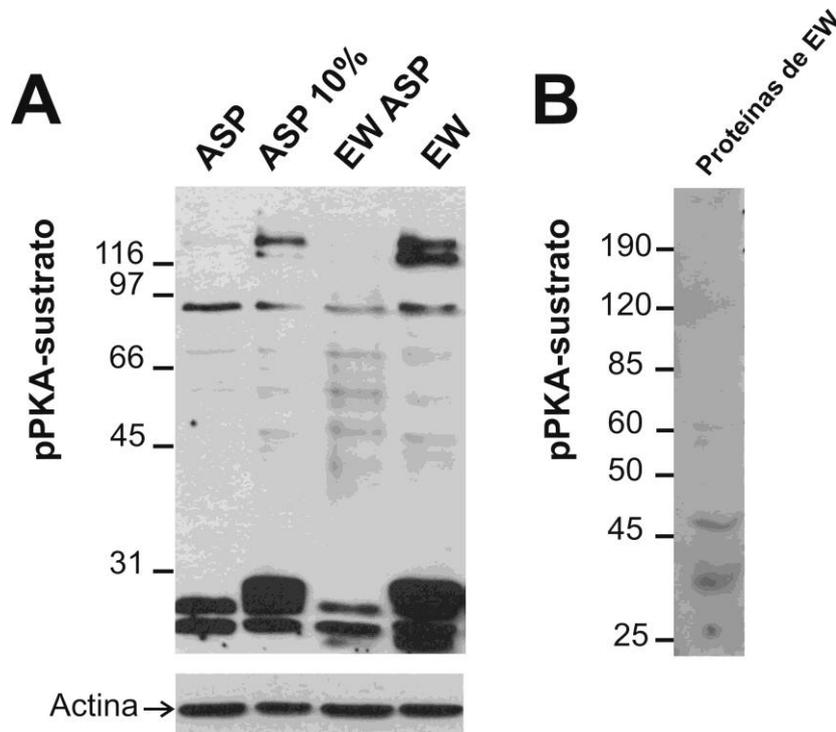


Figura 16: Los medios hipotónicos inducen la fosforilación por PKA. A) Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron incubados en ASP, ASP10%, EW ASP y EW durante 5 minutos a 20°C. Extractos proteicos (A) y 34 µg de proteínas de EW (B) fueron analizados por SDS/PAGE (10%) y WB utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Por otro lado, se analizó el patrón de los sustratos fosforilados por PKA de extractos de espermatozoides incubados en AEW (EW artificial, ver “Caracterización de EW y su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides” del CAP I) durante 5 minutos (Fig. 17). Esta solución simula el agua de huevo (EW) en cuanto a su composición y concentración de iones.

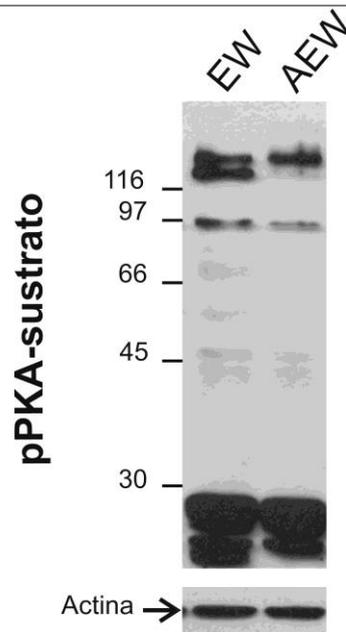


Figura 17: Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron incubados en EW y AEW (AEW: EW artificial: 47 mM NaCl; 0,84 mM KCl; 0,28 mM CaCl₂, Tris 10 mM pH 8,2) durante 5 minutos a 20°C. Los extractos proteicos fueron analizados por SDS/PAGE (10%) y WB utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Efectivamente el patrón observado en AEW es similar al observado para APS10%. Las bandas adicionales observadas en EW no se detectan en una solución que imita a EW (AEW) en cuanto a los valores de pH y concentraciones iónicas.

Se ha postulado que las quinasas PKA cumplirían un rol fundamental en el control flagelar de los espermatozoides. La activación de estas quinasas y la consecuente fosforilación en residuos de serina/treonina de sus proteínas blanco daría lugar a la activación posterior de una/unas tirosina quinasa/as, cuyas proteínas blanco se localizarían principalmente en el flagelo de espermatozoides (Leclerc et al., 1996; Si and Olds-Clarke, 2000). Con el objeto de analizar si efectivamente existen cambios en los patrones de fosforilación en residuos de tirosina se realizó un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos comerciales que detectan proteínas fosforiladas en tirosina. Los espermatozoides fueron incubados en ASP y los dos medios hiposmóticos (ASP10% y EW) y se analizaron los niveles de fosforilación (Fig. 18).

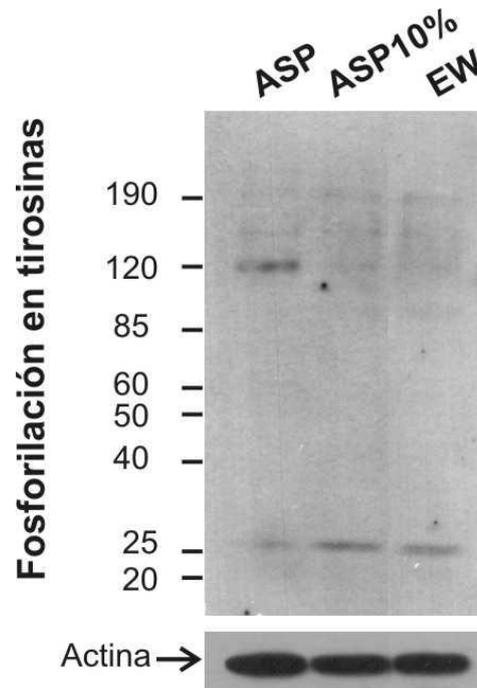


Figura 18: Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron incubados en ASP, ASP10%, EW durante 5 minutos a 20°C. Extractos proteicos fueron analizados por SDS/PAGE (10%) y WB utilizando anticuerpos anti-tirosina fosforilada (clon 4G10). Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Se observan cambios en el patrón de fosforilación entre ASP (donde los espermatozoides son inmóviles) y los medios hipotónicos (ASP 10% y EW donde se activa la motilidad). Si bien las bandas no son muy intensas, se observa que al menos una proteína de 25 kDa se fosforila y otra de 120 kDa se desfosforila. Estos resultados sugieren que, como se ha descrito en otras especies, el paso a un medio hipotónico donde se activa la motilidad de los espermatozoides también induce un cambio en los patrones de fosforilación en residuos de tirosina.

Nuestros resultados muestran que una disminución en la presión osmótica induce un aumento de los niveles de fosforilación por PKA. Con el fin de analizar el patrón de fosforilación de los sustratos de PKA en función de la osmolaridad del medio se incubaron espermatozoides en soluciones de cloruro de colina a distintas concentraciones (0, 25, 50, 100, y 150 mM en Tris 10 mM pH 7.4). Como se puede observar en la figura (Fig. 19) a concentraciones iguales o menores a 50 mM de Cl colina se produce un aumento en el patrón de fosforilación por PKA. Estos resultados confirman nuevamente que la

diminución de la osmolaridad induce la fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina mediada por PKA.

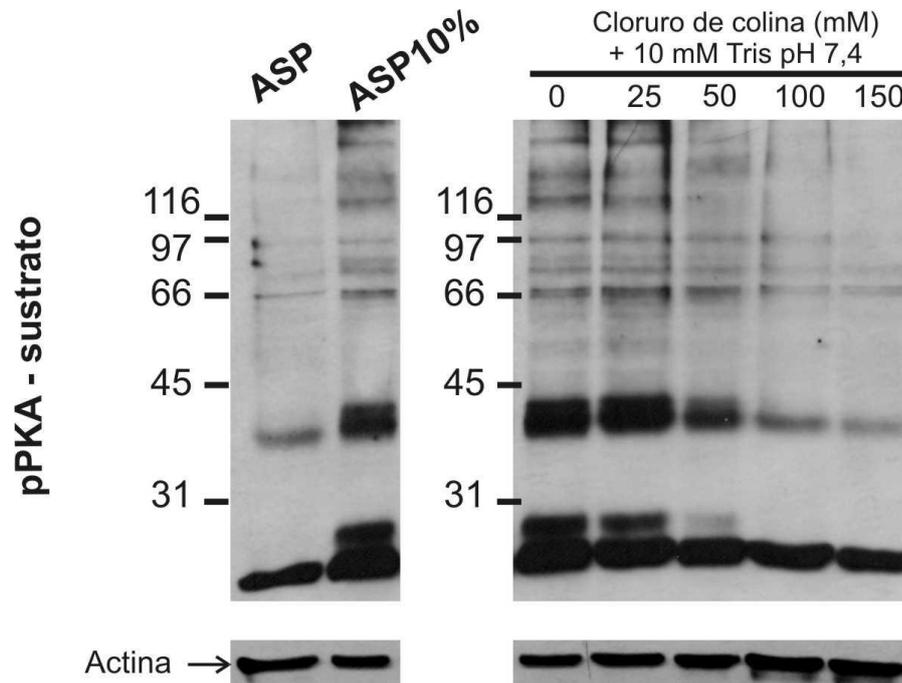


Figura 19: Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron incubados en soluciones de distintas concentraciones de cloruro de colina (en tris 10 mM pH 7,4) durante 5 minutos a 20°C . En el panel de la izquierda se muestran los patrones de espermatozoides incubados en los medios ASP y ASP10%. Los extractos proteicos fueron analizados por SDS/PAGE (10%) y WB utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

A fin de analizar la localización subcelular de las fosfoproteínas blanco de PKA en los espermatozoides de *Bufo arenarum* se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, utilizando los anticuerpos anti-pPKA-sustrato, de espermatozoides fijados y permeabilizados, previamente incubados en los medios ASP, ASP10% y EW (Fig. 20). Luego de la incubación en el medio hipotónico ASP10%, un bajo porcentaje de los espermatozoides (20%) mostraron una señal fluorescente localizada en la pieza media (ver flechas en Fig. 20 panel 2). Esta señal no se observó en espermatozoides incubados en ASP. En los espermatozoides incubados en EW la señal observada fue mucho más intensa que en ASP10% y en el 65% de los espermatozoides analizados la señal se localizó a lo largo de la cabeza (excluyendo la región acrosomal) y pieza media (ver flechas en Fig. 20 paneles 3 y 4). Se observa además una señal muy tenue en flagelo de los espermatozoides incubados en medios hiposmóticos.

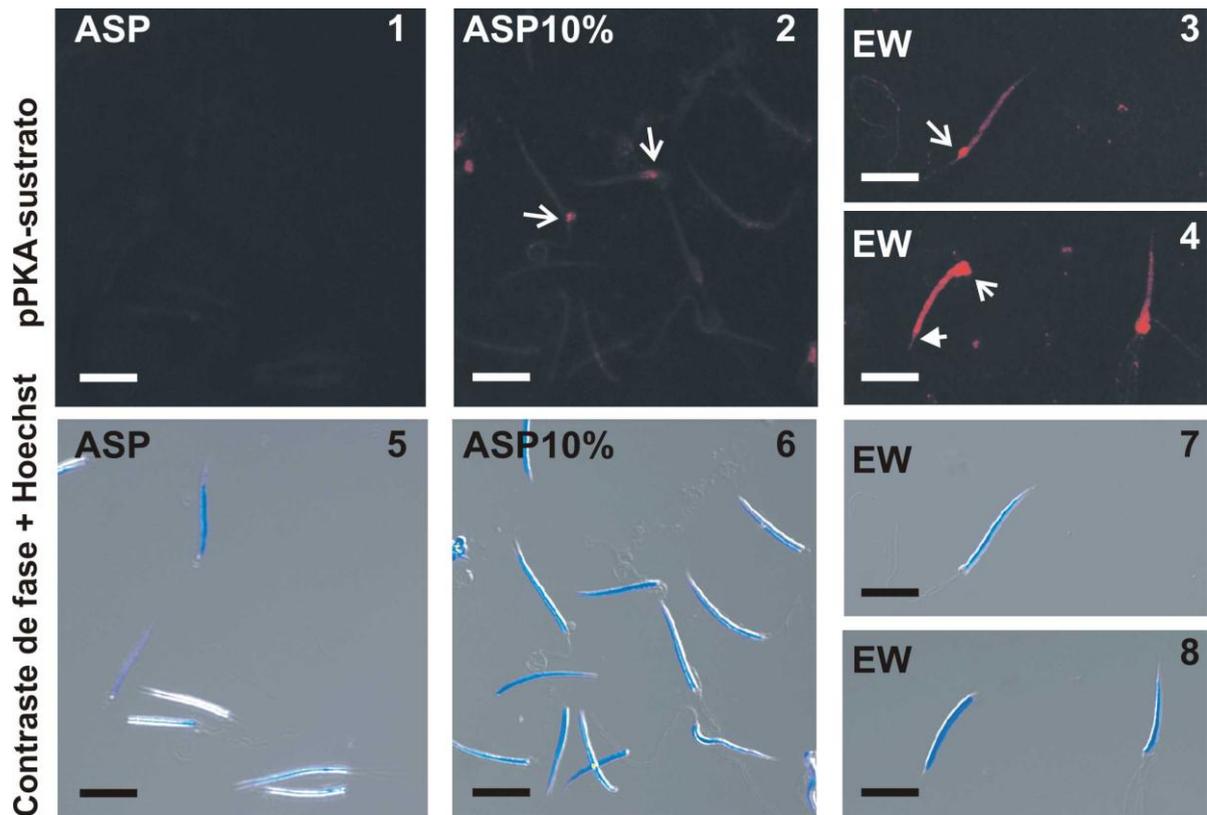


Figura 20: Localización de las fosfoproteínas espermáticas. Espermatozoides preincubados en ASP (paneles 1 y 5), ASP 10% (paneles 2 y 6) y en EW (paneles 3, 4, 7 y 8) fueron fijados y permeabilizados previamente a realizar la inmunolocalización. Se utilizaron anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Los paneles 1-4 muestran la inmuno-fluorescencia detectada con anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo Cy3, mientras que en los paneles 5-8 se muestra la superposición del campo claro (contraste de fase) junto con marcador de núcleos Hoechst. La barra representa 10 μ M.

Rol del AMPc y PKA durante la activación de la motilidad inducida por hipotonicidad

El aumento de los niveles de fosforilación inducida por hipotonicidad sugiere la importancia del rol de la quinasa PKA durante la activación de la motilidad en espermatozoides de *B. arenarum*. Con el fin de estudiar el rol de PKA en la activación de la motilidad, se incubaron espermatozoides en medios hipotónicos (ASP10% y EW) en presencia de un inhibidor de PKA, H-89 (Fig. 21 A).

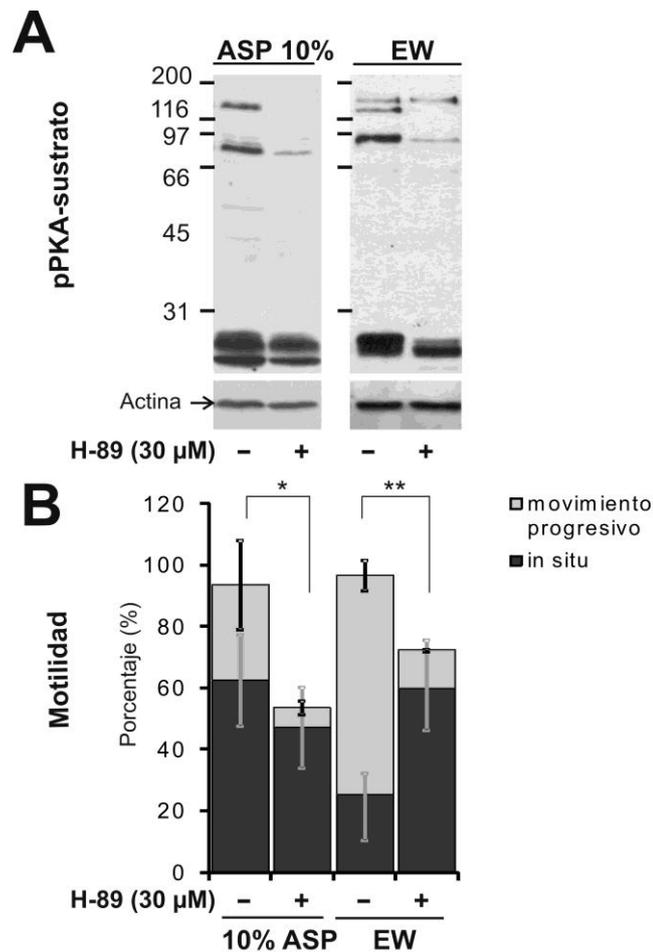


Figura 21: Efecto del inhibidor H-89 sobre la fosforilación por PKA y la motilidad de los espermatozoides. A). Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron preincubados en ASP conteniendo H-89 durante 15 minutos a 20°C antes de ser incubados en ASP10% o EW con H-89. Las fosfoproteínas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% y EW en presencia del inhibidor H-89 (30 μM). Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=5$. Los asteriscos indican un efecto de inhibición significativa respecto al control (*Test de Mann–Whitney para comparar las medianas del movimiento progresivo $p < 0,002$ y **t – student para comparar movimiento progresivo de las medias con un $p < 0,0001$).

Efectivamente, la presencia del inhibidor de PKA, H-89, modificó los patrones de fosforilación en ambos tratamientos. Mediante análisis de densitometría de las bandas de los ensayos de Western Blot se detectó un total bloqueo de la fosforilación de la banda 1 del tratamiento ASP10% 30 μM H-89 (Fig. 22 A) y de la banda 2 de EW 30 μMH-89 (Fig. 22 B). Por otro lado, se observó una disminución en los niveles de fosforilación del resto de las fosfoproteínas. Más interesante aún resultó observar una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje promedio de la motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en ASP10% ($p < 0,002$) y en EW ($p < 0,0001$) en presencia de inhibidor H-89 (Fig. 21 B).

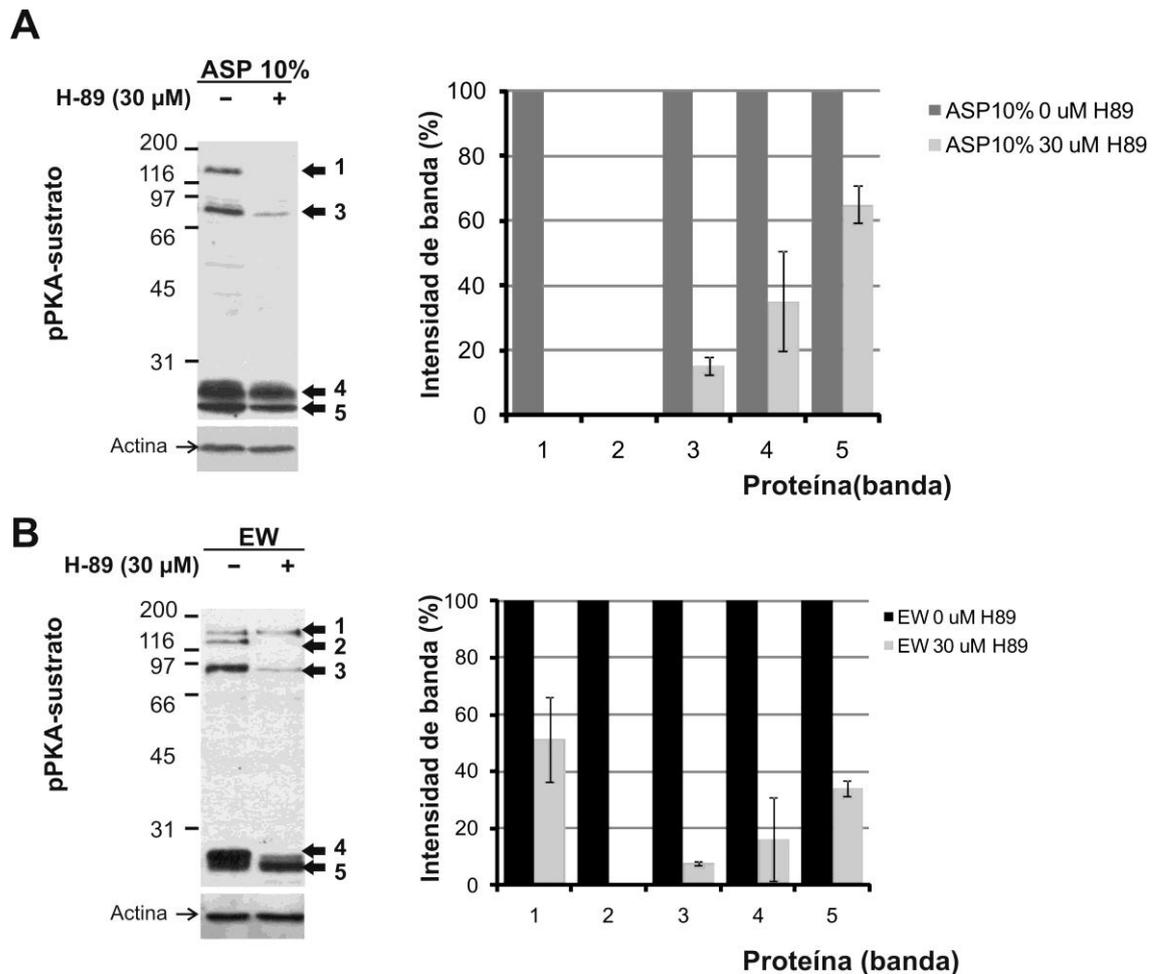


Figura 22: Análisis de densitometría de las bandas. La intensidad de las bandas correspondientes a los ensayos de Western Blot anti-pPKA-sustrato de la Fig. 21 A fueron analizadas utilizando el software Gel Pro Analyzer. Los números de las bandas corresponden a las diferentes fosfoproteínas observadas en ASP10% (A) y EW (B). Los datos representan la media \pm desvío estándar (n=3) del porcentaje de la intensidad de las bandas tomando como 100% la intensidad correspondiente a 0 μ M de H-89.

Los resultados sugieren que la hipotonicidad induce un aumento de AMPc intracelular. Para evaluar esta hipótesis, se incubaron espermatozoides en medio ASP con análogos de AMPc membrana permeable, como dibutiril-AMPc (db-AMPc) y 8-Br-AMPc, y luego se analizaron los sustratos fosforilados de PKA y la motilidad (Fig. 23).

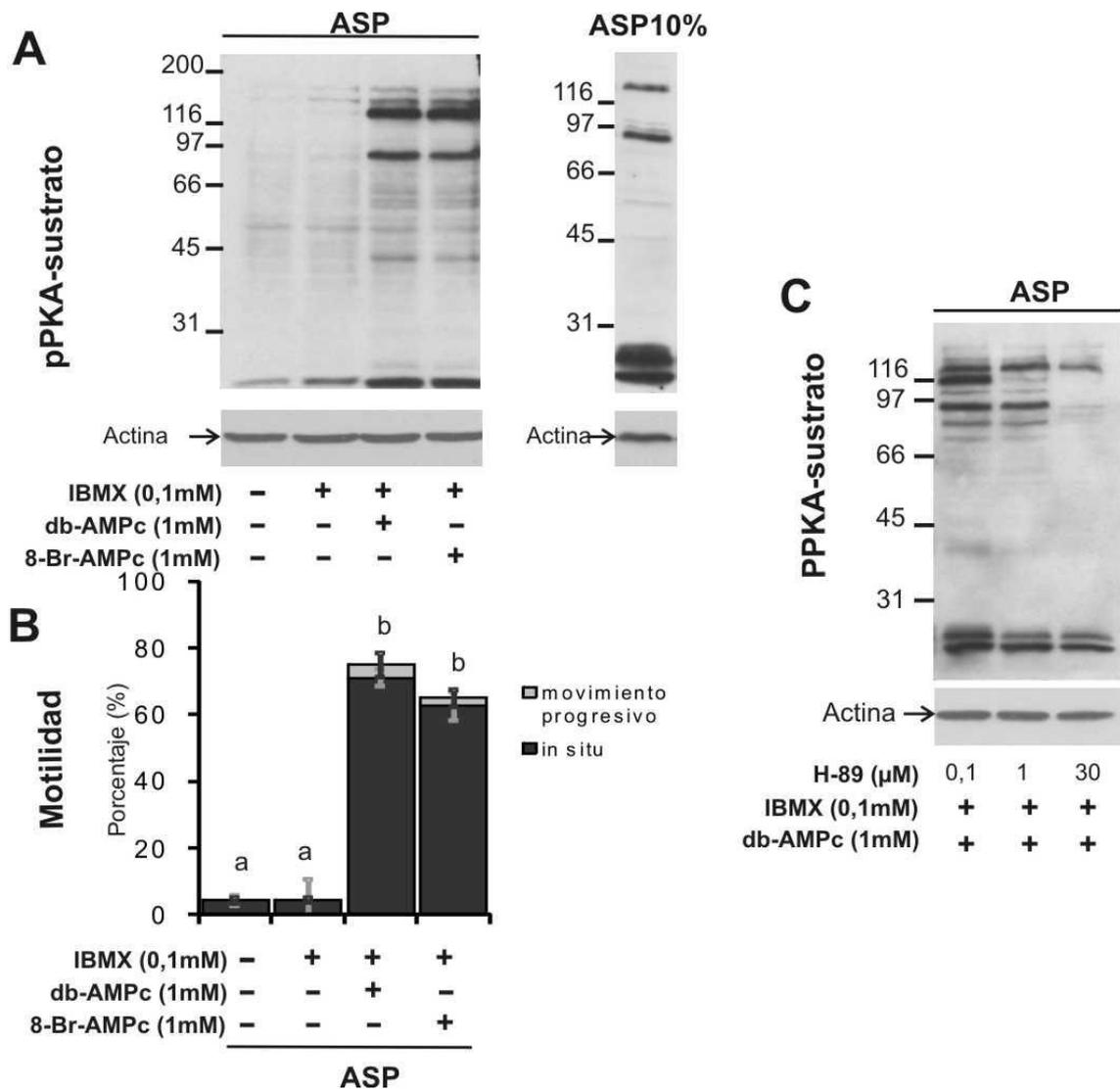


Figura 23: Efecto de agonistas de PKA sobre la fosforilación y la motilidad de los espermatozoides. A). Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron preincubados en ASP conteniendo db-AMPC u 8-Br-AMPC e IBMX durante 15 minutos a 20°C . Las fosfoproteínas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP en presencia de db-AMPC u 8-Br-AMPC e IBMX. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=5$. Las medias de los grupos que presentan diferentes letras difieren significativamente ($p<0,0001$). C) Espermatozoides fueron incubados en ASP conteniendo db-AMPC y H-89 (0,1; 1 y $30 \mu\text{M}$) durante 15 min a 20°C .

Como se observa en la Fig. 23 A la presencia de 8-Br-AMPC o db-AMPC induce un aumento en la fosforilación por PKA. Las proteínas detectadas en estos ensayos presentan un patrón similar al observado en espermatozoides incubados en medio hipotónico ASP10% (panel derecho de la Fig. 23 A). La incubación con los agonistas de PKA promueven la fosforilación de otras proteínas sugiriendo que se estarían activando otras PKAs no vinculadas a este mecanismo. Por otra parte, se detectó un aumento significativo ($p<0,0001$)

de la motilidad *in situ* de los espermatozoides incubados en el medio isosmótico en presencia de los análogos a AMPc (Fig. 23 B). Esto indicaría la importancia del aumento de AMPc intracelular para la activación de la motilidad. Finalmente, el aumento provocado por los análogos de AMPc fue bloqueado por el inhibidor H-89 (Fig. 23 C), lo cual demuestra que esta vía de señalización involucra la activación de la quinasa PKA.

Caracterización del tipo de enzima adenilato ciclasa involucrada en la activación de la motilidad.

Han sido caracterizadas, en células de mamíferos, dos tipos de enzimas adenilato ciclasas. Por un lado, las adenilato ciclasas del tipo transmembrana (tmAC) las cuales se activan por proteínas G y se estimulan por forskolina (FK). Por otro lado, la adenilato ciclasa de tipo soluble (sAC o SACY) (Braun and Dods, 1975; Buck et al., 1999) se estimula por bicarbonato (Chen et al., 2000) y calcio (Jaiswal and Conti, 2003). En espermatozoides de mamíferos, sAC se ha propuesto como la enzima candidata responsable de la síntesis del AMPc y, su regulación por calcio y bicarbonato, sería esencial para inducir los cambios fisiológicos del espermatozoide durante el proceso de capacitación (Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005). Por otra parte, la presencia de tmAC ha sido informada en espermatozoides de mamíferos (Baxendale and Fraser, 2003a; Spehr et al., 2004) e incluso en invertebrados marinos (Beltran et al., 2007).

El interrogante que surge es ¿Qué tipo de enzima AC sería la responsable de la síntesis de AMPc en los espermatozoides de *B. arenarum* durante la activación flagelar?

A partir de resultados ensayados en el laboratorio se observó que:

- 1) la presencia de bicarbonato (activador de sAC) en medio isosmótico no induce el aumento en la motilidad ni la fosforilación por PKA y
- 2) la ausencia de calcio (otro activador de sAC) en medio hipotónico produce una disminución en la motilidad pero no se inhibe la fosforilación por PKA. Esto quiere decir que probablemente el calcio regula la motilidad espermática pero de manera independiente y posterior a la vía regulada por PKA.

Estos resultados nos permitieron hipotetizar que, contrariamente a lo que ocurre en los espermatozoides de mamíferos, la enzima adenilato ciclasa

responsable del aumento de AMPc que induce la activación flagelar sería del tipo transmembrana (tmAC). Para poner a prueba esta hipótesis, espermatozoides de *B. arenarum* fueron preincubados en el medio ASP en presencia de forskolina (FK), un potente activador exclusivo de tmACs (Fig. 24).

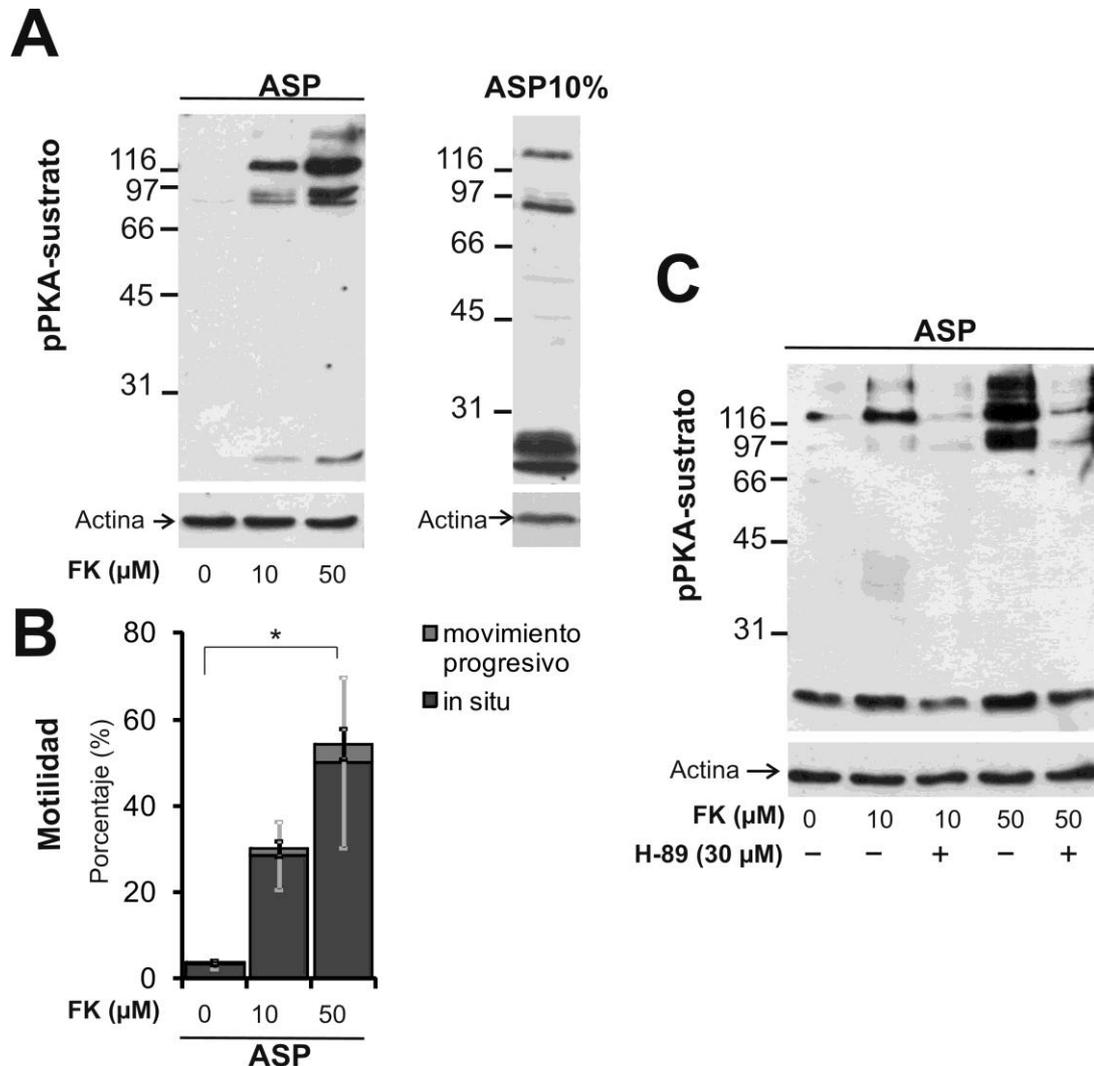


Figura 24: Efecto de FK sobre la fosforilación por PKA y la motilidad de los espermatozoides. A). Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron preincubados en ASP conteniendo FK durante 15 minutos a 20°C o en ASP10% (panel de la izquierda). Las fosfoproteínas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP en presencia de FK. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$. Los asteriscos indican un efecto inhibitorio significativo respecto al control (*Test de Mann-Whitney para comparar las medianas, $p<0,03$). C) Espermatozoides fueron incubados en ASP conteniendo FK (10 y 50 μM) y H-89 (30 μM) durante 15 min a 20°C .

Cuando las células fueron incubadas durante 15 minutos en medio ASP conteniendo FK se observó un aumento en la fosforilación de los sustratos de

PKA (Fig. 24 A). Llamativamente se detectó un patrón similar al observado en espermatozoides incubados en medio hipotónico ASP10% (panel derecho de la Fig. 24 A) y al observado en presencia de los agonistas de AMPc (Fig. 23 A). Esta inducción de la fosforilación provocada por FK es totalmente bloqueada en presencia del inhibidor de la quinasa PKA, H-89 (Fig. 24 C). Por otra parte, el efecto de FK se tradujo en un aumento de la motilidad de los espermatozoides incubados en medio isosmótico ASP (Fig. 24 B). El porcentaje de motilidad total (*in situ* + movimiento progresivo) aumentó significativamente en presencia de 50 μ M de FK ($p < 0,03$).

Las tmACs están reguladas por proteínas G, las cuales son heterodímeros compuestos por tres subunidades distintas; α , β y γ . La presencia de esta proteína en espermatozoides de *Bufo arenarum* fue evaluada mediante ensayos de Western Blot e inmunocitoquímica utilizando anticuerpos policlonales anti-proteína G α (Fig. 25). Estos anticuerpos reconocen una región ampliamente conservada de secuencia RMHLRQYELL, la cual está ubicada en la región C-terminal de la proteína G α . Los ensayos de Western Blot muestran dos bandas inmunoreactivas pertenecientes a las isoformas de mayor (52-58 kDa) y menor (45-43 kDa) peso molecular (ver flechas de Fig. 25 A). Cuando se analizó la localización de esta proteína mediante ensayos de inmunocitoquímica sobre espermatozoides fijados y permeabilizados se detectó una intensa señal fluorescente en la cabeza de los espermatozoides (ver flecha de Fig. 25 B).

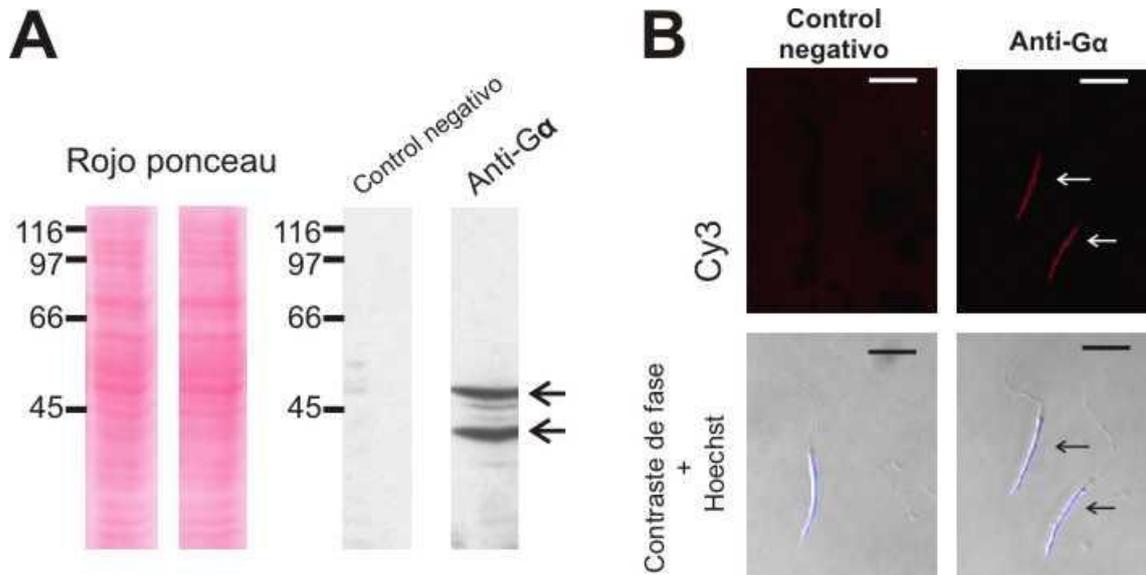


Figura 25: Immunodetección de proteína G α en espermatozoides de *B. arenarum*. A) Ensayo de Western Blot sobre extracto proteico de espermatozoides utilizando anticuerpos policlonales anti-proteína G α . Como control negativo se utilizó suero IgG normal de conejo. A la izquierda se muestra la tinción rojo ponceau ambas membranas. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Ensayo de inmunocitoquímica sobre espermatozoides fijados y permeabilizados previamente a realizar la inmunolocalización. Los paneles de arriba muestra la inmuno-fluorescencia detectada con anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo Cy3, mientras que en los paneles de abajo se muestra la superposición del campo claro (contraste de fase) junto con marcador de núcleos Hoechst. La barra representa 10 μ m.

Posteriormente se analizó el efecto de inhibidores de ACs sobre los sustratos fosforilados de PKA y la motilidad de los espermatozoides. Por un lado se analizó el efecto de MDL (Fig. 26), un inhibidor membrana permeable que ha sido informado como específico para tmAC (Lippe and Ardizzone, 1991). Los espermatozoides fueron preincubados en medio isotónico ASP en presencia del inhibidor durante 15 min. y luego se pasaron las células a un medio hipotónico (ASP10%) manteniendo la concentración del inhibidor.

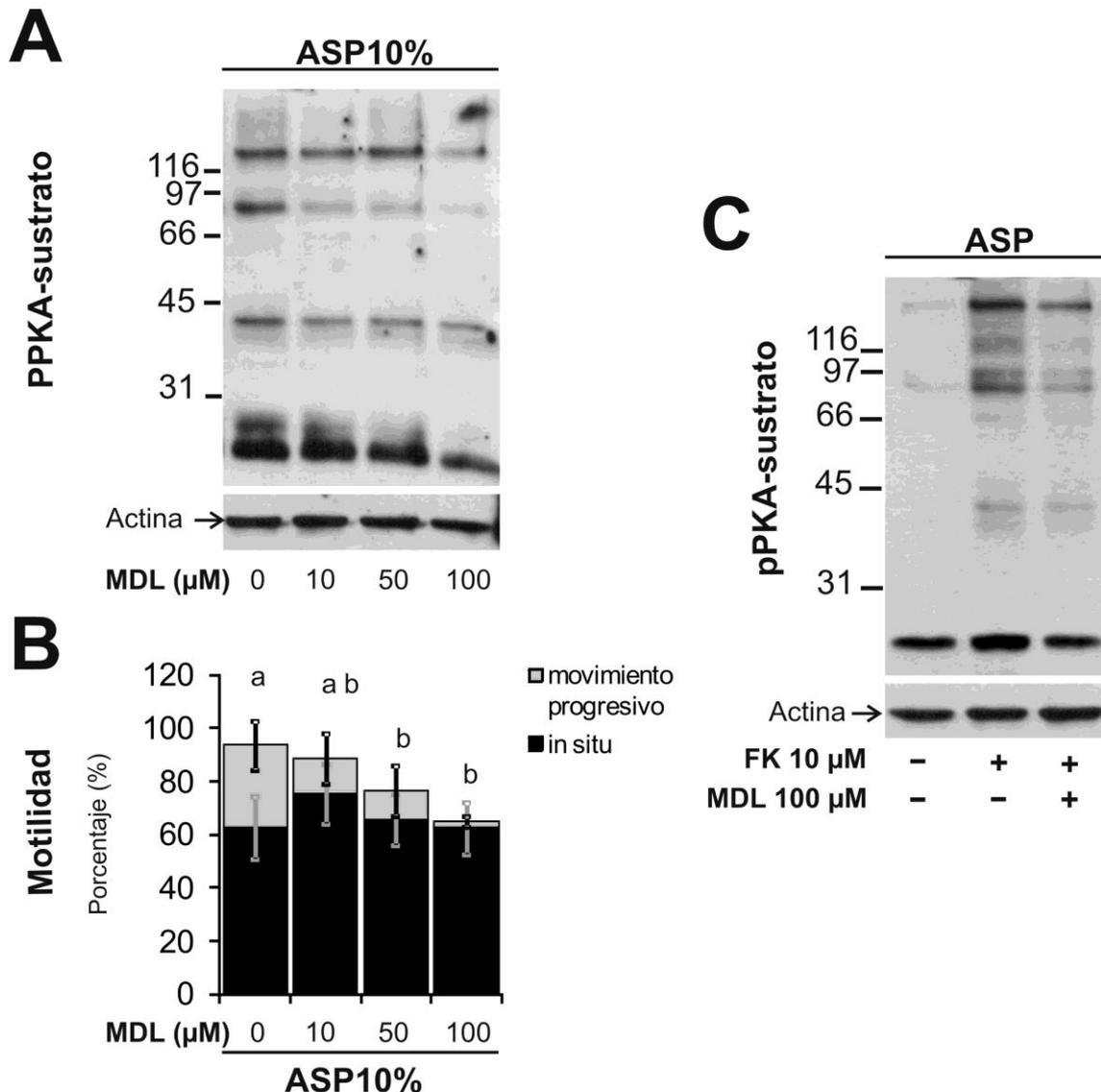


Figura 26: Efecto del inhibidor de tmAC (MDL) sobre la fosforilación por PKA y la motilidad de los espermatozoides. A). Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron preincubados en ASP conteniendo MDL durante 15 minutos a 20°C antes de ser incubados en ASP10% con MDL. Las fosfoproteínas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP 10% en presencia de MDL. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$. Las medias de los grupos que presentan diferentes letras difieren significativamente (ANOVA, $p<0,05$). C) Espermatozoides fueron incubados en ASP conteniendo FK y MDL durante 15 min a 20°C .

La Figura 26 muestra que el inhibidor MDL provoca una disminución en la fosforilación de los sustratos de PKA (Fig. 26 A) que va acompañado por una disminución estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el valor promedio de la motilidad progresiva de los espermatozoides (Fig. 26 B). Mediante el análisis de densitometría de las bandas de los ensayos de Western Blot (Fig. 27) se puede corroborar la disminución de la intensidad de todas las bandas y esta

disminución es dependiente de la concentración del inhibidor. Para el caso del tratamiento con 100 μM de MDL se puede observar una disminución de alrededor del 80% de la intensidad de las bandas 1, 3 y 5 y casi un total bloqueo de la banda 4, en comparación con el control (0 μM de MDL).

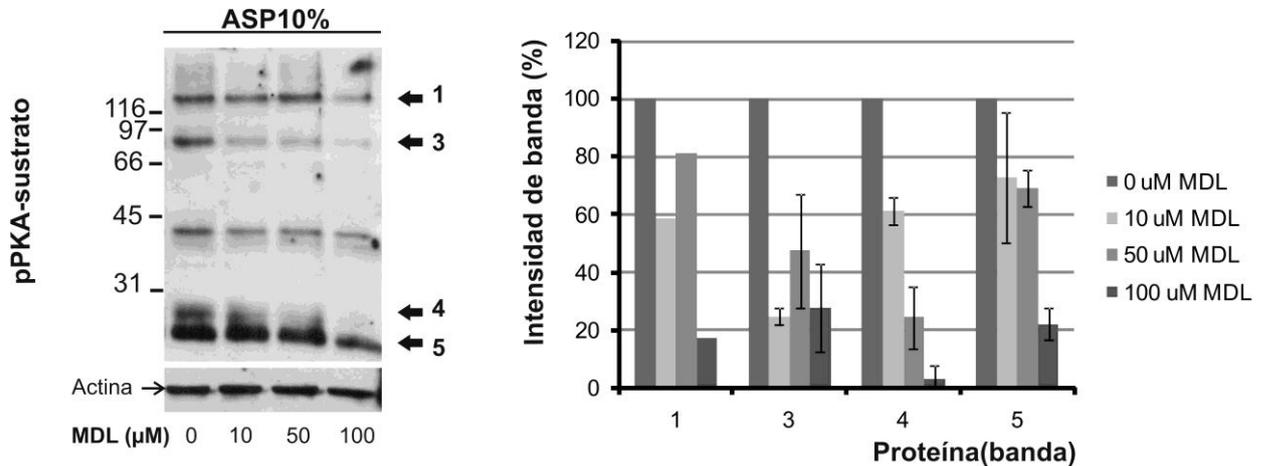


Figura 27: Análisis de densitometría de las bandas. La intensidad de las bandas correspondientes a los ensayos de Western Blot anti-pPKA sustrato de la Fig. 26 A fueron analizadas mediante software específico Gel Pro Analyzer. Los números de las bandas corresponden a las diferentes fosfoproteínas observadas. Los datos representan la media \pm desvío estándar (N=3) del porcentaje de la intensidad de las bandas tomando como 100% a la intensidad correspondiente a 0 μM de MDL.

Para corroborar que el efecto de MDL fuera específico sobre las tmAC se analizaron los niveles de fosforilación de PKA-sustrato en espermatozoides incubados en ASP con FK y MDL (Fig. 26 C). Mediante el análisis de densitometría de las bandas (no mostrado) se detectó una disminución del 50% de la intensidad total de las bandas en presencia del inhibidor MDL (calle 3 Fig. 26 C). Estos resultados sugieren que efectivamente el MDL está actuando sobre tmAC.

Por otro lado, se analizó el efecto de un inhibidor específico para sAC (SACY), KH7. El mismo ha sido informado como selectivo para sAC ($\text{IC}_{50} \sim 5 \mu\text{M}$) y raramente afecta la actividad de las tmAC (Hess et al., 2005). Se analizaron los niveles de fosforilación y la motilidad de los espermatozoides preincubados durante 15 min en un medio ASP en presencia de KH7 y posteriormente incubados por 5 min en medio ASP 10% con KH7 (Fig. 28).

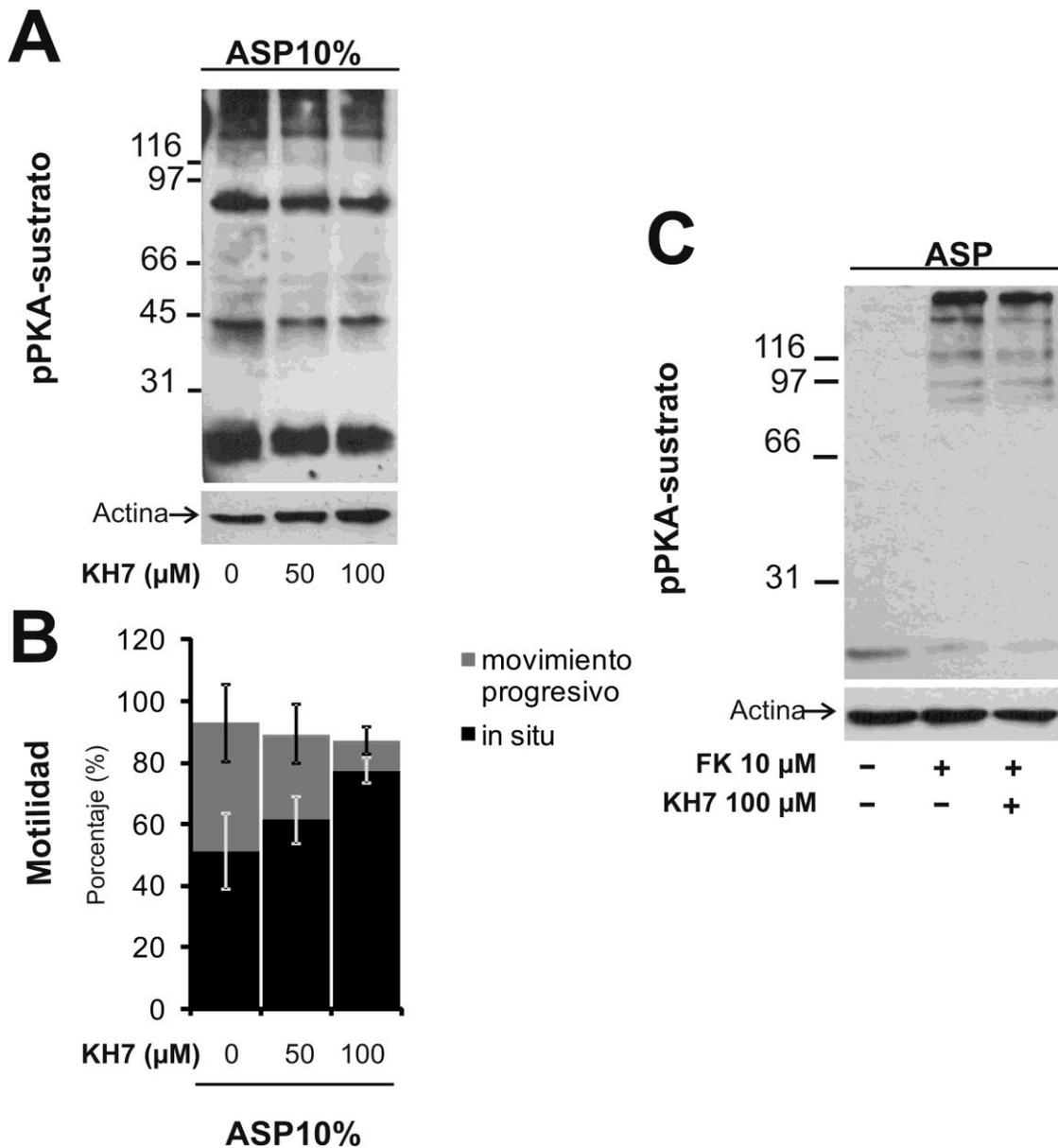


Figura 28: Efecto del inhibidor de sAC (KH7) sobre la fosforilación por PKA y la motilidad de los espermatozoides. A). Suspensiones de espermatozoides (7×10^6 células) fueron preincubados en ASP conteniendo KH7 durante 15 minutos a 20°C antes de ser incubados en ASP10% con KH7. Las fosfoproteínas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-pPKA-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP 10% en presencia de KH7. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$. C) Espermatozoides fueron incubados en ASP conteniendo FK y KH7 durante 15 min a 20°C .

En los ensayos de Western Blot (Fig. 28 A) no se observa un efecto inhibitorio de KH7 sobre la fosforilación de los sustratos de PKA a las concentraciones y tiempos ensayados, sugiriendo que no sería una enzima de tipo sAC la involucrada en este mecanismo. Los análisis de densitometría de las bandas

muestran una leve disminución en la intensidad de las fosfoproteínas 1,3, 4 y 5 (Fig. 29) la cual no supera el 20%.

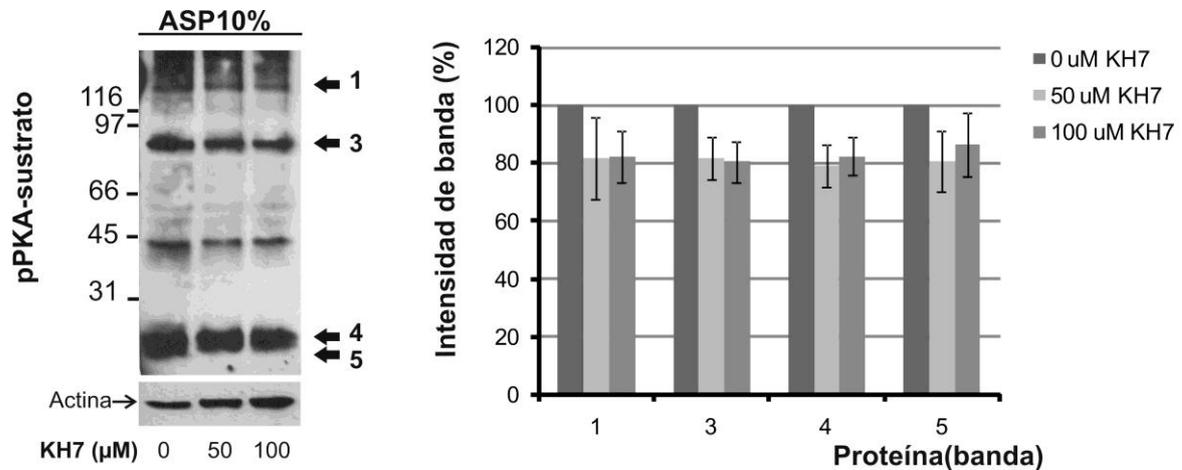


Figura 29: Análisis de densitometría de las bandas. La intensidad de las bandas correspondientes a los ensayos de Western Blot anti-PKA-sustrato de la Fig. 28 A fueron analizadas mediante software específico Gel Pro Analyzer. Los números de las bandas corresponden a las diferentes fosfoproteínas observadas. Los datos representan la media \pm desvío estándar ($n=2$) del porcentaje de la intensidad de las bandas tomando como 100% a la intensidad correspondiente a 0 μ M de KH7.

Se incubaron espermatozoides en ASP con FK y KH7 y nuevamente no se observaron cambios en la fosforilación de los sustratos de PKA (calle 3 de la Fig. 28 C). Además, los valores promedio de la motilidad total de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia del inhibidor no mostraron cambios estadísticamente significativos (Fig. 28 B). Existe una disminución significativa ($p<0,04$) en los valores de la motilidad progresiva. Sin embargo se observa un aumento significativo ($p<0,02$) en los valores de la motilidad *in situ*.

DISCUSION PARCIAL

Los resultados de la primer parte de este capítulo II confirman que el proceso de fosforilación/desfosforilación de proteínas durante la activación flagelar no está restringido solamente a espermatozoides de mamíferos.

Nuestros resultados muestran que existe un cambio en el patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y en residuos de serina/treonina en los espermatozoides activados de *Bufo arenarum*. Además, este cambio en el

patrón de fosforilación de espermatozoides móviles es inducido por hipotonicidad. En especies marinas de fecundación externa como los peces espáridos como la dorada (*Sparus aurata*) y *Lithognathus mormyrus* también se han informado cambios en el patrón de fosforilación de proteínas espermáticas vinculados directamente con la activación flagelar. Contrariamente con lo observado en especies de agua dulce, donde la activación flagelar se da por un choque hiposmótico, este cambio en los patrones de fosforilación es directamente correlacionado con la activación de la motilidad inducida por hiperosmolaridad (Zilli et al., 2008).

Los ensayos realizados con análogos de AMPc mostraron una inducción en la motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum*, incluso en condiciones isosmóticas. Debido a que uno de los principales blancos de acción del AMPc es la quinasa PKA, nos propusimos avanzar en el estudio de la regulación de la motilidad mediada por PKA. Los resultados de este capítulo muestran que el shock hiposmótico promueve la fosforilación por PKA de forma similar a como lo promueven los análogos de AMPc en medios isosmóticos. Esto indica que el choque hiposmótico provocaría un aumento del AMPc intracelular. Los ensayos donde se incubaron espermatozoides en medio hiposmótico en presencia del inhibidor H-89 mostraron una disminución del patrón de fosforilación y, más interesante aún, se observó una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides móviles.

Experimentos realizados en espermatozoides humanos, utilizando los mismos anticuerpos, muestran un aumento en el patrón de fosforilación durante la capacitación de espermatozoides (O'Flaherty et al., 2004). Del mismo modo que en este trabajo de tesis, observaron por un lado, aumentos en los patrones de fosforilación inducidos por análogos de AMPc y por otro, disminuciones de los niveles de fosforilación en presencia de inhibidores de PKA. Los autores informaron que los sustratos fosforilados por PKA de espermatozoides capacitados están localizados en pieza media y flagelo. De manera similar, los resultados de este trabajo muestran que las fosfoproteínas sustratos de PKA están localizadas principalmente en pieza media de espermatozoides móviles de sapo.

Poco se sabe sobre la identidad de las proteínas que son fosforiladas por PKA durante la activación flagelar. Hace varios años Tash y colaboradores (1986) analizaron el efecto inhibitorio de H-8 (potente inhibidor de quinasas dependientes de AMPc) sobre la motilidad de espermatozoides de perro íntegros y permeabilizados y observaron una disminución significativa dosis dependiente en ambos casos. A partir de ensayos *in vitro*, informaron además que existiría una proteína de 56 kDa, “axokinín”, que se fosforilaría de manera dependiente de AMPc. Sugirieron que sería esencial para la activación flagelar (Tash et al., 1984). La identidad de las proteínas que se fosforilan en los espermatozoides de sapo de forma dependiente de AMPc al activarse la motilidad son desconocidas aún.

Cuando los espermatozoides se incubaron en presencia del medio EW, el cual simula las condiciones naturales de fecundación, se observó un patrón más intenso de la fosforilación por PKA e incluso se observaron bandas adicionales. ¿Es posible que los factores presentes en la cubierta gelatinosa de los ovocitos de *Bufo arenarum* modulen el batido flagelar? Recientemente se ha informado que la proteína allurin, obtenida de la cubierta gelatinosa de los ovocitos de *Xenopus laevis*, tendría efectos directos sobre la motilidad de los espermatozoides. Se ha informado que allurin se une mayoritariamente a la pieza media de los espermatozoides (Burnett et al., 2011), sugiriendo la posible existencia de receptores de esta proteína en esta región del espermatozoides. Los investigadores especulan que allurin podría tener un rol importante en la estimulación de la producción de ATP o en la modulación de la motilidad regulada por calcio.

La presencia de enzimas tmAC en espermatozoides de erizo de mar ha sido documentada por Beltrán y colaboradores (2007). Utilizando anticuerpos comerciales específicos de algunas de las isoformas de tmAC observaron una localización diferencial según el tipo de tmAC; encontraron que tmAC1 y tmAC5/6 estaban localizadas en la región acrosomal del espermatozoide y tmAC2, tmAC5/6 y tmAC9 estaban localizadas en pieza media. Mediciones de actividad de tmAC mostraron que la presencia de forskolina (50 μ M) incrementaba significativamente los valores de AMPc y este incremento

disminuyó en presencia de inhibidores específicos de tmACs. Evaluaron el estado del acrosoma de las células incubadas en presencia del inhibidor de tmAC y observaron una disminución significativa en el número de espermatozoides reaccionados. Es por esto que los autores señalaron la importancia de las tmACs en la regulación de la reacción acrosómica de los espermatozoides de erizo de mar.

El rol de las tmACs en espermatozoides de mamíferos sigue siendo aún muy debatido. Del mismo modo que Beltrán (2007), Fraser y colaboradores (Baxendale and Fraser, 2003a; Fraser et al., 2003) detectaron las isoformas tmAC2, tmAC3, tmAC4 y tmAC8 en espermatozoides de ratón y humanos. Estos autores demostraron que, además de estar presentes, estas enzimas son funcionales. Realizaron ensayos de ADP-ribosilación utilizando la toxina colérica en espermatozoides permeabilizados de ratón (toxina producida por *Vibrio cholerae* que actúa sobre las subunidades G α introduciendo un grupo ADP-ribosa en el residuo equivalente a Arg174. El resultado de esta modificación es la activación de la proteína G α , lo que conduce finalmente a la activación de la tmAC) y observaron un aumento en los niveles de AMPc. Estos autores sugieren que la actividad de tmAC podría estar regulada por receptores asociados a proteínas G presentes en los espermatozoides que se activarían durante la capacitación. En referencia a esto último, existen algunas evidencias que señalan el rol fundamental de las enzimas tmAC durante la quimiotaxis mediada por receptores olfativos (“sperm olfactory receptor”, hOR17-4) en espermatozoides humanos (Spehr et al., 2004; Teves et al., 2009).

Los resultados de la última parte de este capítulo muestran que:

1. La presencia de forskolina en el medio isosmóticos ASP promueve, de manera similar a los análogos de AMPc, un patrón de fosforilación similar al detectado en extractos de espermatozoides incubados en medios hipotónicos,
2. La proteína G α , activadora de tmACs, fue detectada en extractos de espermatozoides de *B. arenarum*,
3. El inhibidor de tmAC, MDL, disminuye tanto los patrones de fosforilación por PKA como la motilidad de los espermatozoides a una concentración de 100 μ M y

4. El inhibidor KH7, específico de sACs no fue capaz de bloquear la fosforilación por PKA, ni disminuir significativamente la motilidad de los espermatozoides.

Todos estos resultados señalan a una tmAC como la enzima involucrada en la activación de la motilidad de espermatozoides de *Bufo arenarum*.

El estudio e interpretación de los cambios fisiológicos de espermatozoides de mamíferos es sumamente complejo. Alteraciones en el metabolismo, cambios en el potencial de membrana, pH intracelular, fluidez de membrana, concentración intracelular de iones y cambios en la fosforilación de proteínas, son algunos de los cambios más llamativos que se producen durante la capacitación. También se ha descrito un cambio en el patrón de la motilidad de los espermatozoides durante este proceso. De tener una motilidad progresiva pasan a experimentar un movimiento hiperactivado (Ho et al., 2002). Por todo esto es razonable que en la bibliografía no haya trabajos que vinculen la importancia de enzimas tmAC directa y exclusivamente con la activación flagelar en espermatozoides de mamíferos. No obstante, es interesante mencionar los estudios realizados con ratones que carecen del gen de la enzima tmAC3 (Livera et al., 2005). En espermatozoides de ratones salvajes, los autores midieron la acumulación de AMPc y registraron leves aumentos en presencia de forskolina a una concentración de 100 μ M. En los ratones que carecen la tmAC3 no observaron estos aumentos. En cuanto a las tasas de fecundación, los machos presentaron subfertilidad y, si bien la morfología de los espermatozoides fue aparentemente normal, mostraron una disminución significativa en los parámetros de motilidad (Livera et al., 2005).

La pregunta que surge es ¿Cómo se activa la tmAC de espermatozoides de *Bufo* a partir de un shock hiposmótico?

Una primera hipótesis propone una estimulación directa de la tmAC por hiperpolarización de membrana. Hace casi 20 años atrás (Schultz et al., 1992) se informó que la tmAC del protista *Paramecium* era estimulada por una hiperpolarización de membrana. Cuatro años más tarde otro grupo de investigadores (Beltran et al., 1996) descubrieron que la tmAC de espermatozoides del invertebrado erizo de mar respondía a cambios en el potencial de membrana. Nuestros resultados sugieren que existe un aumento

de fosforilación de proteínas espermáticas dependiente de AMPc el cual es inducido por un choque osmótico al pasar a un medio hipotónico. De manera interesante, resultados preliminares (no mostrados) obtenidos en nuestro laboratorio señalan que los espermatozoides de *B. arenarum* sufrirían una hiperpolarización de la membrana al pasar a un medio diluido.

Otra posibilidad es que exista un receptor sensible a estrés osmótico, previo a la activación de tmAC. Los canales TRPs (“transient receptor potential channels” en inglés) son buenos candidatos para transmitir al interior celular los cambios de osmolaridad que ocurren en el medio exterior. Se han informado que varios miembros de las subfamilias de los TRPs se activarían en respuesta a hipotonicidad en células somáticas (Hoffmann et al., 2009). Específicamente, algunos TRPs se han localizado en cabeza y cola de espermatozoides de ratón (Jungnickel et al., 2001; Trevino et al., 2001) y humanos (De Blas et al., 2009) que podrían tener un rol fisiológico importante.

CAPÍTULO III: Motilidad de los espermatozoides de *B. arenarum* regulada por PKC y serina/treonina fosfatasa.

INTRODUCCIÓN

La presencia de quinasas, fosfatasa y varias proteínas fosforiladas asociadas a la motilidad de los espermatozoides han sido descritas en varias especies de mamíferos, peces teleósteos e incluso en invertebrados marinos. Las quinasas de tipo PKC son un grupo de enzimas que pertenecen al grupo de serina/treonina quinasas AGC y están involucradas en diversas vías de transducción de señales en las células, participando en múltiples funciones fisiológicas, así como en procesos patológicos como el cáncer y determinadas cardiopatías (Hug and Sarre, 1993). Por primera vez y en los años '90, Rotem y colaboradores (Rotem et al., 1990a, b) demostraron la presencia de PKC en espermatozoides humanos, sugiriendo que esta enzima estaría involucrada en la regulación de la motilidad flagelar. Posteriormente varios autores informaron la presencia de PKC en espermatozoides de mamíferos como verracos (Bragado et al., 2010; Harayama and Miyake, 2006) y bovinos (Chaudhry and Casillas, 1992) y la vincularon a los distintos procesos fisiológicos que ocurren en espermatozoides durante etapas previas a la fecundación, como es por ejemplo la reacción acrosómica (Breitbart et al., 1992). El rol importante de PKC como uno de los componentes reguladores de la fisiología de espermatozoides de mamíferos no quedó restringido a este grupo de animales ya que existen evidencias de que la quinasa PKC cumpliría un papel fundamental en la activación de la motilidad de espermatozoides en erizo de mar (White et al., 2007). A partir de estudios farmacológicos utilizando varios inhibidores de diferentes quinasas los investigadores observaron un potente efecto inhibitorio de chelerytrine (inhibidor de PKC) sobre la motilidad de los espermatozoides. Informaron que existe una correlación entre la activación de motilidad y el aumento en los niveles de la fosforilación de proteínas flagelares por PKC (pPKC-sustratos), los cuales disminuyen en presencia del inhibidor chelerytrine. Además, utilizando anticuerpos que reconocen la enzima PKC_{βII} fosforilada, detectaron la quinasa PKC en flagelo, co-localizada con las proteínas pPKC-sustratos (White et al., 2007).

En este último capítulo se analiza si existe una correlación entre la activación de la motilidad de los espermatozoides del anfibio *Bufo arenarum* y la regulación de una vía dependiente de la quinasa PKC.

RESULTADOS

Cambio en el patrón de fosforilación por PKC de proteínas espermáticas asociada a la activación de la motilidad

Espermatozoides de *B. arenarum* fueron incubados en los cuatro medios de estudio; ASP, EW ASP, ASP10% y EW durante 2 min. y luego fueron centrifugados a 650g a 4°C durante 3 min. Los pellets conteniendo las células fueron resuspendidos en un buffer de lisis y los extractos fueron sembrados en un SDS/PAGE al 8%. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y luego se realizó el ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos comerciales específicos que reconocen sitios fosforilables por PKC en residuos de serina (anti-pPKC-sustrato, Cell Signaling, #2261). Los anticuerpos han sido validados anteriormente en estudios con espermatozoides de otras especies como por ejemplo erizo de mar (White et al., 2007) y cerdo (Harayama and Miyake, 2006). Los resultados del ensayo de Western Blot se muestran en la Figura 30.

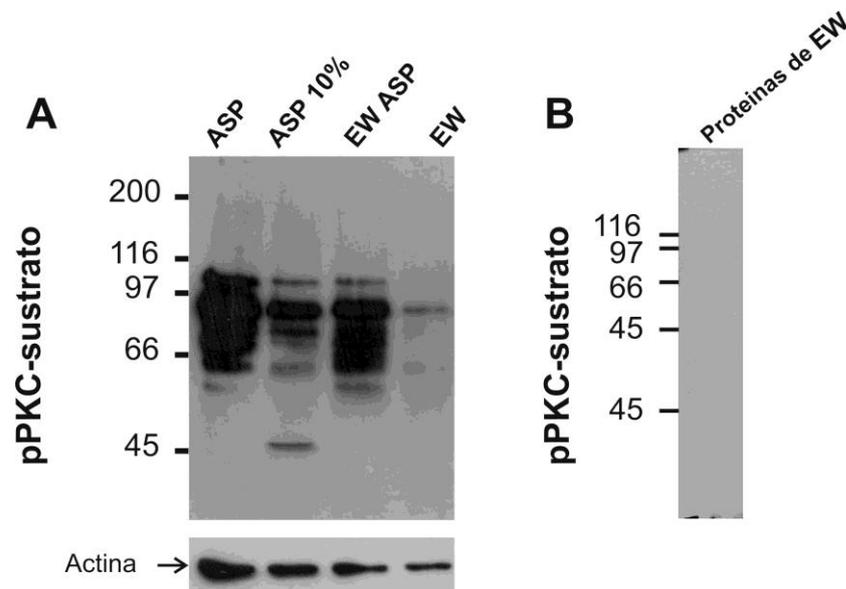


Figura 30: Los medios hipotónicos inducen cambios en el patrón de fosforilación en residuos de serina. A). Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron incubados en ASP, ASP10%, EW ASP y EW durante 5 minutos a 20°C. Extractos proteicos (A) y 34 μ g de proteínas de EW (B) fueron analizados por SDS/PAGE (8%) y WB utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Estos resultados muestran que cuando los espermatozoides pasan a medios hiposmóticos (ASP10% y EW), ocurre una desfosforilación de proteínas fosforiladas en serina de peso molecular de entre 60 a 110 kDa. Por otro lado, al menos una proteína de aproximadamente 50 kDa se fosforila (desde ahora p50).

Debido a que la carga proteica entre las calles correspondientes a los distintos tratamientos aparentemente no fue la misma (ver control de actina de la Fig. 30), se repitió el experimento analizando el patrón de espermatozoides preincubados en ASP, ASP10% y EW (Fig. 31).

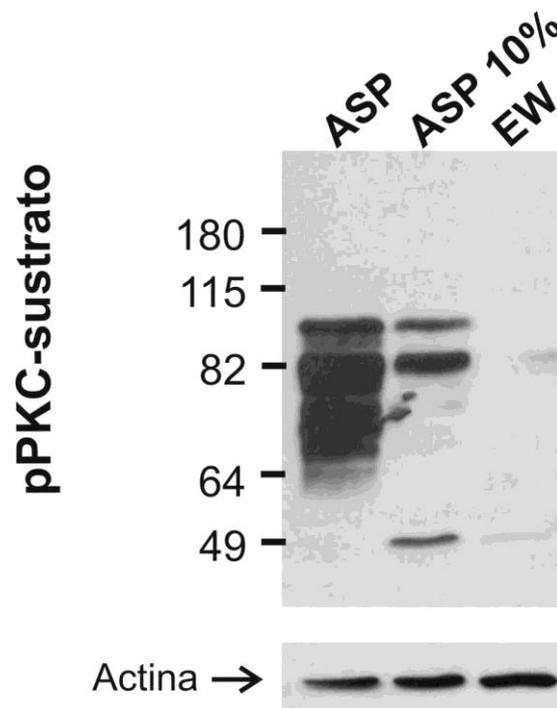


Figura 31: Los medios hipotónicos inducen cambios en el patrón de fosforilación en residuos de serina. A). Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron incubados en ASP, ASP10% y EW durante 5 minutos a 20°C. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Nuevamente se observa el patrón mixto observado de desfosforilación de proteínas de 60 a 110 kDa y de fosforilación de p50.

Se corroboró, además, que EW no presenta proteínas o péptidos fosforilados en residuos de serina detectados por los anticuerpos anti-pPKC-sustrato (Fig. 30 B).

Los resultados revelan que la disminución en la presión osmótica del medio de incubación de los espermatozoides induce un cambio de los niveles de fosforilación por PKC sugiriendo que esta vía también estaría relacionada con la activación de la motilidad de espermatozoides de *B. arenarum*. Con el fin de analizar el patrón de fosforilación de los sustratos de PKC en función de la osmolaridad del medio se incubaron espermatozoides en soluciones de cloruro de colina de distintas concentraciones (0, 25, 50, 100, y 150 mM en Tris 10 mM pH 7,4) y por lo tanto, de distintas osmolaridades (Fig. 32).

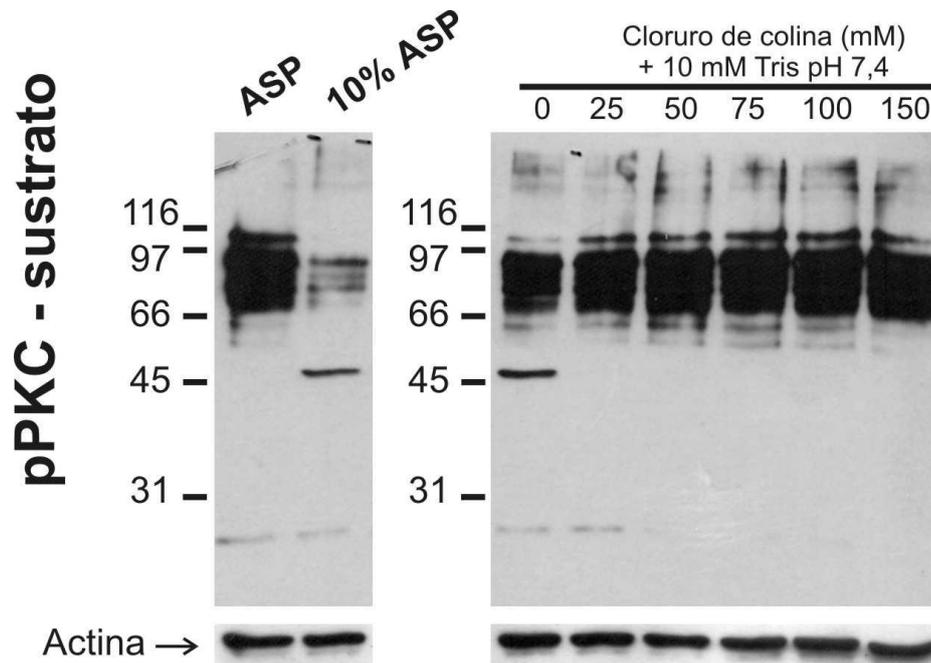


Figura 32: Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron incubados en soluciones de distintas concentraciones de cloruro de colina (en tris 10 mM pH 7,4) durante 5 minutos a 20°C. En el panel de la izquierda se muestran los patrones de espermatozoides incubados en los medios ASP y ASP10%. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa

Se observa que a mayor osmolaridad no ocurre desfosforilación de las bandas de entre 60 a 110 kDa y no se fosforila p50.

Posteriormente se analizó la localización subcelular de las fosfoproteínas blanco de PKC en los espermatozoides de *Bufo arenarum*. Para ello se realizaron ensayos de inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos anti-pPKC-sustrato sobre espermatozoides fijados y permeabilizados, previamente incubados en los medios ASP, ASP10% y EW (Fig. 33). Los espermatozoides incubados en el medio isosmótico ASP muestran señal fluorescente intensa asociada al flagelo (83%), la cual desaparece en los espermatozoides preincubados en medios donde se activa la motilidad (ASP10% y EW). Estos resultados concuerdan con los observados en los ensayos de western blot, donde se observa desfosforilación general de proteínas blanco de PKC (ver Fig. 31). Además, se evidencia en los tres tratamientos una baja señal fluorescente en la cabeza y pieza media, siendo más intensa esta señal en los espermatozoides preincubados en EW. La señal fluorescente observada en los ensayos de inmunocitoquímica de espermatozoides preincubados en EW no coincide con lo observado en los ensayos de western blot, donde hay una disminución general de la fosforilación de proteínas. Probablemente esa señal en la cabeza de los espermatozoides preincubados en EW no es “rescatada” al realizar la extracción de proteínas con el buffer de lisis utilizado.

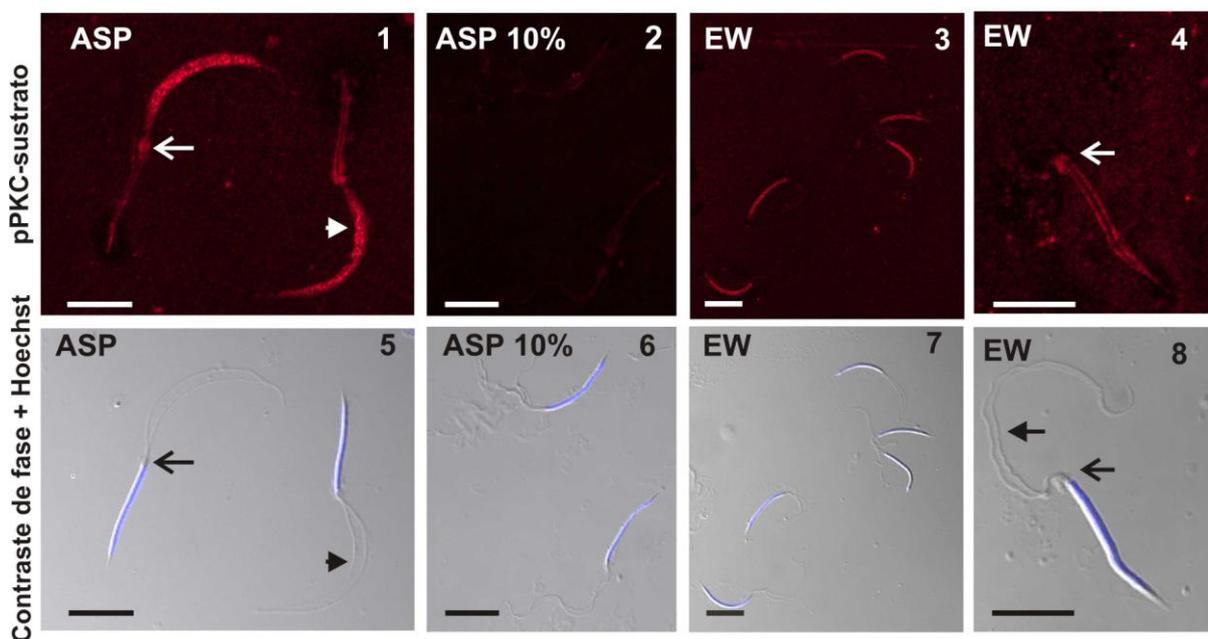


Figura 33: Localización de las proteínas fosforiladas por PKC. Espermatozoides preincubados en ASP (paneles 1 y 5), ASP 10% (paneles 2 y 6) y en EW (paneles 3, 4, 7 y 8) fueron fijados y permeabilizados previamente a realizar la inmunolocalización. Se utilizaron anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Los paneles 1-4 muestran la inmuno-fluorescencia detectada con anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo Cy3, mientras que en los paneles 5-8 se muestra la superposición de campo claro (contraste de fase) y el marcador de núcleos Hoechst. La barra representa 10 μ M.

Activación flagelar: análisis de la vía de señalización dependiente de PKC

El cambio en los niveles de fosforilación inducida por hipotonicidad sugiere la importancia del rol de la quinasa PKC y de serina/treonina fosfatasa durante la activación de la motilidad en espermatozoides de *B. arenarum*. En esta sección se muestran los resultados obtenidos del análisis de la vía regulada por la quinasa PKC.

Se han descrito varias isoformas de PKC en tejidos de mamíferos y se han subdividido en tres grupos según su estructura primaria y dependencia de distintos cofactores. Las PKC “convencionales” (cPKC) se activan por calcio y diacilglicerol (DAG) y pertenecen a este grupo las isoformas α , β I, β II y γ . Las PKC novedosas o “novel” (nPKC) se activan por DAG pero son insensibles al calcio e incluyen a las isoformas δ , ϵ , η y θ . Por último, las PKC atípicas (aPKC) incluyen las isoformas ζ y ι / λ y no requieren ni calcio ni DAG para presentar actividad (Mellor and Parker, 1998). Debido a que se desconoce la naturaleza del/de los tipo/s de quinasa/s PKC que estaría/n involucrada/s en la activación de la motilidad de espermatozoides de sapo se analizó el efecto de distintos tipos de inhibidores, los cuales son específicos para ciertas isoformas de PKC.

Primeramente se estudió el efecto del potente antagonista de PKC, chelerythrine (Chel), un alcaloide de benzofenantridina, aislado a partir de la planta *Chelidonium majus*. Se propone que chelerythrine interacciona con el dominio catalítico de la quinasa PKC como un inhibidor competitivo y sería específico de las isoformas de PKC α , β I, δ y γ . A partir de ensayos *in vitro* realizados con quinasas obtenidas a partir de cerebro de rata se informó un $IC_{50}=0,66 \mu\text{M}$ (Herbert et al., 1990).

Previamente al ensayo de inhibición se estudió, como en todos los casos de esta tesis, la vitalidad de los espermatozoides incubados en medios conteniendo el inhibidor y, sorprendentemente, se registró una disminución abrupta de la vitalidad (de 90 % inicial a 30 % final) de las células al preincubarlas solamente por 15 minutos y a una concentración de chelerythrine de $0,5 \mu\text{M}$. Por lo tanto, se analizaron tiempos menores de preincubación con

el inhibidor y se observó que a un tiempo igual o menor a 5 minutos no se alteraba la vitalidad de las células hasta una concentración máxima de 2 μM . Se realizaron entonces los ensayos con preincubaciones de no más de 5 min. En la siguiente figura (Fig. 34) se muestra el ensayo de Western Blot anti-pPKC sustrato de espermatozoides incubados en ASP en presencia de Chel.

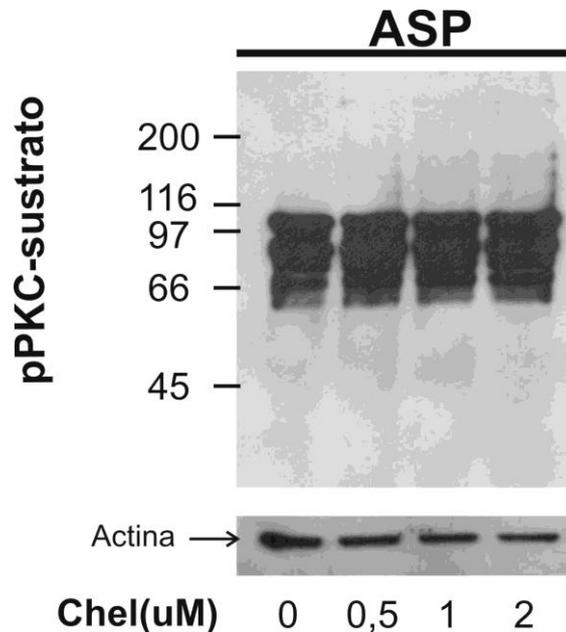


Figura 34: Efecto del inhibidor de PKC chelerythrine (Chel) en ASP sobre los niveles de fosforilación por PKC. Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo Chel (0, 0,5, 1 y 2 μM) durante 5 min. a 20° C. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Como se muestra en la Figura 34, el inhibidor chelerythrine no mostró efectos inhibitorios, a las concentraciones y tiempos de incubación analizados.

Por otro lado y debido a que la única proteína detectada que se fosforila por PKC al activarse la motilidad es p50, se analizó entonces el patrón de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides incubados en el medio hipotónico ASP10% en presencia del inhibidor chelerythrine (Fig. 35).

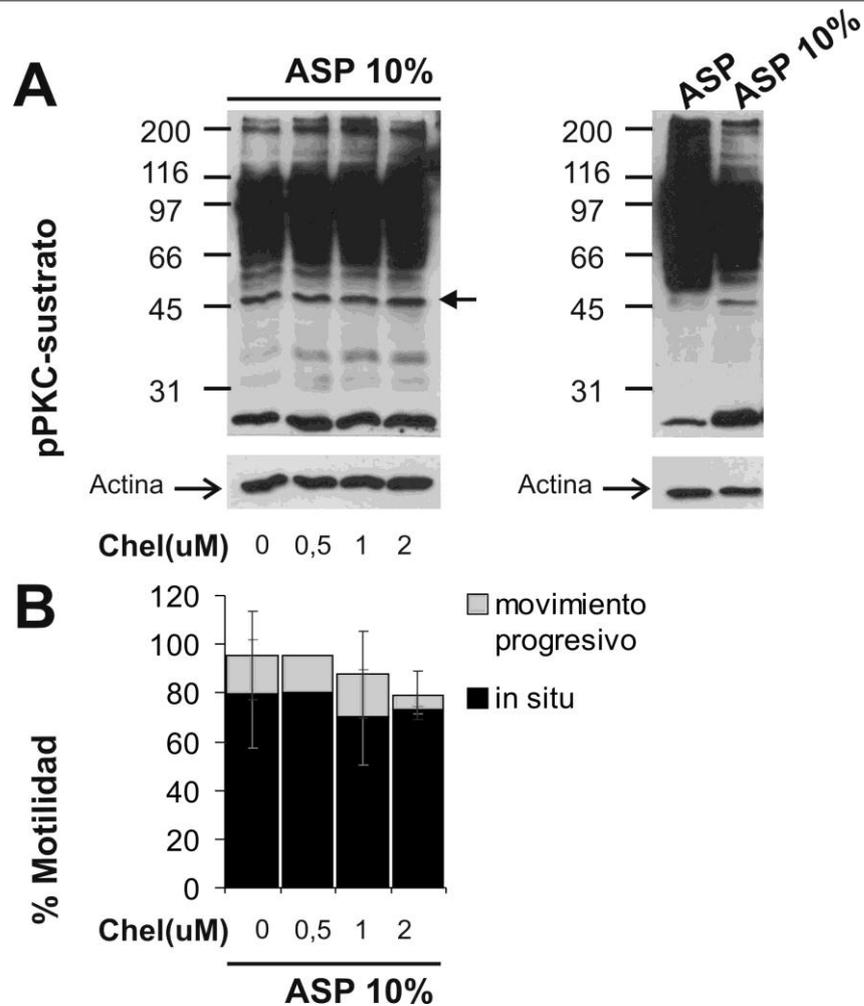


Figura 35: Efecto del inhibidor de PKC, chelerythrine (Chel), en ASP10% sobre los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP y ASP 10% (panel de a derecha) o en ASP conteniendo Chel (0; 0,5; 1 y 2 μ M) durante 5 min. a 20° C y luego fueron incubados durante 5 min en ASP10% con inhibidor. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia del inhibidor chel. Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=3.

No se observó un efecto inhibitorio del antagonista chelerythrine sobre la fosforilación de p50 (ver flecha negra en Fig. 35 A) y tampoco se observaron alteraciones en los porcentajes de motilidad de los espermatozoides incubados con el inhibidor (Fig. 35 B).

Curiosamente, en estudios de inhibición con Chel realizados en espermatozoides de erizo de mar, White y colaboradores (2007) observaron un efecto inhibitorio claro de los sustratos fosforilados de PKC recién a una concentración de 5 μ M. Esta concentración no fue testada durante los ensayos debido a la toxicidad que presentó este fármaco sobre los

espermatozoides de *B. arenarum*. Por otro lado, esta misma publicación muestra el análisis del efecto de chelerythrine sobre la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar e informa una inhibición total a una concentración igual o mayor a 2 μM . En nuestro caso, no observamos efectos significativos sobre la motilidad de los espermatozoides. El interrogante que queda pendiente es si, efectivamente, 5 minutos de preincubación son suficientes para que el fármaco entre a la célula.

A fin de avanzar en la caracterización del tipo de PKC, se utilizó otro inhibidor de enzimas PKC, el inhibidor membrana permeable Gö 6983. Se ha informado que este antagonista inhibe tanto a las isoformas convencionales dependientes de calcio PKC α , β , γ como las isoformas novedosas y atípicas independientes de calcio como las PKC δ , ζ y μ . Los valores informados de IC_{50} se encuentran en el rango 7 a 60 nM, dependiendo de la isoforma (Gschwendt et al., 1996). Se analizaron primeramente los sustratos fosforilados de PKC de espermatozoides preincubados en ASP en presencia del inhibidor durante distintos tiempos de preincubación (15, 30 o 60 minutos) y distintas concentraciones, abarcando un rango de 0 - 100 μM . En ninguno de los casos el inhibidor resultó tóxico para las células. Ciertamente se observó un efecto inhibitorio de PKC recién a los 60 min. de preincubación y a una concentración de 10 μM (Fig. 36 A).

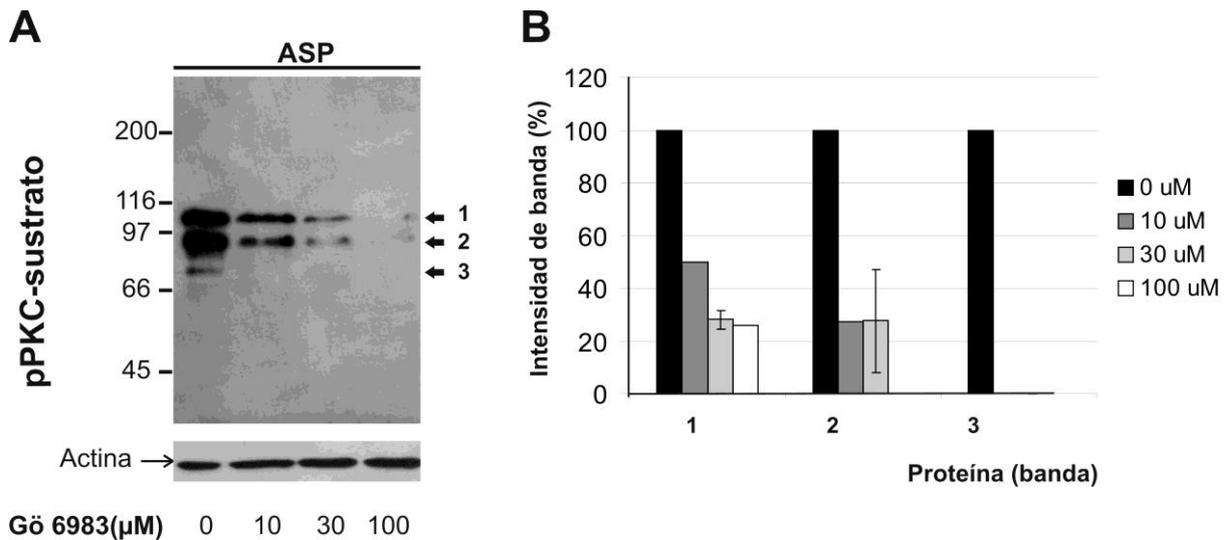


Figura 36: Efecto del inhibidor de PKC Gö 6983 en ASP sobre los niveles de fosforilación por PKC. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo Gö 6983 (0, 10, 30 y 100 μM) durante 60 min. a 20°C . El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de densitometría de las bandas. La intensidad de las bandas correspondientes a A) fueron analizadas utilizando el software Gel Pro Analyzer. Los números de las bandas corresponden a las diferentes fosfoproteínas observadas. Los datos representan la media \pm desvío estándar (N=2) del porcentaje de la intensidad de las bandas tomando como 100% a la intensidad correspondiente a 0 μM de Gö 6983.

Mediante análisis de densitometría de las bandas de los ensayos de Western Blot (Fig. 36 B) se detectó una disminución de la intensidad de las bandas 1 y 2 y la total desaparición de la banda 3, a la mínima concentración testeada del inhibidor (10 μM). Los espermatozoides permanecieron inmóviles en estos tratamientos (no mostrado).

Luego, con el objetivo de analizar el efecto de Gö 6983 sobre la fosforilación de la proteína p50, se analizaron los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de espermatozoides incubados en el medio hiposmótico ASP10% en presencia del inhibidor (Fig. 37).

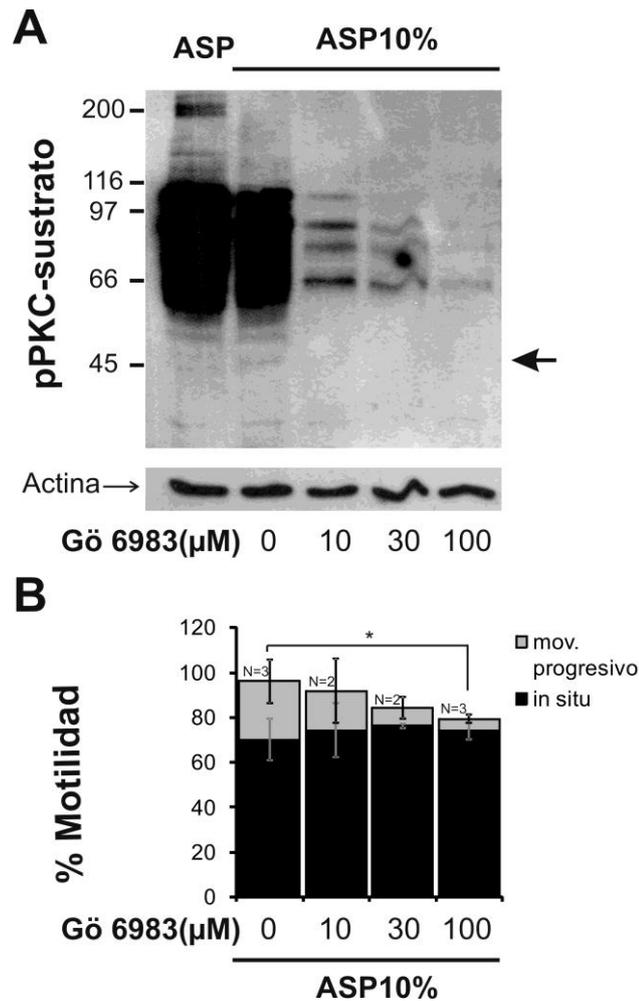


Figura 37: Efecto del inhibidor de PKC Gö 6983 en ASP10% sobre los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP o en ASP conteniendo Gö 6983 (0, 10, 30 y 100 μM) durante 60 min. a 20° C y luego fueron incubados durante 5 min en ASP10% en presencia del inhibidor. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia del inhibidor. Los datos representan la media \pm desvío estándar (* t – student para comparar movimiento progresivo de las medias con un $p < 0,02$).

Se observa inhibición de la señal de las bandas de peso molecular de 60 a 110 kDa y la desaparición de la banda p50 (señalada con una flecha negra en la Fig. 37 A) a la menor concentración testada del inhibidor (10 μM). Además existe una disminución estadísticamente significativa de los valores promedio de la motilidad progresiva entre el control y la mayor concentración testada de inhibidor (Fig. 37 B).

Posteriormente se analizaron los niveles de fosforilación por PKC de espermatozoides incubados en ASP en presencia del agonista membrana-permeable de PKC, Thymeleatoxina (TXA) (Fig. 38). TXA pertenece al grupo de los ésteres de forbol, diterpenos tetracíclicos, los cuales simulan la actividad del DAG y activan a las isoformas de PKC convencionales y novedosas (Ryves et al., 1991).

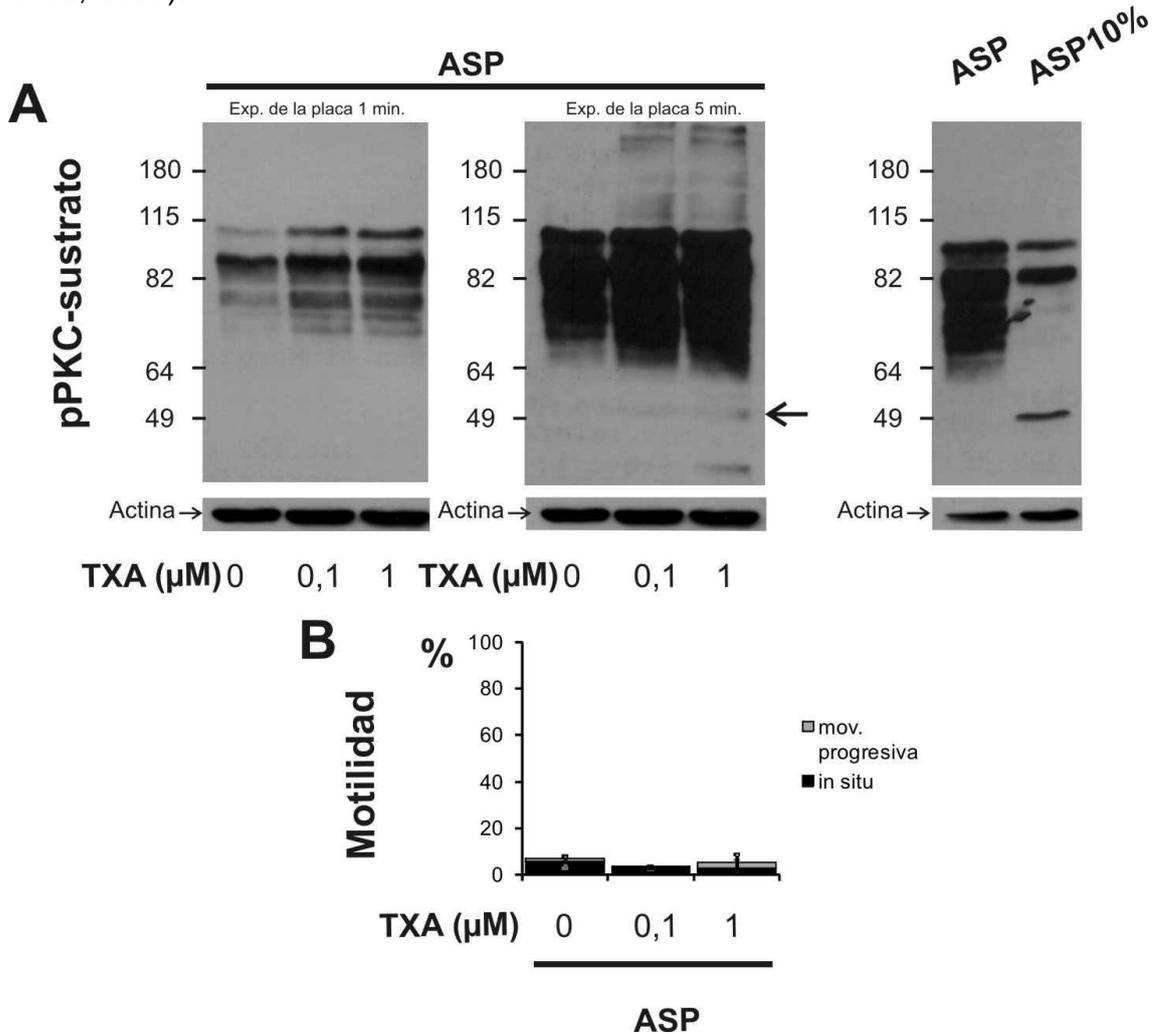


Figura 38: Efecto del activador de PKC Thymeleatoxina (TXA), en ASP sobre los niveles de fosforilación por PKC. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados, por un lado en ASP y ASP10% (panel de la derecha) y por otro, en ASP conteniendo TXA (0; 0,1 y 1 μM) durante 15 min. a 20° C. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Durante el revelado se expusieron dos placas, durante 1 y 5 minutos. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP en presencia de TXA. Los datos representan la media \pm desvío estándar; n=3.

La figura muestra claramente que los niveles de fosforilación por PKC aumentan a concentraciones crecientes del activador TXA. En la calle de

mayor concentración de TXA (1 μM) se observa una banda de aproximadamente 50 kDa que podría ser p50 (ver flecha negra de Fig. 38 A). En este caso no se detectó inducción de la motilidad (Fig. 38 B).

A continuación se estudió el efecto de TXA en los niveles de fosforilación por PKC en medio hiposmótico ASP10%. Los espermatozoides fueron preincubados en ASP con TXA durante 15 min. y luego fueron pasados al medio hiposmótico manteniendo la concentración del activador TXA (Fig. 39).

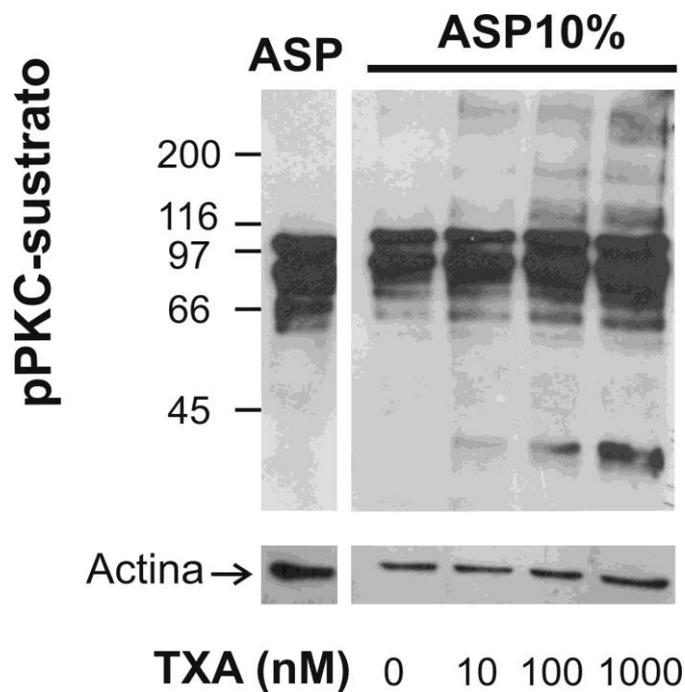


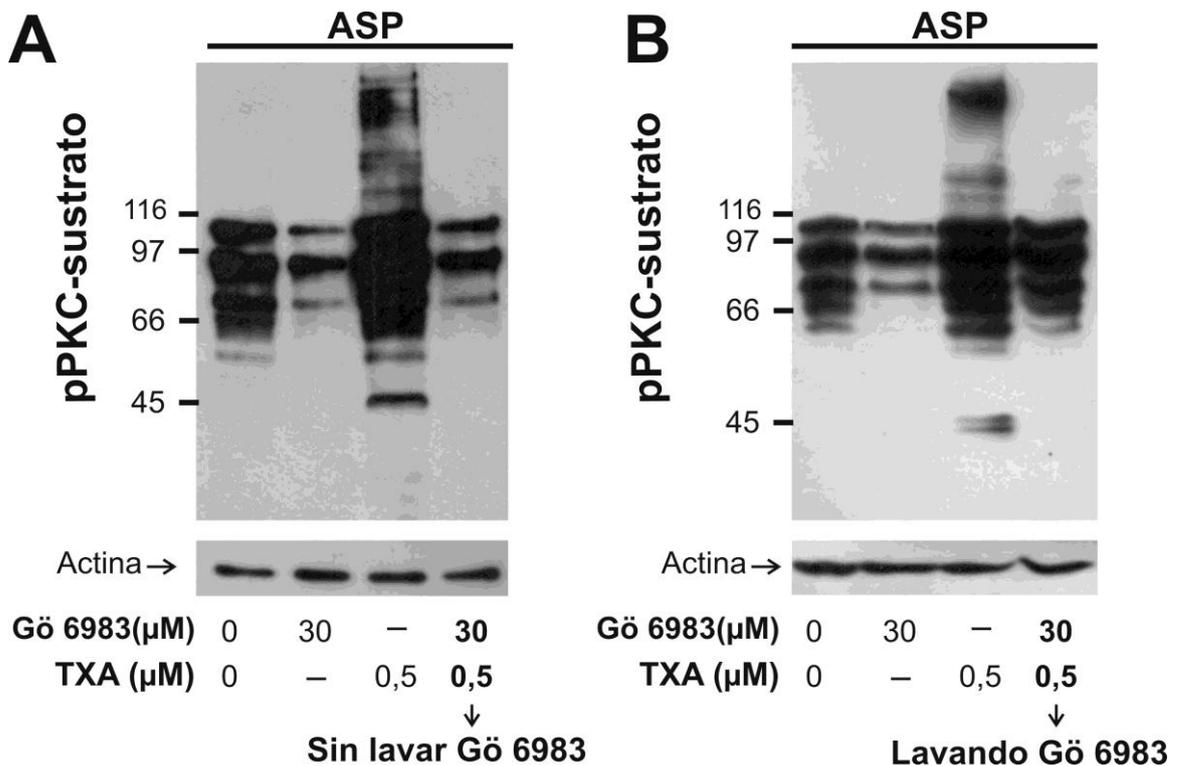
Figura 39: Efecto del activador de PKC, Thymeleatoxina (TXA), sobre los niveles de fosforilación por PKC. Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo TXA (0; 0,1 y 1 μM) durante 15 min. a 20° C. Luego se pasaron los espermatozoides al medio ASP10% con TXA. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Los niveles de fosforilación por PKC son mayores a mayor concentración de TXA, incluso en los extractos pertenecientes a espermatozoides activados incubados en ASP10% donde los niveles de fosforilación disminuyen.

Finalmente, se analizó el efecto de TXA luego de preincubar los espermatozoides en medios isotónico (ASP) en presencia del inhibidor Gö 6983, con el fin de evaluar si se “recuperan” los niveles de fosforilación por

PKC (Fig. 40). Los espermatozoides fueron entonces preincubados ASP en presencia de Gö 6983 (30 μM), TXA (0,5 μM) o preincubados primero con el inhibidor durante una hora y luego se omitió un lavado (Fig. 40 A) o se realizó un lavado (Fig. 40 B) para, finalmente, pasarlos a un medio ASP conteniendo TXA (0,5 μM).

Figura 40: Efecto del inhibidor (Gö 6983) y activador (TXA) de PKC sobre los niveles de fosforilación por



PKC. Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo el inhibidor Gö 6983 (30 μM) durante 60 minutos o conteniendo TXA (0,5 μM) durante 15 min o fueron preincubados primero en presencia del inhibidor y luego se omitió el lavado (A) o se realizó el lavado a las células (B) y posteriormente se pasaron los espermatozoides al medio ASP conteniendo TXA. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Como se muestra en la figura la disminución de los niveles fosforilación provocados por la inhibición con Gö 6983 fue "rescatada" parcialmente por el efecto del activador TXA, solo en el caso que se incluyó el lavado y remoción del inhibidor (calle 4 de la Fig. 40 B). Estos resultados demuestran la especificidad de los anticuerpos y que efectivamente esta vía de señalización involucra la participación de quinasas del tipo PKC.

Activación flagelar: análisis de la vía dependiente de Serina/Treonina fosfatasas

Según los resultados anteriores, durante la activación del batido flagelar de los espermatozoides de *B. arenarum* ocurriría una desfosforilación de proteínas, que previamente estarían fosforiladas por la quinasa PKC. Por lo tanto, enzimas serina/treonina fosfatasas (PPs) tendrían que estar involucradas en la regulación de esta vía.

Las proteínas serina/treonina fosfatasas incluyen las de tipo 1 (PP1) y las de tipo 2 (PP2). Las fosfatasas PP1 están altamente conservadas dentro de los organismos eucariotas. En mamíferos se han informado cuatro isoformas correspondientes a la subunidad catalítica de PP1 que son: PP1 α , PP1 β , PP1 γ 1 y PP1 γ 2 (Chakrabarti et al., 2007). Dentro de las enzimas PP2, cuya clasificación se basa en los requerimientos de cationes para su activación, están las de tipo 2A (PP2A, no requieren de cationes), las tipo 2B o calcineurina (PP2B, activables por Calcio/calmodulina) y las tipo 2C (PP2C, activables a elevadas concentraciones de Magnesio) (Cohen and Cohen, 1989).

Hace ya más de 20 años ha sido informada la presencia de enzimas fosfatasas del tipo PP1 y PP2B (calcineurina) en tejido testicular (Mukai et al., 1991; Muramatsu et al., 1992). Además se ha descrito actividad de proteínas fosfatasas en espermatozoides de bovinos (Tang and Hoskins, 1975), carnero (Barua et al., 1985), cerdo y perro (Tash et al., 1988), humanos (Ahmad et al., 1995) e incluso gallos (Ashizawa et al., 1994). Utilizando anticuerpos específicos contra distintas isoformas se han detectado las fosfatasas PP1 γ 1, PP1 γ 2 y PP1 α (Chakrabarti et al., 2007) y PP2A (Cheng et al., 2009) en espermatozoides de ratón. A partir de estos antecedentes, fue evaluada la presencia de algunas de estas fosfatasas mediante ensayos de inmunodetección, utilizando anticuerpos heterólogos comerciales disponibles en el laboratorio. Se realizaron ensayos de Western Blot sobre extractos proteicos de espermatozoides de sapo, utilizando, por un lado, anticuerpos policlonales anti-PP1 γ (Novus Biologicals, #H00005501-A01) (Fig. 41 A), y por otro lado, anticuerpos policlonales anti-PP2A (Cell Signaling, #2038) (Fig. 41 B) que detectan las subunidades catalíticas de las isoformas tanto α como β .

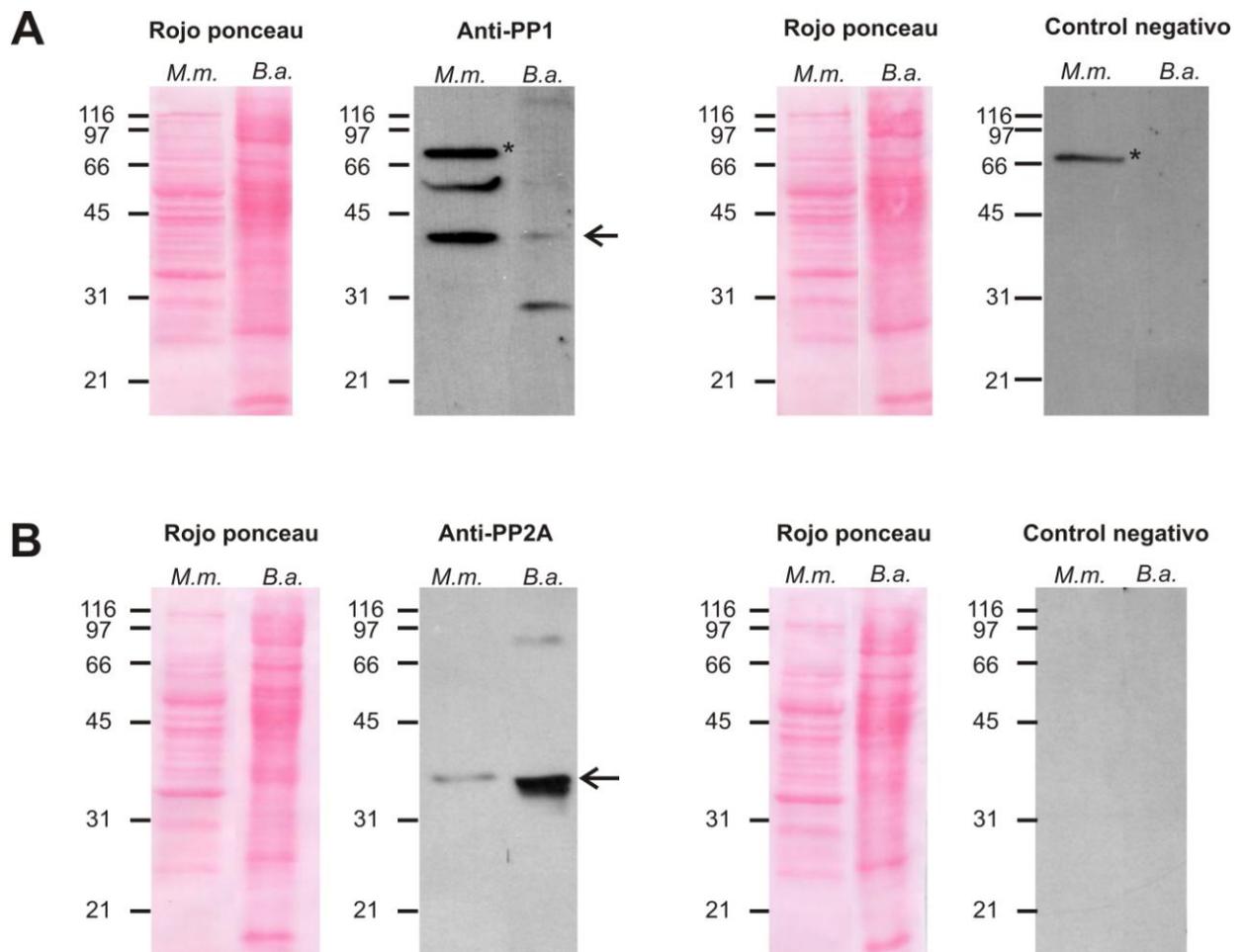


Figura 41: Immunodetección de PPI γ y PP2A en espermatozoides de *B. arenarum* (B.a.). A) Ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-proteína PPI γ . B) Ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-proteína PP2A. Como control positivo se utilizaron extractos de espermatozoides de ratón *Mus musculus* (M.m.) y como control negativo se omitió el anticuerpo primario. A la izquierda se muestra la tinción rojo ponceau de ambas membranas. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

En el ensayo de Western Blot anti-PP1 γ , se observó una banda inmunoreactiva tenue (ver flecha Fig. 41 A) de aproximadamente 37 kDa, la cual coincide con el peso molecular de la banda observada en el control positivo (extracto de espermatozoides de ratón). Se evidenció además una banda de mayor intensidad de menos de 30 kDa peso molecular. En el control negativo correspondiente al extracto proteico de espermatozoides de ratón se observó una banda inespecífica de aproximadamente 70 kDa (señalada con un asterisco * Fig. 41 A). Los ensayos de Western Blot utilizando los anticuerpos anti-PP2A muestran una banda inmunoreactiva de aproximadamente 36-38

kDa, la cual coincide con la banda del control positivo correspondiente al extracto proteico de espermatozoides de ratón (ver flecha de Fig. 41 B).

Para poner a prueba la hipótesis de que efectivamente habría serina/treonina fosfatasas involucradas en la regulación de la motilidad de los espermatozoides de *Bufo arenarum* se realizaron estudios farmacológicos. Se analizó primeramente el efecto del inhibidor de PPs, el ácido okadaico (OA), sobre los patrones de fosforilación por PKC y motilidad espermática. Se sabe que las fosfatasas PP1 y PP2A de mamíferos son extremadamente sensibles a la inhibición por OA (valores de IC₅₀ de 10 y 0,1nM respectivamente) en comparación con las fosfatasas del tipo PP2B (cuyo IC₅₀: 4 µM) y PP2C (insensible a OA) (Cohen, 1989). Este inhibidor ha sido previamente utilizado en ensayos *in vivo* de espermatozoides de varias especies de animales (Inaba, 2002; Krapf et al., 2010; Leclerc et al., 1996). Se preincubaron espermatozoides en ASP en presencia de OA durante 15 min. y luego se pasaron las células al medio hipotónico (ASP10%) manteniendo la concentración del inhibidor (Fig. 42).

En el panel A de la figura se observa un aumento en el patrón de fosforilación a medida que aumenta la concentración del inhibidor. Se observa un efecto inhibitorio claro a la mayor concentración testeada (1000 nM).

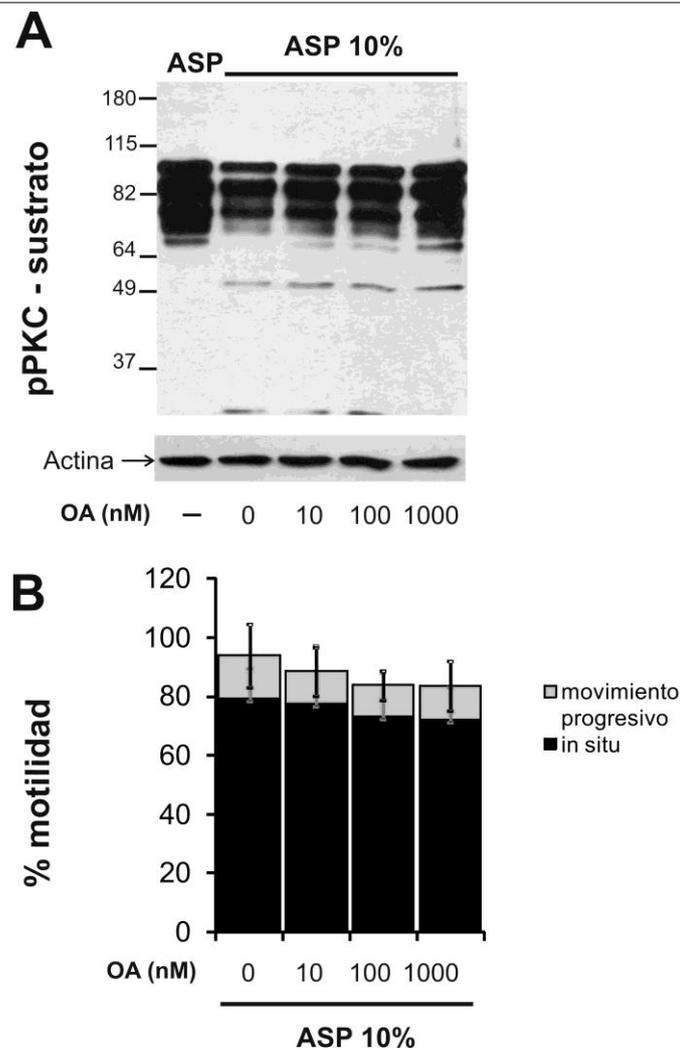


Figura 42: Efecto del inhibidor de serina/treonina fosfatasa, el ácido okadaico (OA), sobre los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo OA (0, 10, 100, y 1000 nM) durante 15 min. a 20°C y luego fueron incubados durante 5 min en ASP10% con inhibidor. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia del inhibidor OA. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$.

Cuando se analizó el efecto de OA sobre la motilidad de los espermatozoides, no se observaron cambios entre el control y los espermatozoides preincubados con el inhibidor (Fig. 42 B). Si las enzimas fosfatasa de anfibios se comportan farmacológicamente igual que las de mamíferos, estos resultados de inhibición con OA nos permiten descartar a la enzima PP2A como candidata de la desfosforilación de las proteínas espermáticas de *B. arenarum* ya que la misma se inhibe a muy bajas concentraciones de OA.

A fin de dilucidar la naturaleza de la/s fosfatasa/s involucrada/s en la desfosforilación de las proteínas espermáticas de sapo se analizó el efecto inhibitorio de cyclosporina A (CsA), un fármaco inmunosupresor aislado del hongo perteneciente al género *Tolypocladium*. Es un inhibidor específico de las proteínas serina/treonina fosfatasas del tipo calcineurina o PP2B que se une a la proteína citoplasmática ciclofilina y el complejo ciclosporina-ciclofilina inhibiría la fosfatasa calcineurina o PP2B (Borel, 2002). Se preincubaron los espermatozoides en ASP en presencia de CsA durante 15 min. y luego se pasaron las células al medio hipotónico (ASP10%) en presencia del inhibidor CsA (Fig. 43).

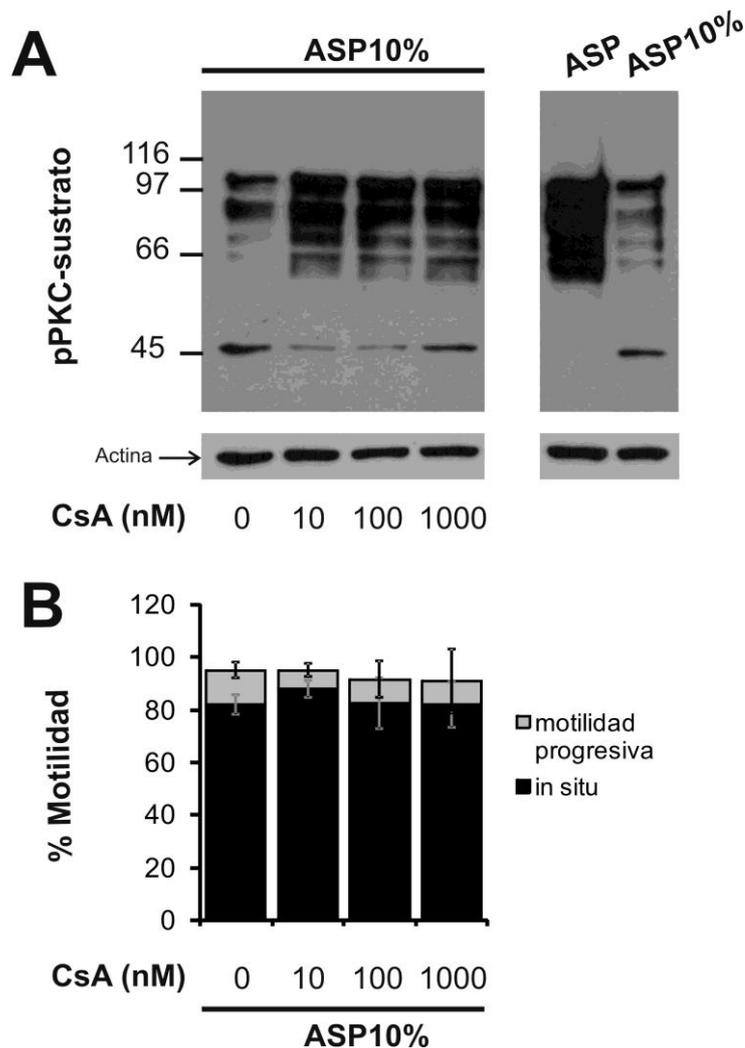


Figura 43: Efecto del inhibidor de serina/treonina fosfatasas, Cyclosporin (CsA), sobre los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo CsA (0, 10, 100, y 1000 nM) durante 15 min. a 20° C y luego fueron incubados durante 5 min en ASP10% con inhibidor. El ensayo de WB se realizó utilizando anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia del inhibidor CsA. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$.

En el panel A de la figura se observa una clara inhibición de las fosfatasas a la menor concentración testada (10 nM). Esto se evidencia por el aumento de la fosforilación de las bandas de alrededor de 60 a 110 kDa, las cuales se desfosforilan en medios hiposmóticos. Sin embargo, cuando se analizó la motilidad de los espermatozoides no se observaron cambios en la motilidad de los espermatozoides (Fig. 43 B).

Estos resultados sugieren que calcineurina (PP2B) podría ser la fosfatasa responsable de la desfosforilación de proteínas en el flagelo de espermatozoides de *Bufo*.

La enzima calcineurina (PP2B) es una fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina. Se ha detectado calcineurina en testículos de ratón (Moriya et al., 1995). Las observaciones de Tash y colaboradores (1988) demuestran la presencia de PP2B en flagelos de espermatozoides de perro, cerdo y erizo de mar, sugiriendo que podría tener un rol muy importante en la regulación del movimiento.

Como la activación de PP2B es dependiente de calcio, se analizó entonces el patrón de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides en presencia de un quelante de cationes divalentes como es el EGTA. Se incubaron los espermatozoides durante 15 min. en medio ASP en presencia de EGTA y posteriormente se los pasó al medio hiposmótico ASP 10% conteniendo EGTA (Fig. 44).

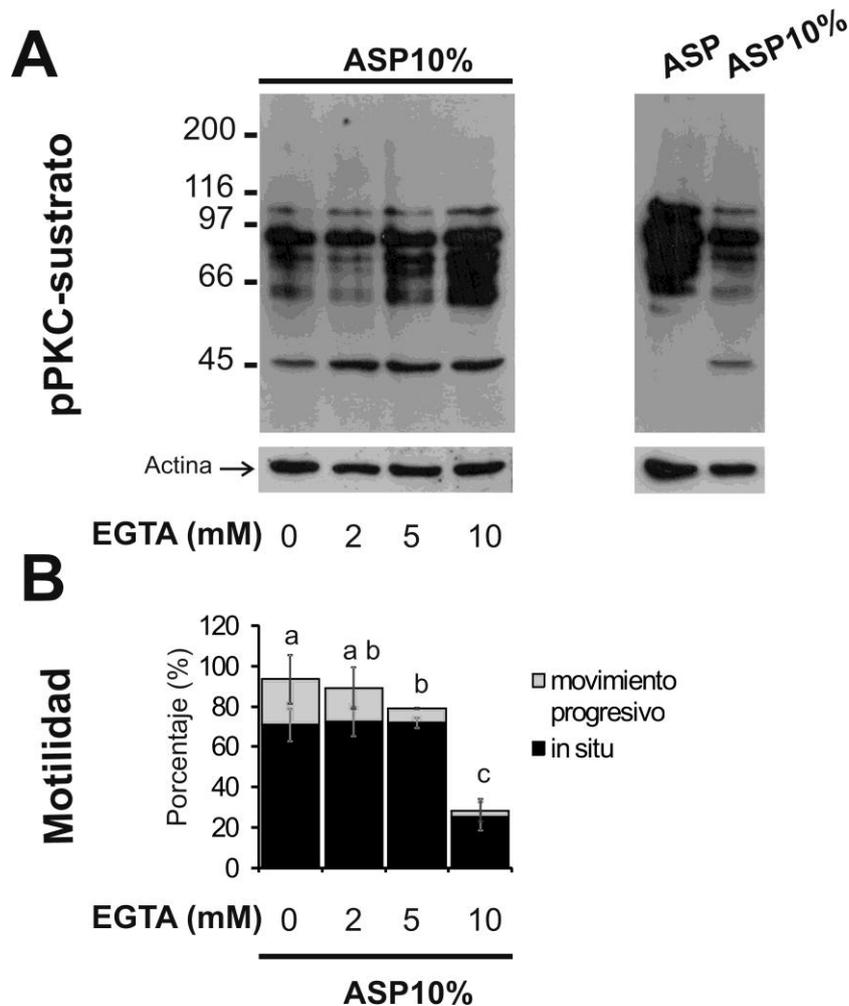


Figura 44: Efecto de EGTA sobre los niveles de fosforilación por PKC y la motilidad de los espermatozoides. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^7 células) fueron preincubados en ASP conteniendo EGTA (0, 2, 5, y 10 mM) durante 15 min. a 20°C y luego fueron incubados durante 5 min en ASP10% con EGTA. El ensayo de WB se realizó utilizando los anticuerpos anti-pPKC-sustrato. Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa. B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides incubados en ASP10% en presencia de EGTA. Los datos representan la media \pm desvío estándar; $n=3$. La media de cada grupo que presenta diferencias significativas se representa con diferentes letras ($p<0,0001$)

En el panel A izquierdo se puede observar como el quelante de calcio tiene un efecto sobre la fosforilación de los sustratos de PKC. A mayor concentración de EGTA, mayor intensidad en las bandas de 60 a 110 kDa. Eso significa que durante la activación flagelar en medio hipotónico, la ausencia de calcio inhibiría la actividad de las fosfatasas responsables de desfosforilar las proteínas espermáticas. Cuando se analizó la motilidad de los espermatozoides, se observó una diferencia estadísticamente significativa de los valores promedio de la motilidad total de los espermatozoides ($p<0,0001$). La motilidad total de los espermatozoides incubados con EGTA 10 mM, donde

la concentración de Ca^{2+} extracelular libre es de 13,74 nM (Maxchelator, Standford Univ, USA; maxchelator.stanford.edu) bajó de 90% a 30% (Fig. 44 B). Es necesario aclarar que en los ensayos de inhibición de la motilidad en presencia de EGTA es posible que se puedan estar alterando otras vías de señalización que están reguladas por calcio y que han sido ampliamente descritas en espermatozoides de varias especies, como es la vía dependiente de las quinasas CaM (Marin-Briggiler et al., 2005; Tash and Means, 1987; Zeng and Tulsiani, 2003).

Los resultados de este parte del capítulo de tesis sugieren que las proteínas fosfatasas involucradas en la desfosforilación de proteínas espermáticas de sapo, serían del tipo calcineurina (PP2B). Por ello, se evaluó la presencia de esta proteína mediante ensayos de inmunodetección por Western Blot, utilizando anticuerpos monoclonales anti-calcineurina humana. Se detectó una proteína de 58 kDa semejante al peso molecular esperado (61 kDa) (flecha negra de la Fig. 45) tanto en el control positivo (extracto proteico de cerebro de rata) como en el extracto de espermatozoides de *B. arenarum*.

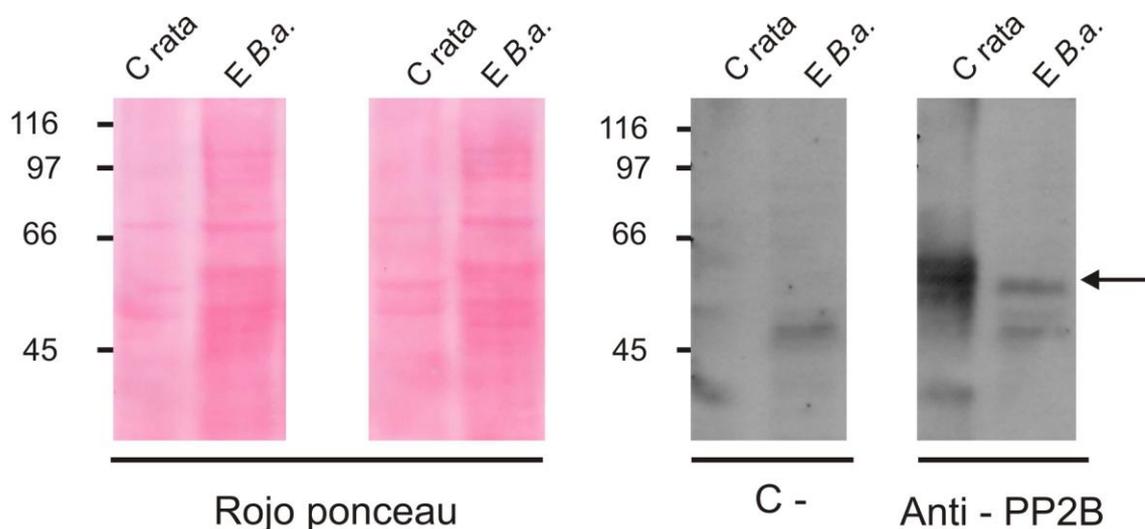


Figura 45: Inmunodetección de calcineurina (PP2B) en extractos proteicos de espermatozoides de *B. arenarum* (E B.a.). Ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-PP2B. Como control positivo se utilizaron 20 μg totales de extracto proteico de cerebro de rata (C rata). Como control negativo se omitió el anticuerpo primario. A la izquierda se muestra la tinción rojo ponceau de las membranas.

Identificación de proteínas blanco de PKC

Se propone que los espermatozoides son células transcripcional y traduccionalmente inertes y se postula que las modificaciones post-traduccionales, particularmente la fosforilación, sería el principal medio de regulación de sus funciones fisiológicas (Baker and Aitken, 2009). Es por eso que la fosfo-proteómica representa una de las herramientas más potentes para estudiar los mecanismos moleculares de regulación de las funciones espermáticas (Nagano et al., 2011). Con el objeto de identificar las proteínas que cambian su estado de fosforilación al activarse la motilidad, se utilizaron geles bidimensionales seguidos de la secuenciación de proteínas de interés. Los cambios de fosforilación fueron monitoreados a partir del análisis en simultáneo de los patrones de fosforilación por PKC (pPKC-sustratos) de extractos de espermatozoides activados (ASP10%) y no activados (ASP) (Fig. 46).

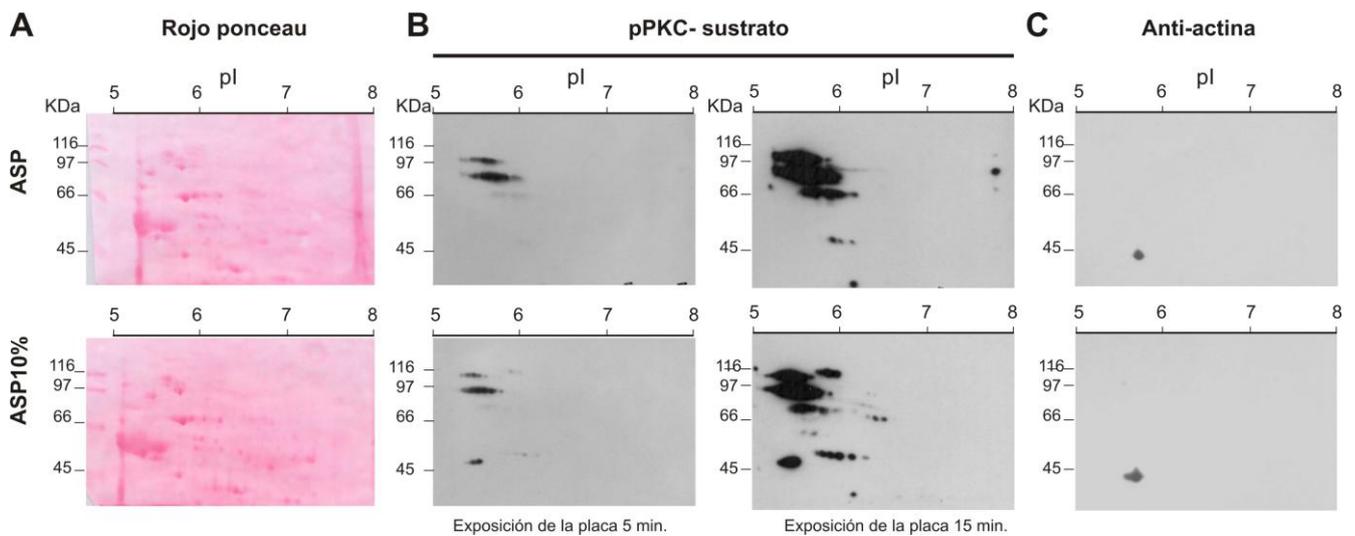


Figura 46: La activación de la motilidad induce cambios en el patrón de fosforilación por PKC. A) Suspensiones de espermatozoides (1×10^8 células) fueron incubados en ASP (arriba) y ASP10% (abajo) durante 5 minutos a 20°C . Los extractos proteicos fueron analizados en geles bidimensionales (rango de pH lineal 5-8 y al 8%) y transferidos a membrana de nitrocelulosa. Ambas membranas se tiñeron con rojo ponceau. B) Se realizó un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-pPKC sustrato. Durante el revelado se expusieron dos placas, durante 5 y 15 minutos. C) Se realizó un WB anti-actina (Actina) como control de siembra. Arriba de cada panel se muestra el rango de pH (5-8). A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

En los geles bidimensionales se observa un cambio mixto en el patrón de fosforilación de proteínas espermáticas. En el extracto de espermatozoides

activados (panel de abajo Fig. 46 B) se observa, por una lado desfosforilación de proteínas de 60 a 110 kDa de peso molecular y de punto isoeléctrico (pI) de 5 a 6,3 de pH y, por otro lado, se observa fosforilación de varias otras proteínas de pesos moleculares de alrededor de 45 a 55 kDa y de pI de entre 5,2 a 6,3 de pH. A modo de visualizar más claramente los resultados anteriores, en la figura se muestra la superposición de las imágenes (Fig. 47) de ambos ensayos de western blot correspondientes al panel de la derecha de la parte B de la Figura 46 (15 min. de exposición de las placas durante el revelado).

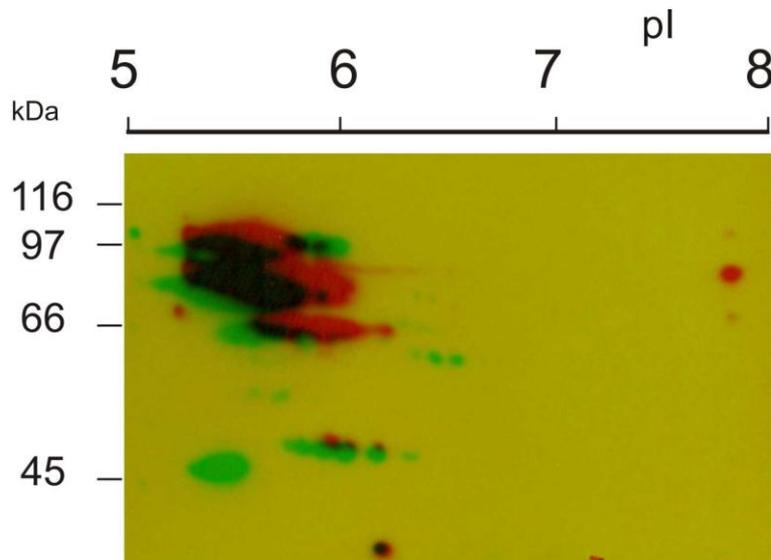


Figura 47: Superposición de las figuras correspondientes a los ensayos de WB de extractos de espermatozoides incubados en ASP (en rojo) vs ASP10% (en verde) correspondientes a los paneles de la derecha de la Fig. 46 B. Arriba de cada panel se muestra el rango de pH (5-8). A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Con el fin de identificar las proteínas que cambian su estado fosforilado se realizó, simultáneamente con los dos geles 2D anteriormente mencionados, un tercer gel, el cual fue teñido con azul de Coomassie (Fig. 48). A partir del análisis de las imágenes de los tres geles fue posible identificar en el gel teñido una proteína que se fosforila al activarse la motilidad de los espermatozoides en medio ASP10% y cuyo pI es de 5,25 y peso molecular aparente de 50 kDa. En la figura correspondiente al Western Blot anti-pPKC-sustrato (Fig. 46) se observan al menos dos “spots” que podrían corresponder a distintos estados de fosforilación de p50.

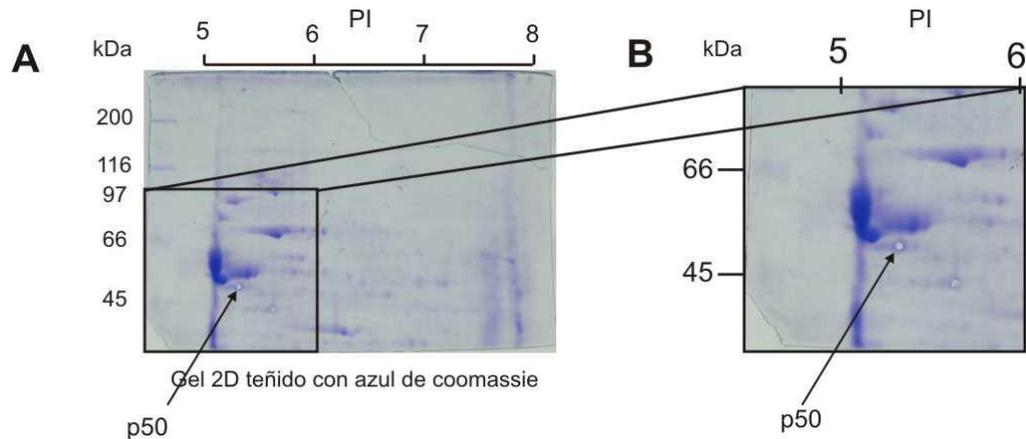


Figura 48: Suspensiones de espermatozoides (1×10^8 células) fueron incubados en ASP durante 5 minutos a 20°C . Los extractos proteicos fueron analizados en un gel bidimensional (rango de pH lineal 5-8 y al 8%) y posteriormente teñido con azul de Coomassie. Arriba de cada panel se muestra el rango de pH (5-8). A la izquierda de los paneles se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Se cortó la sección del gel (ver detalle en Fig. 48 B) y la misma fue enviada a secuenciar al Departamento de Proteómica y Espectrometría de Masa de la Universidad de Massachussets (Worcester, MA, USA).

Los resultados obtenidos a partir de la búsqueda en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando como referencia la base de datos de la rana *Xenopus laevis*, mostraron que 24 de los péptidos secuenciados son únicos de la subunidad beta de la enzima ATP sintetasa (ATPsyn- β).

En la siguiente tabla (Tabla 4) se detallan las proteínas resultantes de la búsqueda, incluyendo el valor del índice emPAI (“exponentially modified Protein Abundance Index”), que indica el grado de abundancia de los péptidos secuenciados en las distintas proteínas.

Listado de proteínas	
1	gi 148223359 Mass: 56338 Score: 5910 Matches: 146(144) Sequences: 26(26) emPAI: 20.87 
	mitochondrial ATP synthase beta subunit [Xenopus laevis]
2	gi 156119513 Mass: 49830 Score: 634 Matches: 17(17) Sequences: 13(13) emPAI: 1.83
	tubulin alpha chain [Xenopus laevis]
3	gi 6678469 Mass: 49877 Score: 618 Matches: 17(17) Sequences: 13(13) emPAI: 1.83
	tubulin alpha-1C chain [Mus musculus]
4	gi 45360809 Mass: 49847 Score: 595 Matches: 17(17) Sequences: 13(13) emPAI: 1.83
	tubulin, alpha 1c [Xenopus (Silurana) tropicalis]
5	gi 148229003 Mass: 47362 Score: 591 Matches: 23(22) Sequences: 14(14) emPAI: 3.11
	proteasome 26S ATPase subunit 4 isoform 1 [Xenopus laevis]
6	gi 147904788 Mass: 50147 Score: 585 Matches: 16(16) Sequences: 12(12) emPAI: 1.64
	tubulin, alpha 1a [Xenopus laevis]
7	gi 148222316 Mass: 49777 Score: 527 Matches: 17(17) Sequences: 12(12) emPAI: 1.83
	hypothetical protein LOC379202 [Xenopus laevis]
8	gi 147902158 Mass: 44801 Score: 459 Matches: 13(13) Sequences: 8(8) emPAI: 1.26
	dynactin subunit 2-B [Xenopus laevis]
9	gi 148222603 Mass: 44710 Score: 423 Matches: 11(11) Sequences: 7(7) emPAI: 0.97
	dynactin subunit 2-A [Xenopus laevis]
10	gi 147905228 Mass: 50054 Score: 407 Matches: 12(12) Sequences: 10(10) emPAI: 1.08
	tubulin, alpha 3c [Xenopus laevis]
11	gi 148224762 Mass: 52583 Score: 220 Matches: 6(6) Sequences: 5(5) emPAI: 0.42
	FAS-associated factor 2-A [Xenopus laevis]
12	gi 30316328 Mass: 51155 Score: 130 Matches: 4(4) Sequences: 4(4) emPAI: 0.27 RecName: Full=RuvB-like 2; AltName: Full=Reptin
13	gi 138532 Mass: 53464 Score: 99 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) emPAI: 0.12 RecName: Full=Vimentin-4
14	gi 1346341 Mass: 29888 Score: 95 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) emPAI: 0.22 RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 47 kDa
15	gi 156119465 Mass: 55418 Score: 84 Matches: 3(3) Sequences: 3(3) emPAI: 0.18 keratin, type II cytoskeletal [Xenopus laevis]
16	gi 147900512 Mass: 47829 Score: 82 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.07 protein disulfide isomerase family A, member 6 [Xenopus laevis]
17	gi 148233255 Mass: 48970 Score: 82 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) emPAI: 0.13 dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase
18	gi 148222436 Mass: 50063 Score: 79 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) emPAI: 0.13 intraflagellar transport 52 homolog [Xenopus laevis]
19	gi 148222525 Mass: 52239 Score: 68 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.06 5'-nucleotidase domain containing 1 [Xenopus laevis]
20	gi 148236203 Mass: 50267 Score: 64 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.06 MGC84118 protein [Xenopus laevis]
21	gi 148232469 Mass: 42958 Score: 56 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.07 keratin 18 [Xenopus laevis]
22	gi 13242237 Mass: 70827 Score: 54 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.04 heat shock cognate 71 kDa protein [Rattus norvegicus]
23	gi 308818173 Mass: 57746 Score: 48 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.05 sperm protein 17 [Xenopus laevis]
24	gi 76780146 Mass: 27426 Score: 45 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.12 LOC733345 protein [Xenopus laevis]
25	gi 4506713 Mass: 17953 Score: 37 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.18 ubiquitin-40S ribosomal protein S27a precursor [Homo sapiens]
26	gi 122034 Mass: 13897 Score: 37 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.23 RecName: Full=Histone H2B 1.2; Short=H2B1.2
27	gi 147905658 Mass: 28711 Score: 35 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.11 ribosomal protein L7 [Xenopus laevis]
28	gi 189217597 Mass: 87803 Score: 33 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.04 phospholipase A2-activating protein [Xenopus laevis]
29	gi 9988777 Mass: 41750 Score: 26 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.08 protein kinase AIRK2 [Xenopus laevis]
30	gi 148231833 Mass: 114059 Score: 24 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.03 ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2 [Xenopus laevis]
31	gi 147907190 Mass: 65682 Score: 21 Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.05 BCL2-associated athanogene 3 [Xenopus laevis]

Tabla 4: Listado de proteínas (en negrita) obtenidas durante la búsqueda en la base de datos de NCBI en las cuales están ordenadas de mayor a menor número de puntuación (score). Se detalla el número de identificación de la base de datos GenBank, masa (mass), puntuación (score), coincidencias (matches), número de secuencias y el índice de emPAI.

Como muestra la tabla, la mayoría de los péptidos secuenciados están presentes en la enzima ATPsyn- β , cuyo valor de emPAI= 20,87 (señalado con flecha roja en la Tabla 4).

El complejo ATP sintetasa, conocido como FoF1-ATP sintetasa, es el encargado de sintetizar adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato y un grupo fosfato, mediante energía suministrada por un flujo de protones (Mitchell, 1961). Está localizado en la membrana de las mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Este complejo posee dos regiones (ver esquema en Fig. 49); la región transmembrana Fo y la región F1. Está formado por varias subunidades y la actividad catalítica está localizada en las subunidades beta (β).

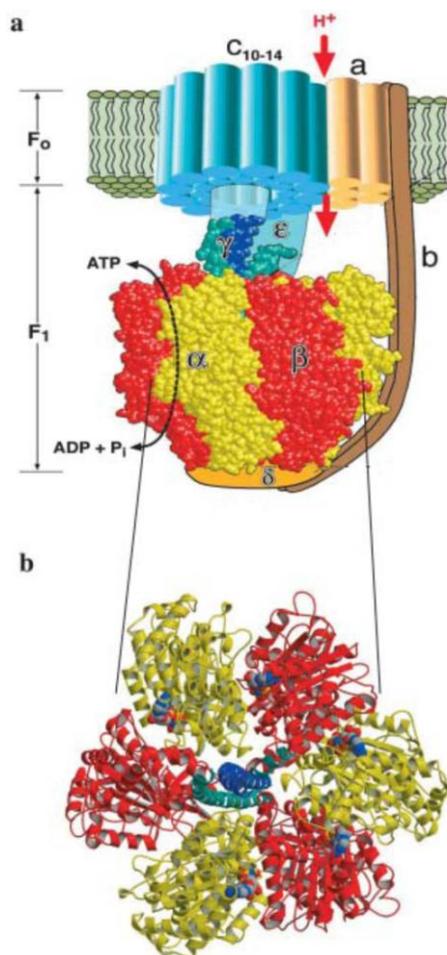


Figura 49: Esquema del complejo Fo F1 - ATP sintetasa. Fo región transmembrana y la región F1. a) Vista lateral del complejo. b) Complejo F1-ATP sintetasa. Las subunidades beta (β) están en rojo, las subunidades alpha (α) en amarillo y el dominio gamma (γ), en azul. Adpatado de Antes y cols. (2003).

En una segunda búsqueda realizada en la base de datos SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>) se observó que la mayoría de los péptidos secuenciados están presentes en la ATPsyn- β de otras especies, sugiriendo que la secuencia de la proteína está altamente conservada entre los distintos grupos de animales. Para corroborar esto último, se alinearon las secuencias disponibles en la base de datos de NCBI de la enzima ATPsyn- β de algunos animales; pez teleósteo *Danio rerio* (NP_001019600.1), anfibios anuros *Xenopus laevis* (NP_001080126.1) y *X. tropicalis* (NP_001001256.1), ave *Gallus gallus* (NP_001026562.1), roedor *Mus musculus* (ABD77233.1) y hombre *Homo sapiens* (NP_001677.2) (Fig. 50).

Como se observa en la figura, las secuencias de la enzima ATPsyn- β analizadas están altamente conservadas. Las secuencias aminoacídicas disponibles en la base de datos NCBI de la ATPsyn- β de los anfibios *X. laevis* y *X. tropicalis* (Fig. 50) presentan 525 aminoácidos y el porcentaje de identidad entre ambas secuencias es del 98,28% (homología del 99,62%).

De los péptidos secuenciados más abundantes se identificaron 24 péptidos cuyas secuencias se detallan en la Tabla 5.

#	secuencia aminoacídica del peptido	residuos
1	KILQDYKS	423-430
2	KVLDAGTPIRI	121-131
3	KIGLFGGAGVGKT	198-210
4	RIPVGPETLGRI	130-141
5	KVVDLLAPYAKG	185-196
6	RTIAMDGTEGLVRG	106-119
7	RIMNVIGEPIDERG	140-153
8	KAHGGYSVFAGVGERT	222-237
9	RFTQAGSEVSALLGRI	307-322
10	RVALTGLTVAEYFRD	278-292
11	KTVLIMELINNVAKA	209-223
12	KVALVYGQMNEPPGARA	261-277
13	RLVLEVAQHLGENTVRT	91-107
14	RDQEGQDVLLFIDNIFRF	291-308
15	KVLDAGTPIRIPVGPETLGRI	121-141
16	RIMNVIGEPIDERGPITTKQ	140-159
17	RAIAELGIYPAVDPLDSTSRI	384-404
18	REGNDLYHEMIESGVINLKD	238-257
19	KSLQDIIAILGMDELSEEDKL	429-449
20	RIPSAVGYQPTLATDMGTMQERI	321-343
21	REGNDLYHEMIESGVINLKDTTSKV	238-262
22	KSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSRA	429-454
23	KQFAAIHAEAPEFVEMSVEQEILVTGIKV	158-186
24	KGSITSVQAIYVPADDLTPAPATTF AHL DATTVLSRA	348-385

Tabla 5: Listado de los 24 péptidos que mostraron el 100% de identidad con la secuencia de la enzima ATP-syn β de *Xenopus laevis* (NP_001080126.1). Se muestra la secuencia y la posición de los residuos secuenciados.

Todos los péptidos mostraron el 100% de identidad con la secuencia de la enzima ATPsyn- β de *Xenopus laevis*. El porcentaje secuenciado abarca el 64,5 % de la secuencia completa de la proteína (secuencia en rojo de la Fig. 51 A). Mediante el análisis de la secuencia en la base de datos NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) se identificaron tres dominios proteicos conservados: un dominio barril beta, el dominio de unión al nucleótido y el dominio carboxilo terminal.

La secuencia de la enzima ATPsyn- β de *X. laevis* tiene un peso molecular y un punto isoeléctrico teóricos de 56 kDa y 5,25 respectivamente (http://web.expasy.org/compute_pi) y presenta 24 residuos serina (en negrita es la Fig. 51).

La secuencia de la ATPsyn- β de *Xenopus laevis* fue analizada *in silico* por siete predictores de sitios putativos de fosforilación: NetPhos, PhosphoMotif, DISPHOS, KinasePhos, GPS 2.1.1, PPSP y PhsoMod. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

	S ₉	S ₂₀	S ₂₁	S ₃₃	S ₃₉	S ₅₇	S ₁₇₄	S ₂₅₀	S ₃₁₃	S ₃₂₄	S ₃₅₀	S ₃₅₃	S ₄₀₀	S ₄₀₂	S ₄₃₀	S ₄₄₄	S ₄₅₂	S ₄₆₂	S ₅₂₅
NetPhos	X			X	X		X				X		X	X	X	X		X	
PhosphoMotif Finder	X	X		X	X	X				X	X							X	
Disphos			X	X	X											X	X		X
Kinase Phos								X	X	X							X		
GPS 2.1.1					X					X	X	X					X	X	
PPSP					X					X	X						X		
PostMod	X				X						X						X		

Tabla 6: Análisis *in silico* de los sitios putativos de fosforilación en residuos de serina (S) presentes en ATPsyn- β de *Xenopus laevis*. Los sitios de fosforilación fueron analizados utilizando NetPhos, PhosphoMotif, DISPHOS, KinasePhos, GPS 2.1.1, PPSP y PhsoMod. El número siguiente a la S corresponde a la posición del residuo de serina de la secuencia de la proteína

El patrón de sitios putativos de fosforilación varió dependiendo del predictor utilizado, por lo que se tuvieron en cuenta sólo los residuos de serina que fueran predichos por al menos tres de los siete predictores de sitios de fosforilación utilizados (pintados de gris claro en Tabla 6). De esta manera, se podrían considerar los siete residuos de serina (S) S₉, S₃₃, S₃₉, S₃₂₄, S₃₅₀, S₄₅₂ y S₄₆₂ como fosfo-aceptores putativos (señalados con círculos de borde negro de la Fig. 51). Solo tres de estos sitios están dentro de la región secuenciada.

```

1 MLGAVGRCSAGALRALRKPTSSSPVQLGQNLLRYSPAALHSRRDYAAQTSAAAKPGTASGRIVAVIGAVVDV 70
  QFDEDLPPILNALEVQGRDTRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLVRGQKVLDAGTPIRIPVGPETLGR 140
  IMNVIGEPIDERGPITTKQFAAIHAEAPEFVEMSVEQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKT 210
  VLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVINLKDTTSKVALVYQGMNEPPGARARVA 280
  LTGLTVAEYFRDQEGQDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKS 350
  ITSVQAIYVPADDLTDPPATTFAHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTRIMDPNIVGLEHYDVARG 420
  VQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHLGKLVPLKDTIKGFQQ 490
  ILHGAYDNLPEQAFYMGPIEEAVTKAEKLAEEHS 525

```

Figura 51: Secuencia aminoacídica de la enzima ATPsyn- β de *Xenopus laevis* (NP_001080126.1). Con letras rojas se indican los péptidos secuenciados. En amarillo se resalta el dominio barril beta. La región resaltada en rosa representa el dominio de unión al nucleótido. Los residuos de serinas están en negrita. Las serinas enmarcadas en un contexto “RXXS” están recuadradas con bordes negros. Los sitios reconocidos por los anticuerpos anti-pPKC-sustrato se señalan subrayados. Los residuos de serina predichos por al menos 3 predictores están marcados por un círculo de bordes negro.

El sitio consenso por excelencia de fosforilación de las quinasa PKC es “RXXS” (Pearson and Kemp, 1991). Se identificaron en la secuencia sólo dos de estos motivos correspondientes a las serinas S324 y S462 (ver recuadros negros en la secuencia de la Fig. 51). Existen estudios que indican que los sitios consenso de fosforilación podrían variar según la isoforma de PKC. Sin embargo se ha informado que la mayoría de las isoformas de PKC preferencialmente fosforilan sitios donde hay un aminoácido hidrofóbico en la posición +1 carboxilo terminal de la serina fosforilada (Nishikawa et al., 1997). Según lo informado por el proveedor, los anticuerpos anti-pPKC sustrato (Cell Signaling, #2261) reconocen proteínas o péptidos que presentan serinas fosforiladas en el siguiente contexto: (R/K)X(pS)(Hyd)(R/K), donde pS, son serinas fosforiladas, Hyd: es cualquier aminoácido hidrofóbico, X es cualquier aminoácido y R/K, arginina/lisina respectivamente. En la secuencia de ATPsyn- β de *Xenopus laevis* se detectaron tres sitios posibles de reconocimiento de los anticuerpos anti-pPKC-sustrato incompletos en las Serinas S9, S33 y S350 (ver residuos subrayados en la secuencia de la Fig. 51). Solo uno de estos sitios está dentro de la región secuenciada.

Por último y para poner a prueba la hipótesis de que p50 es efectivamente la ATPsyn- β de *Bufo arenarum*, se procedió a validarlo experimentalmente. Se realizó un análisis por Western blot utilizando anticuerpos comerciales monoclonales específicos anti-ATPsyn- β de ratón (Millipore, Temecula, CA). Efectivamente se identificó una banda proteica de 50 kDa (Fig. 52).

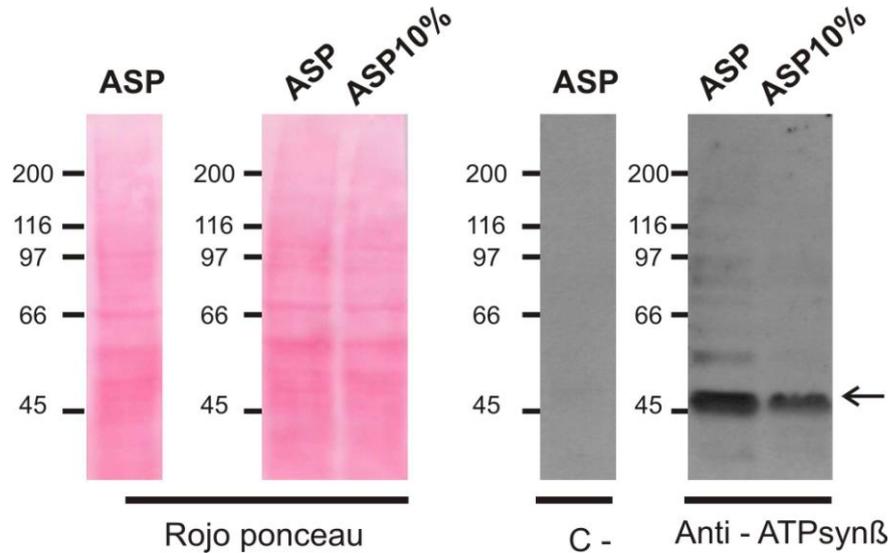


Figura 52: Inmunodetección de ATPsyn- β en extractos proteicos de espermatozoides de *B. arenarum* incubados en ASP o ASP10%. Ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-ATPsyn- β . Como control negativo se omitió el anticuerpo primario. A la izquierda se muestra la tinción rojo ponceau de las membranas.

DISCUSION PARCIAL

Los resultados de este último capítulo muestran que el paso de los espermatozoides de *Bufo arenarum* a un medio hiposmótico induce cambios en el patrón de fosforilación de proteínas sustratos de PKC, específicamente en residuos de serina. Se observa, por un lado, proteínas que se desfosforilan (60-100 kDa) y por otro, fosforilación de al menos una proteína (p50). Estudios realizados en espermatozoides de erizo de mar, donde se utilizaron los mismos anticuerpos anti-pPKC-sustrato, muestran un aumento de la fosforilación por PKC en espermatozoides activados. Además, a partir de experimentos de fraccionamiento subcelular e inmunodetecciones, observan que la mayoría de las proteínas fosforiladas estarían asociadas al flagelo del espermatozoide de erizo de mar (White et al., 2007).

Los resultados de los ensayos de activación e inhibición de PKC realizados en espermatozoides de *Bufo* nos permiten hipotetizar sobre la identidad de la/s isoforma/s de la/s PKC que estaría/n involucrada/s en la regulación de esta vía de transducción de señal. Según nuestros resultados las PKC convencionales o novedosas estarían involucradas en la vía de señalización de la activación

flagelar ya que análogos de DAG inducen el mismo patrón de fosforilación por PKC. Descartamos todas aquellas isoformas insensibles al efecto de los esteroides de forbol, como lo son las enzimas PKC atípicas (PCKa). A partir de los resultados de los ensayos en presencia de EGTA en medios hiposmóticos (Fig. 44) podemos especular también sobre la identidad de la quinasa PKC que fosforila a p50 durante la activación de la motilidad. La fosforilación de p50 se da incluso en presencia de EGTA, lo que quiere decir que la PKC responsable sería alguna del tipo PKC novel (dependientes de DAG, pero independientes de calcio). Probablemente las quinasas PKC, que fosforilan las proteínas de 60-100 kDa cuando los espermatozoides no se mueven, no sean las mismas que las quinasas PKC que fosforilan a p50. Es lógico pensar que exista una compartimentalización de la señal.

Las primeras evidencias donde se señala la participación de la quinasa PKC en la regulación de la motilidad de espermatozoides fueron expuestas por Rotem y colaboradores (Rotem et al., 1990b). Estudiaron el efecto de esteroides de forbol (PMA) y análogos membrana permeables de DAG (OAG) sobre la motilidad de los espermatozoides de humanos y observaron que la motilidad aumentaba según dosis y tiempo dependientes. Demostraron además que el aumento de la motilidad provocado por los activadores era arrestado en presencia de inhibidores específicos de PKC. Los resultados de los ensayos con el éster de forbol en medio isosmótico (Fig. 38) no mostraron una inducción de la motilidad. Esto significa que la activación de PKC no es suficiente para activar el batido flagelar de espermatozoides de sapo. Sin embargo, sí se observó una disminución de la motilidad progresiva de los espermatozoides incubados en medios hiposmóticos en presencia del inhibidor de PKC Gö 6983. En relación a esto es importante mencionar que se ha informado que Gö 6983 también podría actuar como inhibidor de canales de calcio dependientes de voltaje ("L-type Ca²⁺ channel") (Welling et al., 2005). No se puede descartar que el efecto observado de Gö 6983 sobre la motilidad sea inespecífico.

Es necesario continuar con el análisis para dilucidar las funciones de PKC en los espermatozoides de sapo. Los anticuerpos utilizados en este trabajo reconocen sólo proteínas fosforiladas por PKC exclusivamente en residuos de

serina. Sería aún más informativo realizar los mismos ensayos con anticuerpos que reconozcan proteínas fosforiladas por PKC en residuos de treonina y de este modo contar con más información para el análisis de este mecanismo.

Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio de espermatozoides incubados en ASP10% en presencia de H-89 (inhibidor de PKA) muestran la completa inhibición de la fosforilación por PKC de la proteína p50. Este resultado sugiere que la fosforilación de p50 dependería de la activación previa de PKA. Continuar con los ensayos de “cross-talk” resulta de mucha importancia para dilucidar si las vías de señalización estudiadas están realmente vinculadas (este capítulo y Capítulo II de Resultados).

Desde hace muchos años los espermatólogos han destinado muchos esfuerzos en identificar las proteínas espermáticas que cambian su estado de fosforilación durante los diferentes procesos fisiológicos que le ocurren a los espermatozoides. Algunos grupos de investigación han podido avanzar en la identificación de algunas proteínas que cambian su estado de fosforilación durante la activación de la motilidad de espermatozoides de varias especies de vertebrados de fecundación externa. Por ejemplo, Zilli (2008) y colaboradores informaron que proteínas de anclaje de PKA (AKAP), enzimas metabólicas como AcetilCoA-sintetasa y una proteína inhibidor de fosfatasa se fosforilarían al activarse la motilidad de espermatozoides de dorado (*Sparus aurata*). En espermatozoides de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) se ha informado que proteínas relacionadas a las dineínas de cadena liviana (“Tctex2-related dynein light chain”) serían fosforiladas durante la activación de la motilidad (Inaba, 2003).

Hasta el momento no hay estudios de identificación de fosfoproteínas espermáticas en anfibios y menos aún asociadas a la activación de la motilidad. En este trabajo de tesis ha sido posible identificar una proteína que se fosforila en residuos de serina, al activarse la motilidad de los espermatozoides. Esta proteína es la subunidad beta de la enzima ATP sintetasa. El complejo ATP sintetasa está ampliamente estudiado y en algunos sistemas se ha informado la regulación de su actividad por fosforilación (Hojlund et al., 2003; Hojlund et al., 2010; Kane et al., 2010). Curiosamente, hace algunos años, Fujinoki y colaboradores (2001) informaron la existencia de

una proteína de aproximadamente 58 kDa de masa molecular que se fosforilaría en residuos de serina al activarse la motilidad de los espermatozoides de hámster. Más interesante aún resultó cuando lograron identificarla como la ATP sintetasa subunidad beta. Esta proteína se localiza en la cabeza y a lo largo de toda la cola de los espermatozoides de hámster, es por eso que estos autores especularon sobre su función. Hipotetizan que estaría asociada, por un lado, a la producción de ATP en mitocondrias y, por otro lado, funcionaría como una bomba de protones a lo largo de todo flagelo (Fujinoki et al., 2003). Experimentos futuros son necesarios para dilucidar la localización e importancia biológica de la proteína ATP sintetasa beta de los espermatozoides de *B. arenarum*.

Como se mencionó en la primer parte de esta discusión, el cambio del patrón de fosforilación de los sustratos de PKC inducido por el paso de los espermatozoides a un medio hipotónico, incluye una disminución de la fosforilación en varias proteínas de 60 a 100 kDa de peso molecular aparente. A partir de los resultados de las inmunofluorescencias se puede concluir además que las proteínas espermáticas que se desfosforilan estarían asociadas al flagelo de los espermatozoides. Esto último sugiere la activación de proteínas fosfatasa flagelares durante la activación de la motilidad.

Al igual que ha sido descrito en otras especies de animales, fue posible detectar, utilizando anticuerpos comerciales heterólogos, la presencia de tres tipos de fosfatasas en espermatozoides de sapo. La fosforilación de proteínas del axonema está negativamente controlada por varias proteínas fosfatasas. En espermatozoides de gallo, ambas fosfatasas PP1 y PP2A están involucradas en la regulación de la motilidad (Ashizawa et al., 1997; Ashizawa et al., 1994) y por otra parte, se ha informado que la proteína fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina (PP2B) desfosforilaría proteínas dineínas de cadena liviana de espermatozoides de erizo de mar (Tash, 1990). A partir de los ensayos realizados en este trabajo de tesis y bajo el supuesto de que las fosfatasas de anfibios responden farmacológicamente igual que las de los mamíferos, se puede concluir que las fosfatasas candidatas responsables de desfosforilar las proteínas espermáticas serían del tipo PP2B o calcineurina. En base a los hallazgos en otras especies de animales y a nuestros resultados es posible

especular sobre la función de PP2B, la cual podría estar regulando la maquinaria del axonema de los espermatozoides de *B. arenarum*. Según los resultados obtenidos de los ensayos realizados con el inhibidor ácido okadaico no se puede descartar la participación de las fosfatasa tipo PP1.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en el presente trabajo de tesis aportan datos significativos a la comprensión de procesos involucrados en la activación de la motilidad espermática de anfibios anuros.

El diseño acertado de los cuatro medios iónicos nos ha permitido estudiar por separado los distintos fenómenos que le ocurren al espermatozoide antes de fecundar al ovocito. El medio ASP simula las condiciones testiculares (al menos en cuanto a las concentraciones de sodio y potasio), donde los espermatozoides permanecen quiescentes. Por otro lado, sabemos que el medio isosmótico EW ASP desencadena los mecanismos de “capacitación” de los espermatozoides (Krapf et al., 2009; Krapf et al., 2007), sin activar las vías de señalización correspondientes a la activación de flagelar. El medio diluido ASP (ASP10%) activa el batido flagelar, permitiéndonos estudiar la activación inducida exclusivamente por hiposmolaridad. Por último, el medio hipotónico EW, que contiene los factores que difunden de la cubierta gelatinosa, simula el medio natural de fecundación, por lo tanto, es el más complejo y, a la vez, el más interesante para analizar.

La membrana plasmática juega un papel importante en la respuesta del espermatozoide al entorno. Las características propias de la membrana le confieren la capacidad dinámica de regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que pueden conducir, entre otros, a la activación de la motilidad espermática. La activación de la motilidad de espermatozoides de sapo está gobernada por la disminución de la osmolaridad del medio extracelular. Hemos visto que esta activación es reversible, lo cual sugiere la presencia de un “sensor” en la membrana plasmática, el cual es definitivamente sensible a cambios de presión osmótica. En este sentido, este mecanismo regulatorio observado en espermatozoides de sapo es compartido con los de peces ciprínidos (Perchee Poupard et al., 1997).

Resultados de esta tesis demuestran una dependencia del calcio extracelular en la activación flagelar de espermatozoides de sapo. Curiosamente en peces

ciprínidos, la presencia de calcio extracelular es un prerrequisito para la iniciación de la motilidad. El choque hiposmótico produce una hiperpolarización de la membrana, la cual removería la inactivación de los canales de calcio (Krasznai et al., 2000). Se sugiere además, que el ingreso de calcio extracelular a través de canales específicos induciría la activación de la motilidad a través de un sistema dependiente de proteína calmodulina (Krasznai et al., 2000). Este trabajo de tesis no se analizó exhaustivamente el rol del calcio en la regulación de la motilidad por lo que resulta muy interesante avanzar con los estudios en este aspecto.

Una de las observaciones disparadoras de este trabajo de tesis fue el efecto de EW sobre la motilidad espermática: el valor promedio del porcentaje de células que presentan motilidad progresiva fue significativamente mayor en comparación con lo observado en espermatozoides incubados en el medio hipotónico sin factores difusibles (ASP10%). Esto último nos permite hipotetizar que existen componentes que difunden rápidamente de la matriz extracelular de los ovocitos que modulan la motilidad de los espermatozoides homólogos. Supuesto esto, ¿Qué mecanismo hace que la motilidad cambie de *in situ* a progresiva? ¿Significa un batido flagelar más rápido? ¿Implica la activación de otras vías de señalización intracelular que determinan mayor energía disponible? ¿O tiene que ver con un movimiento asimétrico del flagelo? Todos éstos son interrogantes serían muy interesantes para abordar en el futuro. Avanzar con las investigaciones en la identificación de los componentes de EW y continuar con el análisis de sus efectos sobre los espermatozoides resulta de gran relevancia.

En este trabajo de tesis se ha podido avanzar en el conocimiento sobre las vías de señalización intracelulares que regulan la motilidad espermática del sapo. Los resultados se resumen en la Figura 53 y se destacan los siguientes puntos:

1. La señal de iniciación de la activación flagelar está dada por la hipotonicidad del medio de fecundación y está modulada por los factores difusibles presentes en EW.
2. Una proteína “sensora” al estrés osmótico transduciría la señal hacia el interior celular, activando una enzima adenilato ciclasa transmembrana (tmAC).

3. La enzima tmAC sería la responsable de sintetizar AMPc.
4. Los altos niveles de AMPc activan a la quinasa PKA, la cual fosforila proteínas blanco (en residuos de serina/treonina) que se encuentran en la sección post-acrosomal de la cabeza y pieza media. Esta vía regulatoria no depende ni de calcio ni de bicarbonato.
5. Por otro lado, la hiposmolaridad induce la activación de serina/treonina fosfatasas, las cuales desfosforilarían proteínas sustratos de PKC (en fosfo-serina), localizadas mayoritariamente en el flagelo del espermatozoide.
6. El calcio extracelular es necesario para la activación flagelar. Su ausencia inhibe la actividad de las serina/treonina fosfatasas.

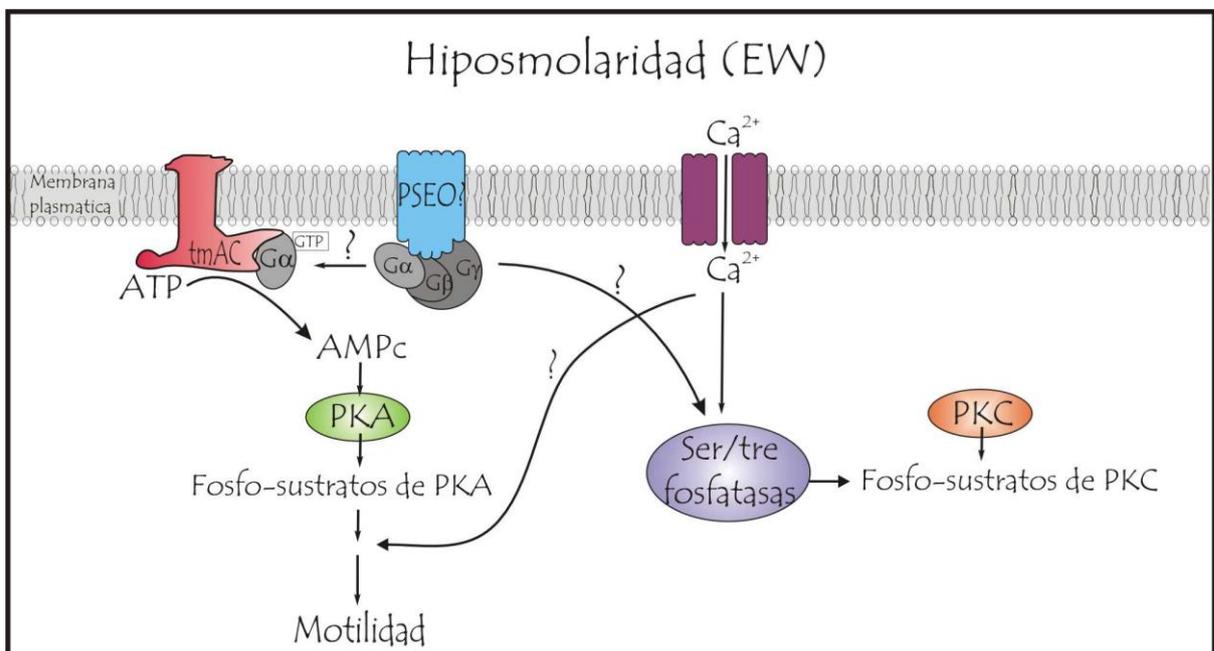


Figura 53: Modelo de estudio propuesto sobre las vías regulatorias de la activación motilidad espermática en *Bufo arenarum*. Una proteína sensible a estrés osmótico (PSEO) registra la disminución de la osmolaridad del medio hiposmótico de fecundación (EW) y activaría a una enzima adenilato ciclasa transmembrana (tmAC). La estimulación de la tmAC provoca un aumento citoplasmático de AMPc el cual activaría a la proteína quinasa PKA. La activación de PKA promovería la fosforilación de proteínas espermáticas y modularía la motilidad. Por otro lado, el medio hipotónico activaría a proteínas serina/treonina fosfatasas las cuales desfosforilarían fosfosustratos de PKC. El calcio extracelular es necesario para la activación flagelar en medio hipotónico y su ausencia inhibiría a las serina/treonina fosfatasas. EW: egg water. γ, β, y α significan proteínas Gγ, Gβ, y Gα.

Los espermatozoides maduros son células especializadas incapaces de realizar la transcripción de genes y de sintetizar proteínas. En este contexto particular, la respuesta celular a los estímulos se basa en cascadas de señalización intracelular basados en modificaciones postraduccionales rápidas tales como la fosforilación/desfosforilación de proteínas. El equilibrio entre la

fosforilación y la desfosforilación de los receptores intracelulares resulta en la activación/bloqueo de vías de señalización específicas, las cuales juegan un papel fundamental en los procesos biológicos. La coordinación y organización de la actividad quinasa/fosfatasa a lo largo del espermatozoide genera un sistema exquisitamente coordinado de regulación espacio-temporal de sus procesos fisiológicos (Luconi et al., 2011). Los resultados de esta tesis muestran que existe una “compartimentalización” de las vías de señalización analizadas. Observamos que durante la activación de la motilidad las proteínas que son fosforiladas por PKA se localizan en pieza media y cabeza, mientras que los sustratos de PKC que son desfosforilados están ubicados mayormente en el flagelo.

La identificación de las proteínas que están involucradas en estas vías de señalización aporta datos fundamentales para el entendimiento de la fisiología espermática. En este trabajo de tesis se ha podido identificar al menos una proteína (ATP sintetasa β) que sería fosforilada por una quinasa PKC durante la activación flagelar. Resulta de sumo interés avanzar en los estudios de fosfo-proteómica espermática abordado desde diferentes modelos de estudio.

Actualmente se estima que el 20% de las parejas humanas en edad reproductiva son infértiles y casi la mitad de los casos se atribuyen a causas masculinas (du Plessis et al., 2011). Una de las patologías de infertilidad masculina es la astenozoospermia o motilidad espermática pobre. Está bastante aceptado que espermatozoides inmóviles o de baja motilidad son incapaces de fecundar al ovocito sin la asistencia de la medicina clínica reproductiva (Turner, 2006). Entender los mecanismos que regulan la motilidad espermática es de suma importancia para la fertilidad humana.

RESUMEN

Un espermatozoide móvil es uno de los requisitos necesarios para que se dé la fecundación de manera exitosa. En animales de fecundación externa los espermatozoides permanecen quiescentes en los testículos y durante la espermiación activan su motilidad. En los anfibios anuros como *Bufo arenarum*, el contacto entre los gametos se da, primeramente, entre los espermatozoides y los factores que difunden rápidamente de la cubierta gelatinosa de los ovocitos (recuperados en una solución denominada EW, del inglés Egg Water). En este trabajo de tesis se estudiaron los factores del medio extracelular que activan el batido flagelar y los efectos de EW sobre los espermatozoides homólogos. Además se avanzó en el conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la activación flagelar. Para abordar estos estudios se realizaron ensayos bioquímicos y farmacológicos, utilizando como modelo espermatozoides del anfibio *Bufo arenarum*. En este trabajo de tesis se demuestra que la activación flagelar es iniciada por el choque hiposmótico del medio extracelular. Esta activación flagelar es reversible, sugiriendo la existencia de proteínas capaces de sensar cambios de presión osmótica. La activación flagelar está gobernada principalmente por dos vías de señalización: una dependiente de calcio y otra vía de señalización regulada por tmAC/AMPC/PKA. Además, se muestran evidencias que durante la activación flagelar se activarían proteínas serina/treonina fosfatasas que desfosforilan proteínas sustratos de PKC, localizadas en el flagelo del espermatozoide.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, K., Bracho, G.E., Wolf, D.P., and Tash, J.S. (1995). Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl* 35, 187-208.
- Al-Anzi, B., and Chandler, D.E. (1998). A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Dev Biol* 198, 366-375.
- Alavi, S.M., and Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell BiolInt* 30, 1-14.
- Antes, I., Chandler, D., Wang, H., and Oster, G. (2003). The unbinding of ATP from F1-ATPase. *Biophys J* 85, 695-706.
- Arranz, S.E., Albertali, I.E., and Cabada, M.O. (1997). *Bufo arenarum* egg jelly coat: purification and characterization of two highly glycosylated proteins. *BiochemJ* 323 (Pt 1), 307-312.
- Arranz, S.E., and Cabada, M.O. (2000). Diffusible highly glycosylated protein from *Bufo arenarum* egg-jelly coat: biological activity. *MolReprodDev* 56, 392-400.
- Ashizawa, K., Hashimoto, K., and Tsuzuki, Y. (1997). Regulation of fowl sperm flagellar motility by protein phosphatase type 1 and its relationship with dephosphorylation of axonemal and/or accessory cytoskeletal proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 108-112.
- Ashizawa, K., and Nishiyama, H. (1978). Effects of temperature on the vigour of motility, oxygen consumption and duration of motility of fowl spermatozoa under aerobic conditions. *Jap Poult Sci* 15, 264-266.
- Ashizawa, K., Suzuki, Y., and Okauchi, K. (1989). Flagellar movement in demembrated preparations of ejaculated fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil* 86, 263-270.
- Ashizawa, K., Wishart, G.J., Hashimoto, K., and Tsuzuki, Y. (1995). Dephosphorylation of a 30-kDa protein of fowl spermatozoa by the addition of myosin light chain kinase substrate peptide inhibits the flagellar motility. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 706-712.
- Ashizawa, K., Wishart, G.J., Tomonaga, H., Nishinakama, K., and Tsuzuki, Y. (1994). Presence of protein phosphatase type 1 and its involvement in temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. *FEBS Lett* 350, 130-134.
- Astrada, J.J. (1953). [Osmotic concentration and motility of spermatozoids in toad *Bufo arenarum* Hensel]. *Rev Soc Argent Biol* 29, 297-299.
- Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Baker, M.A., and Aitken, R.J. (2009). Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteomics* 6, 691-705.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., and Forti, G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 53, 121-131.
- Barbieri, F.D. (1976). Diffusible factors in anuran fertilization. *Acta Physiol Lat Am* 26, 1-9.
- Barbieri, F.D., and Cabada, M. (1969). The role of the diffusible factor released by the egg jelly in fertilization of the toad egg. *Experientia* 25, 1312-1313.
- Barbieri, F.D., del Pino, E.J., and Armayor, M.R. (1977). Properties and isolation of the diffusible factor involved in *Bufo arenarum* fertilization. *Acta Physiol Lat Am* 27, 293-302.
- Barua, M., Bhattacharyya, U., and Majumder, G.C. (1985). Occurrence of an ecto-phosphoprotein phosphatase in goat epididymal spermatozoa. *Biochem Int* 10, 733-741.
- Baxendale, R.W., and Fraser, L.R. (2003a). Evidence for multiple distinctly localized adenyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *MolReprodDev* 66, 181-189.
- Baxendale, R.W., and Fraser, L.R. (2003b). Immunolocalization of multiple Galpha subunits in mammalian spermatozoa and additional evidence for Galphas. *Mol Reprod Dev* 65, 104-113.

- Beltran, C., Vacquier, V.D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L.R., and Darszon, A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1128-1135.
- Beltran, C., Zapata, O., and Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry* 35, 7591-7598.
- Birkhead, T., and Moller, A. (1993). Female control of paternity. *Trends Ecol Evol* 8, 100-104.
- Borel, J.F. (2002). History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr* 114, 433-437.
- Bracho, G.E., Fritch, J.J., and Tash, J.S. (1998). Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 231-237.
- Bragado, M.J., Aparicio, I.M., Gil, M.C., and Garcia-Marin, L.J. (2010). Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa. *J Cell Biochem* 109, 65-73.
- Braun, T., and Dods, R.F. (1975). Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1097-1101.
- Breitbart, H., Lax, J., Rotem, R., and Naor, Z. (1992). Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 281 (Pt 2), 473-476.
- Brillard, J.P. (1990). [Storage of spermatozoa in the oviducts of birds: morphologic, histologic and functional approach]. *Reprod Nutr Dev* 30, 161-174.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 79-84.
- Burgos, M.H., and Fawcett, D.W. (1956). An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *J Biophys Biochem Cytol* 2, 223-240.
- Burnett, L.A., Boyles, S., Spencer, C., Bieber, A.L., and Chandler, D.E. (2008a). *Xenopus tropicalis* allurin: expression, purification, and characterization of a sperm chemoattractant that exhibits cross-species activity. *Dev Biol* 316, 408-416.
- Burnett, L.A., Sugiyama, H., Bieber, A.L., and Chandler, D.E. (2011). Egg jelly proteins stimulate directed motility in *Xenopus laevis* sperm. *Mol Reprod Dev* 78, 450-462.
- Burnett, L.A., Xiang, X., Bieber, A.L., and Chandler, D.E. (2008b). Crisp proteins and sperm chemotaxis: discovery in amphibians and explorations in mammals. *Int J Dev Biol* 52, 489-501.
- Cabada, M.O. (1975). Sperm concentration and fertilization rate in *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura). *J Exp Biol* 62, 481-486.
- Carrera, A., Gerton, G.L., and Moss, S.B. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev Biol* 165, 272-284.
- Clulow, J., and Jones, R.C. (1982). Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *J Reprod Fertil* 64, 259-266.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58, 453-508.
- Cohen, P., and Cohen, P.T. (1989). Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264, 21435-21438.
- Cosson, J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J Fish Biol* 76, 240-279.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., and Dréanno, C. (1999). Ionic factors regulating the motility of fish sperm. . In: Gagnon C, editor *The MAle Gamete: from basic knowledge to clinical applications* Vienna: Cache river press, 161-186.
- Cosson, M., Billard, R., and Letellier, L. (1989). Rise of internal Ca²⁺ accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 14, 424-434.

- Chakrabarti, R., Kline, D., Lu, J., Orth, J., Pilder, S., and Vijayaraghavan, S. (2007). Analysis of Ppp1cc-null mice suggests a role for PP1gamma2 in sperm morphogenesis. *Biol Reprod* 76, 992-1001.
- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.
- Chaudhry, P.S., and Casillas, E.R. (1992). Isozymes of protein kinase C in bovine sperm. *Arch Biochem Biophys* 295, 268-272.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-628.
- Cheng, L., Pilder, S., Nairn, A.C., Ramdas, S., and Vijayaraghavan, S. (2009). PP1gamma2 and PPP1R11 are parts of a multimeric complex in developing testicular germ cells in which their steady state levels are reciprocally related. *PLoS One* 4, e4861.
- De Blas, G.A., Darszon, A., Ocampo, A.Y., Serrano, C.J., Castellano, L.E., Hernandez-Gonzalez, E.O., Chirinos, M., Larrea, F., Beltran, C., and Trevino, C.L. (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* 4, e6095.
- Depeiges, A., and Dacheux, J.L. (1985). Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *J Reprod Fertil* 74, 23-27.
- Diaz Fontdevila, M.F., Bloj, B., and Cabada, M.O. (1991). Effect of egg water from *Bufo arenarum* on the fertilizing capacity of homologous spermatozoa. *J Exp Zool* 257, 408-414.
- du Plessis, S.S., Kashou, A.H., Benjamin, D.J., Yadav, S.P., and Agarwal, A. (2011). Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 36.
- Duellman, W.E., and Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill Company, Inc.
- Eddy, E.M., and O'Brien, D.A. (1995). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E and Neil, J.D, 3rd ed) Raven Press, New York
- Esonoda, P. (1991). Spermatozoon maturation in vertebrates with internal fertilization. *Microsc Electron Biol Celular* 15, 1-23.
- Espósito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A., Robben, T.J., Strik, A.M., Kuil, C., Philipsen, R.L., van Duin, M., Conti, M., *et al.* (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2993-2998.
- Fawcett, D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44, 394-436.
- Fraser, L.R., Adeoya-Osiguwa, S.A., and Baxendale, R.W. (2003). First messenger regulation of capacitation via G protein-coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery. *Mol Hum Reprod* 9, 739-748.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad, C., DeS, R., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S., *et al.* (2006). The Amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297, 370-441.
- Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Shimizu, N., Yamaoka, S., and Okuno, M. (2003). Identification of the 58-kDa phosphoprotein associated with motility initiation of hamster spermatozoa. *J Biochem* 134, 559-565.
- Fujinoki, M., Ohtake, H., and Okuno, M. (2001). Serine phosphorylation of flagellar proteins associated with the motility activation of hamster spermatozoa. *Biomed Res* 22, 45-58.
- Garbers, D.L., Watkins, H.D., Hansbrough, J.R., Smith, A., and Misono, K.S. (1982). The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. *J Biol Chem* 257, 2734-2737.
- Gatti, J.L., Billard, R., and Christen, R. (1990). Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: role in the initiation of sperm motility. *J Cell Physiol* 143, 546-554.

- Gibbons, I.R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol* 91, 107s-124s.
- Giojalas, L.C., and Rovasio, R.A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int J Androl* 21, 201-206.
- Gist, D.H., and Jones, J.M. (1987). Storage of sperm in the reptilian oviduct. *Scanning Microsc* 1, 1839-1849.
- Gist, D.H., Turner, T.W., and Congdon, J.D. (2000). Chemical and thermal effects on the viability and motility of spermatozoa from the turtle epididymis. *J Reprod Fertil* 119, 271-277.
- Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H.J., and Johannes, F.J. (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 392, 77-80.
- Guilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Hansbrough, J.R., and Garbers, D.L. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *JBiolChem* 256, 1447-1452.
- Harayama, H., and 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.
- Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J., and Maffrand, J.P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 993-999.
- Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suarez, S.S., *et al.* (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *DevCell* 9, 249-259.
- Ho, H.C., Granish, K.A., and Suarez, S.S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250, 208-217.
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., and Pedersen, S.F. (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89, 193-277.
- Hojlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P.M., Fey, S.J., Roepstorff, P., Handberg, A., Dela, F., Vinten, J., McCormack, J.G., Reynet, C., *et al.* (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem* 278, 10436-10442.
- Hojlund, K., Yi, Z., Lefort, N., Langlais, P., Bowen, B., Levin, K., Beck-Nielsen, H., and Mandarino, L.J. (2010). Human ATP synthase beta is phosphorylated at multiple sites and shows abnormal phosphorylation at specific sites in insulin-resistant muscle. *Diabetologia* 53, 541-551.
- Howarth, B., Jr. (1983). Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol Reprod* 28, 586-590.
- Hug, H., and Sarre, T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291 (Pt 2), 329-343.
- Ignatz, G.G., and Suarez, S.S. (2005). Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* 73, 519-526.
- Inaba, K. (2002). Dephosphorylation of Tctex2-related dynein light chain by type 2A protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 800-805.
- Inaba, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* 20, 1043-1056.
- Inoda, T., and Morisawa, M. (1987). Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comp BiochemPhysiol A* 88, 539-542.
- Jaiswal, B.S., and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10676-10681.

- Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R., and Florman, H.M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3, 499-502.
- Kane, L.A., Youngman, M.J., Jensen, R.E., and Van Eyk, J.E. (2010). Phosphorylation of the F(1)F(o) ATP synthase beta subunit: functional and structural consequences assessed in a model system. *Circ Res* 106, 504-513.
- Katagiri, C. (1966). Fertilization of dejellied uterine toad eggs in various experimental conditions. *Embryologia (Nagoya)* 9, 159-169.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E.V., Sanjay, A., Pilder, S.H., Salicioni, A.M., and Visconti, P.E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* 285, 7977-7985.
- Krapf, D., O'Brien, E.D., Cabada, M.O., Visconti, P.E., and Arranz, S.E. (2009). Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* modulates the ability of homologous sperm to undergo the acrosome reaction in the presence of the vitelline envelope. *BiolReprod* 80, 311-319.
- Krapf, D., O'Brien, E.D., and Arranz, S.E. (2011). Physiological Modifications to be Considered in Amphibian Sperm Cryopreservation. . In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition T R Tiersch and C C Green, editors World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 100-106.
- Krapf, D., Visconti, P.E., Arranz, S.E., and Cabada, M.O. (2007). Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* induces capacitation-like changes in homologous spermatozoa. *DevBiol* 306, 516-524.
- Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L., and Morisawa, M. (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *ProcNatlAcadSciUSA* 97, 2052-2057.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55, 684-692.
- Lefievre, L., Jha, K.N., de Lamirande, E., Visconti, P.E., and Gagnon, C. (2002). Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 23, 709-716.
- Lillie, F.R. (1919). *Problems of fertilization*. Chicago, IL: The University of Chicago Press.
- Lindemann, C.B., and Goltz, J.S. (1988). Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100--extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton* 10, 420-431.
- Lindemann, C.B., Orlando, A., and Kanous, K.S. (1992). The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *J Cell Sci* 102 (Pt 2), 249-260.
- Lippe, C., and Ardizzone, C. (1991). Actions of vasopressin and isoprenaline on the ionic transport across the isolated frog skin in the presence and the absence of adenylyl cyclase inhibitors MDL12330A and SQ22536. *Comp Biochem Physiol C* 99, 209-211.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M.A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D.R., and Conti, M. (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol Endocrinol* 19, 1277-1290.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Luconi, M., Cantini, G., Baldi, E., and Forti, G. (2011). Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci* 16, 1315-1330.

- Marian, T., Krasznai, Z., Balkay, L., Balazs, M., Emri, M., Bene, L., and Tron, L. (1993). Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *J Histochem Cytochem* 41, 291-297.
- Marian, T., Krasznai, Z., Balkay, L., Emri, M., and Tron, L. (1997). Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cytometry* 27, 374-382.
- Marin-Briggiler, C.I., Jha, K.N., Chertihin, O., Buffone, M.G., Herr, J.C., Vazquez-Levin, M.H., and Visconti, P.E. (2005). Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 118, 2013-2022.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332 (Pt 2), 281-292.
- Mitchell, D.R. (2000). Chlamydomonas flagella. *Journal of Phycology* 36, 261-273.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mizuno, J., Watanabe, A., and Onitake, K. (1999). Initiation of sperm motility in the newt, *Cynops pyrrhogaster*, is induced by a heat-stable component of egg-jelly. *Zygote* 7, 329-334.
- Morisawa, M., and Ishida, K. (1987). Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylate cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *J Exp Zool* 242, 199-204.
- Morisawa, M., and Okuno, M. (1982). Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature* 295, 703-704.
- Morisawa, M., and Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210, 1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., and Morisawa, S. (1983a). Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *JExpBiol* 107, 105-113.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., and Yasuda, K. (1983b). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *JExpBiol* 107, 95-103.
- Morisawa, S., and Morisawa, M. (1986). Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. *J Exp Biol* 126, 89-96.
- Morita, M., Takemura, A., Nakajima, A., and Okuno, M. (2006). Microtubule sliding movement in tilapia sperm flagella axoneme is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphorylation. *Cell MotilCytoskeleton* 63, 459-470.
- Moriya, M., Fujinaga, K., Yazawa, M., and Katagiri, C. (1995). Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell Tissue Res* 281, 273-281.
- Mukai, H., Chang, C.D., Tanaka, H., Ito, A., Kuno, T., and Tanaka, C. (1991). cDNA cloning of a novel testis-specific calcineurin B-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1325-1330.
- Muramatsu, T., Giri, P.R., Higuchi, S., and Kincaid, R.L. (1992). Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 529-533.
- Nagano, K., Shinkawa, T., Yabuki, N., Mutoh, H., Inomata, N., Watanabe, Y., Ashihara, M., Nagahashi, S., Ishii, N., Aoki, Y., *et al.* (2011). Integration of proteomic analyses to monitor the activity status of phosphorylation signaling. *J Proteomics* 74, 319-326.
- Nakano, I., Kobayashi, T., Yoshimura, M., and Shingyoji, C. (2003). Central-pair-linked regulation of microtubule sliding by calcium in flagellar axonemes. *J Cell Sci* 116, 1627-1636.
- Nishigaki, T., Chiba, K., and Hoshi, M. (2000). A 130-kDa membrane protein of sperm flagella is the receptor for asterosaps, sperm-activating peptides of starfish *Asterias amurensis*. *DevBiol* 219, 154-162.

- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z., and Cantley, L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 272, 952-960.
- Nolan, M.A., Babcock, D.F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K.A., and McKnight, G.S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13483-13488.
- Nomura, M., Inaba, K., and Morisawa, M. (2000). Phosphorylation of axonemal 21 kDa and 26 kDa proteins modulates activation of sperm motility in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Zygote* 8 Suppl 1, S59-60.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2004). Phosphorylation of the Arginine-X-X- (Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod* 10, 355-363.
- Oda, S., Igarashi, Y., Manaka, K., Koibuchi, N., Sakai-Sawada, M., Sakai, K., Morisawa, M., Ohtake, H., and Shimizu, N. (1998). Sperm-activating proteins obtained from the herring eggs are homologous to trypsin inhibitors and synthesized in follicle cells. *DevBiol* 204, 55-63.
- Ohta, H., Unuma, T., Tsuji, M., Yoshioka, M., and Kashiwagi, M. (2001). Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. *Aquac Res* 32, 385-392.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *JBiolChem* 260, 9699-9705.
- Olson, J.H., Xiang, X., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., and Chandler, D.E. (2001). Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *ProcNatlAcadSciUSA* 98, 11205-11210.
- Onitake, K., Takai, H., Ukita, M., Mizuno, J.I., Sasaki, T., and Watanabe, A. (2000). Significance of egg-jelly substances in the internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126, 121-128.
- Paniagua, R., Fraile, B., and Sáez, F.J. (1990). Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histol Histopath* 5, 365-378.
- Pearson, R.B., and Kemp, B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 200, 62-81.
- Perchec Poupard, G., Gatti, J.L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., and Billard, R. (1997). Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *J Reprod Fertil* 110, 315-327.
- Porter, M.E., and Sale, W.S. (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J Cell Biol* 151, F37-42.
- Raisman, J., and Pisano, A. (1970). Fertilization of jelly-less *Bufo arenarum* oocytes in the presence of high sperm concentrations. *Acta Embryol Exp (Palermo)* 1, 3-11.
- Ringer, S., and Morshead, E.A. (1877). The Effect of the Chlorides, Bromides, and Iodides of Potassium and Sodium on Frogs. *JAnatPhysiol* 12, 73-84.
- Rotem, R., Paz, G.F., Homonnai, Z.T., Kalina, M., and Naor, Z. (1990a). Further studies on the involvement of protein kinase C in human sperm flagellar motility. *Endocrinology* 127, 2571-2577.
- Rotem, R., Paz, G.F., Homonnai, Z.T., Kalina, M., and Naor, Z. (1990b). Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7305-7308.
- Ryves, W.J., Evans, A.T., Olivier, A.R., Parker, P.J., and Evans, F.J. (1991). Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett* 288, 5-9.

- Schultz, J.E., Klumpp, S., Benz, R., Schurhoff-Goeters, W.J., and Schmid, A. (1992). Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science* 255, 600-603.
- Sever, D.M., and Brizzi, R. (1998). Comparative biology of sperm storage in female salamanders. *J Exp Zool* 282, 460-476.
- Sever, D.M., and Hamlett, W.C. (2002). Female sperm storage in reptiles. *J Exp Zool* 292, 187-199.
- Shivers, C.A., and James, J.M. (1970). Capacitation of frog sperm. *Nature* 227, 183-184.
- Si, Y., and Olds-Clarke, P. (2000). Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 62, 1231-1239.
- Smith, E.F., and Lefebvre, P.A. (1996). PF16 encodes a protein with armadillo repeats and localizes to a single microtubule of the central apparatus in *Chlamydomonas flagella*. *J Cell Biol* 132, 359-370.
- Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J.A., Barbour, J., Zimmer, R.K., Neuhaus, E.M., and Hatt, H. (2004). Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *JBiolChem* 279, 40194-40203.
- Takeda, A. (1982). Studies on reversible inactivation of cock spermatozoa by temperature. *Jap Poult Sci* 19, 26-36.
- Tang, F.Y., and Hoskins, D.D. (1975). Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 62, 328-335.
- Tanimoto, S., Kudo, Y., Nakazawa, T., and Morisawa, M. (1994). Implication that potassium flux and increase in intracellular calcium are necessary for the initiation of sperm motility in salmonid fishes. *MolReprodDev* 39, 409-414.
- Tash, J.S. (1990). Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. in: Gagnon (Ed) CRC Press, Boca Raton/Ann Arbor/Boston,, 229-240.
- Tash, J.S., and Bracho, G.E. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl* 15, 505-509.
- Tash, J.S., and Bracho, G.E. (1998). Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 557-563.
- Tash, J.S., Hidaka, H., and Means, A.R. (1986). Axonin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility. *J Cell Biol* 103, 649-655.
- Tash, J.S., Kakar, S.S., and Means, A.R. (1984). Flagellar motility requires the cAMP-dependent phosphorylation of a heat-stable NP-40-soluble 56 kd protein, axonin. *Cell* 38, 551-559.
- Tash, J.S., Krinks, M., Patel, J., Means, R.L., Klee, C.B., and Means, A.R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* 106, 1625-1633.
- Tash, J.S., and Means, A.R. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod* 26, 745-763.
- Tash, J.S., and Means, A.R. (1983). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 28, 75-104.
- Tash, J.S., and Means, A.R. (1987). Ca²⁺ regulation of sperm axonemal motility. *Methods Enzymol* 139, 808-823.
- Teves, M.E., Guidobaldi, H.A., Unates, D.R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S.J., Morales Garcia, A.A., and Giojalas, L.C. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One* 4, e8211.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *ProcNatlAcadSciUSA* 76, 4350-4354.

- Trevino, C.L., Serrano, C.J., Beltran, C., Felix, R., and Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 509, 119-125.
- Turner, R.M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *ReprodFertilDev* 18, 25-38.
- Valz-Gianinet, J.N., del Pino, E.J., and Cabada, M.O. (1991). Glycoproteins from *Bufo arenarum* vitelline envelope with fertility-impairing effect on homologous spermatozoa. *DevBiol* 146, 416-422.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.
- Visconti, P.E., Johnson, L.R., Oyaski, M., Fornes, M., Moss, S.B., Gerton, G.L., and Kopf, G.S. (1997). Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *DevBiol* 192, 351-363.
- Visconti, P.E., and Kopf, G.S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *BiolReprod* 59, 1-6.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-1150.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., and Diekman, A.B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *JReprodImmunol* 53, 133-150.
- Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K., and Garbers, D.L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5, 1117-1122.
- Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L., and Vacquier, V.D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *JCell Biol* 101, 2324-2329.
- Watanabe, A., Fukutomi, K., Kubo, H., Ohta, M., Takayama-Watanabe, E., and Onitake, K. (2009). Identification of egg-jelly substances triggering sperm acrosome reaction in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Mol Reprod Dev* 76, 399-406.
- Watanabe, A., and Onitake, K. (2002). The urodele egg-coat as the apparatus adapted for the internal fertilization. *Zoolog Sci* 19, 1341-1347.
- Watanabe, A., Takayama-Watanabe, E., Vines, C.A., and Cherr, G.N. (2011). Sperm motility-initiating substance in newt egg-jelly induces differential initiation of sperm motility based on sperm intracellular calcium levels. *Dev Growth Differ* 53, 9-17.
- Watanabe, T., Itoh, T., Watanabe, A., and Onitake, K. (2003). Characteristics of sperm motility induced on the egg-jelly in the internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoolog Sci* 20, 345-352.
- Welling, A., Hofmann, F., and Wegener, J.W. (2005). Inhibition of L-type Cav1.2 Ca²⁺ channels by 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) and 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide (Go6983). *Mol Pharmacol* 67, 541-544.
- White, D., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *J Exp Biol* 210, 4053-4064.
- White, D.R., and Aitken, R.J. (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 22, 163-177.
- Wishart, G.J., and Ashizawa, K. (1987). Regulation of the motility of fowl spermatozoa by calcium and cAMP. *J Reprod Fertil* 80, 607-611.
- Wolf, D.P., and Hedrick, J.L. (1971). A molecular approach to fertilization. II. Viability and artificial fertilization of *Xenopus laevis* gemetes. *Dev Biol* 25, 348-359.

- Xiang, X., Burnett, L., Rawls, A., Bieber, A., and Chandler, D. (2004). The sperm chemoattractant "allurin" is expressed and secreted from the *Xenopus* oviduct in a hormone-regulated manner. *Dev Biol* 275, 343-355.
- Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 23, 193-196.
- Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K., and Morisawa, M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14831-14836.
- Zalisko, E.J., and Larsen, J.H. (1989). Fate of unused sperm in post-breeding male *Ambystoma macrodactylum columbianum*. *Journal of Herpetology* 23, 463-464.
- Zeng, H.T., and Tulsiani, D.R. (2003). Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci* 116, 1981-1989.
- Zilli, L., Schiavone, R., Storelli, C., and Vilella, S. (2008). Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). *Biol Reprod* 79, 356-366.