



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

TESIS DE DOCTORADO

**“Caracterización molecular de las proteínas involucradas  
en el ensamblado de los complejos SNAREs durante la  
exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos”**

Lic. Flores Montero, Karina

Tesista

Directora: Ruete, M. Celeste

Co-directora: Berberian, M. Victoria

Mendoza, Argentina 2023



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS DE DOCTORADO

**“Caracterización molecular de las proteínas involucradas  
en el ensamblado de los complejos SNAREs durante la  
exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos”**

Doctorado en Ciencia y Tecnología

Lic. Flores Montero, Karina  
Tesisista

Directora: Ruete, M. Celeste

Co-directora: Berberian, M. Victoria

Mendoza, Argentina 2023

*A mis padres, quienes siempre han creído en mí.*

*Gracias por su amor y sacrificio.*

*Este logro, también es suyo.*

## **Agradecimientos**

Sin lugar a duda, con el paso del tiempo, diré que los años de doctorado fueron los más felices e intensos de mi vida académica y de seguro estarán entre los mejores de mi vida. Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de este camino y colaboraron con este proyecto. Este trabajo está dedicado a ellos.

A mi directora, Celeste, por darme la oportunidad de que pueda iniciar mi carrera científica, por su dedicación y compromiso con mi formación y su apoyo desinteresado. Por darme la libertad de ser creativa y mantener siempre su confianza en mí. Por su calidez humana y todos los consejos que ha compartido conmigo durante estos años. Siempre estaré agradecida.

A Victoria, mi co-directora, por todos sus consejos y brindarme su apoyo en este hermoso camino que es la ciencia. Gracias por haber estado presente durante todos estos años.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que compartieron conmigo la mayor parte de mi doctorado, Cristi, Laura, Mica y Néstor. Gracias por hacer de cada día algo único, por nuestro gusto por la ciencia, las charlas, los consejos, las risas, las bromas y los miles de mates compartidos.

A mis nuevas compañeras del laboratorio 243, Yeye y Javiera, que me ofrecieron desde el primer momento su ayuda y amistad. Han sido un pilar fundamental en este último tramo de mi doctorado.

A la Dra. Claudia Tomes por haber sido siempre muy generosa conmigo, en cuanto a lo material y lo cognitivo.

Al Dr. Luis Mayorga por siempre estar dispuesto a brindar sus conocimientos científicos y técnicos.

También quiero agradecer a las instituciones que me permitieron concretar esta carrera. A la Secretaría de Investigación Internacionales y Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo que apoyó los primeros años de mi carrera. A CONICET por otorgarme la oportunidad y los medios para finalizar mi doctorado.

A la Universidad Nacional de Cuyo y en especial a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales donde realicé mis estudios de grado y continué con mi posgrado.

Al IHEM por brindarme el lugar físico para la realización de mi doctorado.

A los miembros de mi Comisión evaluadora de doctorado, el Dr. Luis Mayorga, Dr. Carlos Passera y Dr. Pablo Villagra, gracias por su seguimiento, sugerencias y consejos aportados durante el transcurso de mi carrera.

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

A todo el personal técnico del IHEM que de una forma u otra ayudaron en mi proyecto de investigación y facilitaron los medios para poder llevarlo a cabo.

En las siguientes líneas quiero agradecer a las personas que no formaban parte del “Lab”, pero que fueron mi contención y apoyo durante toda mi carrera. Sin ellos, no lo hubiera logrado.

Quiero agradecer especialmente a mis padres por su continuo apoyo, contención y consejos durante este trayecto. Ellos han sido la inspiración de todo. Especialmente a mi padre, Virgilio, que fue quien siempre soñó junto a mí, que esto podía suceder.

A mis hermanos, Daniela, Antonella y Sergio por ser mi contención, mis compañeros incansables. A mis sobrinos Camila, Tiago, Liam y Amadeo, que me han brindado mis momentos más felices.

A mis amigas de la vida, Fanny, Mafe, Romy, Andre, Laura, Joha y Luci que siempre fueron pacientes con su amistad.

A Mauricio, que ha sido el compañero perfecto durante esta etapa de mi vida.

## Resumen

Las proteínas CSP, Hsc70 y SGTA han sido ampliamente estudiadas por formar un complejo trimérico que cumple funciones de chaperona con las proteínas SNARE, piezas principales en la fusión de membranas, durante los procesos de exocitosis en neuronas y células neuroendocrinas. En el presente trabajo de investigación, se evaluó por primera vez la presencia de estas proteínas en la región acrosomal de los espermatozoides humanos y su participación en el ensamble de los complejos SNARE en configuración *trans*, requisito necesario en el espermatozoide, para llevar a cabo la reacción acrosomal. Inicialmente, demostramos la presencia de estas tres proteínas en el espermatozoide humano y su localización específica en la región acrosomal. Posteriormente verificamos que dos de ellas, la proteína CSP y la Hsc70, participan directamente en el proceso de exocitosis del acrosoma. A través de ensayos de Dot Blot, evaluamos la interacción que se producía entre las proteínas CSP y Hsc70, confirmando que forman un complejo en el espermatozoide humano, como se había descrito en otros modelos celulares. Ideando ensayos funcionales localizamos el accionar de la proteína CSP, en la cascada de señalización que conlleva a la reacción acrosomal, ubicándola antes de la salida del calcio contenido en el acrosoma y luego del accionar de las chaperonas NSF/ $\alpha$ SNAP. Gracias al uso de las neurotoxinas como herramientas moleculares, determinamos que CSP es necesaria para el ensamble de los complejos SNARE en configuración *trans*. Finalmente, comparamos el accionar de la proteína CSP recombinante con su par permeable, obteniendo similares resultados y verificando el éxito del modelo de espermatozoides permeabilizados.

## Abreviaturas

- 2-APB: 2-aminoetoxi-difenilborato.
- 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP: 8-(p-clorofeniltio)- 2'-O-metiladenosina- 3',5'-monofosfato cíclico
- AA: acrosoma anterior
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AMPc: adenosina monofosfato cíclico
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: adenosina trifosfato
- CPPs: del inglés, cell-penetrating peptides
- CSP: del inglés, Cystein String Protein
- ES: segmento ecuatorial
- FS: vaina fibrosa, del inglés: fibrous sheath
- FSH: hormona foliculoestimulante
- GST: glutatión-S-transferasa
- Hsc70: del inglés, 70 kDa heat-shock cognate protein
- IAM: membrana acrosomal interna
- IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5 trifosfato
- IPTG: isopropil-β-D-tio-galactosido
- NP-EGTA-AM: O-nitrofenil EGTA- acetoximetil éster
- NSF: del inglés: N-ethylmaleimide-sensitive factor
- OAM: membrana acrosomal externa
- PA: acrosoma posterior
- Pg: progesterona

- PKA: proteína quinasa A
- PLC: fosfolipasa C
- PSA-FITC: del inglés: FITC-coupled Pisum sativum agglutinin
- RA: reacción acrosomal
- SDS: del inglés: sodium dodecyl sulfate
- SGTA: del inglés, small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
- SLO: del inglés Streptolysin O; estreptolisina O
- SNAP: (proteínas de unión NSF solubles, del inglés: soluble NSF-attachment proteins)
- SNARE: del inglés: soluble NSF-attachment protein receptor
- SSCs: del inglés: spermatogonial stem cells
- TEM: del inglés: Transmission Electron Microscope
- TeTx: toxina tetánica
- WB, del inglés: Western Blot
- ZP: zona pelúcida
- $\alpha$ -SNAP: del inglés: soluble NSF-attachment protein
- TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

# índice

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS.....	6
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
1. EL ESPERMATOZOIDE HUMANO.....	18
1.1. ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO.....	18
1.1.1. LA CABEZA.....	19
EL ACROSOMA.....	20
1.1.2. EL FLAGELO.....	21
PIEZA DE CONEXIÓN O CUELLO.....	23
LA PIEZA MEDIA.....	23
LA PIEZA PRINCIPAL.....	25
LA PIEZA FINAL.....	25
2. CAMBIOS Y PROCESOS DURANTE LA VIDA DEL ESPERMATOZOIDE.....	25
2.1. LA ESPERMATOGÉNESIS.....	25
MITOSIS.....	27
MEIOSIS I Y II.....	27
ESPERMIOGÉNESIS.....	29
2.2. MADURACIÓN Y ALMACENAMIENTO POST TESTICULAR.....	30
2.3. LA CAPACITACIÓN.....	31
2.4. LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	34
2.4.1 EL PAPEL DEL CALCIO EN LA RA.....	38
2.5 LA FECUNDACIÓN.....	39
3. LA EXOCITOSIS.....	42
3.1. LA EXOCITOSIS REGULADA.....	43
3.2. LAS PROTEÍNAS SNARE.....	45
3.3. LAS CHAPERONAS MOLECULARES.....	50

3.3.1 LA FAMILIA DE CO-CHAPERONAS HSP40 .....	53
LA PROTEÍNA CSP .....	54
DOMINIOS DE CSP .....	56
CSP ALFA .....	57
CSP BETA .....	59
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE CSP .....	60
3.3.2 LA FAMILIA DE CHAPERONAS HSP70 .....	61
3.3.3 LA PROTEÍNA CO-CHAPERONA SGTA .....	63
DOMINIOS DE SGTA .....	64
4. EL COMPLEJO CSP-Hsc70-SGT .....	65
5. LA RA COMO MODELO DE TRABAJO .....	68
5.1. UTILIDAD DE LA ESTREPTOLISINA O EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	68
5.2. UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR (CPPS) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	69
6. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN QUE CONDUCEN A LA RA EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO .....	69
7. ALCANCES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO DE CHAPERONAS EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO .....	72
7.1. LA INFERTILIDAD MASCULINA .....	72
7.2. LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....	74
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>76</b>
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	77
OBJETIVO GENERAL: .....	77
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	78
1. IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LA MAQUINARIA MOLECULAR INVOLUCRADA EN EL ENSAMBLADO DE LOS COMPLEJOS SNARE DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ....	78
2. ESTABLECER LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y CHAPERONAS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN EL ENSAMBLADO DE LOS COMPLEJOS SNARE EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	78
3. ESTABLECER LOS CAMBIOS EN LA CONFIGURACIÓN DE LOS COMPLEJOS SNARE AL BLOQUEAR LA ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS/CHAPERONAS. ....	79

4. EXAMINAR LA MODULACIÓN DEL PROCESO DE ENSAMBLADO DE LOS SNARE MEDIANTE LA INTRODUCCIÓN AL CITOSOL DE PROTEÍNAS EXÓGENAS ACOPLADAS A PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR (CPPS) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	79
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
REACTIVOS .....	82
PRODUCCIÓN DE BACTERIAS QUIMIOCOMPETENTES .....	82
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR SHOCK TÉRMICO CON DNA PLASMÍDICO .....	83
EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE BACTERIAS .....	83
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	84
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN HUMANO.....	86
SWIM UP Y CAPACITACIÓN.....	87
PERMEABILIZACIÓN CON <i>ESTREPTOLISINA O</i> (SLO) DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	87
ENSAYOS FUNCIONALES CON ESPERMATOZOIDES PERMEABILIZADOS.....	87
ENSAYOS FUNCIONALES CON EL QUELANTE DE CALCIO NP-EGTA-AM.....	88
ENSAYOS FUNCIONALES CON ESPERMATOZOIDES INTACTOS .....	88
EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	88
INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).....	89
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	90
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES CON TRITÓN X-100 .....	91
PARTICIÓN CON TRITÓN X-114: OBTENCIÓN DE FASE ACUOSA Y DETERGENTE .....	91
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR CON BUFFER HIPOSMÓTICO: SEPARACIÓN EN CITOSOL Y MEMBRANA .....	91
PROTOCOLO DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL/CLOROFORMO/AGUA.....	92
DOT BLOT ENTRE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	92
DOT BLOT ENTRE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y UN LISADO CELULAR .....	93
PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS .....	94
ENSAYO DE CO-FLOTACIÓN .....	95
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	96
WESTERN BLOT .....	96
TRATAMIENTO DE DEPALMITOILACIÓN CON HIDROXILAMINA.....	96

DIGESTIÓN DE HIS <sub>6</sub> -TAT-BCSP POR TRIPSINA.....	97
INCORPORACIÓN DE HIS <sub>6</sub> -TAT-BCSP A ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	97
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	98
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>99</b>
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LA MAQUINARIA MOLECULAR INVOLUCRADA EN EL ENSAMBLADO DE LOS COMPLEJOS SNARES DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ....</i>	<i>100</i>
1.1. LAS PROTEÍNAS BCSP, Hsc70 Y SGTA ESTÁN PRESENTES EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	100
1.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS BCSP Y Hsc70 EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ....	102
1.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS BCSP, Hsc70 Y SGTA EN ESPERMATOZOIDES.....	106
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: ESTABLECER LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y CHAPERONAS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN EL ENSAMBLADO DE LOS COMPLEJOS SNARES EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ....</i>	<i>108</i>
2.1. LAS PROTEÍNAS BCSP Y Hsc70 SON REQUERIDAS PARA LA RA.....	108
2.2. LA PROTEÍNA SGTA PODRÍA NO PARTICIPAR EN LA RA DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS .....	111
2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES BCSP Y Hsc70 .....	112
2.4. LA PROTEÍNA BCSP RECOMBINANTE RESCATA LA INHIBICIÓN DE LA RA PROVOCADA POR EL SECUESTRO DE LA PROTEÍNA BCSP ENDÓGENA.....	115
2.5. LA PROTEÍNA BCSP-GST FORMA UN COMPLEJO CON Hsc70-HIS <sub>6</sub> .....	118
2.6. LA PROTEÍNA BCSP-GST INTERACCIONA CON LA PROTEÍNA Hsc70 ENDÓGENA PROVENIENTE DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	119
2.7. LOCALIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE BCSP ENDÓGENA Y RECOMBINANTE EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN. ....	121
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: ESTABLECER LOS CAMBIOS EN LA CONFIGURACIÓN DE LOS COMPLEJOS SNARE BLOQUEANDO LA ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS/CHAPERONAS.....</i>	<i>125</i>
3.1 LA PROTEÍNA BCSP ES NECESARIA PARA EL ENSAMBLE DE LAS SNARE EN CONFIGURACIÓN TRANS .....	126
3.2. EL SECUESTRO DE LA PROTEÍNA BCSP ENDÓGENA EVITA LA APOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICA Y ACROSOMAL EXTERNA, IMPIDIENDO LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS TRANS-SNARE.....	128
3.3. LA AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA BCSP-GST IMPIDE SU UNIÓN A MEMBRANA .....	131
<i>OBJETIVO ESPECÍFICO 4: EXAMINAR LA MODULACIÓN DEL PROCESO DE ENSAMBLADO DE LOS SNARE MEDIANTE LA INTRODUCCIÓN AL CITOSOL DE PROTEÍNAS EXÓGENAS ACOPLADAS A PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR (CPPs) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ....</i>	<i>134</i>

4.1. DISEÑO DE LA PROTEÍNA BCSP PERMEABLE UNIDA A UN TAG DE HIS <sub>6</sub> PARA EVALUAR SU FUNCIÓN EN ESPERMATOZOIDES VIVOS.....	134
4.2. DIGESTIÓN COMPLETA DE BCSP-HIS <sub>6</sub> .....	136
4.3. INCORPORACIÓN DE LA PROTEÍNA CSP PERMEABLE A ESPERMATOZOIDES INTACTOS .....	137
4.4. BCSP PERMEABLE EJERCE LA MISMA FUNCIÓN EN ESPERMATOZOIDES INTACTOS QUE SU PAR CSP-GST EN ESPERMATOZOIDES PERMEABILIZADOS.....	140
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>152</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>155</b>

## Índice de Figuras

Figura 1: Representación del espermatozoide humano.....	19
Figura 2: Esquema de las estructuras que forman la cabeza del espermatozoide humano .....	21
Figura 3: Representación esquemática de la estructura completa de un espermatozoide y de la estructura de su axonema .....	22
Figura 4: Representación de la espermatogénesis y grupos de células germinales masculinas. ....	27
Figura 5: Ilustración de la espermatogénesis .....	28
Figura 6: Interacción del espermatozoide con proteínas del aparato reproductor masculino en la etapa de maduración posttesticular. ....	31
Figura 7: Cascada de señalización que tiene como objetivo la capacitación del espermatozoide. ....	33
Figura 8: Morfología de las membranas del espermatozoide durante la RA .....	37
Figura 9: RA estimulada por glicoproteína (ZP) o progesterona.....	39
Figura 10: Esquema representativo de la fusión de los gametos. ....	41
Figura 11: Esquema de las proteínas SNARE .....	46
Figura 12: Topología del complejo de fusión sináptica.....	47
Figura 14: Ciclo de ensamblado y desensamblado de las proteínas SNARE.....	50
Figura 15: Familia de proteínas DNAJ/Hsc40.....	54
Figura 16: Alineamiento de las secuencias de las proteínas CSP humana $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ .....	55
Figura 17: Esquema representativo de los dominios de las proteínas CSPs.....	57
Figura 18: Estructura de la isoforma $\alpha$ CSP.....	58
Figura 19: Perfil de expresión de CSP en testículos humanos y proteína presente en espermatozoides humanos y localizada en la región acrosomal. ....	60
Figura 20: Dominios esquemáticos de las proteínas Hsp70s/Hsc70s. ....	62
Figura 21: Estructura de la proteína SGTA.....	64

Figura 22: Modelo de la interacción de los dominios de las proteínas que forman el complejo CSP/Hsc70/SGTA .....	66
Figura 23: Esquema de la cascada de señalización que conducen a la RA. ....	71
Figura 24: Esquema del patrón de marca fluorescente en el método de tinción con PSA-FITC. ....	89
Figura 25: Esquema representativo del fragmento 182-198 de las isoformas $\alpha$ y $\beta$ de la proteína CSP .....	100
Figura 26: $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA están presentes en extractos de espermatozoides humanos .....	102
Figura 28: La proteína $\beta$ CSP endógena está palmitoilada en espermatozoides humanos.....	105
Figura 29: Caracterización química de la proteína Hsc70.....	106
Figura 30: Localización de $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en la región acrosomal de los espermatozoides humanos .....	108
Figura 31: $\beta$ CSP y Hsc70 participan en la RA de espermatozoides humanos. ....	110
Figura 32: La proteína SGTA no participa en la RA de espermatozoides humanos.....	112
Figura 33: Producción exitosa de las proteínas recombinantes $\beta$ CSP-GST y Hsc70-His6. ....	113
Figura 34: Presencia de la proteína SGTA en lisados bacterianos transformados con el plásmido codificante.....	114
Figura 35: $\beta$ CSP recombinante compite por los sitios de unión del anticuerpo anti-CSP, liberando la proteína CSP endógena.....	116
Figura 36: El agregado de Hsc70 recombinante recupera la inhibición de la RA causada por la proteína $\beta$ CSP-GST. ....	117
Figura 37: Las proteínas $\beta$ CSP y Hsc70 recombinantes forman un complejo.....	119
Figura 38: La proteína $\beta$ CSP-GST forma complejos con la proteína Hsc70 proveniente de espermatozoides humanos.....	120
Figura 39: CSP endógena y recombinante ejercen su función antes de la salida de calcio del acrosoma.....	123
Figura 40: CSP endógena ejerce su función después de la proteína NSF .....	125

Figura 41: La proteína $\beta$ CSP es necesaria para que el complejo SNARE se ensamble en configuración trans .....	128
Figura 42: La inhibición de la proteína CSP endógena, no permite la aposición de la membrana plasmática y la MAE, evitando la formación de los complejos SNARE en configuración trans. ....	130
Figura 43: Formación de agregados por parte de $\beta$ CSP-GST. ....	132
Figura 44: La agregación de la proteína $\beta$ CSP-GST impide su unión a membrana. ....	133
Figura 45: Estructura de la proteína permeable $\beta$ CSP humana.....	135
Figura 46: Producción exitosa de la proteína recombinantes $\beta$ CSP-TAT-His6.....	136
Figura 47. Digestión de la proteína $\beta$ CSP permeable por acción de la tripsina.....	137
Figura 48: La proteína permeable $\beta$ CSP es incorporada en espermatozoides humanos. ....	138
Figura 49: La proteína permeable $\beta$ CSP es incorporada en espermatozoides humanos. ....	139
Figura 50: La proteína $\beta$ CSP permeable inhibe la RA en espermatozoides no permeabilizados. ....	141
Figura 51. Modelo de la cascada de señalización que conduce a la RA. ....	150

## Índice de Tablas

Tabla 1: Esquema comparativo de las diferencias morfológicas entre la exocitosis del acrosoma y otros tipos de células secretoras .....	35
Tabla 2: Principales familias de chaperonas moleculares en mamíferos.....	52
Tabla 3: Comparación de los parámetros normales de calidad del semen a lo largo de los años.	73
Tabla 4: Preparación de liposomas.....	95

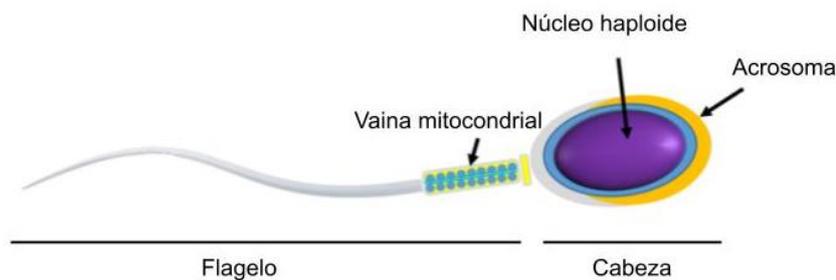
# **Antecedentes**

## 1. El espermatozoide humano

Los espermatozoides son células que fueron descubiertas en 1677 por el científico Antonie van Leeuwenhoek. Desde ese momento muchos investigadores han estudiado las diferentes y complejas estructuras de esta pequeña célula, imprescindible para el desarrollo de una nueva vida (Kumar and Singh, 2021). La espermatogénesis es el proceso por el cual una célula madre diploide llamada espermatogonia (SSCs, del inglés: *spermatogonial stem cells*) se diferencia a espermaticitos hasta llegar a convertirse en células haploides, los espermatozoides. En este elaborado proceso cooperan diferentes células, según el estadio de la espermatogonia, cómo las células de Sertoli, las células mioides peritubulares y las células de Leydig (Cannarella *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2021). Se pueden distinguir cuatro momentos bien diferenciados en la vida de los espermatozoides (i) *espermatogénesis*: cuando las espermatogonias diploides experimentan meiosis y alteraciones morfológicas; (ii) *maduración y almacenamiento post testicular*: sucede después de la espermatogénesis pero antes de la eyaculación, en el que los espermatozoides interactúan con proteínas extracelulares, lípidos y microARN, entre otras moléculas; (iii) *capacitación*: sucede en el tracto reproductivo femenino y los espermatozoides adquieren efectivamente la capacidad de fertilizar ovocitos; y (iv) *fertilización*: proceso por el cual el espermatozoide penetra en las capas protectoras externas del ovocito y transfiere su material genético al oolema, es el paso inicial en la formación de un cigoto (Bertolla, 2020).

### 1.1. Estructura del espermatozoide humano

Los espermatozoides son células altamente especializadas (Figura 1) que contienen en su cabeza el genoma masculino densamente empaquetado y transcripcionalmente inactivo. Además, tomando forma de capuchón se ubica el acrosoma que contiene enzimas capaces de digerir la zona pelúcida durante la fertilización. Posterior a la cabeza se encuentra el flagelo que se extiende hasta el 90% de la longitud del espermatozoide y contiene una disposición 9+2 de microtúbulos y proteínas motoras que proporcionan a los espermatozoides la fuerza propulsora para moverse. Proximal a la cabeza, y rodeando el flagelo, se encuentra la pieza intermedia que contiene las mitocondrias dispuestas en una vaina helicoidal con poco volumen citoplasmático (Reynolds *et al.*, 2017).



**Figura 1: Representación del espermatozoide humano.** Se muestra la cabeza que contiene el núcleo haploide y el acrosoma; y el flagelo, que contiene la vaina mitocondrial. Imagen tomada y modificada de Reynolds et al., 2017.

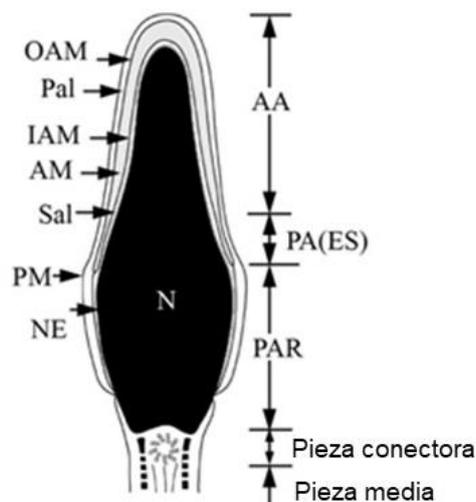
### 1.1.1. La cabeza

El espermatozoide maduro suele ser una célula móvil altamente especializada para una única función, la fertilización del ovocito (Jones et al., 2013). La cabeza del espermatozoide contiene dos grandes estructuras, el núcleo que se encuentra rodeado por la envoltura o membrana nuclear y ocupa la mayor parte de la cabeza y el acrosoma que está delimitado por la membrana acrosomal interna y externa y ocupa el espacio anterior restante (Toshimori and Ito 2003). Asociado a un volumen interno muy reducido, el espermatozoide carece de una variedad de orgánulos, como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los ribosomas citosólicos, que no son necesarios para los procesos que conducen a la fecundación (Jones et al., 2013). Analizando el material genético, se sabe que el ADN de los espermatozoides de mamíferos es el ADN eucariótico más compacto, siendo al menos seis veces más condensado que el ADN en los cromosomas mitóticos. Para lograr este gran empaquetamiento, las células germinales experimentan mitosis y meiosis que generan espermátidas redondas haploides, en las que las histonas unidas al genoma masculino se reemplazan por pequeñas proteínas nucleares básicas ricas en arginina, conocidas como *protaminas* (P1 y P2). Las protaminas forman moléculas lineales, matrices de cromatina una al lado de la otra, muy diferente al empaquetamiento del ADN en células somáticas, en los que el material genético se enrolla alrededor de octámeros de histonas para formar nucleosomas. Durante esta transformación, la cromatina sufre una extensa remodelación para compactarse en la cabeza del espermatozoide (Ward, Steven Ward and Coffey, 1991; Moritz and Hammoud, 2022). Además, se sabe que al momento en que los espermatozoides de los mamíferos se liberan en los túbulos seminíferos, los procesos de transcripción y

traducción genómica se silencian en gran medida; aunque es probable que los espermatozoides entreguen una variedad de especies de ARN al ovocito fertilizado que pueden modular los eventos tempranos en la embriogénesis (Jones *et al.*, 2013).

## El acrosoma

El acrosoma es una vesícula que deriva del aparato de Golgi, ubicado comúnmente en la parte superior de la cabeza del espermatozoide maduro. Históricamente se lo llamó "cuerpo apical" debido a su ubicación, o "perforatorium" ya que se postulaba que podría ayudar al espermatozoide a perforar el óvulo (Hirohashi and Yanagimachi, 2018). Como podemos ver en la Figura 2, esta vesícula está ubicada en la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide y se subdivide en *acrosoma anterior* (AA) y *acrosoma posterior* (PA) o *segmento ecuatorial* (ES), que es el sitio de fusión de los gametos. La parte posterior de la cabeza se denomina región postacrosomal (PAR). Rodeando la cabeza del espermatozoide se encuentran cuatro tipos de membrana: la membrana plasmática (PM), la membrana acrosomal externa (OAM), la membrana acrosomal interna (IAM) y la envoltura nuclear (NE). El estrecho espacio que queda entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, se denomina capa periacrosomal (Pal) y el espacio entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear se denomina capa subacrosomal (Sal) (Ito and Toshimori 2016).



**Figura 2: Esquema de las estructuras que forman la cabeza del espermatozoide humano.** Se muestra la localización y la relación espacial del sistema de membranas y capas citoplasmáticas. AA: acrosoma anterior; PA o ES: acrosoma posterior o segmento ecuatorial; PAR: región postacrosomal; OAM: membrana acrosomal externa; Pal: capa periacrosomal; IAM: membrana acrosomal interna; AM: matriz acrosomal; Sal: capa subacrosómica; PM: membrana plasmática; NE: membrana nuclear y N: núcleo. Imagen tomada y modificada de *Ito et al., 2016*.

Se postula que el acrosoma tiene similitudes con una vesícula secretora, ya que contiene enzimas digestivas que se liberan a través del proceso de exocitosis cuando la célula recibe una señal específica ([Zaneveld et al. 1991](#)). Estas enzimas hidrolíticas pueden ser altamente solubles y liberarse durante la reacción acrosomal (RA) o insolubles, resistentes a los detergentes y permanecer asociadas con el citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide incluso después de la exocitosis del acrosoma. Las proteínas contenidas en el acrosoma se van liberando y exponiendo al ambiente externo, de forma ordenada según el lugar donde se localizan y de esta forma desempeñando su rol en la fertilización, confirmando que las funciones de estas moléculas están muy relacionadas con su disposición dentro del acrosoma. Por ejemplo, hay reportes de que las proteínas localizadas en el acrosoma apical están asociadas con el inicio de la reacción del acrosoma, mientras que las que se ubican en el AA participan de la unión con la zona pelúcida ([Ito and Toshimori 2016](#)).

### 1.1.2. El flagelo

Durante la última fase de la espermatogénesis, las espermatidas se diferencian en la espermiogénesis atravesando varios cambios, como la condensación del núcleo, la formación del acrosoma y de la cola, y la eliminación del exceso de citoplasma ([Lehti and Sironen 2017](#)). La cola del espermatozoide o flagelo es una estructura conservada evolutivamente, que se encarga de la motilidad de la célula y es indispensable para su progresión dentro del tracto genital femenino ([Touré et al. 2021](#)). En esta estructura especializada en forma de cilio intervienen más de 1000 proteínas para ejercer su función ([Kumar and Singh 2021](#)). Como podemos ver en la Figura 3A, esta estructura se puede dividir en cuatro segmentos: el cuello o pieza de conexión, que contiene los centriolos proximales; la pieza media, que contiene la vaina de mitocondrias; la pieza principal y la pieza final ([Gu et al. 2019](#)). Todos estos segmentos flagelares tienen en común una estructura citoesquelética central llamada *axonema* (Figura 3B) que consta de nueve microtúbulos dobles (A y B) periféricos alrededor de un doblete central, conocido como 9+2 ([Inaba 2011; Boguenet et al. 2021](#)). La cola del



(RS), complejo regulador de dineína-nexina (N-DRC), brazos de dineína interior y exterior (IDA, ODA) y estructuras peri-axonémicas: vaina fibrosa (FS) y fibra densa exterior (ODF). Imagen tomada y modificada de Touré *et al.*, 2021.

El axonema está rodeado por estructuras accesorias según la porción de la cola, como las fibras densas exteriores (ODF), la vaina fibrosa (FS) y la vaina mitocondrial (MS). La *pieza de conexión* contiene el cuerpo basal y conecta la cabeza con la cola. La *pieza intermedia* contiene todas las mitocondrias que pueden tener los espermatozoides y nueve ODF que rodean el axonema. En la *pieza principal*, dos ODF son reemplazados por columnas longitudinales de FS. La *pieza final* contiene solo el axonema rodeado por la membrana plasmática (Lehti and Sironen 2017).

### **Pieza de conexión o cuello**

El cuello del espermatozoide contiene el cuerpo basal, formado por un par de centriolos, y conecta la cabeza con la cola. Después de unirse a la envoltura nuclear del espermatozoide, los centriolos están encerrados por nueve columnas segmentadas longitudinales y el *capitulum*. El *capitulum* une la pieza de conexión con la cabeza del espermatozoide (Lehti and Sironen 2017).

### **La pieza media**

Como ya mencionamos anteriormente, el espermatozoide es una célula altamente especializada para una única función, la fertilización. Se puede ver claramente que los espermatozoides poseen una estructura muy diferenciada con una organización mitocondrial extremadamente particular que sugiere que estas son esenciales para su funcionamiento (Boguenet *et al.* 2021). Estas mitocondrias están firmemente unidas entre sí y envueltas helicoidalmente alrededor del axonema, formando una vaina mitocondrial, ubicada en la *pieza media* de los espermatozoides. La vaina mitocondrial está unida a las estructuras vecinas por un retículo de filamentos. En los seres humanos, 72 a 80 mitocondrias forman 10 a 12 giros mitocondriales (Pencheva *et al.* 2021; Boguenet *et al.* 2021). Estas mitocondrias ubicadas en la pieza media del espermatozoide son fuente de ATP, y producen y transportan energía al axonema (Gu *et al.* 2019). La motilidad es una de las características principales que se tiene en cuenta para determinar la "calidad" de los espermatozoides ya que influye directamente en la tasa de fertilización. Esta motilidad es generada por un órgano propulsor, el flagelo, que

utiliza la energía que proviene del metabolismo del AMP cíclico de las mitocondrias localizadas en la pieza media ([Gage 1998](#); [Pencheva et al. 2021](#)). Durante la espermatogénesis, las mitocondrias de los espermatoцитos cambian de una estructura clásica a una estructura más condensada y activa. Durante la espermiogénesis, se pierde gran parte del citoplasma celular (incluidas las mitocondrias) y se modifica el suministro de energía debido al transporte de las células germinales masculinas a través del epitelio germinal desde el compartimento basal (donde obtienen los nutrientes de la sangre directamente) hasta el compartimento central donde las células de Sertoli suministran lactato y piruvato ([Boguenet et al. 2021](#)). Justamente, la formación de la pieza media se produce cuando las mitocondrias, que originalmente se encuentran en el citoplasma periférico, migran y se acumulan en la porción proximal del filamento axial ([Mundy et al. 1995](#)). El papel principal de las mitocondrias es proporcionar energía, pero los espermatozoides no solo usan ATP para la motilidad, sino también para procesos fundamentales como la capacitación, la hiperactivación, la exocitosis del acrosoma y la penetración del ovocito. La literatura reporta que las rutas metabólicas de la producción de energía en los espermatozoides son complejas y aún están en discusión ([Boguenet et al. 2021](#)). La producción de ATP se lleva a cabo por dos vías principales: (a) la glucólisis dentro del citosol y (b) la fosforilación Oxidativa (OxPhos) en las mitocondrias. Sin embargo, los estudios muestran resultados confusos ya que, dependiendo de la especie, existen variaciones estructurales en la ruta energética desde la cabeza hacia la cola y también en el sustrato preferido que se utiliza para generar ATP ([Reynolds et al. 2017](#)). Actualmente, se apoya la idea de que el ATP producido por la vaina mitocondrial podría ser insuficiente para difundirse hacia todo el flagelo y se ha propuesto que la glucólisis anaeróbica refuerza la producción de ATP en la pieza principal. De hecho, la pieza principal está desprovista de mitocondrias, pero contiene una vaina fibrosa (FS) enriquecida con enzimas glucolíticas. Se ha propuesto que la glucólisis anaeróbica y la fosforilación oxidativa, no son mutuamente excluyentes y que los espermatozoides son capaces de utilizar ambas vías ([Boguenet et al. 2021](#)). Diversos estudios han demostrado que la estructura de la pieza media influye en la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides. Se presume que la cantidad de mitocondrias se relaciona directamente con la producción de ATP y la velocidad del espermatozoide. Se ha reportado en humanos, que anomalías en la pieza intermedia como una longitud menor, menos giros mitocondriales, ensamblaje anormal de las mitocondrias o defectos estructurales en sus membranas son posibles causas de la infertilidad masculina ([Gu et al. 2019](#); [Boguenet et al. 2021](#)).

## La pieza principal

La *pieza principal* es la parte más larga del flagelo del espermatozoide y contiene la vaina fibrosa (FS), una estructura del citoesqueleto exclusiva de estos gametos. Se han reportado diversas funciones para esta estructura, como la de cinturón protector para el axonema, andamio para las enzimas involucradas en la transducción de señales, incluida la proteína quinasa A, la vía de señalización de Rho y la vía de señalización de calcio a través de CABYR (proteína regulada por fosforilación de tirosina que se une al calcio, del inglés: *Calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated protein*) (Naaby-Hansen et al. 2002; Kim et al. 2007). Metabólicamente, se sabe que la pieza principal está desprovista de mitocondrias, pero contiene una vaina fibrosa enriquecida con enzimas glucolíticas (Boguenet et al. 2021). La localización de las enzimas glucolíticas dentro de la vaina fibrosa, la vía LDH anaeróbica en la que el piruvato se convierte en lactato y la vía del poliol conducen a la conclusión de que la pieza principal proporciona vías alternativas de producción de ATP anaeróbico a lo largo del flagelo más allá de la pieza intermedia (Kim et al. 2007).

## La pieza final

La *pieza final* de la cola del espermatozoide contiene microtúbulos, aunque ya no forman dobletes emparejados en esta región. Esta zona parece estar menos organizada que el axonema completo, que está más próximo al cuerpo celular (Zabeo et al. 2018).

## 2. Cambios y procesos durante la vida del espermatozoide

### 2.1. La espermatogénesis

La espermatogénesis es una serie de eventos moleculares que comienza con la multiplicación de células madres espermatogoniales (SSCs) y finaliza con su diferenciación en células especializadas, llamadas espermatozoides (Cannarella et al. 2020; Du et al. 2021). En los mamíferos, este proceso ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos, donde las células germinales se desarrollan en un epitelio estratificado y el proceso dura aproximadamente 74 días (Cannarella et al., 2020; Wu et al., 2020; Dunleavy et al. 2019). El epitelio de los túbulos seminíferos consta de un solo tipo de célula somática, la célula de Sertoli, pero contiene



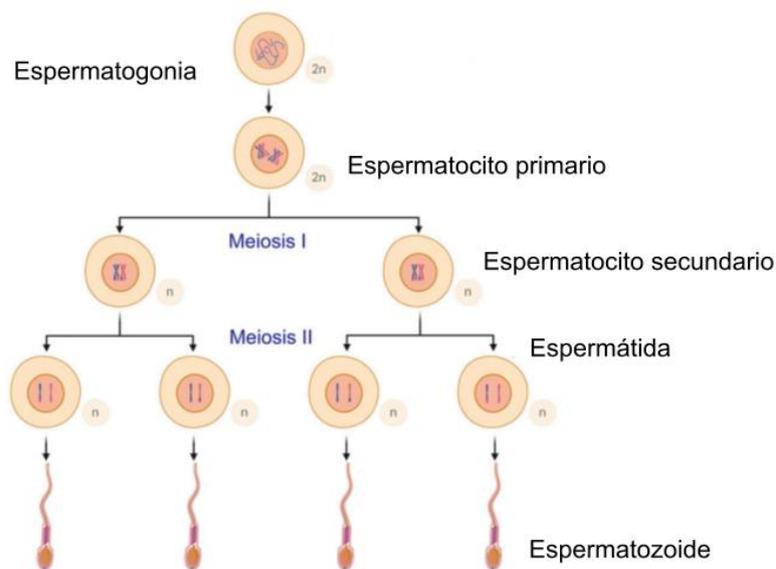
**Figura 4: Representación de la espermatogénesis y grupos de células germinales masculinas.** Las espermatogonias (SG), células germinales mitóticas diploides se encuentran cerca de la lámina basal del túbulo seminífero. Las SG se diferencian para producir espermatocitos primarios que migran hacia la luz del túbulo seminífero a medida que experimentan la meiosis I para generar células haploides llamadas espermatocitos secundarios. Estos espermatocitos secundarios atraviesan meiosis II para producir espermátidas redondas, que se diferencian para formar espermátidas alargadas. Cuando estas últimas están completamente diferenciadas, se separan de las células de Sertoli y viajan por la luz de los túbulos seminíferos al epidídimo, donde se convierten en espermatozoides (no se muestra). Imagen tomada y modificada de *Tan & Wilkinson, 2020*.

## Mitosis

El proceso de la espermatogénesis comienza con las células madre espermatogoniales (SSCs) que experimentan mitosis para renovar su propia población y para proporcionar células que culminarán con una mayor diferenciación ([Dunleavy et al. 2019](#)). Las espermatogonias son células diploides ( $2n$ ) situadas en el compartimento basal de los túbulos seminíferos y en estrecha relación con las células de Sertoli. Tienen un núcleo ovoide y un citoplasma denso que contiene un pequeño aparato de Golgi, pocas mitocondrias y muchos ribosomas libres ([Neto et al. 2016](#)). Podemos encontrar en los testículos humanos dos tipos distintos morfológicamente de espermatogonias indiferenciadas, denominadas  $A_{\text{oscura}}$  y  $A_{\text{pálida}}$ , según las diferencias en su morfología nuclear y la intensidad de la tinción con hematoxilina. Las espermatogonias  $A_{\text{oscuras}}$  son células pequeñas, esféricas o ligeramente ovoides, ubicadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos que tienen un núcleo con cromatina densa y oscura y que se tiñe uniformemente. Las espermatogonias  $A_{\text{pálidas}}$  son más grandes, ovaladas o casi redondas, también localizadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos, pero tienen núcleos pálidos y alargados con cromatina "más gruesa" ([Fayomi and Orwig 2018](#)). Se considera que las  $A_{\text{oscuras}}$  son células inactivas o de reserva, mientras que las espermatogonias  $A_{\text{pálidas}}$  pueden dividirse y formar espermatogonias tipo B que luego se dividen y producen los espermatocitos primarios ([Neto et al. 2016](#)). Esta clasificación ha sido adoptada por muchos investigadores, pero aún no está del todo claro como es el mecanismo de renovación de las espermatogonias ([Dym et al. 2009](#)); sin embargo, todos concluyen que a partir de una espermatogonia  $A_{\text{pálidas}}$  se producen ocho espermatocitos preleptotenos ([Neto et al. 2016](#)).

## Meiosis I y II

Las espermatogonias B se dividen por mitosis formando dos *espermatocitos primarios*, células que representan el comienzo de la profase meiótica (Dunleavy et al. 2019). Estos espermatocitos son las primeras células germinales en cruzar la barrera hematotesticular hacia el compartimento luminal, donde se aíslan inmunológicamente y comienzan con la meiosis. Los espermatocitos primarios se subclasifican según las etapas de la profase 1 (preleptoteno, leptoteno, cigoteno y paquiteno). En la etapa del paquiteno comienza la formación del acrosoma y se produce la recombinación del ADN, proceso crucial para la evolución humana, por lo que los mecanismos de control en la meiosis 1 son muy estrictos, dando como resultado dos espermatocitos tetraploides genéticamente diversos, denominados *espermatocitos secundarios*. Estas células contienen un número haploide de cromosomas, pero un contenido de ADN  $2n$ . Durante la meiosis II, cada espermatocito se divide en dos *espermátidas* redondas haploides (Neto et al. 2016; Dunleavy et al. 2019; Cannarella et al. 2020). A modo de resumen se muestra en la Figura 5, los eventos principales de la mitosis y meiosis I y II.



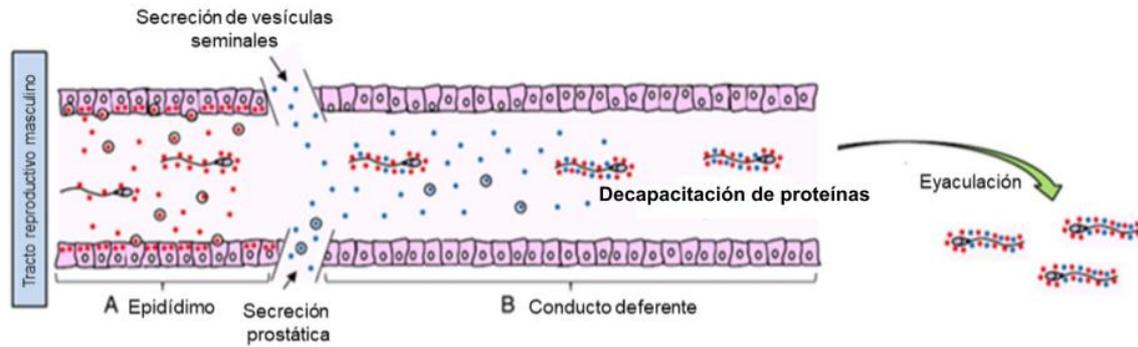
**Figura 5: Ilustración de la espermatogénesis.** El proceso comienza con una espermatogonia diploide, que tras numerosas mitosis (para producir espermatogonias de reserva y otras que entrarán en el proceso de diferenciación), forma un espermatocito primario, que comienza con el proceso de diferenciación, atravesando la meiosis I y convirtiéndose en un espermatocito secundario. Estos espermatocitos sufren meiosis II, convirtiéndose en espermátidas haploides. Finalmente atraviesan el proceso de espermiogénesis (no mostrado en la figura) transformándose en espermatozoides. Imagen tomada y modificada de *Siu et al., 2021*.

## Espermiogénesis

Durante la espermiogénesis una espermátida se convierte en un espermatozoide. En esta etapa no se producen más divisiones celulares, pero ocurren una serie de cambios citoplasmáticos y nucleares ([Neto et al. 2016](#)). Se empaqueta el ADN con protaminas, se forma el acrosoma a partir del aparato de Golgi, se organiza el flagelo y se produce la expulsión del citoplasma. Este proceso dura aproximadamente 26 días en humanos y según la especie, la cabeza del espermatozoide adopta una forma específica. A medida que las células germinales avanzan en cada fase, se trasladan desde la base del epitelio seminífero hasta el borde luminal. Al final de la espermiogénesis los espermatozoides se liberan a la luz del túbulo a través de una serie de procesos denominados colectivamente espermiación ([Dunleavy et al. 2019](#); [Cannarella et al. 2020](#)). Como mencionamos, la biogénesis del acrosoma en los mamíferos se produce durante la diferenciación de las espermátidas, varios estudios señalan que se inicia durante la primera división meiótica, en los espermatoцитos primarios. La formación del acrosoma continuará a lo largo de toda la espermiogénesis, a través de una serie de pasos que moldearán esta vesícula y el núcleo. Podemos decir que la biogénesis del acrosoma se divide en cuatro etapas: la de Golgi, capuchón, acrosoma y maduración. En la fase de Golgi, las vesículas proacrosómicas (formadas durante la meiosis) se fusionan entre sí y se unen al acroploxoma, que es una placa que contiene citoqueratina de actina anclada a la envoltura nuclear ([Moreno 2023](#)). Durante esta fase, hay una intensa síntesis, glicosilación y tráfico de proteínas desde las cisternas del retículo endoplásmico a la superficie *cis*-Golgi ([Alvarez Sedó et al. 2012](#)). Durante la fase de capuchón, el acrosoma aumenta de volumen, pero también se aplana, formando una estructura similar a un casquete, y comienza a extenderse caudalmente sobre la superficie del núcleo. La fase de acrosoma se caracteriza porque el acrosoma continúa extendiéndose caudalmente sobre la superficie nuclear y una estructura formada por microtúbulos paralelos entre sí, crece a partir del anillo perinuclear. Finalmente, en la fase de maduración, el acrosoma alcanza su forma definitiva. Diversos estudios señalan que los espermatozoides de mamíferos también sufren cambios en la forma del acrosoma durante su tránsito a través del epidídimo, por lo que la biogénesis del acrosoma en mamíferos abarca dos pasos diferentes, el primero durante la espermiogénesis y el segundo durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo; sin embargo, la mayoría de las patologías acrosómicas descritas hasta ahora se han atribuido a los primeros pasos de la espermiogénesis ([Moreno 2023](#)).

## 2.2. Maduración y almacenamiento post testicular

Cuando los espermatozoides terminan su estadía en los túbulos seminíferos son células morfológicamente maduras, pero deben pasar por dos procesos más de maduración funcional para que puedan fertilizar con éxito al ovocito. El primero de estos procesos ocurre durante el tránsito epididimario y la eyaculación (Figura 6). A medida que los espermatozoides viajan de la región proximal del epidídimo a la región distal, experimentan una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, como la modificación del tamaño y la apariencia del acrosoma y el núcleo, la migración de la gota citoplasmática a lo largo de la cola, así como cambios estructurales en varios orgánulos intracelulares (Hernández-Silva and Chirinos, 2019). Se ha reportado que los espermatozoides de humanos y ratones adquieren su potencial fertilizante cuando salen de los testículos y atraviesan el epidídimo. Durante este viaje, los espermatozoides entran en contacto con los fluidos secretados por el epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbo uretrales, que en conjunto producen el plasma seminal. Este fluido es crucial para la nutrición, maduración y supervivencia de los espermatozoides, además de prevenir la capacitación prematura y contribuir al reconocimiento e interacción del espermatozoide con el ovocito. Se ha reportado que durante el tránsito por el epidídimo se asocian a la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide factores descapacitantes, que mantienen al gameto protegido de una capacitación prematura (Barrachina et al., 2022). En ratones, el primer factor descapacitante descrito fue la glicoproteína 40 kDa, conocida también como DF (del inglés, *Decapacitation Factor*). Esta proteína se une a la membrana de los espermatozoides a través de un receptor (receptor DF) vía glicofosfatidilinositol (GPI). DF estimula la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa sensible a calmodulina, manteniendo concentraciones de calcio intracelular bajas. A medida que avanza la capacitación, se pierde DF y disminuye la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, lo que permite que aumente el calcio intracelular promoviendo los cambios relacionados con la capacitación. Estudios en humanos muestran que el agregado de DF a los espermatozoides generan una reversión significativa del estado de capacitación de las células, lo que sugiere que un mecanismo similar podría tener lugar en ambas especies (Fraser *et al.*, 2006; Nixon et al. 2006; Hernández-Silva and Chirinos, 2019).



**Figura 6: Interacción del espermatozoide con proteínas del aparato reproductor masculino en la etapa de maduración posttesticular.** Cuando los espermatozoides son liberados de los túbulos seminíferos interactúan con las proteínas del epidídimo que favorecen la maduración posttesticular. Durante la eyaculación, los espermatozoides viajan al conducto deferente y se mezclan con las secreciones de la vesícula seminal y la próstata, que contienen proteínas que interactúan con la membrana plasmática del espermatozoide y actúan como factores descapacitantes. Imagen tomada y modificada de Hernández-Silva & Chirinos, 2019.

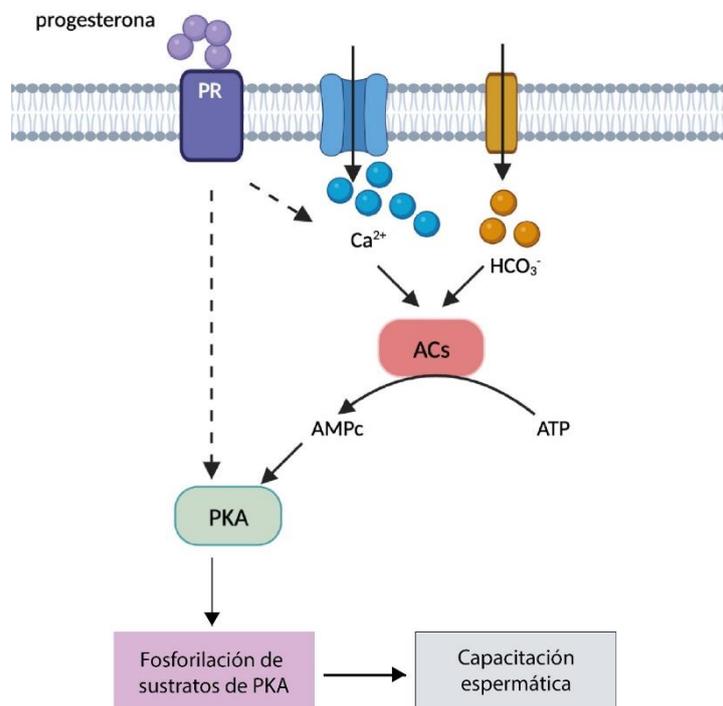
### 2.3. La capacitación

Como ya explicamos, los espermatozoides de mamíferos necesitan adquirir la capacidad de fertilizar al ovocito en dos etapas, primero la maduración posttesticular, que acabamos de explicar y la otra, qué ocurre después de la eyaculación en el tracto femenino conocida como *capacitación*.

A nivel molecular la maduración en el epidídimo es poco conocida, pero se ha descrito que se activan vías de señalización y la incorporación de proteínas secretadas por el epitelio del epidídimo en el aparato reproductor masculino. Además, durante este proceso, los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse progresivamente, pero al finalizar su maduración en el epidídimo, aún no son capaces de fertilizar un óvulo (Buffone et al., 2014). A continuación, comienza la capacitación, que es indispensable que ocurra, ya que el espermatozoide eyaculado no tiene la capacidad de fertilizar inmediatamente a un ovocito (Zeginiadou, Papadimas and Mantalenakis, 2000). Esto involucra una serie compleja de cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en el tracto femenino y culmina con la exocitosis del acrosoma (Leung et al., 2021). La etapa de la capacitación no está completamente dilucidada y son varios los procesos bioquímicos que transcurren durante ella, como (i) la reorganización de los antígenos de la superficie de la membrana que

aumentan su fluidez, (ii) cambios en la relación colesterol/fosfolípidos debido a la pérdida del colesterol por un ligando extracelular como la albúmina, y (iii) fosforilación de proteínas (Zeginiadou, Papadimas and Mantalenakis, 2000). Durante la capacitación, los espermatozoides experimentan un cambio en su patrón de motilidad llamado *hiperactivación*. Experimentos en ratones demostraron que la hiperactivación es un cambio fundamental en los espermatozoides, ya que facilita la liberación del esperma desde el reservorio oviductal y la penetración a través del *cumulus oophorus* y la matriz extracelular de la zona pelúcida (ZP), que rodea al óvulo. En espermatozoides humanos, se probó que solo los capacitados pueden nadar quimiotácticamente utilizando gradientes de progesterona cerca del óvulo (Puga Molina et al., 2018). Cuando comienza la capacitación se eliminan los factores estabilizadores de membrana plasmática, que los espermatozoides adquieren durante su paso por el tracto genital masculino, promoviendo la pérdida de colesterol (Hernández-Silva et al., 2018). La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos, contiene 70% de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros (colesterol), y 5% glicoproteínas y presenta una estructura dinámica que influye en la capacitación espermática y la RA. Se ha descrito que durante la capacitación aumenta su fluidez, por el movimiento lateral del colesterol de la región apical de la cabeza del espermatozoide, y se genera un flujo de colesterol desde la membrana plasmática del espermatozoide al medio extracelular (Puga Molina et al., 2018). Luego ocurre la entrada de calcio mediante la activación de los canales iónicos de la membrana espermática, activando la vía de señalización de la adenosina monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinasa A (PKA) que conduce a un aumento en la fosforilación de las proteínas en residuos de tirosina (Hernandez-Silva et al., 2018; Brukman et al 2018). El calcio puede unirse directamente a los fosfolípidos de la membrana y a numerosas enzimas, modificando las propiedades de la membrana y la actividad enzimática. Este ion también puede unirse a la calmodulina (CaM) formando un complejo, provocando cambios conformacionales y modulando la actividad de la adenilato ciclasa, fosfatasas, fosfodiesterasas y proteínas quinasas (Puga Molina et al., 2018). El AMPc, fue el primer segundo mensajero descrito y en la actualidad se sabe que tiene diversos roles en la fisiología celular, principalmente en respuesta a neurotransmisores y hormonas. Inicialmente se creía que la PKA era el único efector del AMPc, pero después se reportaron más moléculas *target*. La síntesis de AMPc es producto de diez genes distintos que codifican adenilil ciclasa. Nueve de ellos, codifican la familia de isoformas de adenil ciclasa transmembrana (tmAC) con una amplia distribución en tejidos. A diferencia de la familia tmAC, existe una única adenil ciclasa atípica también conocida como sAC, que a través del empalme alternativo genera múltiples isoformas. A diferencia de otras adenilatos ciclasas, sAC es estimulada directamente por bicarbonato, sirviendo de esta manera como sensor de CO<sub>2</sub> en muchos sistemas celulares. Además, sAC es insensible a la regulación por la proteína G y su actividad enzimática aumenta en presencia de Mn<sup>2+</sup>/ATP, en vez de

Mg<sup>2+</sup>/ATP. sAC fue la primera adenilato ciclasa soluble descrita en extractos testiculares y se demostró que es esencial para la fertilización. Es abundante en espermatozoides maduros y es la principal fuente de AMPc en estas células (Buffone et al., 2014). A modo de conclusión como podemos ver en la Figura 7, la entrada de Ca<sup>2+</sup> y HCO<sup>3-</sup> activan la adenilato ciclasa soluble, una vez activada sAC, cataliza la conversión de ATP en AMPc y posteriormente, el AMPc activa a PKA, que a su vez activa las proteínas diana y promueve la fosforilación de las proteínas. Sin embargo, los mecanismos que actúan aguas abajo de PKA durante la capacitación del espermatozoide humano aún no son totalmente claros (Sun et al., 2021).



**Figura 7: Cascada de señalización que tiene como objetivo la capacitación del espermatozoide.** La entrada de Ca<sup>2+</sup> y HCO<sup>3-</sup>, activan la adenilato ciclasa soluble (sAC), que cataliza la conversión de ATP en cAMP. Luego, el AMPc activa la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), que activa proteínas diana. Todos estos cambios preparan al espermatozoide para que adquiera la capacidad de fertilizar al ovocito. Imagen tomada y modificada de Sun *et al.*, 2021.

Haciendo foco en la membrana plasmática de los espermatozoides de múltiples especies incluidos los humanos, durante la capacitación, se ha descrito que se produce la hiperpolarización del potencial de membrana (Em) y que esta, es necesaria y suficiente para que se lleve a la cabo la RA. No existe un estudio profundo acerca de este evento de hiperpolarización, a pesar de su importancia, en humanos. Pero, se ha reportado que en

espermatozoides de ratón podrían participar en la hiperpolarización de la membrana los canales de Na<sup>+</sup>, CFTR, canales de K<sup>+</sup> y otros transportadores de Cl<sup>2-</sup>. Recientes estudios han demostrado que al menos los canales de K<sup>+</sup>, son esenciales para lograr la hiperpolarización de la membrana en espermatozoides humanos, durante la capacitación (López-González et al. 2014). Además, trabajos actuales han demostrado que la capacitación también podría modular la configuración de las proteínas SNARE en espermatozoides humanos, ya que utilizando como herramienta a la toxina tetánica permeable (TeNT-CPP), que escinde a VAMP2 cuando se encuentra en un estado monomérico, demostraron que los complejos SNARE eran resistentes a su escisión cuando finalizaba la capacitación en espermatozoides humanos, sugiriendo que los complejos habían alcanzado una configuración *trans* (Mayorga et al. 2020).

El tiempo necesario para completar la capacitación varía según las especies, en humanos aún no se conoce con exactitud y varía ampliamente *in vivo* e *in vitro*. *In vitro*, se ha reportado que la capacitación del esperma humano varía de 3 a 24 horas (Puga Molina et al., 2018). Cuando la capacitación se completa, el espermatozoide está listo para la reacción acrosomal (Zeginiadou, Papadimas and Mantalenakis, 2000).

## 2.4. La reacción acrosomal

La liberación del acrosoma de los espermatozoides es un proceso exocítico especializado que implica la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática que recubre el espermatozoide (Meizel and Turner, 1991). Durante las últimas décadas se ha considerado que el acrosoma de los espermatozoides de mamíferos tenía dos funciones principales: (1) ser sitio de almacenamiento y liberación de las proteínas requeridas para la unión y penetración de la zona pelúcida y (2) permitir que los espermatozoides se fusionen con el oolema. También se ha mantenido el concepto de que el acrosoma de los espermatozoides debe estar intacto para unirse a la zona pelúcida antes de liberar su contenido acrosomal, lo que permite que los espermatozoides penetren y fertilicen el óvulo (Leung et al., 2021). Actualmente estos conceptos se han revisado y gracias a la implementación de técnicas más complejas y sofisticadas, como el uso de ratones modificados genéticamente que expresan proteínas acrosomales con fluorescencia, han permitido rastrear el estado del acrosoma en fertilizaciones individuales, concluyendo que la mayoría de los espermatozoides de ratones han sufrido la exocitosis del acrosoma antes de que penetren la zona pelúcida (Jin et al., 2011). Otro de los grandes conceptos que se ha

puesto en revisión es que la reacción acrosomal no es un evento de “todo o nada”, donde el acrosoma está intacto o reaccionado, sino más bien es un proceso regulado que incorpora pasos intermedios que implican la pérdida progresiva o gradual del material que forma la matriz acrosomal (Leung et al., 2021). Este evento exocítico regulado, ocurre en respuesta a determinados estímulos, como la progesterona y ciertos neurotransmisores (Hirohashi and Yanagimachi, 2018). Aunque la RA es un evento exocítico, se diferencia del resto ya que los espermatozoides tienen una sola vesícula secretora. Durante la RA ocurre la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, donde se producen múltiples puntos de fusión. La exocitosis del acrosoma lleva a la formación de numerosas vesículas, haciendo que la célula pierda los dos tercios anteriores de su membrana plasmática, ya que en este tipo de exocitosis no se produce el reciclaje de membrana (Tabla 1) (Tomes et al. 2002; Leung et al., 2021).

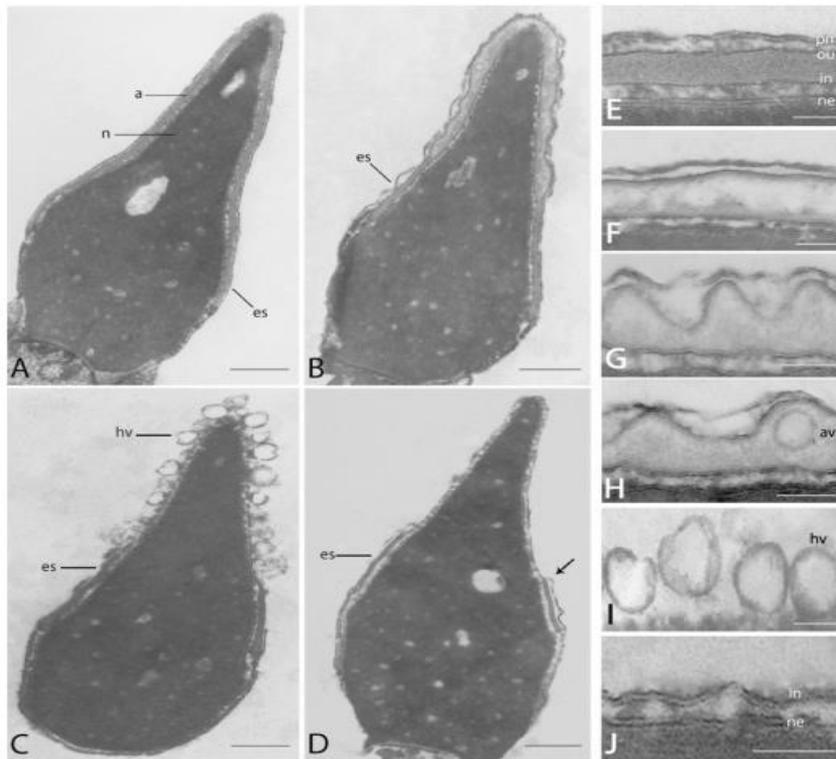
<b><i>La exocitosis acrosomal difiere morfológicamente de la exhibida por otras células secretoras</i></b>		
	<b>Espermatozoide</b>	<b>Otras células</b>
<b>Número de vesículas secretorias/célula</b>	Uno	varias
<b>Número de poros de fusión/vesícula</b>	Varios	uno
<b>Rondas de exocitosis/célula</b>	Una	más de una
<b>Fusión de membranas</b>	pérdida de membranas acrosomal externa y plasmática (vesiculización)	membrana de la vesícula incorporada a la membrana plasmática
<b>Remodelado y reciclado de membranas post-exocitosis y/o endocitosis</b>	No	si

**Tabla 1: Esquema comparativo de las diferencias morfológicas entre la exocitosis del acrosoma y otros tipos de células secretoras.** Esquema obtenido de *Tomes 2006*.

Luego de que los espermatozoides liberan el acrosoma, la membrana acrosomal interna queda expuesta y pasa a ser la membrana más externa de estas células. Curiosamente, la fusión espermatozoide-óvulo no se inicia en el área de la membrana acrosomal interna, sino en la membrana del segmento ecuatorial. Parece ser que en el momento de la reacción acrosomal, la membrana plasmática debe sufrir un cambio drástico que permita la fusión con la membrana acrosómica externa, alterando la naturaleza de la membrana plasmática en el

segmento ecuatorial y posiblemente activando proteínas de fusión latentes (Okabe 2016). Se sabe que el acrosoma almacena  $\text{Ca}^{+2}$  y su interior es ácido. Durante la capacitación, el acrosoma se alcaliniza, lo que activaría las enzimas intraacrosómicas y estimularía la RA espontánea. Diversos experimentos en ratones y humanos, donde se ha estimulado la alcalinización del acrosoma con bases débiles permeables, han demostrado que se desencadena la RA. Por lo que se ha propuesto, que la elevación del pH del acrosoma, promovería el desensamble del núcleo amiloide de la matriz acrosomal, favoreciendo su liberación. Incluso esto ha sucedido en un medio nominalmente libre de calcio, lo que sugiere que la alcalinización del acrosoma es esencial para la liberación del  $\text{Ca}^{+2}$  desde esta vesícula y de todo el contenido acrosomal (Carrasquel Martínez et al. 2022).

Si nos detenemos a analizar la morfología de la membrana del espermatozoide mientras se produce la RA, veremos que se producen importantes cambios. Una vez activadas las múltiples vías de señalización, el gránulo se hincha y la membrana acrosomal externa forma invaginaciones, entrando en contacto con la membrana plasmática en múltiples puntos (Zanetti y Mayorga 2009; Sosa et al. 2015). La apertura y expansión de los poros de fusión en los puntos de contacto dan como resultado la formación de vesículas híbridas que luego se liberan junto con el contenido acrosomal (Zanetti and Mayorga 2009; Belmonte et al. 2016). En la Figura 8 podemos observar la transición morfológica que sufre un espermatozoide desde un estado de reposo a uno estimulado. En los cuadros A y E, la mayoría de los espermatozoides en reposo, presentan un acrosoma denso y una membrana acrosomal externa plana proximal y paralela a la membrana plasmática. Al contrario, cuando los espermatozoides están reaccionados, pierden su acrosoma, exponiendo su membrana acrosomal interna (Figura 8, D y J). En la Figura 8 cuadro F, podemos ver un acrosoma hinchado o en estado de “*swelling*”, es decir el acrosoma mantuvo su morfología de reposo, pero la distancia entre las membranas interna y externa del acrosoma es mayor. En los cuadros G y H de la Figura 8, podemos ver como algunos espermatozoides exhiben una membrana acrosomal externa ondulada y específicamente en la Figura 8 cuadro H, podemos observar como las ondulaciones aumentan de tamaño hasta que entran en contacto con la membrana plasmática, produciendo la aposición de las membranas o “*docking*”. En la Figura 8 cuadros B y H, vemos la presencia de vesículas dentro del acrosoma. Finalmente, en las aposiciones se produce la apertura de los poros de fusión, que se expanden y dan lugar a la formación de vesículas híbridas (compuestas por porciones de ambas membranas), como se observa en la Figura 8 cuadros C e I (Zanetti and Mayorga 2009).



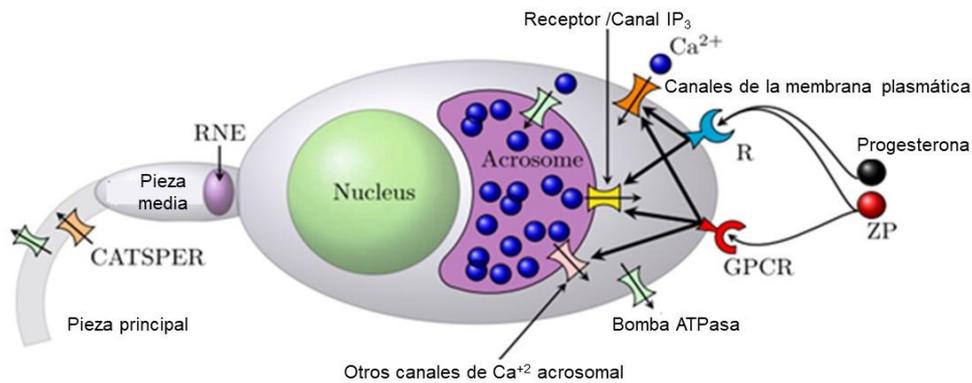
**Figura 8: Morfología de las membranas del espermatozoide durante la RA.** Espermatozoides humanos fueron tratados con 2-aminoetoxi-difenilborato (2-APB) para inhibir la RA y la pérdida del acrosoma y luego estimulados con A23187 (para inducir la RA). Micrografías electrónicas que ilustran las diferentes etapas de la RA; a, acrosoma; es segmento ecuatorial; n, núcleo; hv, vesículas híbridas. **A:** Espermatozoide intacto o en reposo (sin reaccionar). **B:** Espermatozoide con el acrosoma hinchado. **C:** Espermatozoide con el acrosoma vesiculizado. **D:** Espermatozoide reaccionado. Los cuadros E-J muestran con mayor definición los cambios que suceden en las membranas de la cabeza del espermatozoide durante la RA. **E:** Espermatozoides no reaccionados, con acrosoma electrón-denso y membranas acrosomal externa y plasmática paralelas. **F:** Acrosoma hinchado con ondulación de la membrana acrosomal externa. **G:** Acrosoma hinchado con deformación de la membrana acrosomal externa. **H:** Acrosoma hinchado con deformación de la membrana acrosomal externa y vesícula interna (av). **I:** Acrosoma vesiculizado con presencia de vesículas híbridas (hv). **J:** Espermatozoide reaccionado donde sólo se observa la membrana acrosomal interna (in) y la membrana nuclear (ne). Imagen tomada de *Zanetti & Mayorga, 2009*.

Desde el punto de vista molecular, en las aposiciones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática participan las proteínas SNARE (receptores de unión del factor sensible a N- etilmaleimida soluble, del inglés: *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptors*), que son clave para el *docking* entre las membranas que se van a fusionar. Específicamente las proteínas SNARE tienen que formar complejos en configuración *trans* para que se produzca el acercamiento de dichas membranas ([Zanetti and Mayorga 2009](#); [De Blas et al. 2002](#); [Siu et al. 2021](#)). Hablaremos con más detalle de este proceso en los próximos capítulos.

### 2.4.1 El papel del calcio en la RA

La RA ha sido estudiada durante décadas y hoy en día, se sabe que a pesar de todos los inductores que se han descrito, la RA está mediada en última instancia por la elevación del calcio citosólico (De Blas et al. 2002; Li et al. 2020). Se considera que la zona pelúcida (ZP) es la principal desencadenante fisiológica de la RA en los espermatozoides de mamíferos, específicamente la proteína ZP3 y la hormona esteroide progesterona (Pg), que es secretada a niveles micromolares por el ovocito. La acción de cualquiera de estos efectores induce la RA a través de un incremento en la concentración de calcio intracelular (Harper et al. 2006). El calcio es un componente ubicuo en la señalización y regulación de muchos procesos celulares en todas las especies. Las oscilaciones de calcio están implicadas en diversos eventos secretores, como la liberación de neurotransmisores. Al contrario, en los espermatozoides, la RA no es un proceso de liberación periódica de calcio sino un evento final antes de la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del óvulo. Esta liberación de calcio en el espermatozoide tiene dos componentes: un fuerte aumento inicial de las concentraciones de calcio en la cabeza del espermatozoide, seguido de una fase de relajación en la que la concentración de calcio tiende hacia un nivel elevado constante. Cuando se induce la RA se activan canales de la membrana plasmática. Diversos estudios han descrito que los canales involucrados con el inicio de la RA podrían ser un receptor acoplado a proteína G (como se grafica en la Figura 9), que conduciría a la activación de dos enzimas, la fosfolipasa C (PLC) y la adenilato ciclasa (AC) (Simons and Fauci 2018). También se ha propuesto que en la primera entrada de calcio participan los canales  $Ca_v$  tipo-T. Esta familia de canales posee tres miembros  $Ca_v3$ ,  $Ca_v3.1$  y  $Ca_v3.2$ . Los canales  $Ca_v3.1$  y  $Ca_v3.2$  están presentes en la región acrosomal del espermatozoide, sin embargo, los ratones que carecen de estos canales siguen siendo fértiles. El calcio que ingresa por los canales  $Ca_v$  activa a PLC (Darszon et al. 2006). La activación de PLC, hace que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) se separe en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trisfosfato ( $IP_3$ ). La producción de DAG, activa la proteína quinasa C (PKC), que puede abrir canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática, aumentando así los niveles de calcio citosólico. La afluencia de calcio activa los receptores  $IP_3$  que controlan la apertura de canales dependientes de  $IP_3$ . Estos canales pueden liberar calcio desde un depósito interno como el acrosoma hacia el citoplasma. La salida de calcio del acrosoma, causada por la apertura de canales de calcio controlados por el  $IP_3$ , activan los canales de calcio SOCC (del inglés, *store-operated calcium channels*) en la membrana plasmática del espermatozoide, incrementando de forma rápida y sostenida la concentración de calcio citosólico, produciéndose finalmente la liberación del acrosoma (De Blas et al. 2002; Darszon et al. 2006; Simons and Fauci 2018;

Li et al. 2020). acrosomal. Se cree que los canales SOCCs pertenecen a la familia de los Trp (del inglés: *Transient receptor potencial*) y que son los responsables de la elevación lenta y prolongada de la concentración de calcio citoplasmática descrita anteriormente (Darszon et al. 2006). Otras fuentes de calcio están dispersas en el espermatozoide, como los canales CatSper (del inglés, *Cation channel of Sperm*) que se localizan a lo largo de la pieza principal del flagelo y se considera que pueden propagar señales de calcio hacia la cabeza del espermatozoide. Se ha descrito que estos canales permiten la entrada del calcio necesario al flagelo del espermatozoide, para cambiar la forma del movimiento flagelar, proceso denominado hiperactivación (Lishko and Mannowetz 2018). Se postula que la pieza intermedia, también puede contener bombas ATPasa y receptores IP<sub>3</sub>, que regularían el contenido de calcio (Simons and Fauci 2018). En la Figura 9 podemos ver un esquema de los principales canales y receptores que participan en la RA.

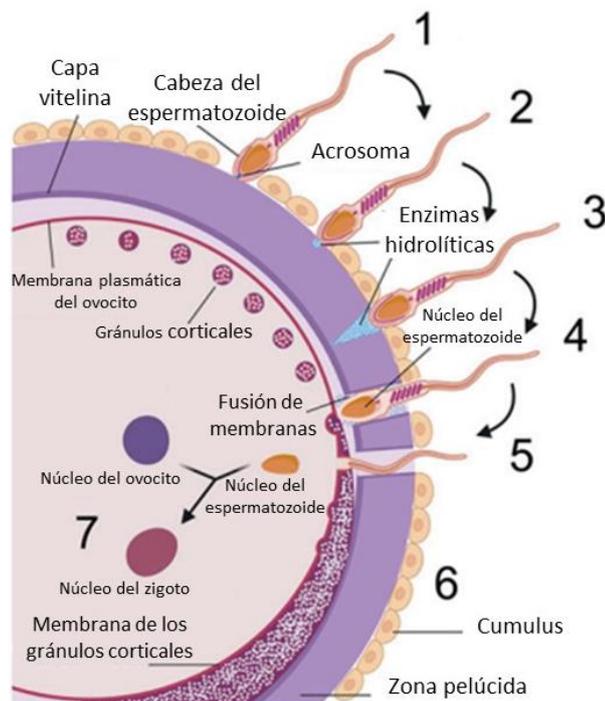


**Figura 9: RA estimulada por glicoproteína (ZP) o progesterona.** Se muestra una imagen representativa de la respuesta del espermatozoide a dos estímulos fisiológicos. Los receptores son R o GPCR (receptor específico de la proteína G). Las bombas de Ca<sup>2+</sup> ATPasa se muestran en verde, los receptores/canal IP<sub>3</sub> en amarillo, los canales CATSPER en naranja y otros canales de calcio acrosomales en rosa. Las flechas a través de las bombas indican el transporte de calcio. Imagen tomada y modificada de *Simon & Fauci, 2018*.

## 2.5 La fecundación

La fecundación se define como la unión de dos gametos, es decir el espermatozoide y el óvulo se fusionan para formar un cigoto diploide y así iniciar el desarrollo de un nuevo ser vivo (Siu et al. 2021). Una vez que el espermatozoide es liberado en el tracto genital femenino, debe unirse a la zona pelúcida (Figura 10). Esto se realiza, como ya lo explicamos a través

de las proteínas ZP, siendo la ZP3 la que cuenta con mayor evidencia. El espermatozoide penetra en la zona pelúcida, liberando enzimas hidrolíticas, gracias a la exocitosis del acrosoma e ingresa al espacio perivitelino. Luego el segmento ecuatorial del espermatozoide (recordemos que ya ha perdido el acrosoma, dejando al descubierto su membrana acrosomal interna) se fusiona con el oolema, permitiendo el ingreso del material genético masculino (Zeginiadou et al. 2000). La fusión de los gametos es un evento dependiente de carbohidratos que tiene lugar a través de la interacción entre varias moléculas de unión a glicanos (receptores) presentes en la membrana plasmática del espermatozoide con sus correspondientes glicanos (ligandos) localizados en la zona pelúcida del ovocito (Wassarman 1999). Este proceso en mamíferos requiere tres tipos diferentes de eventos de fusión de membranas. En primer lugar, el espermatozoide necesita secretar su contenido acrosómico (reacción acrosomal), permitiendo que penetren en la matriz extracelular del ovocito (zona pelúcida) y alcancen su membrana plasmática (Gadella and Evans, 2011). Sin embargo, hay evidencia de que la RA puede ocurrir antes del paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida y aun así fertilizar los ovocitos (Jin et al., 2011). En segundo lugar, después de la penetración de la zona pelúcida, el espermatozoide entra al espacio perivitelino donde se une y fusiona con la membrana plasmática del ovocito (también conocida como *oolema*). Esta fusión es la verdadera fertilización, ya que en este paso el contenido de los espermatozoides se vacía en el citoplasma del ovocito. Finalmente, el ovocito fertilizado necesita prevenir la fertilización poliespérmica, por lo que secreta el contenido de los gránulos corticales mediante la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática del ovocito sobre toda su superficie celular (reacción cortical o exocitosis de los gránulos corticales). Los contenidos corticales secretados modifican la zona pelúcida, convirtiéndola en una célula no receptiva de espermatozoides, produciendo un bloqueo a la polispermia (Gadella and Evans, 2011). La zona pelúcida es una barrera física entre el ovocito y las células foliculares que se forma a partir de glicoproteínas secretadas por los folículos primarios. Existen cuatro glicoproteínas que forman la zona pelúcida en humanos, ZP1 a ZP4. Diversos experimentos, han propuesto que las proteínas ZP humanas purificadas ZP1, ZP3 y ZP4 se unen a los espermatozoides humanos capacitados e inducen la reacción acrosomal, mientras que ZP2 se une a espermatozoides con acrosomas intactos. Estas particularidades deberán ser revisadas ya que la evidencia actual expresa que la RA se puede producir antes de que el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida. Más allá de las funciones de cada una de las glicoproteínas ZP, está bien definido que su rol fundamental es la prevención de la polispermia. Una vez que el espermatozoide penetró la zona pelúcida, ingresa al espacio perivitelino y puede unirse y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo (Siu et al. 2021).



**Figura 10: Esquema representativo de la fusión de los gametos.** En la imagen se pueden observar los pasos secuenciales a través de los cuales se produce la unión de los núcleos femenino y masculino. **1:** El espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito. **2 y 3:** Se liberan las enzimas hidrolíticas que permiten penetrar en la zona pelúcida. **4:** El espermatozoide se fusiona con el ovocito. **5 y 6:** El espermatozoide alcanza el espacio perivitelino, desencadenando la exocitosis de gránulos corticales (previniendo la poliespermia). **7:** El núcleo del espermatozoide ingresa al citoplasma del ovocito, donde sufre importantes cambios morfológicos y se fusiona con el núcleo del ovocito.

Aunque miles de espermatozoides lleguen a la zona pelúcida, solo uno suele llegar al espacio perivitelino. Luego del ingreso de un espermatozoide en este espacio, el ovocito sufre una activación, a través de un mecanismo que aún no está claro por completo, pero se sabe que se produce un cambio en el potencial de membrana y un dramático aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. El aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, estimula la exocitosis de los gránulos corticales, liberando las enzimas hidrolíticas que contienen al espacio perivitelino. Estas enzimas modifican las características químicas y físicas de la zona pelúcida, haciéndola impenetrable para los espermatozoides. Tras la activación por el espermatozoide, el ovocito reanuda la meiosis, pasando a la anafase y luego a la telofase y finalmente se divide en dos células desiguales: el ovocito fertilizado y el segundo cuerpo polar, cada uno de los cuales contiene la mitad del ADN materno. La consecuencia de esta división asimétrica es que la mayoría de las moléculas y la información almacenada durante la ovogénesis que son necesarias para

el desarrollo temprano se retienen en el citoplasma del ovocito. Finalmente, después de que el núcleo del espermatozoide se incorpora al citoplasma del ovocito, sufre una serie de transformaciones, se desintegra la envoltura nuclear, se descondensa la cromatina y se reemplazan las protaminas por histonas. Luego, gracias al desarrollo de las envolturas nucleares alrededor de la cromatina femenina y masculina, se forman los pronúcleos. La aposición de los pronúcleos en el centro del ovocito es un requisito previo para el ensamblaje de los cromosomas paterno y materno en el huso, para la primera división (Plachot 2000).

### 3. La exocitosis

La exocitosis es un componente esencial de la señalización celular en todo el cuerpo y sustenta una diversa gama de vías fisiológicas esenciales (Thorn et al. 2016). Todas las células eucariotas contienen vesículas rodeadas de membrana que están destinadas a exportarse. El transporte de estas vesículas hasta la membrana plasmática requiere un gasto de energía metabólica. Cuando la vesícula se encuentra a unos pocos nanómetros de la superficie celular se produce la exocitosis, es decir, la membrana vesicular se fusiona con la membrana plasmática liberando su contenido. Durante este proceso, la membrana vesicular se convierte en parte de la membrana celular. Podemos clasificar la exocitosis en constitutiva, la llevan a cabo todas las células, o regulada solo la realizan algunas células especializadas como las neuronas o células endócrinas. En la exocitosis constitutiva, las vesículas se liberan tan pronto como alcanzan la membrana celular (Almers 1990). Los niveles de  $Ca^{+2}$  celular en reposo parecen ser necesarios para muchas reacciones de fusión constitutivas, como el tránsito del RE al aparato de Golgi, la fusión intra-Golgi, la fusión vacuolar y la fusión endosómica (Martin 2003). En la exocitosis regulada, las vesículas se acumulan cercanas a la membrana celular y solo se liberan cuando se produce un aumento en la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico (Almers 1990; Burgoyne and Morgan 1993). La exocitosis es un proceso dinámico, rápido y espacialmente restringido que implica múltiples pasos, como el tráfico de vesículas, el anclaje o “*tethering*”, el acoplamiento o “*docking*”, el cebado o “*priming*” y la fusión de las membranas (Thorn et al. 2016).

### 3.1. La exocitosis regulada

Existen dos tipos principales de exocitosis regulada, una que ocurre en los mastocitos, células endocrinas y neuroendocrinas, y el otro en las sinapsis neuronales. Las células neuroendocrinas o endócrinas contienen vesículas secretoras, también conocidas como gránulos secretores o vesículas de núcleo denso, que tienen una variación de tamaño considerable, con diámetros mayores a 100 nm y frecuentemente contienen más de una molécula cargo. Ambas clases de vesículas, sinápticas y secretoras, pasan por la misma serie de eventos: reclutamiento de vesículas a la membrana plasmática, unión específica a la membrana plasmática, su preparación y luego activación de la fusión de la membrana (Söllner 2003). Este tipo de exocitosis está estrechamente controlada por señales específicas y, en muchos casos se produce en áreas restringidas de la membrana plasmática. Como resultado, en condiciones de reposo, las células secretoras acumulan vesículas en el citosol o cercanas a la membrana plasmática o ambas cosas (Söllner 2003). Esta exocitosis, está estrictamente regulada por calcio. En niveles de reposo, el calcio citosólico se mantiene en una concentración menor a 0.1  $\mu\text{M}$ , pero cuando la célula sufre cambios globales o locales de  $\text{Ca}^{+2}$  (1 a 100  $\mu\text{M}$ ), se activa la fusión en los sitios de exocitosis. Diversos estudios indican que sinaptotagmina (Syt), proteína anclada a la membrana de las vesículas secretoras utilizando un único dominio transmembrana, detecta los niveles de calcio que activan la exocitosis y facilita la fusión de membranas. Se ha reportado que la ablación genética de Syt en ratones da como resultado la pérdida del componente sincrónico rápido de la exocitosis. Además, se ha propuesto que Syt, podría evitar la fusión constitutiva en células en reposo, ya que analizando la unión neuromuscular en mutantes nulos para Syt en *Drosophila*, se observó un aumento en la frecuencia de eventos de fusión espontánea (Martin 2003). El mecanismo de exocitosis regulada implica a las proteínas Rab, sec-1/Munc18, Syt y las SNARE. Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas, de 20 a 25 kDa. En levaduras, se ha descrito que las Rab interactúan con las proteínas SNARE y con proteínas SM (del inglés: *Sec1/Munc18-like*). Las proteínas SM, son proteínas solubles de aproximadamente 65 kDa que se unen a sintaxina (una Q-SNARE) (Jahn and Südhof 1999). Las proteínas SNARE (receptores de unión del factor sensible a N etilmaleimida soluble, del inglés: *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptors*), incluyen a sinaptobrevina-2, sintaxina 1 y la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa (SNAP25). El mecanismo exacto por el cual las proteínas SNARE influyen en la exocitosis regulada, aún no es muy claro, pero existe evidencia de que durante la interacción dinámica entre la sinaptobrevina-2, la sintaxina 1 y SNAP25, la vesícula se acerca progresivamente a la membrana plasmática, alrededor de 12 nm, preparando a la vesícula para una eventual fusión con la membrana plasmática. Este

proceso requiere una entrada sustancial de energía (Coorssen and Zorec 2012). Para que se lleve a cabo la fusión, las proteínas SNARE son activadas por NSF, una ATPasa chaperona que disocia los complejos centrales de las SNARE y las proteínas Rab se dirigen a los orgánulos afines y se cargan con GTP (Jahn and Südhof 1999). La proteína NSF (*N*-etilmaleimida factor sensible, del inglés: *N-ethylmaleimide sensitive factor*) es una pieza esencial en el tráfico de membranas intracelulares y se ha demostrado que actúa a través de proteínas adaptadoras llamadas SNAP (proteínas de unión NSF solubles, del inglés: *soluble NSF-attachment proteins*) que no guardan relación con la proteína SNAP-25 y sus homólogos (Südhof and Rizo 2011; Ryu et al. 2016). NSF es una ATPasa de tipo II con dos dominios de unión a ATP. Los monómeros de NSF se ensamblan en un homohexámero y cada monómero consta de tres dominios: el dominio N-terminal y dos dominios AAA+ (ATPasas asociadas con otras actividades, del inglés: *ATPases associated with other activities*). Los dominios AAA+ son comunes en la familia de NSF donde todas las proteínas transducen la hidrólisis de ATP en movimientos conformacionales importantes que se utilizan para llevar a cabo el trabajo conformacional en sus proteínas cliente. Se cree que los dominios N-terminal de NSF son responsables de interactuar con  $\alpha$ -SNAP y el complejo SNARE. La proteína SNAP tiene tres isoformas en mamíferos que se denominan  $\alpha$ SNAP,  $\beta$ SNAP y  $\delta$ SNAP (su ortólogo en levadura se denomina Sec17). Se ha descrito que  $\alpha$ SNAP se une a la superficie del complejo SNARE antes de que NSF desmonte el complejo. Aunque  $\alpha$ SNAP es indispensable en la acción de NSF, el mecanismo por el cual interactúa entre el complejo SNARE y NSF aún no se ha dilucidado completamente. La unión de NSF al complejo SNARE unido a  $\alpha$ SNAP da como resultado un gran complejo denominado complejo 20S. NSF se une al complejo solo cuando está unido a ATP, mientras que la unión se ve afectada cuando está unido a ADP. La carga del complejo  $\alpha$ SNAP-SNARE estimula la hidrólisis de ATP en NSF en uno o dos órdenes de magnitud. La energía libre liberada durante la hidrólisis de ATP induce cambios conformacionales en NSF, que a su vez se emplean para desensamblar el complejo SNARE (Ryu et al. 2016).

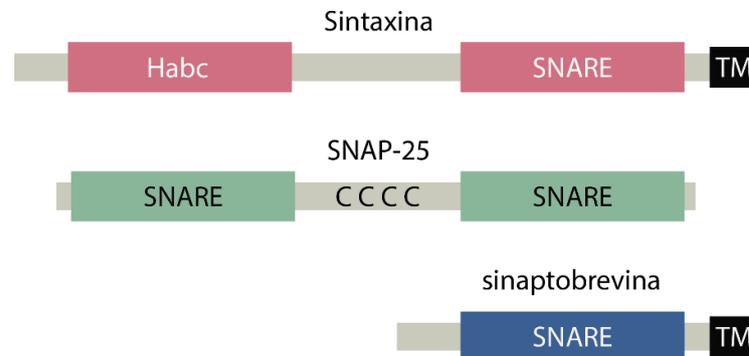
Antes de la fusión de las membranas, estas deben acercarse y reconocerse. Este acercamiento puede ser reversible, ya que se observó que, en células cromafines suprarrenales, las vesículas secretoras que ya están firmemente adheridas a la membrana plasmática pueden liberarse nuevamente sin fusionarse. Después de la unión de las membranas, se inicia la fusión, proceso que involucra el ensamblaje del complejo central SNARE. Es posible que este paso, implique una fusión parcial, requisito previo para la formación de los poros de fusión (Jahn and Südhof 1999). El poro de fusión es un canal estrecho acuoso rodeado por una membrana relativamente curvada. A primera vista estas estructuras parecen muy inestables, pero diversos trabajos han demostrado que un poro de

fusión puede reabrirse cientos de veces, por lo que tienen una estabilidad considerable, que puede surgir de la reorganización de los constituyentes de la membrana, incluida la acumulación específica de componentes anisotrópicos en la membrana que rodea el poro de fusión. El diámetro del poro de fusión puede fluctuar entre estados estrechos y más anchos, terminando a veces en la etapa de fusión completa (Coorsen and Zorec 2012).

### 3.2. Las proteínas SNARE

Las SNARE (del inglés, *Soluble NSF Attachment Protein REceptor*) forman una superfamilia de proteínas pequeñas que en su mayoría están ancladas a la membrana y comparten un motivo común de aproximadamente 60 aminoácidos (motivo SNARE). Estas proteínas se descubrieron en levaduras y neuronas, por lo que inicialmente en base a su localización y estructura general, las SNARE se clasificaron en t-SNARE (para SNARE localizadas en la membrana objetivo o "target") y v-SNARE (para SNARE localizadas en la membrana de la vesícula). Continuando con esta clasificación sináptica, las t-SNARE comprenden a la familia de proteínas syntaxina y SNAP-25, mientras que las v-SNARE contienen a la familia de sinaptobrevina. Durante los últimos años, se han descrito muchas proteínas SNARE adicionales, algunas con relación lejana a los tres "miembros fundadores" neuronales, por lo que es difícil clasificarlas en v- o t-SNARE. Por lo que el motivo SNARE es la característica definitoria de todas las proteínas que pertenecen a esta familia (Jahn and Südhof 1999; Jahn, Lang and Südhof, 2003). Tiempo después, cuando se obtuvieron las estructuras cristalinas del complejo de fusión se pudo observar que el complejo mantenía una asociación de cuatro hélices formado principalmente por interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, todos los complejos SNARE contienen una capa central hidrofílica conservada de aminoácidos que interactúan entre sí y se compone de tres residuos de glutamina y uno de arginina. Las mutaciones en esta capa central redujeron la estabilidad del complejo, causando defectos en el tráfico de membranas. Por lo que se propuso una re-clasificación de las proteínas SNARE en función de sus contribuciones a la capa hidrofílica o capa "iónica 0". Las R-SNARE proporcionan una arginina (R) a esta capa iónica y las Q-SNARE proporcionan glutaminas complementarias (Q). Aunque las R-SNARE incluyen la mayoría de las proteínas previamente clasificadas como v-SNARE, no hay razones estructurales por las que las hélices proporcionadas por las vesículas deban derivar solo de R-SNARE, como en el caso del complejo de fusión sináptica (Fasshauer et al. 1998; Südhof and Rizo 2011). La estructura de las proteínas SNARE es relativamente simple (Figura 11), con varios elementos

intrínsecamente desordenados y plegados, como el motivo SNARE, el dominio N-terminal y la región transmembrana, que interactúan con otras SNARE, con proteínas reguladoras y membranas biológicas (Khvotchev and Soloviev 2022).

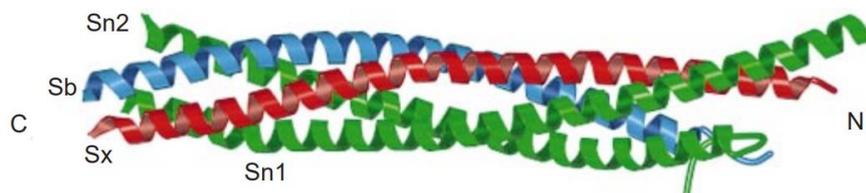


**Figura 11: Esquema de las proteínas SNARE.** Podemos observar a las tres proteínas fundadoras de esta familia, con su motivo SNARE característico detallado (SNARE) y sus dominios transmembrana (TM). La proteína SNAP-25 contiene dos motivos SNARE y ningún motivo TM. Se marcan en su estructura central las cisteínas (CCCC) donde se palmitoila. Sinaptobrevina y Sintaxina-1, llevan un solo motivo SNARE en su estructura y contienen un dominio transmembrana cada una. Imagen tomada y modificada de *Sudhof & Rizo, 2011*.

La proteína VAMP2, también conocida como sinaptobrevina-2, es una pequeña proteína de membrana intrínsecamente desordenada (Khvotchev and Soloviev 2022). Se ha descrito que en ratones *knockout* para sinaptobrevina, la tasa de fusión de vesículas sinápticas espontáneas disminuyó 10 veces y la desencadenada por  $Ca^{+2}$  lo hizo 100 veces, demostrando que sinaptobrevina puede catalizar las reacciones de fusión, pero no es absolutamente necesaria para la exocitosis (Schoch et al. 2001). La mayoría de las proteínas SNARE contienen una secuencia N-terminal corta y no estructurada generalmente de 10 a 30 residuos, que parece ser que no tiene una función determinada. Sin embargo, en sintaxinas, la región N-terminal forma una interfaz de unión con miembros de la familia de las proteínas Sec1/Munc18, también esenciales para la fusión de membranas. La parte central de esta proteína está ocupada por el motivo SNARE, que tiene una longitud de 60 a 70 residuos (Figura 11). La región C-terminal de las SNARE contiene una secuencia corta conectora yuxtamembrana de 10 residuos aproximadamente. Estos residuos conservados son hidrofóbicos y se postula que tienen propiedades activas para catalizar la fusión de membrana. Además, la mayoría de las SNARE tienen una región transmembrana (TM), de cerca de 20 residuos, que no solo ancla las proteínas SNARE a una membrana, sino que podría desempeñar funciones en la multimerización de las SNARE, la regulación de la fusión

de membranas y la dinámica de los poros de fusión. Algunas SNARE como SNAP-25 carecen de regiones transmembrana y se unen a una de ellas mediante modificaciones postraduccionales hidrofóbicas, como la palmitoilación en la región que contiene las cisteínas (Khvotchev and Soloviev 2022). Se ha reportado que sinaptobrevina, SNAP-25 y las SNARE Snc1, Syn8 y Tlg1 (presentes en levaduras), se palmitoilan en residuos de cisteína *in vivo* cerca de sus respectivos dominios transmembrana. Por lo tanto, la modificación de lípidos de las proteínas SNARE podría contribuir a la regulación del ciclo de vesículas sinápticas (Brunger 2005).

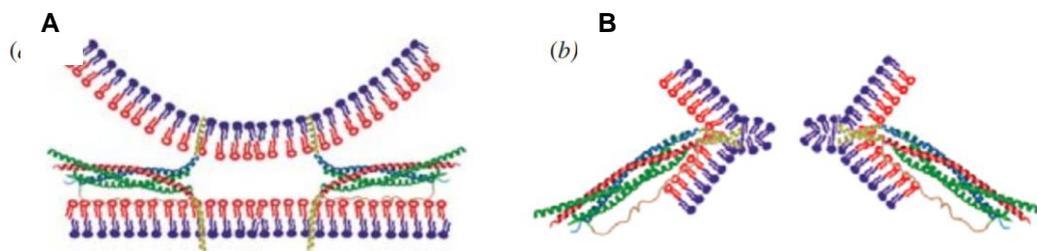
El complejo de fusión sináptica está dispuesto como un cilindro de 120 Å de longitud con sección transversal circular (Figura 12). Los cuatro componentes del heterotrímero están dispuestos en paralelo, con los extremos N terminal en un extremo del haz y los extremos C terminal en el extremo de anclaje de la membrana. El extremo N terminal del complejo central consiste en una interacción de dos hélices entre la sintaxina y la hélice α de SNAP-25 (Sn1). La parte central consta de un haz de cuatro hélices con un paso superhelicoidal a la izquierda en el que la hélice α de sinaptobrevina se yuxtapone con la sintaxina y las otras hélices α de SNAP-25 (Sn2). En el extremo C terminal del complejo, interaccionan las dos hélices de sinaptobrevina y sintaxina (Sutton et al. 1998).



**Figura 12: Topología del complejo de fusión sináptica.** Se puede observar la organización del complejo SNARE formado por cuatro hélices. En azul, sinaptobrevina-II (Sb); en rojo, sintaxina-1 (Sx) y en verde, SNAP-25 (Sn1 y Sn2). Imagen tomada de Sutton et al., 1998.

Se ha descrito que el ensamblaje del complejo SNARE avanza lentamente *in vitro*, pero se acelera con las proteínas reguladoras de SNARE *in vivo*. Cada proteína SNARE normalmente contribuye con un solo motivo SNARE, pero algunas proteínas, como SNAP-25 y sus homólogos (SNAP-23, -29, y -47) que contienen dos motivos puede participar en la formación de un solo complejo (Khvotchev and Soloviev 2022). Los complejos SNARE pueden ensamblarse de manera reversible en paquetes helicoidales apretados (Jahn and Südhof,

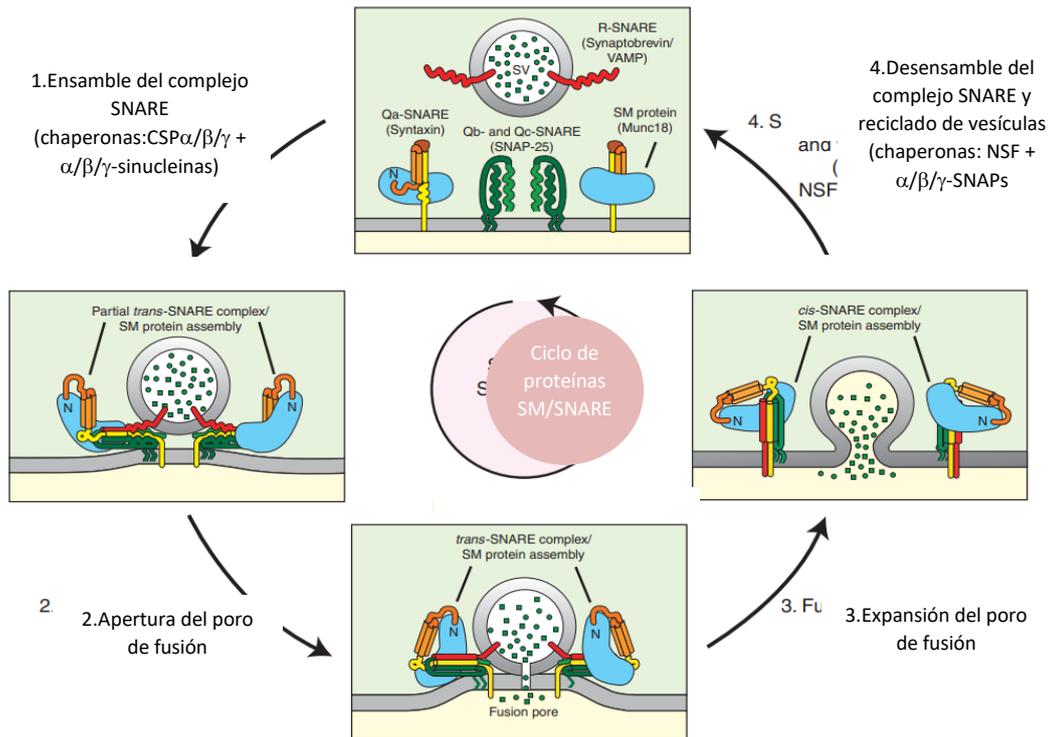
1999). Cuando el ensamblaje forma complejos *trans*-SNARES (Figura 13 A), es decir, las proteínas SNARE están ancladas en membranas diferentes, se produce la fuerza requerida para superar la barrera de energía asociada con la fusión de membrana, induciendo la unión de las bicapas. Luego del proceso de fusión, las proteínas SNARE, quedan acopladas en la misma membrana, por lo que se dice que forman complejos *cis*-SNARE (Figura 13 B). Estos complejos luego se desensamblan y se reciclan, por acción de la proteína ATPasa NSF junto con los cofactores solubles denominados SNAP (proteínas de unión soluble a NSF) (Zhang and Hughson 2021).



**Figura 13: El complejo SNARE en configuración *trans* y *cis*.** (A) Complejo *trans*-SNARE parcialmente ensamblado acoplando una vesícula a su membrana diana. Se asumió que los dominios transmembrana eran helicoidales. (B) Complejo *cis*-SNARE completamente ensamblado después de la fusión y la formación de poros. Imagen tomada de Brunger, 2005.

Gracias a que las proteínas SNARE son blancos de neurotoxinas producidas por bacterias del género *Clostridium* que causan tétanos y botulismo, se pudo determinar su rol esencial en la fusión de membranas. La toxina tetánica (TeTx) y siete neurotoxinas botulínicas (BoNT/A, -B, -C1, -D, -E, -F y G) inhiben la liberación de neurotransmisores debido a la escisión proteolítica altamente específica y dependiente de zinc de las proteínas SNARE. BoNT/A y -E escinden SNAP-25 y BoNT/C escinde a syntaxina y con menor eficiencia a SNAP-25. Las restantes BoNT, así como la toxina tetánica, son específicas de VAMP (Pellizzari et al. 1999; Tomes et al. 2002). Las proteínas SNARE solo son vulnerables a las neurotoxinas cuando no están ensambladas en complejos ternarios compactos (Hayashi et al. 1994; Tomes et al. 2002) es decir cuando se encuentran en un estado monomérico o ensambladas parcialmente (Sutton et al., 1998). La primera proteína SNARE identificada de esta manera fue la sinaptobrevina, cuando se demostró que la toxina tetánica y algunos subtipos de la toxina botulínica la escindían específicamente por la mitad. Luego se demostró que syntaxina1 y SNAP25, eran sustratos de diferentes subtipos de toxina botulínica (Südhof and Rizo 2011). Con ayuda de las últimas tecnologías, la energía, la cinética y las vías de

ensamblado de las proteínas SNARE *in vitro* se ha caracterizado muy bien, pero no está del todo claro como es el ensamblaje, con ayuda de chaperonas reguladoras, de manera fisiológica (Zhang and Hughson 2021). Se ha descrito que el ensamblaje competente de las SNARE para la fusión de vesículas sinápticas se mantiene mediante complejos de chaperonas formados por CSP $\alpha$ , Hsc70 y SGT, y por la chaperona sinucleína que actúa de forma no enzimática (Südhof and Rizo 2011). Además, existe el consenso de que una de las proteínas fundamentales para el ensamblaje del complejo SNARE *in vivo* es la familia de proteínas SM. Una de las primeras proteínas descrita de esta familia en levaduras fue Sec1. Tiempo después se descubrió en humanos a Munc18. Juntos, Sec1 y Munc18, le dieron el nombre a la familia SM. Los humanos tienen siete proteínas SM, entre ellas: Munc18-1, Munc18-2 y Munc18-3 que participan en la exocitosis (Zhang and Hughson 2021). También, se han descrito proteínas adicionales que actúan sobre esta maquinaria para controlar con precisión la ubicación, el tiempo, la velocidad y la magnitud de la fusión de membranas (Zhang and Hughson 2021; Khvotchev and Soloviev 2022). Las proteínas SNARE funcionan mediante ciclos de ensamblaje y desensamblaje de los complejos, para llevar a cabo la fusión. En estos ciclos de fusión cumplen un papel importante la chaperona NSF y  $\alpha$ -SNAP, que hacen que las proteínas SNARE estén disponibles nuevamente para otra ronda. El ciclo comienza con los amino y carboxilos terminales formando un estilo de cremallera en complejos *trans*-SNARE que acortan la distancia entre las membranas que van a fusionar (Figura 14-1). Se postula que el cierre completo de estos complejos produce la apertura del poro de fusión, aunque es posible que el cierre completo solo estrese las membranas y que la apertura del poro de fusión ocurra posteriormente con ayuda de las proteínas SM. Después de la apertura del poro de fusión, las dos membranas se fusionan por completo y los complejos *trans*-SNARE se convierten en complejos *cis*-SNARE (Figura 14-2), que se disocian en monómeros gracias a la participación de NSF y  $\alpha$ -SNAP (Figura 14-4) (Südhof and Rizo 2011).



**Figura 14: Ciclo de ensamblado y desensamblado de las proteínas SNARE.** (1) Durante el “priming” (cebado), las proteínas SNARE se ensamblan parcialmente en complejos *trans* y las proteínas SM se asocian con estos complejos al unirse al extremo amino de la syntaxina (cuadro izquierdo). (2) Luego, el ensamblaje completo de las SNARE en configuración *trans*, separa las membranas, abriendo el poro de fusión (cuadro inferior), que se expande de tal manera que la membrana de la vesícula colapsa en la membrana objetivo, y (3) los complejos *trans*-SNARE se convierten en complejos *cis*-SNARE (cuadro derecho). (4) Finalmente, los complejos *cis*-SNARE son disociados por la ATPasa NSF que actúa en conjunto con sus adaptadores  $\alpha/\beta/\gamma$ -SNAP (Figura adaptada y modificada de *Sudhof & Rizo, 2011*).

Las disfunciones de esta maquinaria de fusión están vinculadas a trastornos neurológicos, diabetes, cáncer y enfermedades inmunológicas en los humanos ([Zhang and Hughson 2021](#); [Khvotchev and Soloviev 2022](#)).

### 3.3. Las chaperonas moleculares

Podemos definir como *chaperona molecular* a cualquier proteína que interactúa y ayuda en el plegamiento o ensamblaje de otra proteína sin ser parte de su estructura final (Kim *et al.*, 2013) y que aseguran el mantenimiento de un proteoma funcional en condiciones normales y de estrés ([Quan and Bardwell 2012](#)). La proteostasis u homeostasis de las proteínas (control

de calidad de proteínas), que incluye la regulación de la síntesis, el plegamiento, el desdoblamiento y el recambio de proteínas, está mediada por un sistema de chaperonas y proteasas. Estos sistemas de control de calidad tienen un papel esencial en la vida de las células, asegurando que las proteínas se plieguen correctamente y funcionen en el lugar y momento correctos (Saibil, 2013). Aunque el mecanismo de trabajo de las principales familias de chaperonas está bien descrito, la especificidad por sus proteínas cliente aún no está lo suficientemente bien definido como para permitir predecir con precisión el impacto de una chaperona particular en un cliente específico. La transcripción de muchas chaperonas está regulada por estímulos de estrés, como el choque térmico. Esta inducción confiere termotolerancia y por lo tanto contribuye a la resistencia al estrés de un organismo (Quan and Bardwell 2012). El buen funcionamiento de este sistema de chaperonas es crucial para el plegamiento, la translocación y el despliegue de las proteínas cliente. Los desequilibrios en la proteostasis se observan en un número creciente de enfermedades, lo que enfatiza la importancia del control de calidad de las proteínas celulares. El plegamiento incorrecto de proteínas es el trastorno más frecuente, y se manifiesta por la formación de depósitos intra y/o extracelulares de proteínas agregadas. Ejemplos de estos estados de alteración, son la formación de inclusiones intracelulares con  $\alpha$ -sinucleína o huntingtina agregada en las enfermedades de Parkinson o Huntington respectivamente, o la acumulación de placas extracelulares de  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Estudios actuales han reportado las deficiencias en la proteostasis, en otras enfermedades relacionadas con la edad, como la diabetes tipo II, la amiloidosis periférica, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, demostrando que con el envejecimiento se produce una disminución gradual de la capacidad de proteostasis celular (Kim et al. 2013). En una célula típica, los diferentes tipos de chaperonas se organizan en una gran red funcional, en la que múltiples chaperonas dependientes e independientes de ATP, con proteínas clientes parcialmente superpuestas actúan juntas para protegerlos de plegamientos no productivos (Hiller 2019). Se han descrito más de 20 familias de chaperonas, que difieren principalmente en cuanto a su peso molecular y características estructurales. Debido al hecho de que se identificaron originalmente sobre la base de su capacidad para conferir resistencia celular al estrés ambiental, la mayoría de estas familias de chaperonas se denominan proteínas de choque térmico (Hsp, del inglés *Heat shock proteins*). En los mamíferos, las Hsp se clasifican según su peso molecular y se dividen comúnmente en las familias Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y Hsp27 (Tabla 2) (Narberhaus 2002; Kim et al., 2013). Las principales chaperonas utilizan ciclos de unión e hidrólisis de ATP para actuar sobre los polipéptidos no nativos, facilitando su plegamiento o despliegue. Otras simplemente tienen una función de "transferencia", protegiendo las subunidades nacientes durante el proceso de ensamblaje (Saibil, 2013). En humanos, se

estima que entre 20000 y 25000 proteínas son responsables de la ejecución exitosa de los procesos celulares (Kim et al., 2013).

<b>Principales familias de chaperonas en mamíferos</b>				
<b>Nombre</b>		<b>Localización celular</b>	<b>ATPasa</b>	<b>Prevención pasiva de la agregación</b>
<b>Eucariotas</b>	<b>Procariotas</b>	<b>Eucariotas</b>		
Hsp100	Clp B	MT	+	-
Hsp90	HtpG	Cit, RE, MT	+	+
Hsp70, Hsc70	DnaK	Cit, RE, MT	+	+
Hsp40	DnaJ	Cit, RE, MT	- (cataliza las ATPasas en Hsp70)	+
Hsp60	GroEL	MT	+	+
Hsp22/27	IbpA, IbpB	Cit, RE, MT	-	+

**Tabla 2: Principales familias de chaperonas moleculares en mamíferos.** En la tabla se muestran la ubicación celular y sus funciones centrales. MT: mitocondria, Cit: citoplasma, RE: retículo endoplasmático, Hsp: heat-shock protein. Tabla tomada de *Hinault et al., 2006*.

Como ya mencionamos, las chaperonas moleculares son actores fundamentales en diversas células y procesos, por lo que es de esperar que también tengan un rol importante en el proceso de maduración del espermatozoide. Como revisamos anteriormente, la maduración del espermatozoide depende de la pérdida, modificación y/o remodelación de las proteínas espermáticas existentes en respuesta a las señales proporcionadas por los tractos reproductivos masculino y femenino. Si bien muchos aspectos de la espermatogénesis y la maduración posttesticular de los espermatozoides aún no se han dilucidado por completo, cada vez es más evidente que estos elaborados procesos están cuidadosamente regulados por una gran cantidad de productos genéticos que se expresan en una fase específica y es de esperar que varias clases de chaperonas moleculares se encuentran entre las que han demostrado desempeñar funciones indispensables durante todas las etapas del desarrollo de los espermatozoides ([Dun et al. 2012](#)).

También, describimos con anterioridad a las proteínas SNARE y las proteínas Sec1/Munc18 (SM) como actores principales de casi todos los eventos de fusión de membranas intracelulares y la exocitosis. Si bien se sabe que las SNARE participan en la fusión, las vías fisiológicas del ensamblaje de los complejos SNARE y los roles mecánicos de las proteínas SM, han sido el objetivo de diversas investigaciones durante mucho tiempo. En la actualidad sabemos que las proteínas SNARE necesitan a diversas proteínas chaperonas para alcanzar sus conformaciones (Zhang and Hughson 2021). Además, se ha descrito que, en ausencia de chaperonas, las SNARE se ensamblan incorrectamente en formas incapaces de mediar en la fusión de membranas, por lo que el papel de las proteínas chaperonas es esencial para el ensamblado correcto de las SNARE y en consecuencia para una exocitosis eficaz (Brunger 2005). Existe una maquinaria molecular para llevar a cabo una rápida y sincrónica exocitosis. Esta maquinaria está formada por proteínas auxiliares que realizan contribuciones esenciales a la exocitosis regulada (Gundersen 2020). A continuación, se desarrollarán las características principales de las familias de chaperonas, involucradas en este trabajo de investigación.

### 3.3.1 La familia de co-chaperonas Hsp40

Las proteínas de la familia DnaJ/Hsp40 (proteína de choque térmico 40) se han conservado a lo largo de la evolución y son importantes para la traducción, el plegamiento, el despliegue, la translocación y la degradación de proteínas. Se sabe que estimulan la actividad ATPasa de otra chaperona, la Hsp70 (Chamberlain and Burgoyne, 1997). En humanos, se han descrito 41 miembros de la familia DnaJ/Hsp40; 34 contienen el típico dominio J y 7 lo conservan parcialmente, pero aún se considera que funcionan como proteínas DnaJ/Hsp40. El dominio J es una secuencia de 70 aminoácidos que tiene cuatro hélices y una región bucle entre las hélices II y III que contiene un tripéptido altamente conservado de histidina, prolina y ácido aspártico (el motivo HPD, Histidina, Prolina, Aspártico). Además del dominio J, estas proteínas contienen otras regiones conservadas, que son fundamentales para sus funciones y sirven para su clasificación (Figura 15) (Qiu *et al.*, 2006). Las de tipo I o A, está estrechamente relacionada con la DnaJ de *Escherichia coli* y comprende el dominio J en el extremo N-terminal, un dominio rico en glicina/fenilalanina (G/F), una región rica en cisteínas y un extremo C-terminal que reconoce y se une al sustrato. La función directa del dominio G/F aún no está clara, pero es probable que participe en el reconocimiento y modulación de sustratos. Las DNAJ tipo II o B, tienen una estructura similar a la del tipo A, un dominio J en el extremo N-terminal con una región G/F adyacente, pero carecen del dominio de dedo de

zinc (*zinc finger*). Cualquier proteína J que no tuviera una estructura que encaje en la clasificación de tipo I o II fueron asignadas a un tipo III o C. Básicamente, las proteínas de tipo III, contienen sólo el dominio J, que se puede localizar en cualquier parte de la proteína (Kampinga and Craig, 2010; Ruggieri *et al.*, 2016)



**Figura 15: Familia de proteínas DNAJ/Hsc40.** Clasificación según su estructura, en tres subtipos. El tipo I contiene un dominio J N-terminal (con un tripéptido conservado de histidina, prolina y ácido aspártico), adyacente a un dominio rico en glicina/fenilalanina (G/F), una región con dedos de zinc (Zinc finger) rica en cisteína y un dominio C-terminal, responsable de la unión a la proteína cliente. El tipo II es similar al tipo I, pero carece de la región del dedo de zinc. El tipo III tiene solo el dominio J conservado. Imagen tomada y modificada de Ruggieri *et al.*, 2016.

## La proteína CSP

La proteína CSP (del inglés, *Cysteine String Protein*), es una proteína que pertenece a la familia de co-chaperonas HSP40/DNAJ, caracterizada por la presencia de un dominio J y que pertenece al subtipo HSP40 tipo III o DNAJC (Ohtsuka, 1993). Los miembros de esta familia difieren entre sí por su ubicación subcelular y distribución tisular, pero la chaperona CSP se expresa en gran medida en todas las neuronas, donde se localiza en las membranas de las vesículas sinápticas en la terminal presináptica (Chamberlain and Burgoyne, 2000). En *Drosophila*, se informó que CSP interacciona con Sintaxina-1 (una t-SNARE) (Wu *et al.* 1999), mientras que, en vertebrados, se reportó que la CSP se une a la sinaptobrevina/VAMP pero no a la sintaxina (Leveque *et al.* 1998). Los mamíferos expresan tres isoformas de CSP:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (como se puede observar en la Figura 16), pero  $\alpha$ CSP es la principal isoforma en el cerebro y es la ortóloga de la única CSP expresada en invertebrados (Patel *et al.*, 2016). Por la misma razón es la isoforma más estudiada. Diversas investigaciones reportaron que  $\alpha$ CSP está asociada a vesículas sinápticas y otros tipos de orgánulos secretorios regulados, como los

gránulos de zimógeno pancreático, los gránulos secretores de la hipófisis anterior, los gránulos cromafines suprarrenales, los gránulos que contienen insulina de células  $\beta$  pancreáticas y los gránulos corticales de ovocitos de rana. Según los resultados que se obtuvieron a través de Northern blot y RT-PCR, se informó que las otras isoformas,  $\beta$ CSP y  $\gamma$ CSP eran específicas del testículo y que no habían sido reportadas en otros tejidos (Fernández-Chacón et al. 2004), pero tiempo después se informó que  $\beta$ CSP estaba presente en el epitelio auditivo y que protegía las células ciliadas internas en la retina de ratones  $\alpha$ CSP KO, además de demostrar que el RNAm de  $\beta$ CSP era detectable en el cerebro del ratón (Schmitz et al. 2006). Actualmente la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org>), muestra la expresión génica de  $\beta$ CSP (gen: DNAJC5B) en 41 tejidos y de  $\gamma$ CSP (gen: DNAJC5G) en 68 tejidos. El Atlas de Proteínas Humanas (Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>) informa que el RNAm de  $\beta$ CSP humana está presente en tejido testicular, sangre, músculos, pulmones, tejidos del sistema inmunitario y en riñones. La misma fuente de información reporta que existen niveles bajos de expresión de  $\gamma$ CSP en el cerebro (específicamente en la corteza cerebral, el hipocampo y las amígdalas), además de la sangre y el músculo (Gundersen 2020).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

DNAJC5  ---MADQRQRSLSTSGESLYHVLGLDKNATSDDIKKSY-----RKLAL 40
DNAJC5B MACNIPNQRQRTLSTTGEALYEILGLHKGASNEEIKKTY-----RKLAL 44
DNAJC5G --MSTVKEAAHRLSKSEMSLYAVLDLKKGASPEDFKKSYSHSALLPHPPFEYHLGRKLAL 58
      .:  : **:  :** :*.*.*.*: :::**.*          *****

DNAJC5  KYHPDKNPDNPEAADKFKEINNAHAILDATKRNIYDKYGSGLGLYVAEQFGEENVNTYFV 100
DNAJC5B KHHPDKNPDDPAATEKFKEINNAHAILDISKRSIYDKYGSGLGLYVAEQFGDENVNTYFM 104
DNAJC5G RYHPDKNPGNAQAAEIFKEINAAHAILSDSKKRKIYDQHGSGLGIYLYDHFGEEGVRYFYI 118
      :*****.: *:: ***** *****:* .**.***::****.*: :*:*.*. **;

DNAJC5  LSSWAKALFVFCGLLTCCYCCCCLCCCFNCCCCKKCPKAPEGEETEFYVS----PED-- 154
DNAJC5B LSSWAKALFVIVGLLTGCYFCCCLCCCNCCCCHCRPESSVP-EEDFYVS----PED-- 157
DNAJC5G LNRCWFKTLVILCTLLTCCCFCC----CCCFCCGALKPPPEQDSGRKYQQNVQSQPPRSG 174
      *.* *.**:..: *** * ** * *** :*          .: . *

DNAJC5  LEAQLQSDEREATDTPIVIQPASATETTQLTADSHPSYHTDGFN 198
DNAJC5B LEEQIKSDMEKDVPVFLQPTNANEKTLIKEGSRSYCTDS-- 199
DNAJC5G AKCDFRSEENSEDDF----- 189
      : :::*: .. *

```

**Figura 16: Alineamiento de las secuencias de las proteínas CSP humana  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .** Cuando las secuencias tienen residuos idénticos se muestran con (\*) y cuando son evolutivamente conservados como (:). Imagen tomada de Gundersen 2020.

La proteína CSP cuenta con regiones de su estructura primaria evolutivamente conservadas en invertebrados y vertebrados, siendo distinguible un sitio de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA) en su N-terminal; un dominio J; una cadena de cisteína que cuenta con 13 a 15 cisteínas dentro de un fragmento de 25 aminoácidos (región que le da el nombre a la proteína); una región “enlazadora o *linker*” que conecta el dominio J y la región rica en cisteínas; y por último un dominio menos conservado, el C-terminal (Arnold et al., 2004). Se ha demostrado que la proteína CSP se une a la membrana de las vesículas sinápticas (Evans and Morgan, 2005) y es esencial para la neurotransmisión normal en *Drosophila melanogaster*, ya que los mutantes nulos de CSP tienen un fenotipo parcialmente letal y unos pocos neurotransmisión alterada (Chamberlain and Burgoyne, 1997). Además, la delección de CSP causa degeneración presináptica en moscas, gusanos y ratones, lo que evidencia claramente su función neuroprotectora universal. En humanos, estudios recientes muestran que las proteínas tau y  $\alpha$ -sinucleína, serían posibles clientes de CSP, argumentando su rol en enfermedades neurodegenerativas. También se ha reportado que mutaciones en el gen de CSP provocan lipofuscinosis cerioidea neuronal (Benitez et al. 2011) y la disminución de su expresión es un evento temprano en la enfermedad de Alzheimer (Tiwari et al. 2015).

## Dominios de CSP

Como mencionamos anteriormente, los principales dominios de CSP incluyen un dominio J N-terminal, una región enlazadora o *linker*, una región rica en cisteínas ubicada centralmente, y un dominio C-terminal (Figura 17). El dominio J, es un motivo ampliamente conservado que comprende un tramo de 70 aminoácidos aproximadamente en el extremo N-terminal. Esta característica hizo que CSP se clasificara en la familia de proteínas de dominio J. Además, los dominios J se unen a la región de unión de nucleótidos (motivo HPD) de las proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70), funcionando como su co-chaperona (Braun et al. 1996). La unión de CSP a Hsc70 regula la actividad ATPasa de Hsc70, que ayuda a evitar que las proteínas desnaturalizadas se agreguen (Shirafuji et al., 2018). Además existe evidencia de que la interacción de CSP con Hsc70 refuerza la prevención de la agregación de la luciferasa desnaturalizada *in vitro* en luciérnagas (Prescott et al., 2008). La región rica en cisteínas de CSP, toma la forma de un dominio similar a un dedo de zinc y está involucrada en la prevención de la agregación de la proteína (Chamberlain and Burgoyne, 1997). Esta región está altamente palmitoilada en la proteína endógena y se sabe que es necesaria para su ubicación intracelular y su función (Greaves et al., 2008).

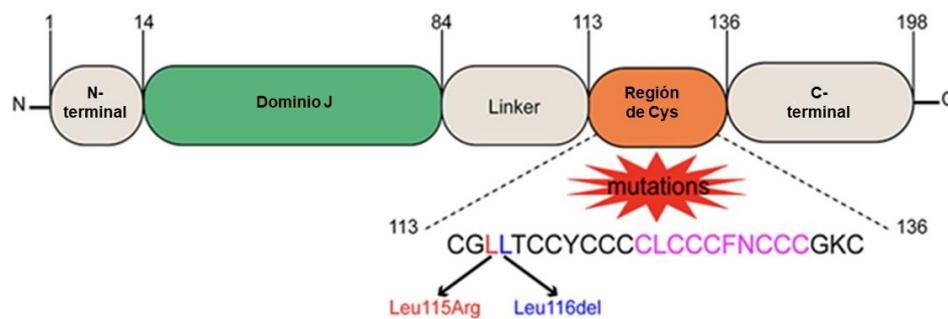


**Figura 17: Esquema representativo de los dominios de las proteínas CSPs.** Se observa en la imagen los dominios representativos de la familia de proteínas CSP. El dominio J, contiene el motivo HPD, por el cual se une a Hsc70. La región Cys, contiene numerosas cisteínas, por donde se palmitoila la proteína endógena. El C terminal es la parte más desestructurada de la proteína y la que más varía entre las isoformas. Imagen tomada de *Gundersen, 2020*.

## CSP alfa

La proteína  $\alpha$ CSP es una co-chaperona molecular conservada evolutivamente de 27–34 kDa localizada en vesículas presinápticas en neuronas. Está codificada por el gen DNAJC5 y se expresa mayoritariamente en el cerebro. Tiene múltiples funciones, como mantener la proteostasis a través de la estimulación del ciclo ATPasa de Hsc70 ([Rupawala et al. 2022](#)). Cuando se analizó la interacción entre  $\alpha$ CSP y Hsc70, se observó que la estimulación máxima de la actividad ATPasa de Hsc70 por parte de  $\alpha$ CSP se obtuvo cuando estaba presente en un exceso molar de 2 veces. Posteriormente, cuando se realizaron las mutaciones D45A y H43Q sobre  $\alpha$ CSP de tipo salvaje, se observó que las proteínas mutantes son claramente defectuosas para estimular la actividad ATPasa de Hsc70, en comparación con  $\alpha$ CSP de tipo salvaje, ya que no podían unirse directamente a Hsc70 o si lo hacían no lograban estimular la actividad ATPasa de Hsc70 ([Chamberlain and Burgoyne 1997](#)). Las mutaciones específicas L115R y  $\Delta$ L116 (Figura 18) generan la enfermedad neurodegenerativa Lipofuscinosis ceroidea neuronal (NCL, del inglés: *Neuronal Ceroid Lipofuscinoses*). Sorprendentemente estas mutaciones están dentro de la región rica en cisteínas, que normalmente se encuentra palmitoilada, por lo que las mutaciones producen una depalmitoilación reducida en las proteínas  $\alpha$ CSP. Se ha reportado que la enzima depalmitoilante tioesterasa 1 (PPT1) se encuentra sobreexpresada y mal localizada en el cerebro de pacientes con lipofuscinosis y que mantiene una relación enzima sustrato con CSP. También, se demostró que los mutantes de CSP *in vitro*, se oligomerizan, perdiendo su actividad de co-chaperona. Mutaciones en PPT1 generan una palmitoilación general alterada, haciendo que sus proteínas sustratos tengan una localización de membrana y señalización

defectuosa (Henderson et al. 2016). Investigaciones recientes, han demostrado que  $\alpha$ CSP media la exportación de huntingtina mutante a través de dos subpoblaciones de vesículas extracelulares (EVs, del inglés: *Extracellular Vesicles*) de tamaño de 180 a 240 nm y de 10–30  $\mu$ m. También se reportó que el resveratrol reduce la exportación de mutantes de huntingtina a través de ambas rutas de EV (Pink et al. 2021).  $\alpha$ CSP está implicada en una serie de otros trastornos neurodegenerativos, incluidos el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington, sin embargo, aún no se han establecido completamente los mecanismos a través de los cuales opera la proteína (Henderson et al. 2016).

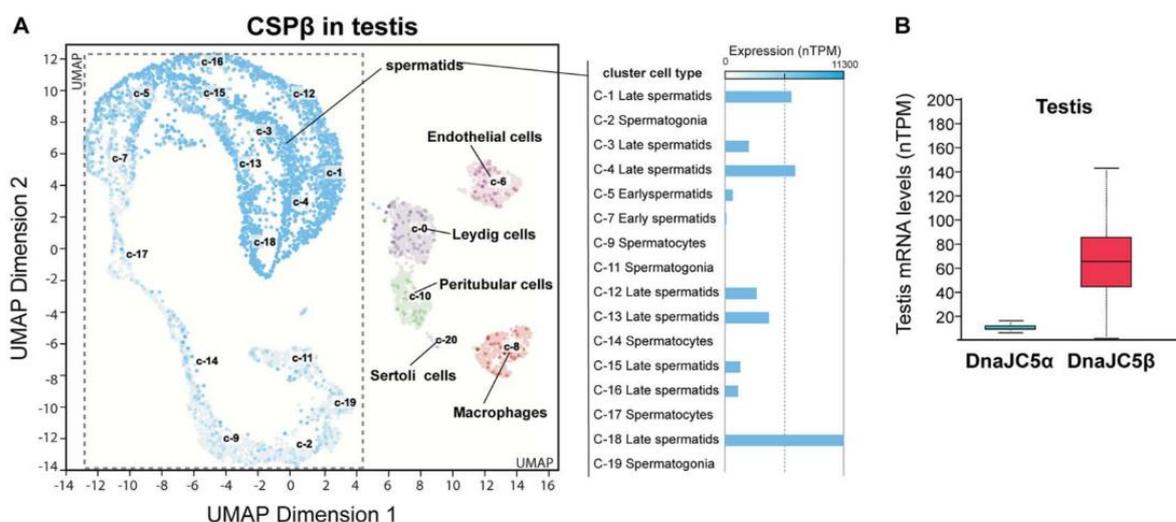


**Figura 18: Estructura de la isoforma  $\alpha$ CSP.** Se observan claramente los dominios característicos de las proteínas DNAJ. En la región rica en cisteínas se resalta un fragmento de la secuencia, donde se producen las mutaciones, cambiando la leucina 115 por una arginina y perdiendo la leucina 116. Estas mutaciones son características en la Lipofucinosis ceroidea neuronal. Imagen tomada y modificada de Huang & Zhang, 2022.

Se postula que  $\alpha$ CSP tiene un rol esencial en la activación y regulación de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  (Gundersen and Umbach 1992) y en la exocitosis uniéndose a las proteínas SNARE. Además de que diversos estudios mostraron que la eliminación de  $\alpha$ CSP provoca una disfunción progresiva en las sinapsis que termina matando a los ratones KO, debido a la pérdida en la integridad de la terminal nerviosa. De esta forma la proteína  $\alpha$ CSP participaría en la prevención de la neurodegeneración, cuando las demandas de la función normal (exocitosis continua de vesículas sinápticas) impone una carga sobre la maquinaria proteica involucrada (Fernández-Chacón et al. 2004).

## CSP beta

Existe una similitud en la secuencia de  $\beta$ CSP y  $\alpha$ CSP de un 70%, ambas estructuras son idénticas excepto por una delección en el C-terminal de  $\beta$ CSP de 31 aminoácidos (Chamberlain and Burgoyne 1997). Aunque, en un principio, los genes de  $\beta$ CSP y  $\gamma$ CSP fueron restringidos al tejido testicular, cuando se lograron desarrollar anticuerpos específicos para  $\beta$ CSP, se la localizó en sinaptosomas y fracciones de vesículas sinápticas de ratón, además de comprobarse que formaba parte de un complejo de gran peso molecular, mediante la autoasociación, de aproximadamente 100 kDa (Gundersen et al. 2010). Tiempo después se reportó que  $\beta$ CSP está presente en los homogeneizados del bazo, en el bulbo y cerebelo de ratas adultas (Chamberlain and Burgoyne 1997). Actualmente, el acceso a la información en la base de datos del *Human Protein Atlas* (proteinatlas.org), nos proporciona una imagen completa de los perfiles de expresión de las proteínas en tejidos humanos normales. Cuando se analizó el ARNm de  $\beta$ CSP se observó que se expresa casi exclusivamente en los testículos, mostrando mayor especificidad en las espermátidas tardías y tempranas (Figura 19A). Cuando se analizó el ARNm de CSP $\alpha$ , se observó que tenía una alta expresión en 55 tipos de células y tejidos diferentes. En conjunto, estos datos revelaron que la  $\alpha$ CSP parece estar asociada a los tejidos neurales y  $\beta$ CSP está predominantemente presente en los testículos. En este sentido, la expresión de ARN de  $\beta$ CSP es significativamente mayor en los testículos en comparación con  $\alpha$ CSP (Figura 19B), por lo que para los objetivos de nuestra investigación asumimos que la isoforma presente en los espermatozoides y blanco de nuestra investigación es  $\beta$ CSP.



**Figura 19: Perfil de expresión de CSP en testículos humanos y proteína presente en espermatozoides humanos y localizada en la región acrosomal.** (A) Agrupamiento de proyección y aproximación de colector uniforme (UMAP) de datos de células individuales que representan los grupos celulares identificados que están coloreados por tipo de célula (proteinatlas.org v21.1) (perfiles de expresión de ARNm: "nPTM": transcripciones normalizadas por millón). (B) Comparación de la expresión de ARNm de CSP $\alpha$  (nTPM promedio: 10,8) y CSP $\beta$  (nTPM promedio: 65,9) en testículos normales (proteinatlas.org v21.1). Figura tomada de *Flores Montero et al., 2023*.

## Modificaciones postraduccionales de CSP

Se demostró que  $\alpha$ CSP endógena está fosforilada en sinaptosomas, células PC12 y células cromafines (Evans et al., 2001). Se sabe específicamente que la fosforilación se produce en la Ser10 del dominio J y que reduce su interacción con la syntaxina o sinaptotagmina y por ende modula la exocitosis, alterando selectivamente su disponibilidad para las interacciones proteína-proteína (Arnold et al., 2004), pero no afecta su interacción con la proteína Hsc70 o la subunidad de la proteína G (Evans et al., 2001). Esto se podría explicar, ya que la fosforilación en Ser10 provoca un desorden en la hélice del N-terminal de CSP, desencadenando la formación de un bucle en horquilla que se estabiliza por las interacciones iónicas entre fosfoSer10 y el residuo Lys58 en el dominio J. Estos efectos inducidos por la fosforilación de CSP, dan como resultado cambios significativos en la conformación y distribución de carga superficial de CSP debilitando las interacciones proteína-proteína (Patel et al., 2016). Estudios recientes muestran que CSP también puede ser fosforilada por PKC en Ser10 y Ser34 (Shirafuji et al., 2018). Esto podría explicarse ya que como se sabe, CSP está fuertemente palmitoilada en su región rica en cisteínas, lo que le facilita unirse a la membrana de la vesícula sináptica y PKC fosforila fácilmente estos sustratos, convirtiendo a CSP un buen cliente de PKC gracias a la palmitoilación. La Ser34 en la hélice II del dominio J se encuentra 9 aminoácidos aguas arriba del motivo HPD, que es crucial para la interacción con HSC70/HSP70. El aminoácido correspondiente a Ser34 de CSP es alanina en casi todos los miembros de las familias humanas HSP40/DNAJ, y se convierte en el residuo Ser solo en  $\alpha$ CSP, DNAJC22 y DNAJC28 y en el residuo Thr en  $\beta$ CSP de humanos. Se demostró que la doble fosforilación de CSP en Ser10 y Ser34 por PKC promueve la interacción entre CSP y Hsc70, lo que induce aún más la actividad chaperona de Hsc70 para con SNAP25 y respalda la supervivencia de las células neuronales (Shirafuji et al., 2018).

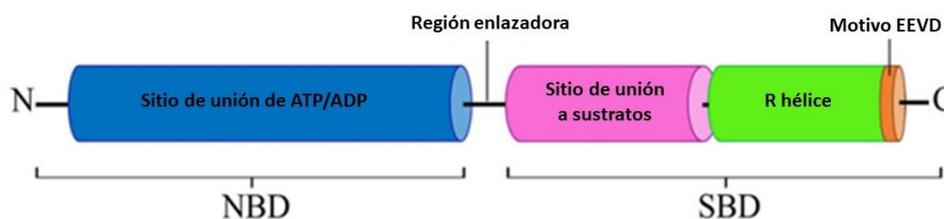
La S-Palmitoilación, unión de grupos de palmitato en residuos de cisteína a través de enlaces tioéster, regula las interacciones con la membrana de muchas proteínas. CSP está ampliamente palmitoilada en hasta 14 residuos de cisteína presentes en su región rica en cisteínas (CDR, del inglés *cysteine-rich domain*). Además se sabe que CSP carece de secuencias transmembrana o secuencias consenso de isoprenilo/miristilo, pero que el CRD de CSP "se duplica" como una secuencia dirigida a la membrana y como un dominio de palmitoilación (Greaves et al., 2008). Durante mucho tiempo se propuso que el dominio hidrofóbico de CSP, que estaba acilado con ácidos grasos podría participar directamente en la fusión de membranas (Smith et al. 2005). Esta modificación postraduccional juega un papel doble en la promoción de la unión estable a la membrana. En primer lugar, la hidrofobicidad general de esta región puede permitir la interacción transitoria de la proteína no palmitoilada a la membrana, llevándola a encontrarse con las palmitoiltransferasas Asp-His His-Cys (DHHC) unidas a la membrana. La posterior palmitoilación del dominio de cisteína por proteínas DHHC específicas promueve la unión estable a la membrana, además de que puede regular la clasificación de proteínas y su microlocalización dentro de las membranas, facilitando el tráfico de CSP hacia las vesículas secretoras y la membrana plasmática (Greaves et al., 2008, 2012).

### 3.3.2 La familia de chaperonas Hsp70

Las proteínas de choque térmico Hsp (del inglés: *Heat shock proteins*) constituyen una gran familia de proteínas chaperonas altamente homólogas que se inducen en respuesta a una elevación de la temperatura, pero también a tensiones ambientales, físicas y químicas tan diversas como el frío, la radiación ultravioleta y cicatrización de la herida. Su rápida expresión limita las consecuencias de los daños inducidos por el estrés y facilita la recuperación celular. Las proteínas de la familia Hsp70 se encuentran entre las proteínas más conservadas durante la evolución y están presentes desde las arqueobacterias hasta los mamíferos superiores (Stricher et al. 2013). La homología entre las proteínas de diferentes organismos es muy alta y esta conservación en la secuencia de la proteína se debe a que también se conserva la funcionalidad en los distintos dominios de la naturaleza. Por ejemplo, se reportó que la proteína Hsp70 proveniente de humanos puede proteger fibroblastos de ratón contra diferentes tipos de estrés (Li et al. 1991). La familia de chaperonas Hsp70 está compuesta por al menos 13 miembros, incluidas proteínas inducidas por el estrés como HSPA1A y miembros que no son inducibles por estrés, como HSPA5, HSPA8 y HSPA9. HSPA1A y HSPA8 se encuentran en el citosol, el núcleo, los exosomas extracelulares y en la membrana

celular; HSPA5 está presente en el retículo endoplásmico y los exosomas extracelulares, mientras que HSPA9 se encuentra en la mitocondria y en el núcleo (Bonam et al. 2019).

La estructura de Hsp70 se compone de secuencias de aminoácidos y dominios altamente conservados (Figura 20): dominio ATPasa N-terminal (NBD, del inglés: *nucleotide-binding domain*), que es una estructura de 44 kDa que participa en la unión de Hsp70 con proteínas cliente y en la hidrólisis de ATP; una región media que contiene sitios sensibles a proteasas y un dominio de unión al sustrato SBD (del inglés: *substrate-binding domain*), que se compone de 2 subdominios, un sándwich  $\beta$  de 15 kDa que se une a sustratos peptídicos y una R-hélice de 10 kDa que actúa como una tapa sobre el sitio de unión al sustrato. El extremo C-terminal contiene el motivo EEVD, rico en leucina, que media la interacción con las proteínas Hsp40 y las cochaperonas que contienen el dominio TRP (Mayer and Bukau 2005; Stricher et al. 2013).



**Figura 20: Dominios esquemáticos de las proteínas Hsp70s/Hsc70s.** Contienen dos dominios funcionales altamente conservados que incluyen un NBD (unión a nucleótidos) y un dominio de unión al sustrato (SBD) en el C-terminal. En el dominio NBD se encuentra una región que une e hidroliza ATP. Luego hay una región enlazadora (dominio de bisagra) corta que asegura la flexibilidad entre los dos dominios principales. El dominio SBD contiene dos subdominios, un sándwich  $\beta$  de 15 kDa que se une a sustratos peptídicos (color rosado) y una R hélice (color verde) de 10 kDa que actúa como una tapa sobre el sitio de unión del sustrato y que, por lo tanto, es central para la unión de co-chaperonas. En el C-terminal también se encuentra el motivo EEVD que participa en la unión a chaperonas. Imagen tomada y modificada de *Vostakolaei et al., 2020*.

Actualmente se han identificado 17 isoformas diferentes de la familia Hsp70, pero sus funciones aún no están claras. Estas isoformas se pueden clasificar en dos amplias categorías. Las dos formas más comunes son Hsp70, inducible por estrés; y la Hsc70, expresada constitutivamente que proporciona importantes funciones de viabilidad celular (Rohde et al. 2005). Las proteínas inducibles por estrés y las proteínas expresadas constitutivamente muestran un 85% de similitud en su forma humana (Bonam et al. 2019). Las proteínas Hsp70 son componentes esenciales de la red de chaperonas celulares. Algunas Hsp70 están reguladas de manera diferencial en varias etapas de desarrollo, como

las HSP70-2 y HSC70T en ratones, que se expresan específicamente en células espermatogénicas (Eddy, 1999). Las proteínas Hsp70 junto con sus co-chaperonas de la familia de proteínas del dominio J evitan la agregación de proteínas no nativas a través de la asociación con secuencias hidrofóbicas de la proteína sustrato, lo que las protege de las interacciones intermoleculares (actividad de "holder") (Rohde et al. 2005).

La proteína Hsc70 (del inglés, 70 kDa *heat-shock cognate protein*, gen HSP8A) es una proteína chaperona que está involucrada en diversos procesos celulares, como el plegamiento de proteínas, su translocación a través de la membrana y el armado o desarmado de complejos proteicos (Mayer and Bukau 2005). Se ha reportado que tanto la proteína Hsp70 o Hsc70 actúan en conjunto con otras proteínas celulares para ejercer funciones de chaperonas, como el plegamiento de proteínas, el ensamblaje o desensamblaje de complejos de proteínas o el transporte de proteínas a orgánulos (Liu et al. 1999). Un gran conjunto de proteínas accesorias apoya la función de Hsc70. Estas proteínas accesorias, denominadas co-chaperonas median la presentación de proteínas cliente, modulan el ciclo de hidrólisis de ATP, inducen la formación de complejos de chaperonas más grandes, reclutan complejos de chaperonas a los orgánulos y cambian el destino de las proteínas cliente. Hsc70 proporciona sitios de acoplamiento independientes para sus co-chaperonas en sus dominios N- y C- terminal, a través de varios motivos estructurales conservados. El motivo J de aproximadamente 70 residuos de aminoácidos perteneciente a la familia DnaJ media la unión de las co-chaperonas que respaldan el plegamiento de las proteínas cliente a Hsc70 (Tobaben et al. 2003).

### 3.3.3 La proteína co-chaperona SGTA

La proteína SGTA (del inglés, *small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha*) se descubrió originalmente debido a su interacción con las proteínas de la cubierta de dos virus, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el parvovirus H-1 (Tobaben et al. 2001). SGTA contiene pequeñas repeticiones tetratricopeptídicas ricas en glutamina (TPR, del inglés, *TetratricoPeptide Repeat*). Pertenece a una familia de proteínas moleculares co-chaperonas, que comparten el motivo TPR, que cuando se dispone en tándem, forma un módulo de interacción proteína-proteína capaz de facilitar las interacciones con una amplia gama de proteínas cliente (Philp et al., 2016). La proteína SGTA pesa 34 kDa, está formada por 313 aminoácidos y se expresa en todos los tipos de tejidos. Además, se sabe que SGTA se ensambla como un homodímero y consta de tres dominios estructurales (Figura 21): un dominio de dimerización N-terminal que ayuda a las vías de clasificación de proteínas; un

dominio central de repetición tetratricopeptídica (TPR) que media en las interacciones con proteínas de choque térmico, receptores proteasómicos, hormonales y proteínas virales; y una región C-terminal rica en glutamina que se une a sustratos hidrofóbicos. Esta proteína está altamente conservada en eucariotas y muestra una homología de secuencia importante entre metazoos (Roberts et al. 2015).



**Figura 21: Estructura de la proteína SGTA.** SGTA se compone de 313 residuos y tiene tres dominios característicos. Un dominio N terminal de homodimerización (residuos 1–69) seguido de un enlace de 14 residuos, tres repeticiones del dominio TPR (residuos 86–208) y un dominio C-terminal (residuos 211–313) que incluye una región rica en glutamina (Q) (residuos 274 - 313). Imagen tomada de Roberts et al., 2015.

SGTA se identificó por primera vez en complejos con proteínas virales y es un regulador clave en el control de calidad macromolecular y la señalización de receptores hormonales (Philp et al., 2016). Además, juega un papel importante en la integración postraduccional de proteínas de membrana anclada a la cola (TA, del inglés: *tail-anchored membrane*). Las proteínas TA son una familia de proteínas de membrana caracterizadas por un dominio citoplasmático funcional unido a la bicapa lipídica por una hélice de dominio transmembrana de un solo paso (TMD, del inglés: *transmembrane domain*) y constituyen alrededor del 5 % de todas las proteínas de membrana humana, incluidas las SNARE (Roberts et al. 2015). Se ha reportado que SGTA se localiza predominantemente en el citoplasma, pero también se detectó en el núcleo (Philp et al., 2016). Se expresa en la mayoría de los tejidos humanos e interacciona con muchas proteínas diferentes incluyendo proteínas codificadas por VIH-1 (Vpu y Gag), receptores hormonales y miostatina (Roberts et al. 2015). Existe una isoforma de SGTA, llamada SGTB con una identidad de secuencia de aminoácidos del 60% que se expresa casi exclusivamente en el cerebro. Ambas isoformas de SGT poseen propiedades de unión similares con Hsc70 y CSP y se ha comprobado que pueden oligomerizar sin tener preferencias entre ellas a través del dominio N-terminal (Tobaben et al. 2003).

## Dominios de SGTA

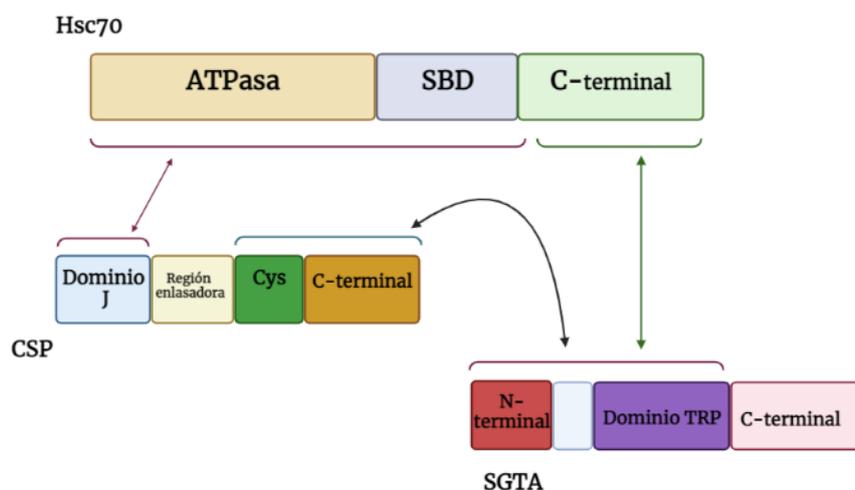
El extremo N-terminal de SGTA media su oligomerización. Esta región contiene un tramo altamente conservado de residuos de aminoácidos hidrofóbicos con un potencial significativo

para formar una bobina enrollada, que es un motivo de dimerización común. La interacción heterotípica entre las dos isoformas de SGT es tan eficiente como la dimerización homotípica de las isoformas de SGT, lo que implica que podrían formarse heterooligómeros en el cerebro donde se coexpresan ambas isoformas ([Tobaben et al. 2003](#)). Los motivos TPR son versátiles tanto en estructura como en función y consisten en 3 y 16 repeticiones en tándem, con cada repetición compuesta de 34 aminoácidos que forman un motivo hélice-giro-hélice. Estos motivos median interacciones proteína-proteína específicas, explotando su variabilidad estructural para definir su funcionalidad y se requiere un mínimo de tres repeticiones en tándem para su función (Blatch y Lässle, 1999). SGTA contiene tres motivos TPR dispuestos en tándem, cada uno formado por un par de hélices  $\alpha$  plegadas de forma antiparalela, en las que las tres repeticiones TPR son casi idénticas estructuralmente ([Roberts et al. 2015](#)). El dominio TRP de SGTA se expresó en bacterias y se incubó con los fragmentos C-terminales de las proteínas Hsc70 y Hsc90. A través de ensayos de *pull down*, se pudo comprobar que la proteína SGTA interactuaba con Hsc70 y Hsc90 a través de su motivo TRP y el motivo EEVD en el C-terminal de las proteínas Hsc70 y Hsc90. El dominio C-terminal de SGTA contiene una región rica en glutamina, que consta de un tramo de 39 aminoácidos con 13 residuos de glutamina dispersos en el fragmento. La importancia funcional del dominio C-terminal se investigó mediante el sistema de dos híbridos de levadura, utilizando fragmentos de diferentes tamaños de SGTA. Se encontró que SGTA de longitud completa y los fragmentos que contenían el dominio C-terminal interactuaban con fragmentos polipeptídicos que contenían seis o más residuos no polares consecutivos. La proteína SGTA sin su C-terminal no interactuó con los fragmentos hidrofóbicos, mostrando que este fragmento es necesario para que la proteína interactúe con sustratos hidrofóbicos ([Liou and Wang 2005](#)).

#### **4. El complejo CSP-Hsc70-SGT**

Como mencionamos anteriormente, la fusión de membranas durante la exocitosis está regulada por una maquinaria conservada en la que participan las proteínas SNARE y las proteínas SM. Para que este proceso se lleve a cabo con éxito se requieren mecanismos de control locales y chaperonas que aseguren el funcionamiento continuo de la maquinaria de fusión ([Sharma et al. 2011](#)). Inicialmente se demostró que la proteína CSP interactuaba con la proteína Hsc70 a través de ensayos de ATPasas, donde se observó que CSP estimulaba fuertemente la actividad ATPasa de Hsc70, uniéndose ambas proteínas a través del dominio J de CSP ([Stahl et al. 1999](#)). También, se observó que mutaciones en el motivo HPD de la proteína CSP, específicamente en los residuos de histidina (H43Q) o ácido aspártico (D45A), redujeron la capacidad de CSP para estimular la actividad ATPasa de Hsc70 en mamíferos ([Chamberlain and Burgoyne 1997](#)). A través del sistema de doble híbrido en levaduras, donde

la transcripción se lleva a cabo solo si dos proteínas de interés se reconocen y se unen, se confirmó la interacción de  $\alpha$ CSP y SGTA. Luego se investigó si  $\beta$ CSP, que difiere en el extremo C-terminal de  $\alpha$ CSP, también se unía a SGTA y se concluyó que existía una interacción fuerte similar entre ambas isoformas de CSP con SGTA. Además, se observó que el dominio C-terminal de CSP es esencial para unirse a SGTA, mientras que el dominio J en el N-terminal no es necesario. Utilizando el mismo ensayo, se probó si la proteína SGTA se unía a Hsc70 a través de su motivo TRP. Los resultados demostraron que los motivos TPR de SGT son necesarios, pero no suficientes para la unión de Hsc70 y que el dominio C-terminal de Hsc70, pero no el dominio ATPasa, es esencial para la interacción con SGT (Tobaben et al. 2001). Reportes posteriores, confirmaron a través de mutaciones específicas, donde la lisina 89 y asparagina 93 (pertenecientes al primer TPR) o en lisina 154 (perteneciente al tercer TPR) se intercambian por alaninas en la proteína SGTA (y también en su isoforma  $\beta$ ), que ocurría una perturbación en la unión a Hsc70, pero no era suficiente para eliminar toda interacción entre Hsc70 y SGTA (Tobaben et al. 2003). Los dominios involucrados en estas interacciones se representan en la Figura 22. El dominio J de CSP es esencial para la interacción con Hsc70 (Braun et al. 1996; Stahl et al. 1999), mientras que el dominio C-terminal de CSP interactúa con SGTA. En Hsc70, son necesarios dos dominios distintos, el dominio ATPasa y el dominio de unión al sustrato, para su interacción con CSP (Stahl et al. 1999). Por el contrario, el dominio C-terminal, pero no el dominio ATPasa de Hsc70 es crucial para la unión con SGTA. Los TPR de SGTA son esenciales para su interacción con CSP y Hsc70 (Tobaben et al. 2001).



**Figura 22: Modelo de la interacción de los dominios de las proteínas que forman el complejo CSP/Hsc70/SGTA.** En la figura se observan la estructura principal de cada proteína. Las flechas indican la interacción entre dominios.

Tanto CSP como SGT pueden interactuar de forma independiente con Hsc70 a través de su dominio J y dominio TPR, respectivamente (Tobaben et al. 2003). La fuerza de interacción entre SGTA y Hsc70 es un orden de magnitud menor que la de SGT y CSP. Sin embargo, está en el mismo orden de magnitud que el de CSP y Hsc70 (Tobaben et al. 2001). Posteriormente, diversos estudios demostraron que CSP, Hsc70 y la proteína SGTA coimmunoprecipitaban en vesículas sinápticas purificadas. Estos resultados sugirieron que se formaba el complejo trimérico CSP/Hsc70/SGT *in vivo*. El ensamblado de este complejo depende de ADP, mientras que el ATP lo desensambla. Además, se observó que la función ATPasa de Hsc70 es fuertemente estimulada por la combinación de CSP y SGTA. Por lo que se postuló que el complejo trimérico CSP/Hsc70/SGT constituye la maquinaria sináptica chaperona que regula el replegamiento de una proteína mal plegada en la superficie de las vesículas sinápticas (Tobaben et al. 2001; Prescott et al., 2008). Algunas de las características que resaltan la importancia de este complejo trimérico, son (i) sufre un ciclo de disociación y asociación impulsado por la hidrólisis de ATP, (ii) la unión simultánea de CSP y SGT a Hsc70 estimula al máximo la actividad ATPasa de Hsc70, (iii) el complejo trimérico funciona como una chaperona y exhibiendo una fuerte actividad de replegamiento frente a un sustrato desnaturalizado, como se vio con la *luciferasa*, mientras que los respectivos monómeros o dímeros estaban inactivos, (iv) CSP, SGT y Hsc70 forman un complejo proteico estable en las vesículas sinápticas, y (v) la sobreexpresión de SGT en neuronas del hipocampo y de CSP en células cromafines, así como las mutaciones de Hsc70 en *Drosophila* conducen a una reducción similar en la transmisión sináptica (Tobaben et al., 2001). Se han reportado resultados donde se identifica al complejo CSP $\alpha$ -Hsc70-SGT como un complejo chaperón de las SNARE sinápticas, que funciona para mantener a SNAP-25 en un estado conformacionalmente productivo que es capaz de ensamblar el complejo SNARE durante ciclos repetidos. Como ya se describió,  $\alpha$ CSP reside en vesículas sinápticas, mientras que SNAP-25 está anclado a la membrana plasmática. Por lo tanto, la interacción del complejo con SNAP-25 podría vincular las vesículas sinápticas a la membrana plasmática antes del ensamblaje del complejo SNARE y servir para que la fusión de vesículas sea competente, demostrando de esta forma que el complejo de chaperonas CSP $\alpha$ -Hsc70-SGT garantiza el funcionamiento a largo plazo de la maquinaria SNARE sináptica (Sharma et al. 2011). Cuando se alteran las funciones del complejo CSP-Hsc70-SGT, la ubiquitinación de los sustratos puede aumentar, lo que sugiere que el nivel de ubiquitinación es uno de los indicadores del trastorno de la actividad de las chaperonas (Shirafuji et al., 2018).

## 5. La RA como modelo de trabajo

### 5.1. Utilidad de la estreptolisina O en espermatozoides humanos

La exocitosis regulada implica un reordenamiento estructural para el ensamblaje y desensamblaje de diferentes complejos proteicos, proceso en el cual la actividad de las proteínas chaperonas es fundamental (Morgan and Burgoyne, 1995). Como mencionamos anteriormente, la RA es un tipo de exocitosis regulada que ocurre en los espermatozoides capacitados y es fundamental para la fertilización del ovocito. Al igual que otros procesos de secreción regulada, la exocitosis del acrosoma requiere una maquinaria molecular conservada. Nuestro laboratorio se enfoca en estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la RA, como así también los cambios morfológicos que suceden durante el proceso. Utilizamos como modelo de estudio la RA que ocurre en espermatozoides humanos porque posee ciertas ventajas respecto a otros modelos de exocitosis. Como ya dijimos, el espermatozoide tiene una única y gran vesícula exocítica de fácil visualización que es completamente secretada frente a un estímulo. De esta forma podemos evaluar si hubo o no exocitosis, analizando la presencia o ausencia del acrosoma en respuesta a diferentes tratamientos. Sin embargo, la ausencia de los procesos de transcripción y traducción en los espermatozoides limita el abordaje disponible para el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la exocitosis acrosomal (Tomes 2007). Para afrontar esta limitación, nuestro grupo ha desarrollado un modelo de permeabilización controlada de la membrana plasmática de los espermatozoides utilizando estreptolisina O (SLO) (Mayorga et al. 2007), que es un método altamente utilizado para estudiar la exocitosis en células somáticas (Yunes et al. 2000). La RA en los espermatozoides permeabilizados con SLO es dependiente de calcio y tiene características funcionales y morfológicas similares a las observadas en células intactas, es decir, no permeabilizadas. Al permeabilizar la membrana de los espermatozoides, podemos introducir iones, proteínas recombinantes, anticuerpos y otros reactivos impermeables a membranas para determinar la función y caracterizar la etapa modulada por una molécula blanco endógena. El sistema es fácilmente manipulable, refleja la organización *in vivo* de la célula y posibilita la medición de una RA morfológicamente indistinguible de aquella en espermatozoides sin permeabilizar (Mayorga et al. 2007). La técnica de permeabilización con SLO ha sido adoptada por otros laboratorios para estudiar la RA (Ackermann et al. 2008; Hutt et al. 2005).

## 5.2. Utilidad de los péptidos de penetración celular (CPPs) en espermatozoides humanos

Como mencionamos anteriormente, el espermatozoide es una célula altamente diferenciada con un único propósito, la fertilización. Además de no poseer algunas organelas como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, se sabe que durante su maduración se silencian los mecanismos de transcripción y traducción de proteínas (Jones *et al.*, 2013). Estas características hacen que el estudio de los diversos mecanismos que regulan la actividad de los espermatozoides se vea limitada. Ante esto, utilizamos una herramienta que nos permite introducir diferentes partículas de interés a espermatozoides humanos vivos y móviles. Los CPPs (del inglés, *cell-penetrating peptides*) son péptidos de hasta 40 aminoácidos, con la capacidad de acceder al interior de la célula por medio de diferentes mecanismos. Existen numerosos CPPs, pero los análisis de sus estructuras y propiedades indican que la característica en común es su capacidad para cruzar membranas y llevar cargas dentro de las células. Existen dos formas principales mediante las cuales los CPPs, con o sin carga, pueden atravesar las membranas de células y orgánulos: translocación directa o uno de varios mecanismos endocíticos (Zorko, Jones and Langel, 2022). Se ha reportado que el espermatozoide maduro carece de la maquinaria proteica requerida para los mecanismos endocíticos convencionales que requieran el reciclaje activo de lípidos (Howl *et al.*, 2022). Por lo que, se postula que la incorporación de estos péptidos podría darse a través de un mecanismo de translocación directa. Quizás contrariamente a lo esperado, los CPPs se translocan rápidamente a través de la membrana plasmática de los espermatozoides, para acumularse dentro de distintos compartimentos intracelulares (Howl *et al.*, 2022). La incorporación de dominios proteicos de transducción típicos, tales como el péptido TAT del VIH ha sido monitoreada en espermatozoides bovinos (Jones *et al.*, 2013). Nuestro laboratorio tiene experiencia en el uso de CPPs en la investigación de la RA. Ejemplos de esto, son la versión permeables de Rab3A (Lopez *et al.* 2007) y Rab27 (Bustos *et al.* 2018) y de TeNT-CPP en el estudio de la dinámica de los complejos SNARE durante la capacitación (Mayorga *et al.* 2020).

## 6. Cascada de señalización que conducen a la RA en el espermatozoide humano

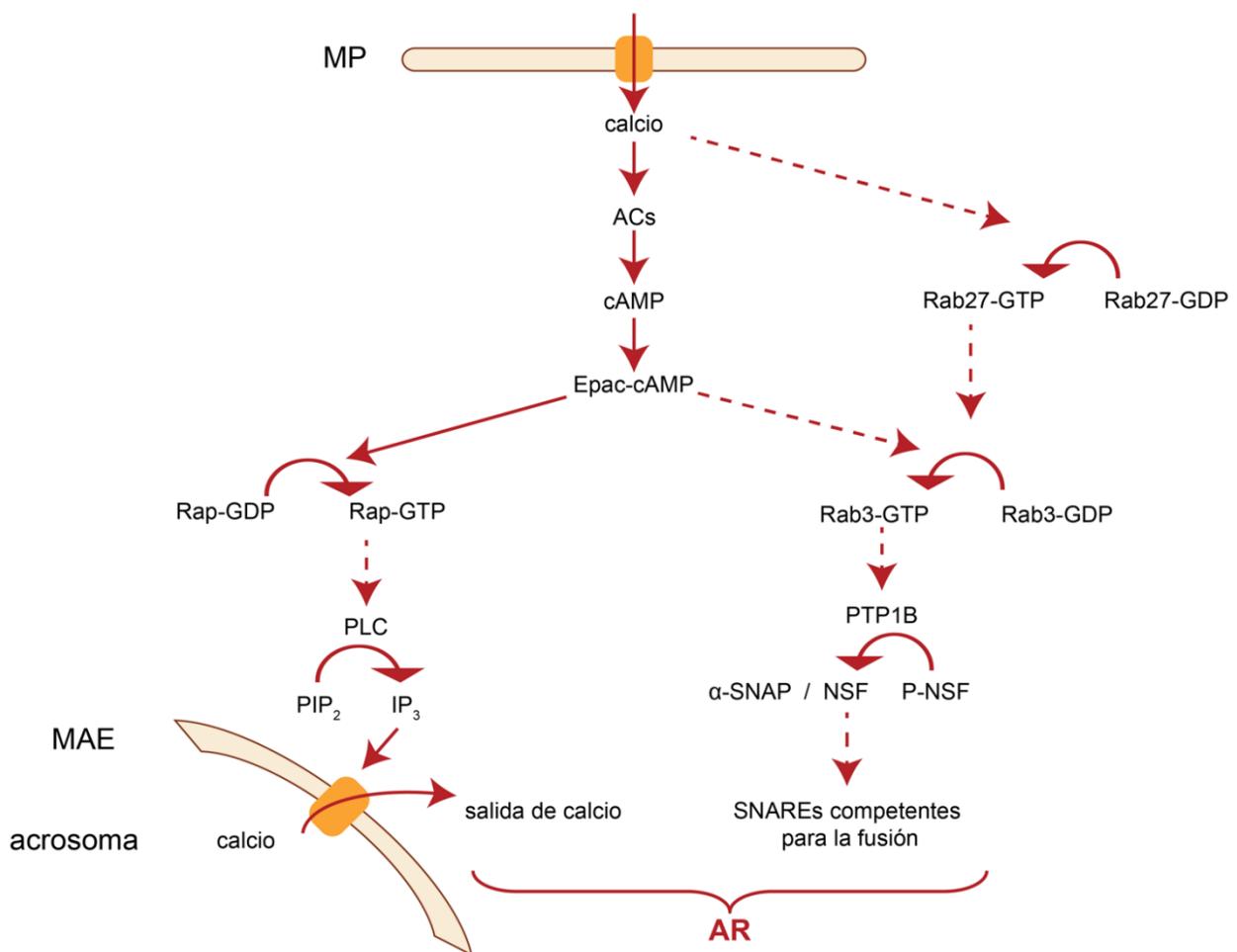
En base a los antecedentes obtenidos por nuestro laboratorio, hemos propuesto una vía de señalización activada por calcio que conduce a la exocitosis del contenido del acrosoma cuando los espermatozoides son incubados con diversos inductores. Como ya desarrollamos

en secciones previas, cuando el espermatozoide es estimulado por la unión a ZP3 se produce una respuesta bifásica de calcio, que implica la apertura de múltiples canales. Se ha descrito que la primera entrada de calcio es a través de los canales  $Ca_v$  tipo-T. El calcio que ingresa por estos canales activa a PLC, que incrementa la concentración de  $IP_3$  y moviliza el calcio acrosomal. Al liberarse el calcio desde el acrosoma, se abren los canales de calcio SOCCs en la membrana plasmática, lo que aumenta drásticamente la concentración de calcio intracelular y se dispara la RA (Darszon et al. 2006). En respuesta al aumento de calcio intracelular, se activa la adenilato ciclasa soluble (sAC) y posteriormente se incrementan los niveles de AMPc que son censados por la proteína Epac. Esta proteína se sitúa en un punto crítico, en el que la vía de señalización que gobierna la exocitosis acrosomal, se bifurca para dar lugar a una “rama movilizadora de calcio interno” y una “rama proteica”. La precisa confluencia de ambas ramas conlleva a la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa, liberando finalmente el contenido acrosomal (Figura 23).

- *Rama movilizadora de calcio interno:* Al incrementarse la concentración de AMPc, a través de Epac, el AMPc estimula el intercambio de GDP por GTP en la proteína Rap, generando Rap activa. De alguna manera aún no establecida Rap estimula la actividad de PLC que genera  $IP_3$  y moviliza el calcio del acrosoma a través de canales sensibles a  $IP_3$ .
- *Rama proteica:* Epac promueve no sólo la activación de Rap1, sino que también es capaz de regular la exocitosis controlando otras moléculas. Un análogo selectivo para Epac estimula el intercambio de GDP por GTP en Rab3A de manera indirecta, generando Rab3A-GTP (Branham et al., 2009). Luego se activa de algún modo PTP1B que desfosforila a NSF. Finalmente, NSF/ $\alpha$ -SNAP desensamblan los complejos *cis* SNARE y gracias a la ayuda de múltiples chaperonas, las SNARE alcanzan su configuración *trans* acercando las membranas y produciéndose la liberación del acrosoma.

De acuerdo con este modelo, la incubación de espermatozoides permeabilizados con calcio o de espermatozoides no permeabilizados con ionóforos de calcio, permite la libre difusión de estos iones hacia el interior de la célula, lo que simula la situación fisiológica de su entrada a través de los canales SOCC. Como consecuencia, estos tratamientos permiten el estudio de pasos relativamente tardíos de la cascada exocítica, que ocurren luego del ingreso sostenido de calcio, ya que se eluden todos aquellos eventos que ocurren previos a la

apertura de los canales SOCC. Resultados previos en espermatozoides permeabilizados demostraron que la movilización de calcio intracelular no puede ser eliminada sin comprometer la exocitosis (De Blas et al. 2002). Estos datos indican que la RA requiere una liberación de calcio desde el acrosoma posterior a la apertura de los SOCC. Esta fase que conduce a la exocitosis utiliza canales sensibles a  $IP_3$  (De Blas et al. 2002; Ruete et al. 2014) y se lleva a cabo una vez que la maquinaria bioquímica de fusión ha sido ensamblada. La función de esta salida de calcio altamente localizada sería la de activar a sinaptotagmina, proteína indispensable para conseguir el ensamblaje completo de las proteínas SNARE que finalmente acerca las membranas para la fusión.



**Figura 23: Esquema de la cascada de señalización que conducen a la RA.** El calcio ingresa a la célula a través de canales activados por progesterona o a través de los poros generados por la SLO. El incremento de calcio citosólico activa la ACs. El AMPc sintetizado por la ACs activa a Epac y a partir de este punto, la vía de señalización se divide en dos ramas. Una de las vías está encabezada por la activación directa de Rap por Epac y conduce a

la activación de una PLC y en consecuencia la producción de IP3. El IP3 generado induce la liberación del calcio retenido en el acrosoma a través de canales operados por IP3 presentes en la membrana acrosomal externa. Epac también activa indirectamente a Rab3A, disparando el *tethering* del acrosoma a la membrana plasmática a través del ensamble de complejos macromoleculares. Durante el *tethering* o como consecuencia de él se inicia la activación y/o el reclutamiento de PTP1B, que activa NSF al desfosforilarlo. Luego NSF/ $\alpha$ -SNAP desensamblan los complejos cis SNARE, dejándolas en una configuración competente para la fusión. Ambos, el incremento de calcio localizado y las SNARE fusogénicas convergen y completan los pasos finales de la fusión de membranas. Las flechas sólidas significan que existe un paso entre las vías implicadas, mientras que las flechas punteadas indican que el número de pasos entre ellas es desconocido (MP: membrana plasmática, MAE: membrana acrosomal externa. Imagen tomada y modificada de Ruete *et al.*, 2014).

## **7. Alcances y perspectivas del estudio de chaperonas en el espermatozoide humano**

### **7.1. La infertilidad masculina**

En la actualidad una de cada seis parejas necesita la ayuda de técnicas de reproducción asistida (TRA) para concebir un hijo. En el 40% de las parejas infértiles, el factor masculino es la causa de la infertilidad. Existe un aumento de reportes que sugieren que la fertilidad en los hombres está disminuyendo y que la concentración de espermatozoides disminuyó aproximadamente un 50% en los últimos 50 años a nivel mundial. Por ejemplo, un estudio de EE. UU. reportó que la concentración de espermatozoides entre los donantes de esperma disminuyó de  $112 \times 10^6$  /ml a  $78 \times 10^6$  /ml entre 2003 y 2013. Diversas explicaciones se han propuesto como causa de esta observación, el estilo de vida actual, cambios ambientales, tabaquismo y la exposición a la contaminación (Dai *et al.* 2021). Incluso los valores recomendados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés: *World Health Organization*) para los parámetros de semen han disminuido dramáticamente a lo largo de los años (Tabla 3) (Agarwal *et al.* 2021).

**Evolución de los valores normales de los parámetros de semen desde 1980 al 2010**

	OMS Manual 1º ed (1980)	OMS Manual 2º ed (1987)	OMS Manual 3º ed (1992)	OMS Manual 4º ed (1999)	OMS Manual 5º ed (2010)
Volumen	ND	≥ 2 mL	≥ 2 mL	≥ 2 mL	≥ 1.5 mL
Concentración de espermatozoides	20-200 x 10 <sup>6</sup> /mL	20 x 10 <sup>6</sup> /mL	20 x 10 <sup>6</sup> /mL	20 x 10 <sup>6</sup> /mL	15 x 10 <sup>6</sup> /mL
Conteo total de espermatozoides	≥ 40 x 10 <sup>6</sup> /mL	≥ 40 x 10 <sup>6</sup> /mL	≥ 40 x 10 <sup>6</sup> /mL	≥ 40 x 10 <sup>6</sup> /mL	≥ 39 x 10 <sup>6</sup> /mL
Motilidad espermática (% progresivo)	≥ 60%	≥ 50%	≥ 60%	≥ 60%	≥ 32%
Vitalidad espermática (%)	ND	≥ 50%	≥ 75%	≥ 75%	≥ 58%
Morfología espermática (% normal)	≥ 80.5% <sup>†</sup>	≥ 50%	≥ 30% <sup>‡</sup>	≥ 15% <sup>§</sup>	≥ 4%

**Tabla 3: Comparación de los parámetros normales de calidad del semen a lo largo de los años.** Datos extraídos del Manual de Laboratorio para la Examinación y procesamiento del semen humano y la interacción Moco cervical-espermatozoide de la Organización Mundial de la Salud. ND: no definido. <sup>†</sup> Basado en el trabajo de MacLeod's. <sup>‡</sup> Promedio de la población fértil. <sup>§</sup> Valor no definido, pero criterio estricto y datos sugerido de fertilización in vitro. Tabla tomada y modificada de *Agarwal et al., 2021*.

La infertilidad masculina puede ser causada por varios factores que ocurren aisladamente o en asociación con varios síndromes complejos. A pesar de la importancia del análisis de semen en la etapa inicial de la investigación de la infertilidad, se estima que el 15% de los hombres infértiles presentan espermatozoides normales ([Magalhães et al. 2021](#)). Aunque el análisis de semen sigue siendo la piedra angular para evaluar la infertilidad masculina, es necesario desarrollar pruebas para evaluar la calidad y función del espermatozoide para un diagnóstico avanzado ([Pathak et al. 2020](#)). En hombres con infertilidad idiopática a pesar de completar las investigaciones de diagnóstico, no se puede identificar la causa de la alteración de los parámetros del semen ([Agarwal et al. 2021](#)). En estas situaciones, estudios moleculares, como el uso de anticuerpos específicos para la detección de proteínas, en diferentes procesos fisiológicos como la capacitación y la reacción acrosomal, son muy útiles. La incorporación de estos métodos de diagnóstico en la práctica habitual de los laboratorios de andrología es un paso importante para seguir mejorando las tecnologías de reproducción

asistida (Dai et al. 2021). Durante la vida de un hombre, los gametos masculinos pasan por importantes procesos de proliferación, diferenciación y maduración morfofuncional. Los espermatozoides adquieren motilidad progresiva y sufren importantes cambios morfológicos y bioquímicos para asegurar la formación de espermatozoides que sean capaces de reconocer y fertilizar ovocitos en el tracto reproductivo femenino. Durante estos procesos, se pueden producir alteraciones que alteren la fertilidad masculina (Magalhães et al. 2021). Existe evidencia que respalda que diversas chaperonas están relacionadas durante todo el proceso de la espermatogénesis, como por ejemplo las proteínas Hsp70 (del inglés: *Heat shock proteins-70*) que aumenta su expresión y concentración en el espermatozoide cuando se produce un daño en su ADN (Sisti et al. 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes, consideramos que los resultados que se puedan obtener de esta investigación servirán para dar un poco de luz a los mecanismos que envuelven la infertilidad masculina.

## 7.2. Las enfermedades neurodegenerativas

Las células tienen un sofisticado sistema de control de calidad que entra en acción cuando se produce un desequilibrio o se acumulan proteínas mal plegadas, agregadas o dañadas. Las proteínas deben plegarse a su estado nativo para lograr su funcionalidad. Sin embargo, bajo condiciones de estrés fisiológico como estrés oxidativo, calor e inflamación o incluso bajo condiciones ambientales, las proteínas se vuelven vulnerables y susceptibles a la formación de interacciones no nativas (Chaari 2019). En este sistema de control, uno de los principales actores son las chaperonas moleculares. Las chaperonas tienen funciones fisiológicas esenciales, como asistir en el plegamiento de polipéptidos nacientes y llevar proteínas a través de las membranas (Hinault et al. 2006). Las chaperonas más comunes son las proteínas de la familia Hsp (heat-shock protein), que actúan como la primera línea de defensa y no solo ayudan al plegamiento adecuado de las proteínas, sino que también promueven el replegamiento de las especies desnaturalizadas (Chaari 2019). Algunas chaperonas, en particular las pequeñas Hsp, también pueden proteger la membrana del estrés ambiental. En virtud de la mitigación que producen ante los efectos nocivos de las mutaciones que se inducen por las agresiones leves sobre las células, se considera que las chaperonas moleculares sirven como reguladores de las variaciones fenotípicas, modulando el ritmo de la evolución molecular (Hinault et al. 2006).

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, la enfermedad de los Priones y la de Huntington tienen en común que se produce un plegamiento y/o la eliminación anormal de especies de proteínas potencialmente citotóxicas.

La mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas comienzan con una disfunción sináptica. Actualmente existe evidencia de que, en muchas de las enfermedades neurodegenerativas, los agregados proteicos pueden salir de las células y entrar en células vecinas, lo que conduce a una propagación de la enfermedad similar a un prion. Varios informes han sugerido que ciertas chaperonas pueden estar presentes en el espacio extracelular y, por lo tanto, tener funciones neuroprotectoras (Chaari 2019). En la enfermedad del Alzheimer, las características patológicas incluyen las placas extracelulares de  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y ovillos intracelulares que contienen a la proteína *tau* mal plegada y agregada. Actualmente, se ha reportado que en el hipocampo se produce una alteración en la proteína  $\alpha$ CSP antes de las reducciones en la proteína sinaptofisina, lo que sugiere que representa un marcador más temprano y más sensible de la degeneración sináptica. Investigaciones actuales, demostraron que  $\alpha$ CSP es un componente esencial de una vía no convencional de secreción de proteínas asociadas al plegamiento incorrecto (MAPS) utilizada para exportar proteínas mal plegadas asociadas a enfermedades neurodegenerativas, como tau,  $\alpha$ -sinucleína y TDP-43, a través de un proceso de liberación dependiente de exosomas o mediante una liberación independiente de ellos (Rupawala et al. 2022). La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro. Durante esta enfermedad, se forman inclusiones llamadas cuerpos de Lewy, que están compuestas principalmente por la proteína  $\alpha$ -sinucleína agregada. Se ha reportado que los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen un aumento importante en la expresión de Hsp70 en respuesta a  $\alpha$ -sinucleína mal plegada. Experimentos en moscas, donde se sobreexpresó esta chaperona, demostraron la capacidad de Hsp70 para inhibir la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Además, el agotamiento de la expresión de Hsp70 reveló un aumento de la citotoxicidad de la  $\alpha$ -sinucleína y posteriormente la degeneración de las neuronas (Chaari 2019). Las enfermedades denominadas poliQ, como la enfermedad de Huntington, se caracterizan por un defecto en la degradación de la proteína mutada (en el caso de la enfermedad de Huntington la proteína mutada es la huntingtina), que da lugar a la formación de fragmentos N-terminales con expansiones poliQ que tienen tendencia a la agregación. Reportes actuales, demuestran que existen proteínas que interactúan con estos agregados y están relacionadas con su proceso de formación. La proteína Sgt2, un ortólogo de SGTA en levaduras, se ha demostrado que es una de las proteínas que interacciona con los agregados causantes de este tipo de enfermedades neurodegenerativas (Kubota et al. 2021). Actualmente está cobrando mucha fuerza el campo en el que las chaperonas se utilizan como blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Chaari 2019). Teniendo en cuenta esto, consideramos que cualquier avance en la comprensión del funcionamiento e interacción de las chaperonas, pueden aportar datos significativos.

# **Hipótesis y Objetivos**

## Hipótesis de Trabajo

1. El complejo de chaperonas formado por las proteínas  $\alpha$ CSP-Hsc70-SGTA, cumple roles fundamentales en la exocitosis regulada en neuronas y células neuroendocrinas. Los espermatozoides humanos también exocitan de forma regulada su único granulo secretorio, el acrosoma. A través del Atlas de Proteínas Humanas, corroboramos que la isoforma  $\beta$ CSP es la de mayor expresión en espermátidas maduras. También, diversos estudios demostraron que la interacción entre  $\beta$ CSP y la proteína Hsc70 era similar a la que se producía con la isoforma alfa. **Basados en estos antecedentes, postulamos que las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA están presentes en la región acrosomal en los espermatozoides humanos.**
2. Las proteínas SNARE son componentes fundamentales de la maquinaria exocítica en las células secretoras. Diversos estudios reportan la existencia de proteínas chaperonas que facilitan el ensamblado y desensamblado de los complejos SNARE, así como de la exocitosis en general. Se ha demostrado que las proteínas  $\alpha$ CSP-Hsc70-SGTA forman un complejo trimérico que auxilia a las SNARE en neuronas y células neuroendocrinas. **Por lo tanto, nosotros proponemos que las proteínas  $\beta$ CSP-Hsc70-SGT forman un complejo trimérico en los espermatozoides humanos y facilitan el ensamblado del complejo SNARE en configuración *trans*.**

### Objetivo general:

La exocitosis es un proceso dinámico, complejo y altamente regulado que comprende un gran número de componentes que se generan y destruyen, asocian y disocian de manera secuencial y transiente, originando una serie de etapas definibles bioquímica, morfológica, cinética y funcionalmente. El objetivo de este trabajo es caracterizar las proteínas involucradas en el ensamblado de los complejos SNARE y sus mecanismos moleculares durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos.

## **Objetivos específicos:**

### **1. Identificar y caracterizar la maquinaria molecular involucrada en el ensamblado de los complejos SNARE durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos.**

Como mencionamos anteriormente, en otros tipos celulares, las proteínas SNARE que participan en la exocitosis dependiente de  $Ca^{+2}$  son asistidas por un complejo trimérico de proteínas chaperonas. En base a esto, pretendemos determinar la presencia de las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en espermatozoides humanos. Es sabido que la RA es un proceso exocítico finamente controlado por diversas proteínas que van ejerciendo su rol, en etapas secuenciales dependientes de la ubicación que tienen en el espermatozoide. Evaluaremos la localización dentro del espermatozoide de cada una de las proteínas que forman el complejo. Mediante las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia, analizaremos la presencia y localización de las proteínas. Esperamos encontrar a  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en la región acrosomal de los espermatozoides humanos. Además, mediante las técnicas de partición celular con Tritón X-114 y de fraccionamiento subcelular con un buffer hipoosmótico, analizaremos las características químicas de las proteínas que son fundamentales para la formación y ubicación del complejo trimérico durante el proceso de la exocitosis del acrosoma.

### **2. Establecer la función de las proteínas y chaperonas moleculares que participan en el ensamblado de los complejos SNARE en espermatozoides humanos.**

Como se citó anteriormente la reacción acrosomal es un tipo especial de exocitosis regulada, que muestra muchas ventajas en el estudio de los mecanismos que gobiernan este proceso. De esta forma, se puede evaluar si hubo o no exocitosis, tan solo observando la presencia o ausencia del acrosoma en el espermatozoide. Utilizando la técnica de permeabilización controlada de la membrana plasmática con estreptolisina O (SLO) podremos incorporar en el espermatozoide anticuerpos que secuestren la proteína endógena y luego a través de ensayos funcionales evaluar el proceso de reacción acrosomal. Nosotros esperamos ver una inhibición de la RA, cuando los espermatozoides son tratados con los anticuerpos de las proteínas de interés, corroborando su participación en la exocitosis del acrosoma. También

realizando ensayos funcionales, podremos determinar en qué momento de la cascada de señalización ejercen su función estas proteínas.

### **3. Establecer los cambios en la configuración de los complejos SNARE al bloquear la acción de las proteínas/chaperonas.**

Como explicamos previamente para que se lleve a cabo la exocitosis de una vesícula o granulo secretorio, es necesario que la membrana plasmática de la vesícula o granulo se fusione con la membrana celular. Diversos estudios confirman que para que se produzca esta fusión, es necesario que las membranas en juego se acerquen. En este proceso de acercamiento, tienen un rol fundamental las proteínas SNARE y sus chaperonas. Como ya explicamos, la utilización de neurotoxinas ha sido primordial en el descubrimiento y análisis de la función de las proteínas SNARE. Haciendo uso de estas herramientas e incorporando en el espermatozoide inhibidores, proteínas recombinantes y anticuerpos, analizaremos el estado de ensamblaje de las proteínas SNARE cuando bloqueamos la función de nuestras proteínas de estudio.

### **4. Examinar la modulación del proceso de ensamblado de los SNARE mediante la introducción al citosol de proteínas exógenas acopladas a péptidos de penetración celular (CPPs) en espermatozoides humanos.**

Como se mencionó previamente, los espermatozoides son células traduccional y transcripcionalmente inactivas. Esta característica limita en cierta forma el estudio de los mecanismos que controlan la exocitosis del acrosoma, ya que es imposible sobre-expresar o inhibir la expresión de cualquier proteína de interés. Para superar esta limitación, nuestro laboratorio adaptó el método de permeabilización controlada de la membrana plasmática con SLO. Aunque se ha descrito que el espermatozoide, luego de ser tratado con SLO conserva las mismas características funcionales por un tiempo determinado, nosotros quisimos corroborar el accionar de alguna de nuestras proteínas en espermatozoides con la membrana plasmática intacta. Para esto, diseñamos una de nuestras proteínas unidas a un péptido de penetración celular (TAT), que le confiere la característica de atravesar la membrana plasmática del espermatozoide sin haber sido permeabilizada. De esta forma, pretendemos primero corroborar el ingreso de la proteína a través de las técnicas de Western blott e

inmunofluorescencia y luego analizar la funcionalidad de la proteína en la RA a través de ensayos funcionales. Esperamos obtener el mismo patrón de funcionamiento de la proteína de interés y de esta forma sustentar nuestros resultados previos en condiciones fisiológicas.

# **Materiales y Métodos**

## Reactivos

El anticuerpo policlonal CSP de conejo (purificado por afinidad con el inmunógeno dirigido hacia los aminoácidos 182-198 de CSP de rata), el anticuerpo policlonal anti-NSF de conejo (antisuero) y el anticuerpo monoclonal anti-tubulina alfa de ratón (IgG purificada) fueron de Synaptic Systems (Göttingen, Alemania). El anticuerpo policlonal de conejo anti-SGTA (purificado mediante la proteína A por cromatografía de afinidad) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-Hsp70 (purificado mediante la proteína A por cromatografía de afinidad) fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (EEUU). El anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (IgG purificada) fue de Novus Biologicals, LLC (Centennial, CO, EE. UU.). Las IgG anti-peroxidasa de rábano anti-ratón, anti-conejo y anti-conejo de cabra conjugadas con Cy<sup>TM</sup>3 (H+L) se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Obtuvimos la preparación sinaptosómica de la Dra. V. González Polo y Dr. S. Patterson (Universidad de Cuyo, Mendoza, Argentina). El 2-APB (borato de 2-aminoetoxidifenilo) de Calbiochem se adquirió de Merck Química, Argentina SAIC (Buenos Aires, Argentina). El éster de O-nitrofenil EGTA-acetoximetilo (NP-EGTA-AM) se adquirió de Life Technologies (Buenos Aires, Argentina). N, N, N', N'-tetrakis (2- pyridymethyl) ethylenediamine (TPEN) se obtuvo de Molecular Probes (Waltham, MA, USA). La lectina de aglutinina (PSA) de *Pisum sativum* marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), el paraformaldehído, la poly-L-lysine, la albúmina de suero bovino (BSA) y el ácido Tánico se adquirieron de Sigma-Aldrich<sup>TM</sup> (Buenos Aires, Argentina). El sopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se obtuvo de ICN (Eurolab SA, Buenos Aires, Argentina). Todos los suministros de microscopía electrónica fueron de Pelco (Ted Pella Inc. CA, EE. UU.). La estreptolisina O (SLO) recombinante se obtuvo a través del Dr. Bhakdi (Universidad de Mainz, Mainz, Alemania). Los espermatozoides se cultivaron en líquido tubárico humano (HTF) (según la fórmula de Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE. UU., HTF) suplementado cuando estaba indicado, con BSA al 0,5 %.

## Producción de bacterias quimiocompetentes

Bacterias *Escherichia coli* BL21, se cultivaron en 2 ml de medio líquido Luria-Bertani (LB) durante toda la noche. A la mañana siguiente, el cultivo se expandió en 20 ml de LB y se incubó por 2-3 hs a 37 °C. Las bacterias se recuperaron centrifugando a 1500 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 6,64 ml del Buffer RF1 frío (100 mM cloruro de rubidio, 50 mM cloruro de manganeso, 30 mM acetato de potasio, 10 mM cloruro de calcio y 15% de

glicerol; pH 5,8). Se incubaron las bacterias durante 1 h a 4 °C y luego se centrifugó a 1500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Las bacterias se resuspendieron en 1,6 ml del Buffer RF2 frío (10 mM MOPS sodio y 10 mM cloruro de rubidio) y se incubaron durante 15 min a 4 °C. Las bacterias se guardaron en alícuotas de 50 µl en tubos estériles a -80 °C.

### **Transformación de bacterias por shock térmico con DNA plasmídico**

Se descongelaron las bacterias *E. coli* BL21 competentes (se usaron 50 µl por condición) y se incubaron con 100 ng de DNA plasmídico. La mezcla se transfirió a hielo y se incubó durante 30 minutos. Luego se colocaron en un baño a 42 °C durante 90 segundos y se transfirieron rápidamente a hielo por 2 minutos. Finalmente se adicionó LB a cada condición para activar el crecimiento de las bacterias durante 1 h a 37 °C. Finalizado el crecimiento, las bacterias se centrifugaron a 2600 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspendió en 100 µl de LB y se sembró en placas con LB-agar y los antibióticos correspondientes de selección. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

### **Extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias**

Se incubaron en 10 ml de LB con el antibiótico correspondiente de acuerdo a la resistencia de las bacterias que contienen el plásmido deseado. Se dejaron toda la noche a 37 °C a 220 rpm. Al día siguiente, se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La purificación de ADN plasmídico se realizó con el Kit Wizard (R) Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Se continuó como lo indica el protocolo, las bacterias se resuspendieron en 250 µl de Solución de Resuspensión y se disolvieron hasta no observar grumos. Después se agregaron 250 µl de Solución de Lisis, el tubo se invirtió 4 veces y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se agregaron 350 µl de Solución de Neutralización y se centrifugó a 20000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lisado bacteriano obtenido se colocó en una columna que retiene el ADN plasmídico, se centrifugó a 20000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y la columna se reinsertó en el tubo de recolección. La columna se lavó con 750 µl de Solución de Lavado y se centrifugó a 20000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se repitió el paso de lavado con 250 µl de Solución de Lavado. La columna se transfirió a un tubo estéril y el ADN plasmídico purificado se eluyó de la columna con 50 µl de buffer TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0, 0,1 mM de

EDTA). La concentración del plásmido obtenido se verificó con la medición del ADN en el Nano Spectrophotometer LNS-101 (Labocon). Los stocks de ADN se guardaron a -20°C.

## **Producción de proteínas recombinantes**

Todas las proteínas utilizadas se transformaron en bacterias competentes *E. coli* BL21. La  $\beta$ CSP unida a un *tag* de GST en el vector pGEX-2T fue una donación del Dr. Pier Scotti (Laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, Université de Bordeaux, France). La expresión de  $\beta$ CSP recombinante se indujo con 1 mM isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) por 4 horas a 37 °C. Su purificación se realizó mediante el protocolo estándar de lisis y purificación por cromatografía de afinidad en glutatión-sefarosa. Los pellets obtenidos luego de las inducciones, de cultivos de 200 ml fueron resuspendidos en 3 ml de buffer de lisis (PBS pH 8, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10  $\mu$ g/ml DNAsa, 1% Tritón X-100 y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)). Los lisados se sonicaron 3 veces por 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de GST-sefarosa (GE Healthcare; Buenos Aires, argentina) durante 1 hora a 4°C (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La proteína unida a la resina de GST se lavó 2 veces con PBS pH 8 y 1 vez con Tris HCl 50 mM pH 8. Finalmente, la elución se hizo en alícuotas de 100  $\mu$ L con el buffer de elución (50 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl y 20 mM glutatión reducido). Los eluidos obtenidos fueron conservados a -80°C con 20% de glicerol. La proteína Hsc70 unida a un *tag* de His<sub>6</sub> en el vector pET28a fue obtenida gracias al Dr. Thomas Südhof (Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Su expresión se indujo con 1 mM IPTG, durante 3 horas a 37 °C. Luego de la inducción los pellets obtenidos de 200 ml de cultivo se resuspendieron en buffer de lisis (20 mM Tris HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 10 mM imidazol y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)). Los lisados se sonicaron 2 veces por 15 segundos a 20 Hertz, posteriormente se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de Ni-NTA (Qiagen; Hilden, Alemania) durante 1 hora a 4°C (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La proteína unida a

la resina se lavó tres veces con buffer de lavado (20 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM ATP, 20 mM imidazol, 5% glicerol). La elución se hizo con buffer de elución (20 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 10 mM ATP, 5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 250 mM imidazol) en alícuotas de 100  $\mu$ L. Los eluidos obtenidos fueron conservados a  $-80^\circ C$  con 20% de glicerol. La proteína SGTA también unida a un *tag* de His<sub>6</sub>, en el vector pET28a fue concedida por el Dr. Thomas Südhof (Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Esta proteína se indujo con 1 mM isopropil- $\beta$ -D-tio-galactosido (IPTG) por 5 horas a  $30^\circ C$ . Luego de la inducción los pellets obtenidos de 100 ml de cultivo se resuspendieron en 1,5 mL de buffer de lisis (20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM ATP, 10 mM imidazol y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)). Los lisados se sonicaron 2 veces 15 segundos a 20 Hertz, posteriormente se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a  $4^\circ C$ . Se recuperó el sobrenadante y se probaron diferentes condiciones de elución con la resina de Ni-NTA. Se desarrollará con mayor detenimiento el proceso de elución en la Sección de Resultados. La proteína NSF fusionada a un *tag* de His<sub>6</sub>, en el vector pET28 fue una donación del Dr. Dirk Fasshauer (Department of Fundamental Neurosciences, Université de Lausanne, Switzerland). La producción de NSF recombinante fue inducida con 1 mM IPTG, durante 3 h a  $37^\circ C$ . Su purificación se realizó utilizando resina de Ni-NTA, 20 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.5 mM ATP, 5 mM  $MgCl_2$ , y 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. La elución se realizó con 20 mM Tris HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.5 mM ATP, 5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 250 mM imidazol. La cadena liviana de la proteína TeTx unida a un *tag* de His<sub>6</sub>, en el vector pQE3 fue obtenida gracias al Dr. T. Binz (Institut für Zellbiochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Germany). Su expresión fue inducida con 0.25 mM IPTG por 3 h a  $37^\circ C$ . Su purificación se realizó utilizando resina de Ni-NTA en 50 mM Tris HCl pH 7.4, 500 mM NaCl y 50 mM imidazol, seguida por la elución en 50 mM Tris HCl pH 7.4, 300 mM NaCl y 350 mM imidazol. La expresión del *tag* de GST (expresado en el vector pGEX) se indujo con 1 mM isopropil- $\beta$ -D-tio-galactosido (IPTG) por 3 hs a  $37^\circ C$ . Su purificación se realizó mediante el protocolo estándar de lisis y purificación por cromatografía de afinidad en glutatión-sefarosa. Los pellets obtenidos luego de las inducciones de 200 ml de cultivo fueron resuspendidos en 3 ml de buffer de lisis (PBS pH 8, 1 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)). Los lisados se sonicaron 3 veces por 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a  $4^\circ C$ . Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de GST-sefarosa durante 1 hora a  $4^\circ C$  (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La proteína unida a la resina de GST se lavó 3 veces con buffer de lavado (100 mM Tris HCl pH

8, 120 mM NaCl). Finalmente, la elución se hizo en alícuotas de 100  $\mu$ l con el buffer de elución (100 mM Tris HCl pH 8, 120 mM NaCl y 20 mM glutatión reducido). Los eluidos obtenidos fueron conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  con 20% de glicerol. Por último, se produjo también la proteína  $\beta$ CSP permeable unida a un *tag* de His6 y a un péptido de penetración celular (TAT) en el vector pET28a+. Este plásmido comercial se obtuvo a través de GenScript (Hong Kong). Su expresión fue inducida con 0.2 mM IPTG durante toda la noche a  $22^{\circ}\text{C}$ . Su purificación se realizó utilizando resina de Ni-NTA, 20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM imidazol y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714). Los lisados se sonicaron 2 veces 15 segundos a 20 Hertz, posteriormente se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a  $20000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante y se incubó con la resina de Ni-NTA durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La proteína unida a la resina se lavó tres veces con buffer de lavado (20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM imidazol, 5% glicerol) La elución se realizó con 20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 250 mM imidazol. Los eluidos obtenidos fueron conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  con 20% de glicerol.

La concentración de las proteínas recombinantes se midió a través del Kit BCA *protein* (Thermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina) en BioRad 3350 Microplate Reader usando BSA como blanco o a través de la intensidad de las bandas de un Coomassie blue en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando como referencia una curva de BSA con concentraciones conocidas.

### **Obtención de muestras de semen humano**

Los ensayos realizados en esta investigación siguen los principios éticos descritos en la Declaración de Helsinki. La recolección y manipulación de las muestras de semen humano fue aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina (Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, EXP-CUY: 25685/2016). Todas las muestras de semen humano fueron obtenidas de donantes voluntarios sanos, en un rango de edades de 21 a 45 años, que firmaron un consentimiento informado para poder participar en la investigación.

## **Swim up y capacitación**

Una vez obtenida la muestra de semen, ésta se incubó entre 15 y 30 minutos a 37 °C para alcanzar la licuefacción. El medio HTF (5.94 g/L NaCl, 0.35 g/L KCl, 0.05 g/L MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O, 0.05 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 g/L CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O, 2.1 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.51 g/L D-glucosa, 0.036 g/L piruvato de Na, 2.39 falta la unidad g/L? lactato de Na, 0.06 g/L penicilina, 0.05 g/L estreptomina, 0.01 g/L rojo fenol), la BSA 5% y los tubos de *swim up* se mantuvieron a 37 °C en estufa con 95% de aire/ 5% de CO<sub>2</sub> antes de usar. Para comenzar con el protocolo de *swim up* en condiciones capacitantes, se preparó el medio HTF suplementado con BSA en una relación 9:1. Se colocaron 800 µl de medio con BSA en cada tubo y se le adicionaron 300 µl de semen cuidadosamente en el fondo. Los tubos se colocaron en una gradilla de madera con una inclinación de 45° (para garantizar una mayor superficie de contacto entre las fases y así una mayor recuperación de células) y se incubaron por 1 hora en una estufa a 37 °C con 95% de aire/ 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se recolectó la fase superior, seleccionando así sólo la fracción mótil de espermatozoides. La concentración de espermatozoides recuperada del *swim up* se midió usando una cámara de Makler contando al microscopio de campo claro. Finalmente, la concentración se ajustó a 10x10<sup>6</sup> células/ml con medio HTF suplementado con BSA. Posteriormente se dejó en las mismas condiciones de temperatura y oxigenación por 2 horas, completando un tiempo total de capacitación de 3 horas.

## **Permeabilización con *Streptolisisina O* (SLO) de la membrana plasmática**

Una vez terminada la capacitación de los espermatozoides se procedió a permeabilizar su membrana plasmática. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37 °C, centrifugando a 2600 x g durante 3 minutos. Luego, se resuspendieron en un volumen de PBS frío y se incubaron en presencia de 3 U/ml de SLO durante 15 minutos a 4 °C. Los espermatozoides se lavaron centrifugando a 2600 x g durante 3 minutos y luego se resuspendieron en un volumen de HB-EGTA (20 mM Hepes-K, pH 7, 250 mM sacarosa, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT).

## **Ensayos funcionales con espermatozoides permeabilizados**

Posterior a la permeabilización, las células se dividieron en alícuotas de 50 µl y se incubaron entre 10 a 15 minutos a 37 °C después de cada adición de diferentes reactivos, proteínas, anticuerpos, dependiendo del ensayo, como lo indican las leyendas de cada figura en la

sección de Resultados. Al terminar las incubaciones se sembraron 10 µl de cada condición en portaobjetos excavados (*teflón-printed slides*) y las células se fijaron por secado al aire.

### **Ensayos funcionales con el quelante de calcio NP-EGTA-AM**

Cuando los ensayos funcionales se realizaron utilizando el quelante de calcio fotosensible NP-EGTA-AM, los espermatozoides permeabilizados fueron incubados por 10 minutos a 37 °C con el reactivo antes de ser incubados con los inhibidores o calcio, siempre en oscuridad. La fotólisis se indujo luego de la última incubación, exponiendo los espermatozoides dos veces (1 min por vez) a un transiluminador U.V. (FBTIV-614, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), mezclando e incubando por 5 minutos adicionales a 37 °C. Al terminar las incubaciones se sembraron 10 µl de cada condición en portaobjetos excavados (*teflón-printed slides*) y las células se fijaron por secado al aire.

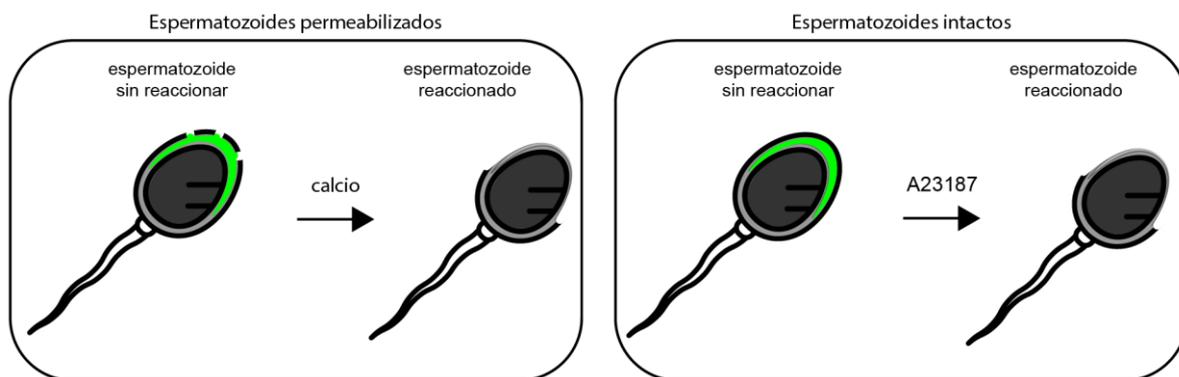
### **Ensayos funcionales con espermatozoides intactos**

Una vez terminada la capacitación se centrifugaron los espermatozoides por 3 minutos. Luego se lavaron en un volumen de HTF y se volvieron a centrifugar a 2600 x g por 3 minutos. Se dividieron en alícuotas de 50 µl y luego se adicionaron los reactivos correspondientes a analizar con tiempos de incubación de 15 minutos. Al terminar las incubaciones se centrifugaron todas las muestras a 3000 x g por 2 minutos y se resuspendieron en 50 µl de metanol frío. Se incubaron por 10 minutos a 4 °C y finalmente se sembraron 10 µl de cada condición en portaobjetos excavados (*teflón-printed slides*). Las células se fijaron por secado al aire.

### **Evaluación de la reacción acrosomal**

Luego del secado de las muestras en los portaobjetos, las células permeabilizadas o intactas se trataron o fijaron con metanol frío por 20 segundos y se tiñeron con 10 µl de lectina *Pisum sativum* conjugada al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC 25 µg/mL en PBS) que tiene la capacidad de unirse a los residuos de manosa que están presentes en el acrosoma (Mendoza *et al.*, 1992) y se incubaron por 40 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Terminado el tiempo, los portaobjetos se colocaron en

un vaso de Coplin vertical y se lavaron con agua destilada durante 20 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar y almacenaron en la oscuridad hasta evaluar la RA, lo cual se hizo por observación directa en microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot II o Zeiss, con objetivo de inmersión 60X. Se contaron 200 células por cada condición y se las clasificó en “reaccionadas” o “no reaccionadas” según el patrón de tinción (Figura 24). Los datos obtenidos se analizaron usando el test de ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a niveles de  $P < 0,05$ .



**Figura 24: Esquema del patrón de marca fluorescente en el método de tinción con PSA-FITC.** En espermatozoides permeabilizados o intactos la marca verde representa la lectina PSA-FITC, el estímulo de calcio o de A23187 induce la RA y al liberarse el contenido del acrosoma se pierde la marca de fluorescencia.

### Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para determinar la localización de las proteínas en los espermatozoides, estos se capacitaron por 2 horas y luego fueron llevados a un volumen de  $10 \times 10^6$  células por ml. Se lavaron con HTF 1X centrifugando a  $2600 \times g$  por 2 minutos. Luego se separaron las células en alicuotas de 50  $\mu$ l por condición y se incubaron con paraformaldehído al 2% por 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a  $5200 \times g$  por 2 minutos y luego se neutralizaron con glicina 100 mM en PBS pH 7,2. Después se pegaron 200.000 células aproximadamente (50  $\mu$ l de muestra) en cubres redondos de 12 mm de diámetro, previamente incubados con poli-L-lisina (1  $\mu$ l stock 0,1% p/v Sigma, diluída en 20  $\mu$ l agua tridestilada). Los cubres se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego los espermatozoides se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS a temperatura ambiente por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS-PVP (0,1% polivinilpirrolidona en PBS) a temperatura ambiente. Luego se bloquearon con 5% BSA en PBS/PVP durante 1 h a 37 °C

en cámara húmeda, para evitar la tinción no específica. A continuación, se diluyeron los anticuerpos anti-CSP (4 µg/mL), anti- Hsc70 (1 µg/mL) y anti-SGT (0,07 µg/mL) en 3% BSA en PBS/PVP y se añadieron a los espermatozoides permeabilizados incubando por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron las células tres veces con PBS-PVP a temperatura ambiente por 10 minutos y se adicionaron los anticuerpos anti-conejo (para el anticuerpo anti-SGTA y anti-Hsc70) o anti-ratón (para el anticuerpo anti-CSP) conjugados con Cy3<sup>TM</sup> (2,5 µg/ml en 1% BSA en PBS/PVP) y se incubaron en cámara húmeda a 37 °C por 1 hora. Posteriormente los cubres se lavaron 3 veces con PBS-PVP por 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizó la membrana externa del espermatozoide con metanol frío por 20 segundos. Luego, las células se tiñeron con PSA-FITC (25 µg/ml en PBS) durante 40 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y se lavaron 3 veces con PBS-PVP por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cubres se montaron en MOWIOL 4-88 adicionado con 2 µM de Hoechst 33342 y se resguardaron en oscuridad hasta la observación en el microscopio (Eclipse TE2000 Nikon equipado con el objetivo de inmersión Plan Apo 60x/l.40). Se contaron 200 células como mínimo y las imágenes fueron tomadas con la cámara digital Hamamatsu C4742-95 operada con el software Metamorph 6.1 (Universal Imaging, Bedford Hills, NY, USA). Finalmente se restó el ruido de fondo y se ajustaron el brillo y contraste con el programa Image J (software libre del N.I.H.) para obtener patrones de tinción de todo o nada.

### **Microscopía electrónica**

Las células tratadas fueron fijadas a temperatura ambiente con 2.5% (w/v) de glutaraldehído en PBS pH 7,4 por 1 hora. Se lavaron dos veces con PBS y se agregó 1% (w/v) de osmio tetraóxido en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Luego las muestras se deshidrataron incrementando la concentración de acetona fría. Las células se infiltraron a temperatura ambiente en acetona:Spurr (1:1) por 2 horas y finalmente se incorporaron en resina pura y se dejaron a temperatura ambiente por toda la noche. Las muestras fueron curadas por 24 horas a 70 °C. Se utilizó una cuchilla de diamante (Diatome) para cortar delgadas secciones (80 nm) de muestras en el ultramicrotomo Leica Ultracut R. Luego, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo/citrato de plomo. Finalmente se utilizó el microscopio electrónico Zeiss 900 a 80 kV para tomar fotografías de las muestras obtenidas.

## **Preparación de extractos de espermatozoides con Tritón X-100**

Los espermatozoides capacitados se lavaron 2 veces con PBS. La cantidad de células mínima que se utilizó para preparar extractos fue de  $10 \times 10^6$ . A esa cantidad de células se las resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 5 mM  $MgCl_2$ ) con inhibidores de proteasas (cóctel de Sigma P2714) para extraer las proteínas. Luego se sonicaron 3 veces a 20 Hertz durante 15 segundos con intervalos de 10 segundos. El lisado se dejó reposar a 4 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 20000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Los extractos clarificados se recuperaron y guardaron a -20 °C hasta su uso.

## **Partición con Tritón X-114: obtención de fase acuosa y detergente**

Para realizar estos experimentos se utilizaron los protocolos estándares de Bordier (Bordier, 1981) y Pride & Phillips (Pryde and Phillips, 1986). Los espermatozoides capacitados ( $10 \times 10^6$  células) se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis como se describió arriba teniendo en cuenta que se cambió el Tritón X-100 por 1% de Tritón X-114. Las células se sonicaron 3 veces a 20 Hertz durante 15 segundos con intervalos de 10 segundos por vez. Se dejó reposar por 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugaron a 20000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (extracto) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos para favorecer la separación de fases. Después se centrifugó a 1000 x g durante 2 minutos. Se puede observar claramente cómo las proteínas hidrofóbicas particionan a la fase detergente (en el fondo del tubo como una gota de aceite) y las proteínas hidrofílicas particionan a la fase superior acuosa. Las fases se separan y las proteínas se precipitaron con el protocolo de metanol/cloroformo/agua.

## **Fraccionamiento subcelular con buffer hipoosmótico: separación en citosol y membrana**

Para realizar esta técnica seguimos el protocolo descrito por Bohring & Krause (Bohring and Krause, 1999) y modificado por Tomes *et. al.* (Tomes et al., 2005). Terminado el *swim up*, los espermatozoides capacitados fueron diluidos en buffer hipoosmótico en una relación 1:9 (Jeyendran et al. 1984) e incubados por 2 horas a 37 °C. Finalizado el tiempo se corroboró que al menos el 80% de las células tenía la cola enrollada. Luego, las muestras fueron sonicadas 3 veces por 4 minutos a 40 Hz en hielo. Se volvió a observar al microscopio y se

corroboró que el 95% de las células había perdido el flagelo. Se centrifugó a 10600 x g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 20800 x g. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en la ultracentrífuga Beckman Optima a 208000 x g por 2 horas a 4 °C separando los pellets (fracción particulada) de los sobrenadantes (fracción soluble). Los pellets se resuspendieron en 20 µL de SB2X reductor y los sobrenadantes se precipitaron siguiendo el protocolo de metanol/cloroformo/agua y se resuspendieron en 20 µL de SB2X reductor. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

### **Protocolo de precipitación de proteínas con metanol/cloroformo/agua**

Una vez obtenidos los extractos totales o las fases acuosas y detergentes, las muestras se separaron en alícuotas de 300 µl a los cuales se les agregaron 400 µl de metanol, 200 µl de cloroformo y 100 µl de agua tridestilada (en caso de ser necesario) y se agitó vigorosamente después de cada adición. Luego, se centrifugó a 12000 x g durante 5 minutos. Se descartó la fase superior, evitando tocar la fase intermedia (contiene las proteínas) y luego se adicionaron 300 µl de metanol, agitando vigorosamente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante (SN) completamente. Se lavó el pellet de proteínas con 1 ml de metanol al 50% y se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto. Se descartó el metanol y el pellet de proteínas se secó al aire. Finalmente, los pellets se resuspendieron en SB2X reductor y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

### **Dot Blot entre proteínas recombinantes**

Para llevar a cabo los dot blots utilizamos el Bio-Dot® Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Se tomó la membrana de nitrocelulosa con poros de 0,22 µm y se activó con metanol 100% durante 20 segundos y luego se transfirió al buffer Tris (TBS, del inglés: *Tris Buffered Saline*) Tris-HCl 10 mM (pH 7,00) y NaCl 150 mM durante 10 minutos. Una vez que la membrana fue humedecida, se colocó en el aparato de acuerdo con lo especificado por el manual del fabricante, y se cubrió con el mismo buffer para asegurar la adhesión uniforme de la proteína. Se ajustó la válvula de flujo para que la cámara de vacío estuviese abierta al aire y se llenaron los pocillos con 100 µL de TBS para rehidratar la membrana. Luego se colocó en cada pocillo la proteína Hsc70 en distintas concentraciones (2 µg y 4 µg)

usando el mismo volumen para que el filtrado sea homogéneo (mínimo de 50  $\mu$ L y máximo de 500  $\mu$ L). Todos los pocillos se llenaron con el mismo volumen y aquellos pocillos que no se usaron se taparon con parafilm, para impedir el flujo de aire a través de estos. Se filtró toda la muestra a través de la membrana por flujo de gravedad durante 30 minutos. Se realizó un lavado con 50  $\mu$ L de TBS-T (TBS suplementado con 0.05 % de Tween-20) a cada pocillo y se filtró conectando al vacío. Luego se retiró la membrana del aparato, se lavó con TBS-T y se tiñó con rojo Ponceau como control de sembrado. Se dejó secar por 10 minutos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche al 3% en TBS-T), posteriormente se procedió a cortarla para incubarla con la proteína. La proteína recombinante  $\beta$ CSP-WT (1  $\mu$ g por pocillo) se diluyó en el Buffer overlay (TBS-T 1%, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1 mM ATP). La membrana se incubó 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente con la condición correspondiente. Finalizado el tiempo de incubación, se lavó 2 veces con 2 ml de TBS-T por 5 minutos y se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-GST (0,007  $\mu$ g/mL). Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T por 5 minutos y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo conjugado con HRP (0,1  $\mu$ g/ml en solución de lavado). Se realizaron 3 lavados nuevamente con TBS-T a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a detectar las proteínas con el sistema de quimioluminiscencia (Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) usando Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón).

### **Dot Blot entre una proteína recombinante y un lisado celular**

Para llevar a cabo este dot blot utilizamos el Bio-Dot® Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Se tomó la membrana de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu$ m y se activó con metanol 100% durante 20 segundos y luego se transfirió al buffer Tris (TBS, del inglés: *Tris Buffered Saline*) Tris-HCl 10 mM (pH 7,00) y NaCl 150 mM durante 10 minutos. Una vez que la membrana fue humedecida, se colocó en el aparato de acuerdo con lo especificado por el manual del fabricante, y se cubrió con el mismo buffer para asegurar la adhesión uniforme de la proteína. Se ajustó la válvula de flujo para que la cámara de vacío estuviese abierta al aire y se llenaron los pocillos con 100  $\mu$ L de TBS para rehidratar la membrana. Luego se colocó en cada pocillo la proteína  $\beta$ CSP-GST en distintas concentraciones (2  $\mu$ g y 4  $\mu$ g) usando el mismo volumen para que el filtrado sea homogéneo (mínimo de 50  $\mu$ L y máximo de 500  $\mu$ L). Todos los pocillos se llenaron con el mismo volumen y aquellos pocillos que no se usaron se taparon con parafilm, para impedir el flujo de aire a través de estos. Se

filtró toda la muestra a través de la membrana por flujo de gravedad durante 30 minutos. Se realizó un lavado con 50  $\mu$ L de TBS-T (TBS suplementado con 0.05 % de Tween-20) a cada pocillo y se filtró conectando al vacío. Luego se retiró la membrana del aparato, se lavó con TBS-T y se tiñó con rojo Ponceau como control de sembrado. Se dejó secar por 10 minutos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche al 3% en TBS-T), posteriormente se procedió a cortarla para incubar con el lisado celular. 150 M de espermatozoides fueron lisado con buffer de lisis (20 mM TrisHCl pH 7.4, 1 mM  $MgCl_2$  y 1 mM ADP, 20 mM NaCl, 0.5% Igepal y y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)), sonicados 5 veces a 20 Hertz durante 15 segundos con intervalos de 10 segundos. El lisado se dejó reposar a 4 °C durante 20 minutos y luego se centrifugó a 20000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se recuperó el lisado y se incubaron las membranas con la proteína  $\beta$ CSP recombinante fijada en ella, por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se lavó 2 veces con 2 ml de TBS-T por 5 minutos y se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-Hsc70 (0,02  $\mu$ g/mL). Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T por 5 minutos y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo conjugado con HRP (0,1  $\mu$ g/ml en solución de lavado). Se realizaron 3 lavados nuevamente con TBS-T a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a detectar las proteínas con el sistema de quimioluminiscencia (Kallium Technologies, Buenos Aires, Argentina) usando Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Como controles, se sembraron en la membrana de nitrocelulosa 0  $\mu$ g y 4  $\mu$ g de la proteína  $\beta$ CSP recombinante y se incubaron con buffer de lisis. Luego se procedió de la misma manera que la condición experimental.

## **Preparación de liposomas**

Se prepararon V-liposomas mezclando los lípidos de la siguiente manera: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), dioleoyl-glycero-phosphocholine (DOPS), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), colesterol y 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD PE) de Avanti Polar Lipids.

Lípidos	Mf	Vt	PM	Mi	%	Vi
POPC	10 mM	210 $\mu$ l	760,076 g/mol	25 mg/ml	39 /100	24,90 $\mu$ l
DOPS	10 mM	210 $\mu$ l	810,025 g/mol	10 mg/ml	19 /100	32,32 $\mu$ l
POPE	10 mM	210 $\mu$ l	718,01 g/mol	10 mg/ml	20,5 /100	30,91 $\mu$ l
Colesterol	10 mM	210 $\mu$ l	386,65 g/mol	10 mg/ml	20 /100	16,24 $\mu$ l
NBD PE	10 mM	210 $\mu$ l	872,09 g/mol	1 mg/ml	1,5 /100	27,47 $\mu$ l

**Tabla 4: Preparación de liposomas.** En la tabla se muestran las concentraciones de los lípidos que se usaron para armar los liposomas.

Se mezclaron los lípidos en cloroformo y el disolvente se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno y se secó durante la noche al vacío. Al día siguiente los liposomas se resuspendieron en el Buffer RB<sub>150</sub> G10 (HEPES 25 mM, pH 7,4, KCl 100 mM, glicerol 10%) para dar una concentración lipídica final de 10 mM. Los lípidos hidratados se agitaron vigorosamente durante 5 min. Las vesículas multilaminares grandes resultantes se rompieron mediante 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y se forzaron una primera vez, a través de un filtro de policarbonato de 100 nm al menos 19 veces usando una miniextrusora (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Luego se volvieron a pasar 19 veces a través de un filtro de policarbonato de 50 nm usando nuevamente la miniextrusora. Los liposomas se almacenaron a 4 °C y se usaron en los siguientes tres días.

### Ensayo de co-flotación

Las proteínas recombinantes deseadas (4 $\mu$ M) y 16.5  $\mu$ l de liposoma reconstituido, se diluyeron en el Buffer RB<sub>150</sub> G10 (HEPES 25 mM, pH 7.4, KCl 100 mM, glicerol 10%) a un volumen final de 165  $\mu$ l y se incubaron a 4 °C durante 1 h. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de HistoDenz al 80 % (p/v) (Sigma) y se colocaron en el fondo de tubos de ultracentrífuga Beekman. A continuación, se agregaron lentamente 150  $\mu$ l de HistoDenz al 35 % (p/v) y 150  $\mu$ l de HistoDenz al 30 % (p/v). Se adicionaron lentamente 50  $\mu$ l de RB<sub>150</sub> G10 en la parte superior del gradiente de densidad. Las muestras se centrifugaron a 48.000 rpm con un rotor SW55 (Beckman) durante 4 h a 4 °C. A continuación, se analizó la parte superior del gradiente (150  $\mu$ L) mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie Blue.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las proteínas se corrieron en geles de poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970) para analizarlas y caracterizarlas. Ajustando la concentración de la acrilamida-bisacrilamida se generan poros de diferentes tamaños que permiten migrar a las proteínas según su peso y luego reconocerlas comparando su migración en el gel con un patrón conocido de pesos moleculares. Finalizada la corrida, los geles se pueden teñir con Coomassie Blue R250 o transferir para realizar un Western blot, como se describe a continuación.

## **Western blot**

Una vez finalizada la electroforesis el gel de poliacrilamida se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  (Hybond, GE Healthcare) durante 1 hora a 25 mA (amperaje constante) en el Semi-Dry transfer (Amersham). Posteriormente se incubaron las membranas con solución de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS Tween-20 al 0,1% pH: 7,6) por 1 hora a temperatura ambiente para evitar la reactividad inespecífica. Luego, se lavaron las membranas tres veces con PBS Tween-20 al 0,1% por 10 minutos cada lavado y se incubaron con los anticuerpos anti-CSP (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-Hsc70 (0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y anti-SGT (0,007  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 4°C toda la noche en movimiento. Al día siguiente, se lavó tres veces con PBS Tween-20 al 0,1% por 10 minutos cada lavado y posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con HRP (0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en solución de lavado) para el anticuerpo anti-CSP o anti-conejo conjugado con HRP (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en solución de lavado) para los anticuerpos anti-Hsc70 o anti-SGTA durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó realizando 3 lavados de 10 minutos con PBS Tween-20 al 0,1%. La detección de las proteínas se realizó con un sistema de quimioluminiscencia (Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) usando Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Las cuantificaciones de las intensidades de las bandas obtenidas se analizaron con el programa Image J.

## **Tratamiento de depalmitoilación con hidroxilamina**

Los espermatozoides capacitados ( $300 \times 10^6$  células) se lavaron 2 veces con PBS. A continuación, se lisaron con 20 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón

X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub> y un cocktail de inhibidor de proteasas (P2714, Sigma). La muestra fue sonicada 3 veces por 15 segundos a 40 Hz con intervalos de 10 segundos cada vez y luego se incubó 30 minutos a 4 °C. El extracto total fue centrifugado a 20000 x g por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se dividió en dos para continuar con los tratamientos. Cada fracción fue incubada con una concentración final de 1M de hidroxilamina (HA, pH 7.5) o 1 M de Tris HCl (Tris, pH 7.5) que se tomó como control. Las muestras se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Finalmente, fueron precipitadas con cloroformo/metanol/agua, resuspendidas en SB2X reductor y hervidas por 10 minutos a 95 °C. Luego se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot.

### **Digestión de His<sub>6</sub>-TAT-βCSP por tripsina**

Para determinar la concentración de tripsina que era capaz de digerir completamente a la proteína His<sub>6</sub>-TAT-βCSP recombinante, 1 uM de la proteína CSP permeable fue incubado con distintas concentraciones de tripsina (0 a 100 µg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 20 µl de SB reductor y las muestras se hirvieron durante 3 minutos a 100°C. Las muestras procesadas se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% y luego se tiñeron con Coomassie blue.

### **Incorporación de His<sub>6</sub>-TAT-βCSP a espermatozoides humanos**

Para corroborar el ingreso de la proteína βCSP permeable se trabajaron con 45 x 10<sup>6</sup> células por condición. Una vez terminada la capacitación se lavaron los espermatozoides con HTF a 2600 x g por 3 minutos. Luego se resuspendieron en HTF y se incubaron con 1 µM de la proteína permeable por 30 minutos a 37 °C, moviendo frecuentemente para levantar las células que precipitan. En una condición, se añaden 30 µg/ml de tripsina, para que degrade la proteína no incorporada a las células. A la otra condición no se le agrega tripsina, y se incuban las dos condiciones por 20 minutos a 37 °C moviendo con frecuencia. Finalizadas las incubaciones se centrifuga por 3 minutos a 2600 x g y se separa el SN del pellet (espermatozoides). El sobrenadante se precipitó con el protocolo metanol/cloroformo/agua, como se explicó con anterioridad y luego se resuspendió en 50 µL de SB1X reductor. A los pellets se los resuspendió en 50 µL de SB1X no reductor, se los hirvió por 5 minutos, se vortexeó y se volvió a hervir por 5 minutos. Luego se centrifugó a 10000 x g por 10 minutos a

4 °C, se recuperó el SN y se le agregó DTT 100 mM. Se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 15% y se realizó un Western blot anti-His<sub>6</sub>.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Los test de ANOVA unidireccional y post-test de Dunnett se realizaron utilizando datos no normalizados. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a valores de  $p < 0,05$ . Para analizar los datos de microscopía electrónica de transmisión se utilizó ANOVA bidireccional y se consideró una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes patrones cuando  $p < 0,05$  (prueba t de Dunnett).

# Resultados

**Objetivo específico 1:** *Identificar y caracterizar la maquinaria molecular involucrada en el ensamblado de los complejos SNAREs durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos.*

### **1.1. Las proteínas $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA están presentes en los espermatozoides humanos**

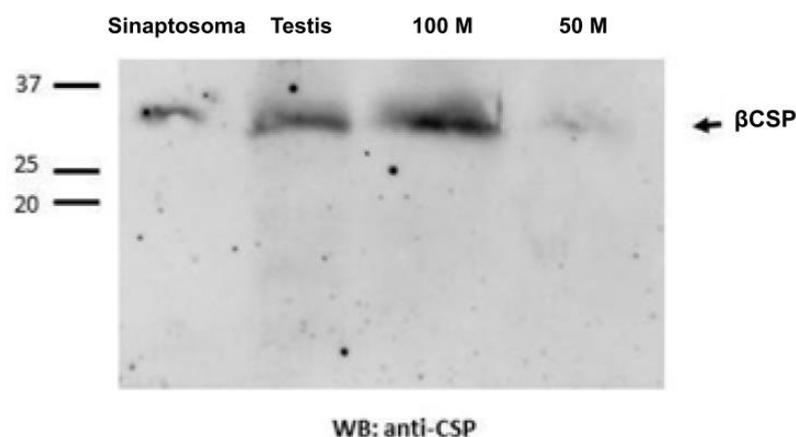
Como mencionamos anteriormente el espermatozoide humano experimenta un cambio estructural complejo antes de fertilizar al ovocito, llamado reacción acrosomal (RA) (Hirohashi and Yanagimachi, 2018). Este proceso de exocitosis regulada, altamente conservado en diferentes tipos celulares, depende de una maquinaria proteica que se activa ante un incremento de la concentración de calcio intracelular (Patrat, Serres and Jouannet, 2000). Durante la exocitosis regulada se ponen en funcionamiento proteínas como la sinaptotagmina,  $\alpha$ -SNAP/NSF, Muncs, Rabs y las proteínas SNARE (Schluter et al., 2002; Stojilkovic, 2005). Actualmente hay evidencia de que otras proteínas como  $\alpha$ CSP, Hsc70 y SGTA tienen un papel fundamental en la regulación de la maquinaria exocítica (Burgoyne and Morgan, 1993) lo que nos llevó a pensar que estas proteínas también podrían tener un papel importante en la exocitosis del acrosoma en espermatozoides humanos. Desarrollamos en la *Sección de Antecedentes*, que a través de la búsqueda en la base de datos del Atlas de Proteínas Humanas (Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>) confirmamos que el RNAm de  $\beta$ CSP humana se expresa mayoritariamente en el tejido testicular y las espermátidas tardías. Por esta razón, nosotros hipotetizamos que la isoforma  $\beta$  de la proteína CSP es la que tiene mayor prevalencia en los espermatozoides. Adquirimos el anticuerpo anti-CSP de la empresa Synaptic System, que reconoce el fragmento 182-198 de la proteína (Figura 25). Este fragmento está altamente conservado en las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de CSP, por lo que para proponer que detectamos la presencia de  $\beta$ CSP en los espermatozoides utilizando este anticuerpo, nos apoyamos en los datos obtenidos del programa Atlas de Proteínas Humanas (versión 22.0).

DNAJC5	TQLTADSHPSYHTDGFN 198
DNAJC5B	TQLIKEGSRSYCTDS - - 199

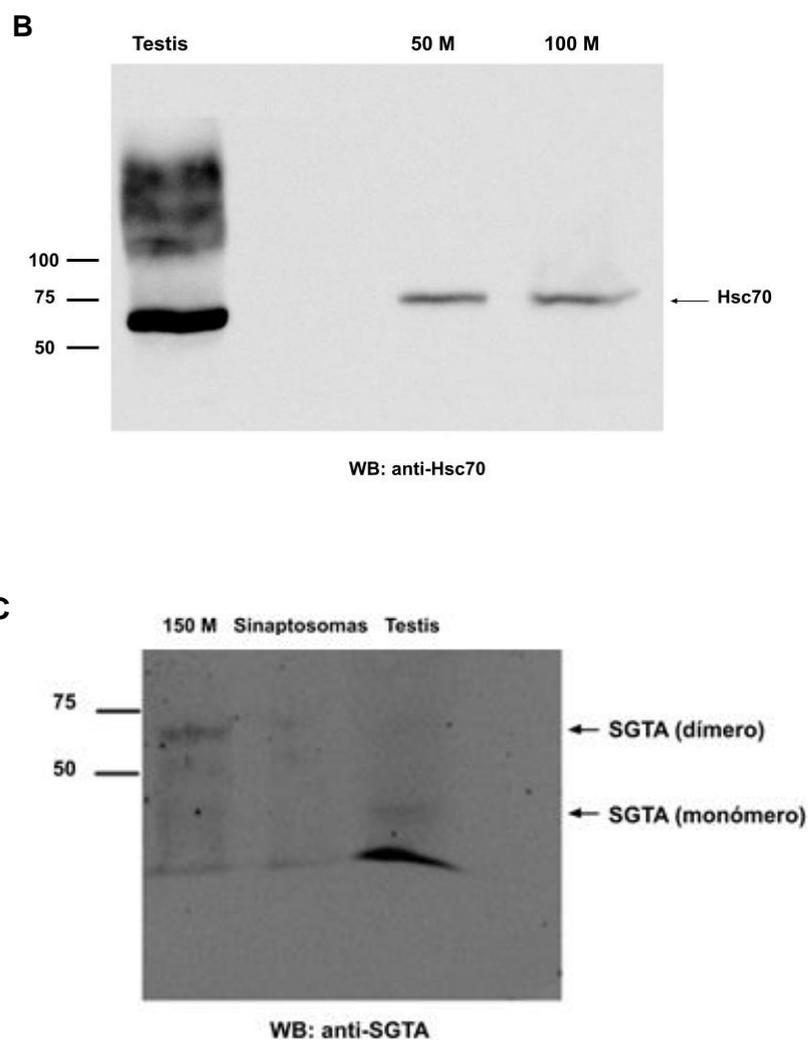
**Figura 25:** Esquema representativo del fragmento 182-198 de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína CSP. Se observan en el esquema los residuos conservados entre las dos isoformas de la proteína CSP (en rojo).

Para comenzar con la investigación, lo primero que se planteó, fue detectar en extractos de espermatozoides humanos las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA. Para esto, se realizaron diferentes ensayos con la técnica de Western blot (WB). Se prepararon extractos de espermatozoides humanos, como se explicó en la *Sección de Materiales y Métodos* y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10 %, que luego fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y expuestos a los anticuerpos monoclonales anti-CSP, anti-Hsc70 y anti-SGTA respectivamente. En la Figura 26 se observan las bandas que revelan la presencia de las proteínas en extracto de espermatozoides. En la Figura 26A detectamos una banda a la altura de aproximadamente 34 kDa que corresponde a la proteína  $\beta$ CSP endógena palmitoilada\*. Como mencionamos anteriormente el peso de  $\beta$ CSP endógena es de 24 kDa, pero al encontrarse altamente palmitoilada en su región rica en cisteína, su peso asciende a 34 kDa. Este resultado nos estaría indicando que  $\beta$ CSP también está palmitoilada en espermatozoides humanos, como se encuentra en otros modelos celulares. En el WB anti-Hsc70 (Figura 26B), observamos claramente una banda a la altura de 70 kDa que se corresponde con el peso molecular de la proteína Hsc70 endógena. En la figura 26C podemos ver el WB anti-SGTA, donde se observa una banda a los 68 kDa aproximadamente. Cómo mencionamos en la *Sección de Antecedentes*, se ha descrito que la proteína SGTA es funcional de forma dimérica (Trotta *et al.*, 2012) lo que nos estaría indicando que la proteína también forma dímeros en los espermatozoides humanos. En todos los ensayos se utilizaron como controles positivos, cerebro de rata (sinaptosomas) y tejido testicular de ratón (testis).

A



\*Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al.*, 2023.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>



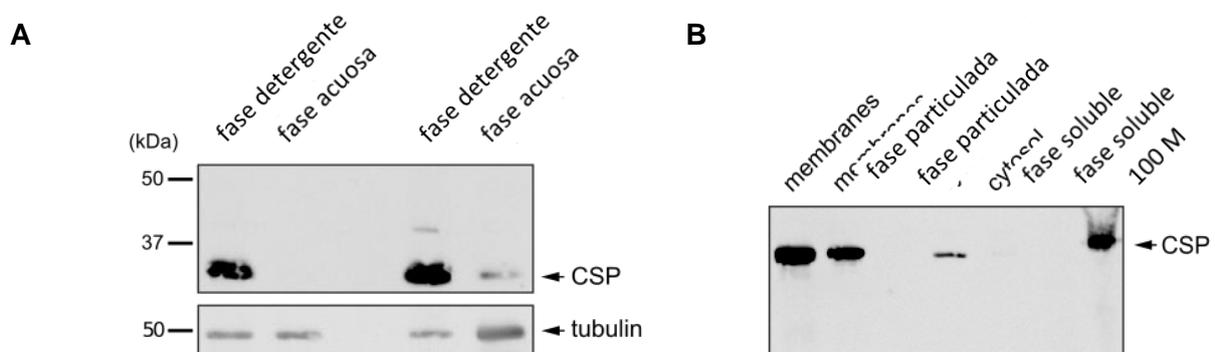
**Figura 26:  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA están presentes en extractos de espermatozoides humanos.** Para determinar la presencia de las proteínas se utilizaron muestras de sinaptosomas, tejido de testículo (testis) y extracto de espermatozoides con una concentración de  $50 \times 10^6$  células (50M),  $100 \times 10^6$  células (100M) y de  $150 \times 10^6$  células (150M) respectivamente. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, donde se revelaron con los anticuerpos específicos, anti-CSP, anti-Hsc70 y anti-SGTA. Los marcadores de peso molecular estándar ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

### **1.2. Caracterización química de las proteínas $\beta$ CSP y Hsc70 en espermatozoides humanos.**

Después de confirmar la presencia de las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en espermatozoides humanos, se procedió a investigar sobre sus características químicas. Para esto se realizaron ensayos de particiones celulares y subcelulares (ver *Materiales y Métodos*).

Para realizar las particiones celulares se utilizó el detergente Tritón X-114, con el cual es posible separar proteínas de un extracto en una fase acuosa y otra detergente, dependiendo de las características hidrofílicas o hidrofóbicas de las mismas. Las muestras tratadas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 % y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se realizó un WB utilizando los anticuerpos específicos y con anti-tubulina, utilizado como control de carga. Como podemos ver en la Figura 27A<sup>\*</sup>, localizamos mayormente a  $\beta$ CSP en la fase detergente, lo que nos indica que tiene características hidrofóbicas. Como mencionamos en la *Sección de Antecedentes*, la proteína  $\beta$ CSP sufre de numerosas palmitoilaciones en su cadena de cisteína y se demostró que en *Drosophila* (Zinsmaier et al., 1990), en ratones, ranas y en humanos (Edmonds et al., 2017) está palmitoilada. Este resultado junto con la determinación de su presencia en espermatozoides humanos, con un peso aproximado de 34 kDa (Figura 27A) nos permite hipotetizar que  $\beta$ CSP está palmitoilada, y podría estar unida a membrana en algún estadio de las etapas que llevan a la RA. <sup>\*</sup>Para corroborar si  $\beta$ CSP está asociada a la membrana, realizamos fraccionamientos subcelulares con un buffer hipoosmótico, como se describió anteriormente en *Materiales y Métodos*.

Finalizado el tratamiento obtuvimos dos fases, una particulada (con componentes de membrana y citoesqueleto) y una soluble (con componentes de citosol y acrosoma). La fase particulada se resuspendió en sample buffer (SB) y la fase soluble se precipitó con el protocolo metanol/cloroformo/agua, para luego resuspenderse en SB. Se corrieron las fracciones obtenidas en geles de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, donde fueron reveladas con el anticuerpo anti-CSP, posteriormente se realizó un western blot con anti-tubulina, como control de carga. Como se pudo observar, la mayor parte de la proteína  $\beta$ CSP en espermatozoides se encontró en la fracción particulada, lo que nos indica que se encuentra asociada a la membrana (Figura 27B) <sup>\*</sup>.



<sup>\*</sup> Datos publicados recientemente en Flores-Montero et al., 2023.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>

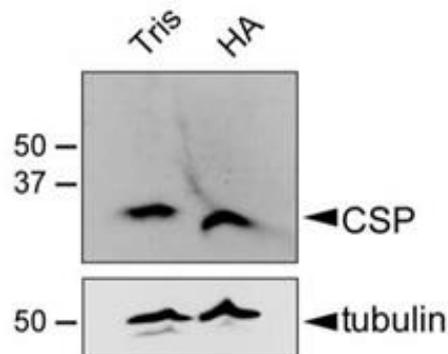
**Figura 27: Caracterización química de CSP. (A):** Se realizó una partición celular con Tritón X-114, luego las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron por WB con el anticuerpo anti-CSP. Se realizó un Western blot con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga de proteína de espermatozoides. Se muestra la presencia de la proteína  $\beta$ CSP en la fase detergente en dos condiciones diferentes, extracto de 100M (primeras dos calles en la membrana) y extracto de 150 M de células (últimas dos calles en la membrana). **(B):** Extractos de espermatozoides se trataron con buffer hipoosmótico para dividir en dos fracciones subcelulares: fase particulada y fase soluble. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron por WB con el anticuerpo anti-CSP. Se realizó un Western blot con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga de proteína de espermatozoides. Se puede ver claramente que la proteína  $\beta$ CSP está mayormente asociada a la fase particulada. Como control se sembró un extracto de espermatozoides (100 M). Los marcadores de peso molecular estándar ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

Nuestros resultados acerca de las características químicas de  $\beta$ CSP, están en correlación con algunos ya reportados en otros sistemas celulares. Una característica controversial de la proteína CSP es su alto nivel de palmitoilación, que incluso modifica su peso molecular en aproximadamente 10 kDa, pasando de 24 kDa cuando la proteína no está palmitoilada a 34 kDa cuando se han unido grupos palmitatos a su región rica en cisteínas (Gundersen, 2020). Se han postulado diversas funciones para esta modificación postraduccional, como de anclaje a la membrana, clasificación de proteínas y la microlocalización de proteínas dentro de membranas (Greaves et al., 2008). Esta diferencia en su peso molecular es fácilmente detectable en geles de SDS-poliacrilamida y en diversos trabajos se ha demostrado el estado palmitoilado de la proteína, gracias al tratamiento con hidroxilamina. Por lo que, para sustentar nuestros resultados, nos propusimos indagar de forma directa, si  $\beta$ CSP endógena estaba palmitoilada en espermatozoides humanos. La hidroxilamina, actúa sobre los grupos palmitatos rompiendo los enlaces éster que los unen a las proteínas. Por lo que el tratamiento con este reactivo, libera a  $\beta$ CSP de los grupos palmitatos, disminuyendo su peso molecular y haciendo que migre en el gel de poliacrilamida más que la proteína palmitoilada. Se lisaron 300 millones de espermatozoides capacitados, para obtener todo su contenido proteico. El extracto total fue centrifugado a 14000 x g por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se dividió en dos tratamientos. Cada fracción fue incubada con una concentración final de 1M de hidroxilamina (HA, pH 7.5) o 1 M de Tris HCl (Tris, pH 7.5) que se tomó como control (Figura 28)\*. Las muestras se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Luego se precipitaron con el protocolo de cloroformo/metanol/agua y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%,

---

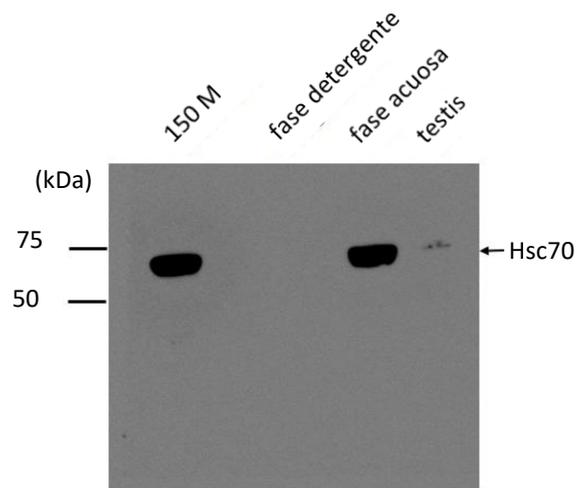
\*Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al., 2023*.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>

para posteriormente ser analizadas por WB con el anticuerpo anti-CSP. Analizando los resultados obtenidos, podemos establecer que  $\beta$ CSP endógena está eficientemente palmitoilada en espermatozoides humanos ya que el tratamiento con la hidroxilamina produjo un cambio en su movilidad electroforética, y que esta modificación postraduccional es relativamente estable.



**Figura 28: La proteína  $\beta$ CSP endógena está palmitoilada en espermatozoides humanos.** 300 millones de espermatozoides fueron tratados con 1M de hidroxilamina (HA) o 1M de Tris HCl (Tris), como control. Se puede observar un desplazamiento mayor, en la electroforesis, de la proteína tratada con HA, lo que nos indica que perdió grupos palmitatos cuando la proteína estuvo en presencia de la hidroxilamina. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron por WB con el anticuerpo anti-CSP. Los marcadores de peso molecular estándar ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

A continuación, realizamos una caracterización similar con la proteína Hsc70. Se tomó un extracto de espermatozoides y se realizó una partición celular con Tritón X-114, obteniendo las fases detergente y acuosa. Luego se corrió un gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. A diferencia de la proteína  $\beta$ CSP, como se puede observar en la Figura 29, la proteína Hsc70 particionó en la fase acuosa, lo que coincide con sus características reportadas como proteína citosólica e hidrofílica (Bonam et al. 2019).



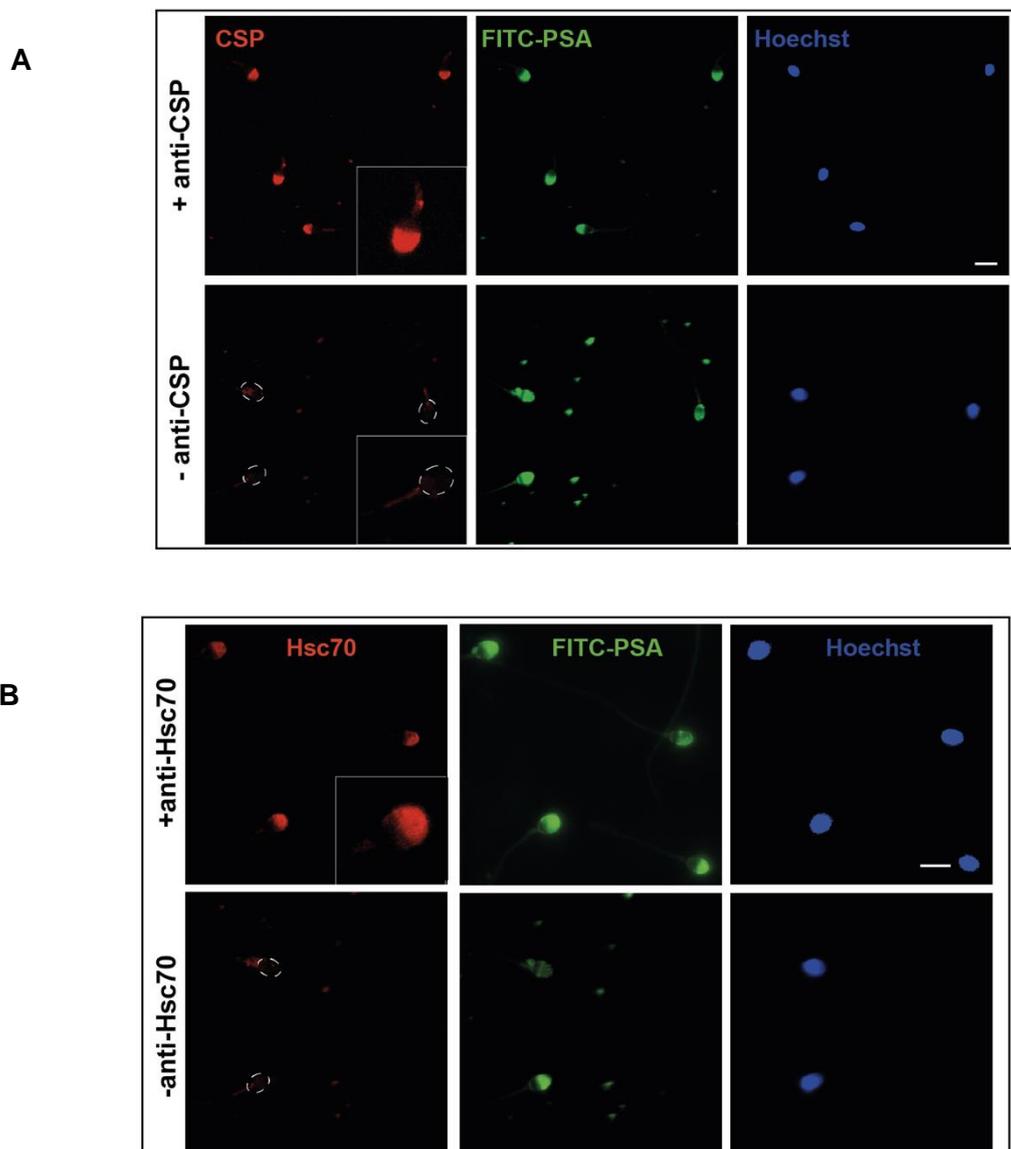
**Figura 29: Caracterización química de la proteína Hsc70.** Se realizó una partición celular con Tritón X-114, luego las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron por WB con el anticuerpo anti-Hsc70. Se muestra la presencia de la proteína Hsc70 en la fase acuosa. Como controles positivos se sembraron también un extracto de espermatozoides con 150 millones de células (150 M) y tejido testicular (testis). Los marcadores de peso molecular estándar ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

### 1.3. Localización subcelular de las proteínas $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en espermatozoides

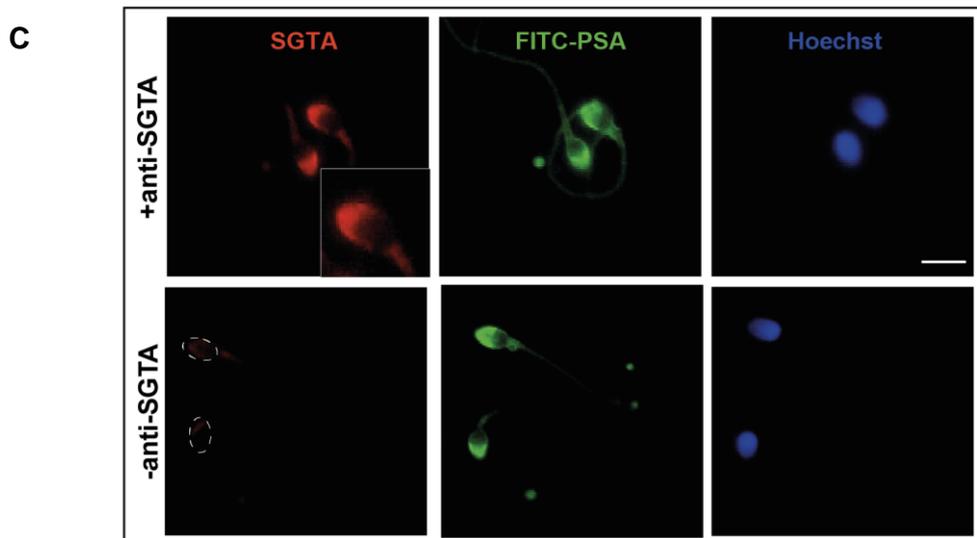
Luego de verificar la presencia de  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en espermatozoides humanos, nos preguntamos cuál era su localización dentro del espermatozoide. Como mencionamos anteriormente, las proteínas que están involucradas en el proceso de la exocitosis del acrosoma cumplen una función dependiente de la disposición que tengan dentro del granulo secretorio (Ito and Toshimori 2016). Como se reportó, estas proteínas cumplen funciones de chaperonas sobre las proteínas SNARE, que son fundamentales para la fusión de membranas en los procesos de exocitosis regulada en células neuroendocrinas (Südhof and Rizo 2011). Por lo que nosotros hipotetizamos que estas proteínas podrían encontrarse en la región acrosomal de los espermatozoides humanos y cumplir funciones similares a las que cumplen en otros modelos celulares. Para esto, empleamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta (ver *Materiales y Métodos*), que sirve para detectar la presencia de proteínas en estructuras celulares. De esta forma, pudimos corroborar la presencia de las tres proteínas en la región acrosomal del espermatozoide, como se observa en la Figura 30. La localización de las proteínas sería congruente con su función en la RA,

además de ser un resultado novedoso, ya que no habían sido descritas con anterioridad en el espermatozoide humano. En cada experimento se fijaron 50000 células aproximadamente y se incubaron con los anticuerpos específicos anti-CSP (Figura 30A)\*, anti- Hsc70 (Figura 30B) y anti-SGTA (Figura 30C). Se utilizó como control, células incubadas solo con el anticuerpo secundario anti-rabbitCy3 para las células incubadas previamente con los anticuerpos primarios (anti-CSP, anti-Hsc70 y anti-SGT) para comprobar la especificidad del anticuerpo primario.

Luego fueron observadas al microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron procesadas con Image J (software libre del N.I.H.).



\* Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al., 2023*.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>



**Figura 30: Localización de  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en la región acrosomal de los espermatozoides humanos.**

En todos los experimentos, los espermatozoides capacitados fueron pegados a cubreobjetos con polilisina, fijados con PAF 2% y luego neutralizados con glicina 100 mM pH 7.4. Luego de la permeabilización con tritón X-100 0,1%, los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 5% y luego las células fueron incubadas con el anticuerpo primario específico. **(A):** Las células tratadas fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-CSP. **(B):** Las células tratadas fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-Hsc70. **(C):** Las células tratadas fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-SGTA. En los tres experimentos se realizó una triple tinción con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Cy3 (paneles rojos), la lectina PSA-FITC (tiñe la matriz acrosomal, paneles verdes) y el colorante Hoechst 33342 (tiñe los núcleos celulares, paneles azules). Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones. (Barras = 5  $\mu$ m).

**Objetivo específico 2:** *Establecer la función de las proteínas y chaperonas moleculares que participan en el ensamblado de los complejos SNAREs en espermatozoides humanos.*

### **2.1. Las proteínas $\beta$ CSP y Hsc70 son requeridas para la RA**

Una vez que verificamos la presencia y localización de las proteínas en el espermatozoide, nos propusimos investigar si estaban involucradas con la exocitosis del acrosoma. Un punto interesante que tuvimos en cuenta, fue que desde la condensación de los cromosomas, que ocurre en las espermátidas, muchas investigaciones proponen que la transcripción y

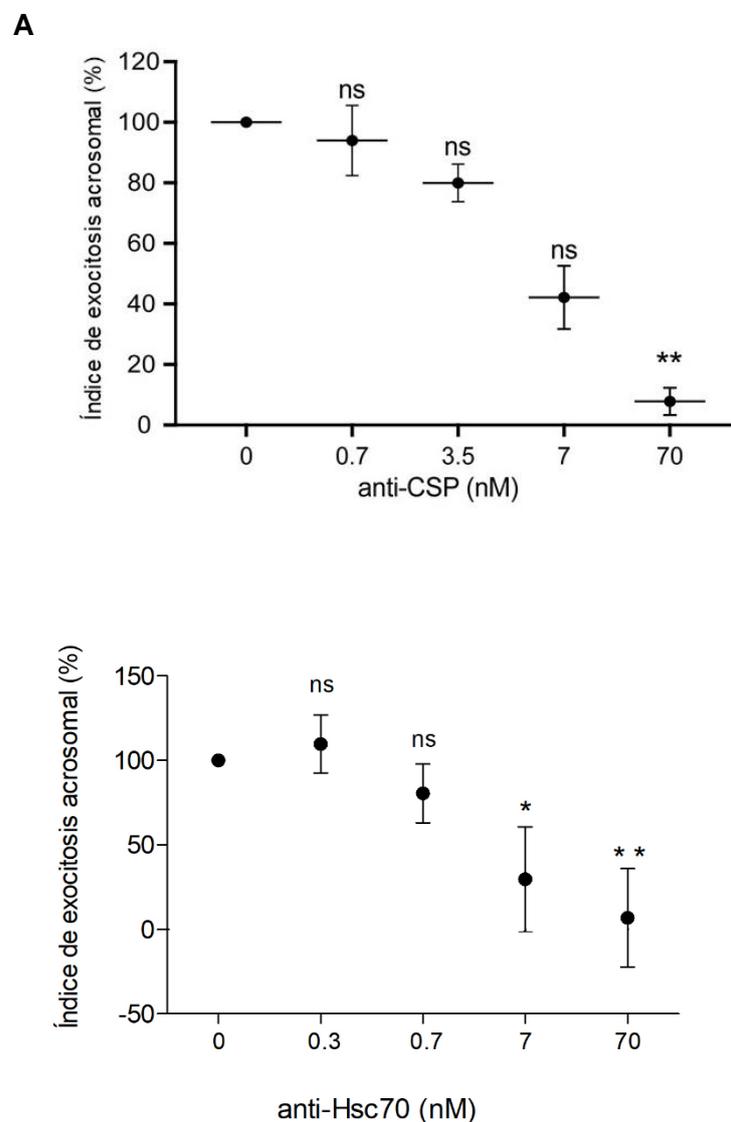
traducción de proteínas se termina gradualmente con la compactación de la estructura cromosómica en el espermatozoide maduro (Ren *et al.*, 2017), lo que impide realizar experimentos de sobreexpresión o silenciamiento para investigar el papel de proteínas en la exocitosis. Por lo que, para estudiar el rol de las proteínas, debíamos incorporar a las células anticuerpos, proteínas recombinantes, inhibidores o estimulantes de la RA, lo que también se dificultó ya que estos reactivos no podían atravesar la membrana plasmática. Para resolver esto, utilizamos la técnica de permeabilización controlada de la membrana celular con la toxina estreptolisina O (SLO), que ha sido utilizada con éxito anteriormente en nuestro laboratorio (Yunes *et al.*, 2000) y en otros (Ackermann *et al.*, 2008). De esta forma se pueden introducir factores exógenos al citosol de las células a través de los poros que realiza la SLO. La RA en espermatozoides permeabilizados es morfológicamente indistinguible de la que sucede en células sin permeabilizar. El protocolo de permeabilización con SLO consiste en incubar los espermatozoides con la toxina en hielo por 15 minutos (lo que favorece la unión de la SLO al colesterol de las membranas). Luego se elimina el exceso no unido por lavados y se colocan las células en el buffer HB-EGTA adicionado con DTT, donde la concentración de calcio libre es despreciable (ver *Materiales y Métodos*) y son incubadas a 37 °C por 10 minutos para permitir que la enzima oligomerice y forme poros en la membrana plasmática. Finalizado este tiempo los espermatozoides se incubaron con proteínas, anticuerpos, entre otros, para evaluar los efectos de estos sobre la RA.

Primero decidimos investigar si la proteína  $\beta$ CSP participaba en la RA inducida por calcio en espermatozoides permeabilizados con SLO. Para esto, incubamos las células permeabilizadas con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-CSP (0.7 nM, 3.5 nM, 7 nM y 70 nM) a 37 °C por 15 minutos. Luego adicionamos calcio al medio, incubamos por 15 minutos más a 37 °C y posteriormente determinamos el efecto del anticuerpo en la RA (Figura 31A). La RA se evalúa por microscopía de fluorescencia al determinar la presencia del acrosoma con la lectina PSA-FITC (que une residuos de manosa presentes en la matriz acrosomal). Se contaron como mínimo 200 células y se calculó el índice de reacción acrosomal o exocitosis acrosomal relativa como se describió en *Materiales y Métodos*. Como podemos observar en la Figura 31A\*, se inhibe la RA disparada por calcio de manera concentración dependiente. El anticuerpo anti-CSP, que reconoce y secuestra la proteína endógena, inhibió la RA completamente a una concentración de 70 nM. Por lo tanto, se seleccionó esta concentración para los posteriores experimentos. Estos resultados nos indicaron que la proteína  $\beta$ CSP es requerida para la liberación del acrosoma cuando los espermatozoides son estimulados con calcio. A continuación, realizamos el mismo ensayo

---

\* Datos publicados recientemente en Flores-Montero *et al.*, 2023.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>

para investigar el rol de Hsc70 en espermatozoides humanos. Incubamos las células permeabilizadas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-Hsc70 (0.3 nM, 0.7 nM, 7 nM y 70 nM) a 37 °C por 15 minutos. Luego adicionamos calcio al medio, incubamos por 15 minutos más a 37 °C y determinamos el efecto del anticuerpo en la RA (Figura 31B). Como se observa en la imagen la RA disminuye a medida que aumenta la concentración del anticuerpo anti-Hsc70, ya que secuestra a la proteína endógena impidiendo que cumpla su rol y demostrando que es necesaria para la liberación del acrosoma. En este experimento determinamos que a una concentración de 70 nM del anticuerpo anti-Hsc70 la RA se inhibe completamente, lo que nos llevó a elegir esta concentración para futuros experimentos.

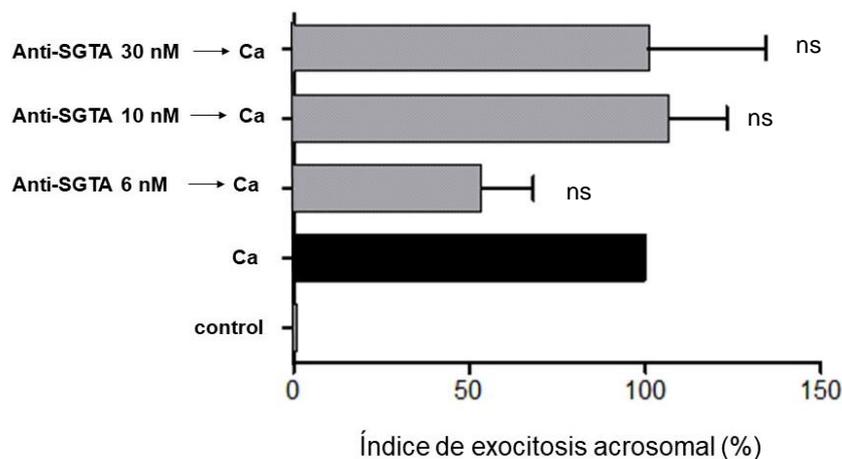


**Figura 31:  $\beta$ CSP y Hsc70 participan en la RA de espermatozoides humanos.** Los espermatozoides humanos permeabilizados con SLO se trataron por 15 min a 37 °C con concentraciones crecientes de los anticuerpos específicos. La RA se inició subsecuentemente con la adición de 0,5 mM de calcio y se incubó por 15 min a 37

°C. La exocitosis se evaluó por microscopía de fluorescencia con lectina PSA-FITC y los datos se normalizaron como se describe en *Materiales y Métodos*. **(A)**: Los espermatozoides fueron incubados con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-CSP. **(B)**: Los espermatozoides fueron incubados en concentraciones crecientes del anticuerpo anti-Hsc70. Los resultados graficados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos.

## 2.2. La proteína SGTA podría no participar en la RA de los espermatozoides humanos

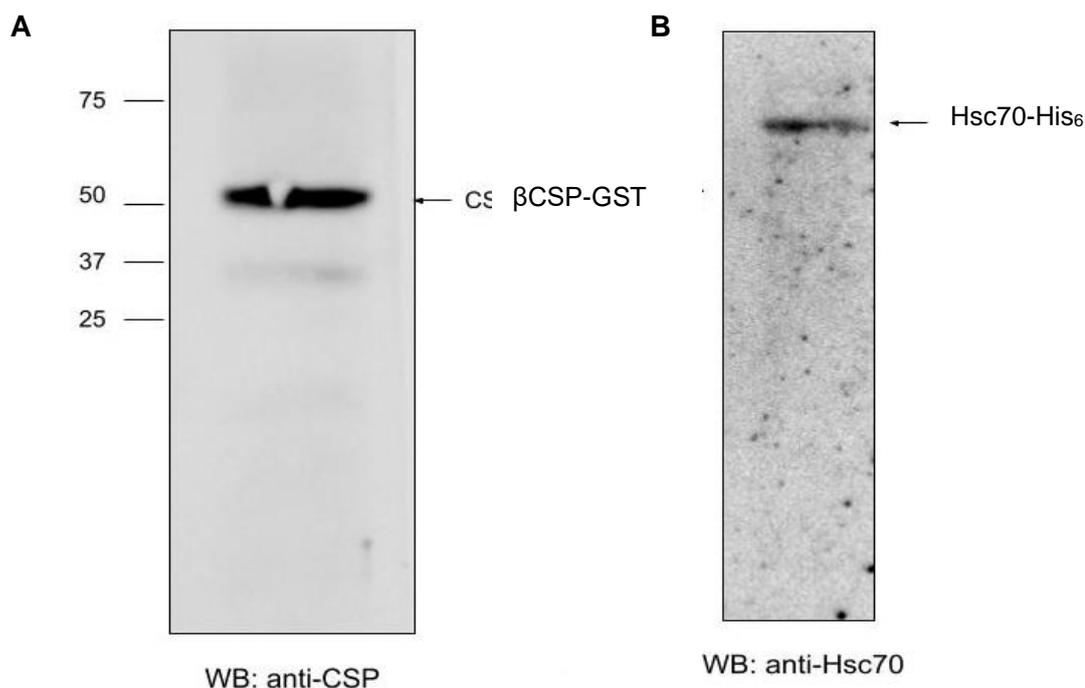
Una vez que confirmamos la participación de  $\beta$ CSP y Hsc70 en la RA, nos propusimos investigar si la proteína SGTA también estaba involucrada en la exocitosis del acrosoma. En diversas investigaciones se ha reportado la formación de un complejo trimérico que auxilia a las proteínas SNARE en la fusión de membranas (Sharma et al. 2011), por lo que nosotros supusimos que, si las tres proteínas estaban presentes en la región acrosomal del espermatozoide, las tres estaban relacionadas con la RA. Para corroborar esto, realizamos los mismos ensayos funcionales que con las otras dos proteínas. En esta oportunidad, los espermatozoides permeabilizados fueron incubados por 15 minutos a 37 °C con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-SGTA (6 nM, 10 nM y 30 nM) que reconoce y secuestra la proteína endógena. Luego fueron estimulados con calcio, incubando 15 minutos a 37 °C. Como podemos observar en la Figura 32, el secuestro de la proteína endógena con el anticuerpo anti-SGTA no impide que la RA se lleve a cabo, por lo que podemos sugerir que esta proteína no interviene de forma directa en la exocitosis del acrosoma.



**Figura 32: La proteína SGTA no participa en la RA de espermatozoides humanos.** Los espermatozoides humanos permeabilizados con SLO se trataron por 15 min a 37 °C con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-SGTA. La RA se inició subsecuentemente con la adición de 0,5 mM de calcio y se incubó por 15 min a 37 °C. La exocitosis se evaluó por microscopía de fluorescencia con lectina PSA-FITC y los datos se normalizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados graficados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos.

### **2.3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes $\beta$ CSP y Hsc70**

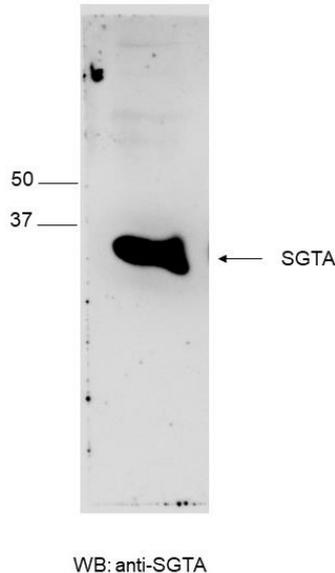
Para continuar con el estudio de las proteínas y su rol en el espermatozoide, procedimos a producirlas de forma recombinante. En el caso de CSP, pudimos obtener el plásmido que codifica específicamente a la isoforma  $\beta$ , por lo que transformamos cepas de *E. coli* para producir la proteína unida a un *tag* de GST. Para comprobar su expresión, corrimos en un gel de poliacrilamida al 10% la proteína recombinante GST- $\beta$ CSP purificada y luego la analizamos por WB. Como podemos ver en la Figura 33A, observamos una única banda aproximadamente a la altura de 50 kDa ( $\beta$ CSP + *tag* GST= 49 kDa), corroborando que la proteína fue obtenida en una alta concentración y pureza, demostrando que el diseño fue exitoso. Además, de esta manera demostramos que el anticuerpo anti-CSP usado hasta el momento, reconoce la isoforma  $\beta$  de CSP. De igual forma produjimos la proteína recombinante Hsc70 unida a un *tag* de His<sub>6</sub> y luego corrimos la proteína purificada en un gel de poliacrilamida al 10% y se analizó con un WB anti-Hsc70 (Figura 33B). Como se puede ver obtuvimos una banda a la altura esperada y demostramos que el anticuerpo reconoce a la proteína recombinante. Para más detalles acerca de la producción de las proteínas ver la sección de *Materiales y Métodos*.



**Figura 33: Producción exitosa de las proteínas recombinantes βCSP-GST y Hsc70-His6.** Las proteínas recombinantes se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron por WB con los anticuerpos anti-CSP (**A**) y anti-Hsc70 (**B**) como se describe en Materiales y Métodos. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

Cuando nos propusimos producir de forma recombinante la proteína SGTA, nos encontramos con un gran desafío. Después de probar las condiciones de inducción y purificación que nos recomendaba el *paper* original donde había sido producida unida a un tag de GST (Tang et al. 2006) y no obtener buenos resultados, modificamos las condiciones de inducción y purificación. Después de probar varias condiciones de inducción (1 mM isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido (IPTG) 37 °C por 3 horas, 0.2 mM IPTG 22 °C por toda la noche y 1 mM IPTG 30 °C por 5 horas) logramos inducir con éxito su producción, pero no así su purificación. Como bien comentamos en la Sección de *Materiales y Métodos* obtuvimos el plásmido que codifica la proteína SGTA humana en el vector pET28a y logramos inducir su producción con 1 mM IPTG por 5 horas a 30 °C. Luego de la inducción los pellets obtenidos de 100 ml de cultivo se resuspendieron en 1,5 mL de buffer de lisis (20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 10 mM imidazol y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714)). Los lisados se sonicaron 2 veces 15 segundos a 20 Hertz, posteriormente se agregó Tritón X-100 1% y se sonicó una vez más durante 15 segundos a 20 Hertz. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó por 1 hora con la

resina de Ni-NTA a 4°C (se utilizaron 2 ml de resina por cada 100 ml de lisado clarificado). La proteína unida a la resina se lavó tres veces con buffer de lavado (20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoetanol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATP, 20 mM imidazol, 5% glicerol). Finalmente, la elución se realizó con buffer de elución (20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM β-mercaptoetanol y 250 mM imidazol) en alícuotas de 100 μl. Como esta elución fue infructuosa, cambiamos las condiciones llevando el pH de los buffers de lavado y de elución a 7.4 y realizando todo el procedimiento a temperatura ambiente pero tampoco tuvimos buenos resultados. Después, intentamos mantener el pH de los buffers de lavado y de elución en 8 y realizando todo el procedimiento a temperatura ambiente, pero tampoco logramos obtener la proteína purificada. Actualmente, seguimos trabajando en la puesta a punto de las condiciones de elución de la proteína SGTA, para poder utilizarla en experimentos para una pronta publicación. En la Figura 34 podemos ver un WB anti-SGTA, que se realizó al lisado bacteriano obtenido. Observamos una única banda clara a la altura de los 34 kDa, lo que nos confirmaría que las condiciones de inducción de la proteína son las correctas. Para corroborar que el anticuerpo esté reconociendo a la proteína SGTA recombinante, incubamos la membrana con el anticuerpo anti-His<sub>6</sub> y observamos también la presencia de una banda a la misma altura (datos no mostrados).



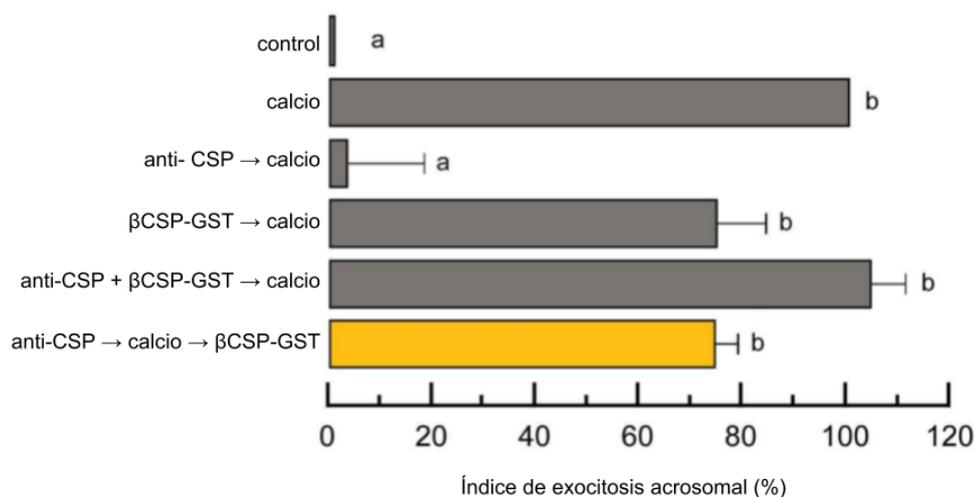
**Figura 34: Presencia de la proteína SGTA en lisados bacterianos transformados con el plásmido codificante.** Se transformaron bacterias *E. coli* y luego se las indujo con 1 mM de IPTG por 5 horas a 37 °C. El lisado bacteriano fue incubado durante 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugado a 20000 x g por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y sembró en un gel de poliacrilamida al 15% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló por WB con el anticuerpo anti-SGTA. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

#### **2.4. La proteína $\beta$ CSP recombinante rescata la inhibición de la RA provocada por el secuestro de la proteína $\beta$ CSP endógena**

Una vez purificadas las proteínas recombinantes se realizaron diversos ensayos. Como mostramos en la Figura 31A, cuando tratamos los espermatozoides permeabilizados con anti-CSP y luego estimulamos la RA con calcio (también Figura 35: anti-CSP  $\rightarrow$  calcio), se inhibe la exocitosis del acrosoma. Ante este resultado, evaluamos la RA, tratando a los espermatozoides permeabilizados con 70 nM del anticuerpo anti-CSP, estimulando la exocitosis del acrosoma con calcio y añadiendo 140 nM de  $\beta$ CSP recombinante no palmitoilada. Curiosamente, la adición de la  $\beta$ CSP exógena revirtió el bloqueo impuesto por el anticuerpo (Figura 35\*, anti-CSP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$   $\beta$ CSP-GST). Para verificar la especificidad de estos resultados, bloqueamos los sitios del anticuerpo con  $\beta$ CSP recombinante antes de agregarlo a los espermatozoides permeabilizados. En esta secuencia (Figura 35, anti CSP+ CSP $\beta$   $\rightarrow$  calcio) no observamos inhibición de la exocitosis. Además, cuando los espermatozoides permeabilizados fueron incubados con la proteína  $\beta$ CSP-GST (70 nM) por 15 minutos a 37 °C y luego se estimuló la reacción acrosomal con la adición de calcio por 15 minutos a 37°C ( $\beta$ CSP-GST  $\rightarrow$  calcio) no se inhibió la RA. Nosotros hipotetizamos que, al ingresar la proteína recombinante al espermatozoide, compite en la unión de sus sustratos con la proteína endógena. Para revertir la inhibición causada por el anticuerpo anti-CSP (70 nM), agregamos 140 nM de  $\beta$ CSP-GST, el doble de la concentración del anticuerpo que sabemos que al secuestrar la CSP endógena inhibe la RA. Por lo que consideramos que al agregar en mayor concentración la proteína recombinante, está sería la que tenga mayor probabilidad de unirse a sus proteínas *partner*, como la Hsc70. Otro dato para tener en cuenta es que la proteína  $\beta$ CSP recombinante no tiene las modificaciones postraduccionales que la caracterizan, la palmitoilación ya que es producida en bacterias y éstas carecen de las enzimas necesarias para este proceso. Esto nos hace pensar, que cuando el espermatozoide permeabilizado es estimulado con calcio, la proteína  $\beta$ CSP recombinante estaría uniéndose a la proteína Hsc70, formando complejos no funcionales ya que  $\beta$ CSP no estaría palmitoilada y esto podría causar una errónea localización en las membranas y por ende inhibir la exocitosis de acrosoma.

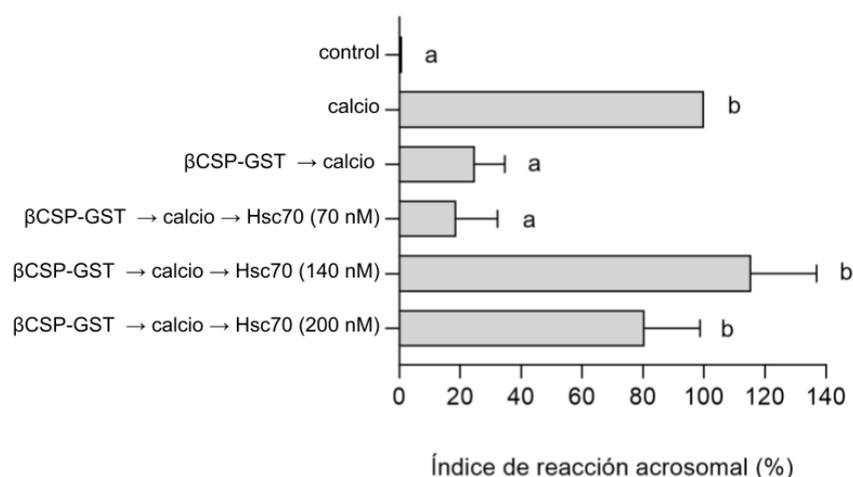
Una de las herramientas desarrollada en nuestro laboratorio es la de los “*pares reversibles*”. Esta herramienta, nos ayuda a investigar con más profundidad las vías de señalización de la RA, en nuestro modelo de espermatozoides permeabilizados y nos confiere la capacidad de detener de forma reversible la exocitosis desencadenada por calcio en etapas específicas con un reactivo al que llamaremos “inhibidor 1”. Posteriormente podemos sondear el sistema con un segundo inhibidor (“inhibidor X”) y finalmente rescatar el bloqueo inicial con reactivos

que revierten el efecto del inhibidor 1 (“rescate del inhibidor 1”). Esta estrategia, de añadir un inhibidor 1 → calcio → inhibidor X → rescate del inhibidor 1, en esta secuencia nos permite mapear el punto en la que el inhibidor X opera en relación con el inhibidor 1 (Ruete et al. 2014). Si analizamos nuevamente la Figura 35 (anti-CSP → calcio → βCSP-GST), podemos ver que es una secuencia con pares reversibles. En este ensayo funcional donde inhibimos la función de la proteína βCSP endógena con el agregado del anticuerpo anti-CSP (inhibidor 1) a los espermatozoides permeabilizados, por 15 minutos a 37 °C y luego los estimulamos con calcio por 15 minutos a 37 °C. Finalmente agregamos la proteína βCSP recombinante (rescate del inhibidor 1) y cómo podemos ver en la Figura 35 (anti-CSP → Ca → βCSP-GST) procedió la reacción acrosomal normalmente. Además de generar una herramienta para futuros ensayos y confirmar la importancia de la participación de βCSP en la RA, estos resultados nos indican que CSP exógena competiría con la proteína endógena por la unión al anticuerpo y de esta forma CSP endógena se liberaría, restaurando su funcionalidad



**Figura 35: βCSP recombinante compite por los sitios de unión del anticuerpo anti-CSP, liberando la proteína CSP endógena.** Los espermatozoides permeabilizados con SLO se incubaron primero con 70 nM de anti-CSP (10,5 µg/ml) durante 15 min a 37 °C y luego se estimularon con 0,5 mM de calcio durante otros 15 min a 37 °C. Finalmente, se incubaron con 140 nM de GST-βCSP no palmitoilada recombinante para rescatar la exocitosis durante 15 min a 37 °C (barra amarilla, anti-CSP → calcio → βCSP). Los controles (barras grises) incluyeron espermatozoides permeabilizados sin estímulo (control), con 0,5 mM de calcio (calcio), con 70 nM del anticuerpo anti-CSP y luego el estímulo de calcio, como control de inhibición de la exocitosis (anti-CSP → calcio), con 70 nM de la proteína βCSP recombinante no palmitoilada y luego el estímulo de calcio (CSPβ → calcio) y 70 nM del anticuerpo anti-CSP pretratados con 140 nM de βCSP-GST (anti-CSP + CSPβ → calcio). En todas las condiciones, se evaluó la exocitosis acrosomal utilizando FITC-PSA. Los datos se normalizaron como se indica en *Sección de Materiales y Métodos*. Los datos representados representan la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Letras diferentes muestran diferencias significativas (P < 0,01).

Posteriormente, quisimos indagar con más profundidad acerca del resultado que habíamos obtenido cuando agregábamos a los espermatozoides permeabilizados la proteína  $\beta$ CSP-GST. Nosotros, explicamos la inhibición de la RA en este ensayo, sugiriendo que la proteína recombinante forma complejos no funcionales con Hsc70, ya que la proteína  $\beta$ CSP-GST no está palmitoilada y esto podría producir una localización errónea del complejo en el momento que es necesario. Para poder corroborar la idea de que la proteína  $\beta$ CSP-GST se une con Hsc70 cuando los espermatozoides permeabilizados son estimulados con calcio, ideamos el siguiente ensayo funcional, donde agregamos a los espermatozoides la proteína recombinante Hsc70-His<sub>6</sub> en concentraciones crecientes. Los espermatozoides permeabilizados fueron incubados con 140 nM de  $\beta$ CSP-GST por 15 minutos a 37 °C y luego estimulados con calcio por 15 minutos a 37 °C. Finalmente se los incubó con diferentes concentraciones de Hsc70-His<sub>6</sub> por 15 minutos a 37 °C. Como podemos observar en la Figura 36, cuando se alcanza una concentración de 140 nM de la proteína recombinante Hsc70-His<sub>6</sub> la RA ocurre con normalidad. Esta concentración (140 nM) duplica la concentración del anticuerpo anti-Hsc70 (70 nM) que habíamos determinado que inhibía la RA. Nosotros proponemos, que la proteína  $\beta$ CSP-GST ingresa a los espermatozoides, se une a Hsc70 formando complejos no funcionales, pero cuando se produce un aumento en la concentración de Hsc70 (gracias al ingreso de la proteína Hsc70 recombinante) se desplazaría el equilibrio químico, formando complejos funcionales entre la proteína  $\beta$ CSP endógena y Hsc70 recombinante o formando complejos no funcionales entre la proteína  $\beta$ CSP-GST y Hsc70 recombinante, dejando a Hsc70 endógena libre para poder formar complejos con  $\beta$ CSP endógena y de esta forma recuperar la RA.

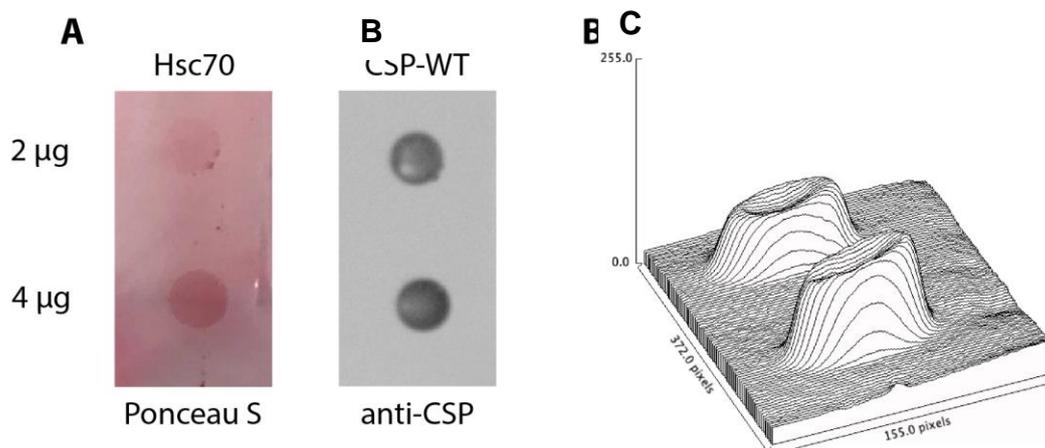


**Figura 36: El agregado de Hsc70 recombinante recupera la inhibición de la RA causada por la proteína  $\beta$ CSP-GST.** Espermatozoides permeabilizados se trataron por 15 min a 37 °C en presencia de 140 nM de la proteína  $\beta$ CSP-GST y luego se estimuló la RA con el agregado de calcio por 15 minutos a 37 °C ( $\beta$ CSP-GST  $\rightarrow$

calcio). Finalmente, se les agregó la proteína Hsc70 recombinante en concentraciones crecientes y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Podemos observar que con el agregado de 140 nM de Hsc70 recombinante ( $\beta$ CSP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$  Hsc70 (140 nM)), se recupera la inhibición de la RA ocasionada por  $\beta$ CSP recombinante ( $\beta$ CSP-GST  $\rightarrow$  calcio). Los espermatozoides se tiñeron y se contaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## **2.5. La proteína $\beta$ CSP-GST forma un complejo con Hsc70-His<sub>6</sub>**

Numerosas investigaciones han reportado que las proteínas  $\alpha$ CSP, Hsc70 y SGTA forman un complejo trimérico. Se demostró que la proteína  $\alpha$ CSP interactuaba con la proteína Hsc70 estimulando fuertemente su actividad ATPasa, uniéndose ambas proteínas a través del dominio J de CSP (Stahl et al. 1999). También, se observó que mutaciones en el motivo HPD de la proteína CSP, específicamente en los residuos de histidina (H43Q) o ácido aspártico (D45A), redujeron la capacidad de CSP para estimular la actividad ATPasa de Hsc70 en mamíferos (Chamberlain and Burgoyne 1997). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados previos que habíamos obtenido, donde podíamos hipotetizar que la proteína  $\beta$ CSP recombinante estaría uniéndose a la proteína Hsc70, quisimos indagar a través de un ensayo de Dot Blot si estas proteínas estaban interactuando. Para esto, fijamos en una membrana de nitrocelulosa diferentes concentraciones de la proteína Hsc70 (2  $\mu$ g y 4  $\mu$ g) y luego la incubamos con la proteína  $\beta$ CSP recombinante (para más detalles ver la *Sección de Materiales y Métodos*). En la Figura 37A, vemos la membrana teñida con Rojo Ponceau S, como control de carga de la proteína Hsc70 en diferentes concentraciones. En la Figura 37B, podemos observar la señal obtenida luego de revelar la membrana que se incubó con el anticuerpo anti-CSP, que revela la interacción entre las proteínas, demostrando una mayor interacción en el pocillo con más carga inicial de proteína Hsc70 recombinante. En la Figura 37C, se grafica claramente el grado de interacción que existe entre las proteínas recombinantes y cómo podemos ver, se produce una importante interacción entre la proteína Hsc70-His<sub>6</sub> y la  $\beta$ CSP-WT que depende de la concentración de las proteínas. Este resultado apoya nuestra hipótesis de que las proteínas recombinantes podrían estar formando complejos en el espermatozoide, que también son dependientes de la concentración de proteínas que ingrese en él.

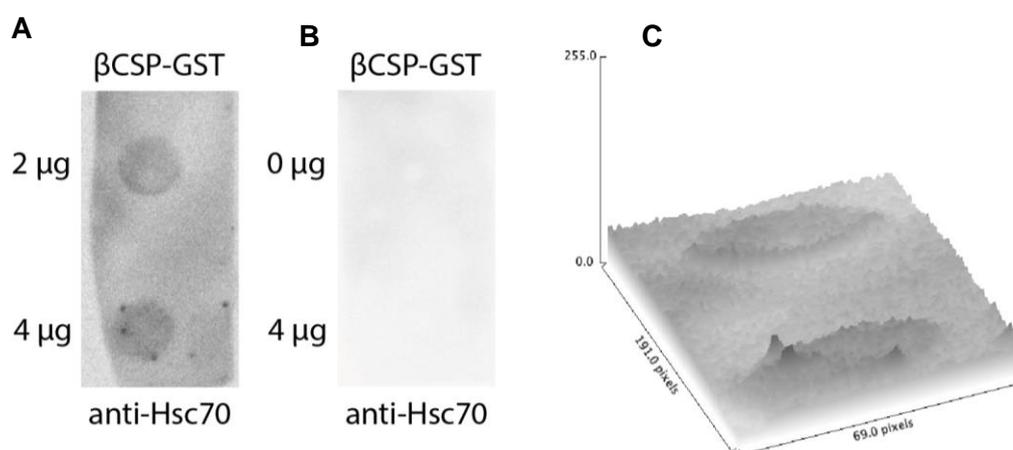


**Figura 37: Las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 recombinantes forman un complejo.** Para determinar la unión de las proteínas  $\beta$ CSP-GST y Hsc70-His<sub>6</sub> realizamos un ensayo de Dot Blot donde sembramos diferentes concentraciones (2  $\mu$ g y 4  $\mu$ g) de la proteína Hsc70 recombinante en una membrana de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu$ m. **A:** Se tiñó la membrana con rojo Ponceau S como control de sembrado de la proteína Hsc70. **B:** Se dejó secar por 10 minutos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche al 3% en TBS-T), posteriormente se procedió a incubarla con la proteína  $\beta$ CSP-GST WT. La proteína recombinante  $\beta$ CSP-WT (1  $\mu$ g por pocillo) se diluyó en Buffer overlay (TBS-T 1%, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM ATP) y se incubó por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se lavó 2 veces con 2 ml de TBS-T por 5 minutos y se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-GST (0,007  $\mu$ g/mL). Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T por 5 minutos y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo conjugado con HRP (0,1  $\mu$ g/ml en solución de lavado). Se realizaron 3 lavados nuevamente con TBS-T a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a detectar las proteínas con el sistema de quimioluminiscencia (Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) usando Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). **C:** Esquema donde se grafica la intensidad de la interacción en píxeles que tienen las proteínas CSPs recombinantes con Hsc70.

## **2.6. La proteína $\beta$ CSP-GST interactúa con la proteína Hsc70 endógena proveniente de espermatozoides humanos**

Los resultados que habíamos obtenido hasta este momento nos confirmaban la interacción entre la isoforma  $\beta$  de CSP y la proteína Hsc70, ambas recombinantes. Estos resultados estaban en correlación con los reportados por otros investigadores, como Braun (Braun et al. 1996) o Tobaben (Tobaben et al. 2001), que postulaban que la isoforma  $\alpha$  de CSP formaba complejos con Hsc70. Este novedoso resultado, daba fuerza a nuestra hipótesis de que la

proteína  $\beta$ CSP forma complejos con la proteína Hsc70, cuando eran incorporadas al espermatozoide humano. Para avanzar un poco en la investigación de la interacción de estas proteínas, decidimos realizar un ensayo de Dot blot donde fijamos en la membrana de nitrocelulosa diferentes concentraciones de la proteína  $\beta$ CSP-GST (2  $\mu$ g y 4  $\mu$ g) y luego la incubamos durante 1 hora 30 minutos con 500  $\mu$ L de un lisado de espermatozoides de 150 millones de células (para más detalles ver la *Sección de Materiales y Métodos*). A continuación, se realizaron los lavados correspondientes, se bloqueó con leche al 3% y se dejó la membrana incubando toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-Hsc70. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo y se reveló. En la Figura 38A, podemos ver la presencia de la proteína Hsc70 en la membrana, lo que nos estaría indicando que la proteína Hsc70 endógena, presente en el lisado de espermatozoides interactuó con la proteína  $\beta$ CSP recombinante fijada en la membrana. Este resultado, apoya nuestra hipótesis de que las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 endógena forman un complejo y es la primera vez que se informa sobre la interacción de estas proteínas en el espermatozoide humano. Como controles (Figura 38B) se sembró en un pocillo 4  $\mu$ g de proteína  $\beta$ CSP-GST y en otro 0  $\mu$ g (la membrana se mantuvo húmeda con buffer TBS). Esta membrana se incubó por 1 hora 30 minutos con buffer de lisis y se continuó de la misma manera que la condición experimental. Cuando se reveló la membrana, no observamos la presencia de Hsc70, lo que nos corrobora la especificidad de la interacción entre las proteínas. En la Figura 38C se grafica la intensidad de interacción de las proteínas  $\beta$ CSP-GST y Hsc70 endógena.



**Figura 38: La proteína  $\beta$ CSP-GST forma complejos con la proteína Hsc70 proveniente de espermatozoides humanos.** Para determinar la unión de las proteínas  $\beta$ CSP-GST y Hsc70 endógena realizamos un ensayo de Dot Blot donde sembramos diferentes concentraciones (2  $\mu$ g y 4  $\mu$ g) de la proteína  $\beta$ CSP recombinante en una

membrana de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . **A:** Luego de la fijación de las proteínas recombinantes en la membrana, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche al 3% en TBS-T), posteriormente se procedió a incubarla con un lisado de extracto de espermatozoides de 150 millones de células por 1 hora 30 minutos. El buffer de lisis que se utilizó para extraer las proteínas de los espermatozoides contenía 20 mM TrisHCl pH: 7.4, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1 mM ADP, 20 mM NaCl, 0.5% Igepal y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714). Finalizado el tiempo de incubación, se lavó 2 veces con 2 ml de TBS-T por 5 minutos y se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti- Hsc70 (0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T por 5 minutos y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo conjugado con HRP (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en solución de lavado). Se realizaron 3 lavados nuevamente con TBS-T a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a detectar las proteínas con el sistema de quimioluminiscencia (Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) usando Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). **B:** Controles, se sembró en la membrana 0  $\mu\text{g}$  y 4  $\mu\text{g}$  de  $\beta\text{CSP-GST}$  y se procedió de la misma manera que con la membrana experimental **C:** Esquema donde se grafica la intensidad de la interacción en píxeles entre la proteína  $\beta\text{CSP}$  recombinantes y la Hsc70 proveniente de espermatozoides humanos.

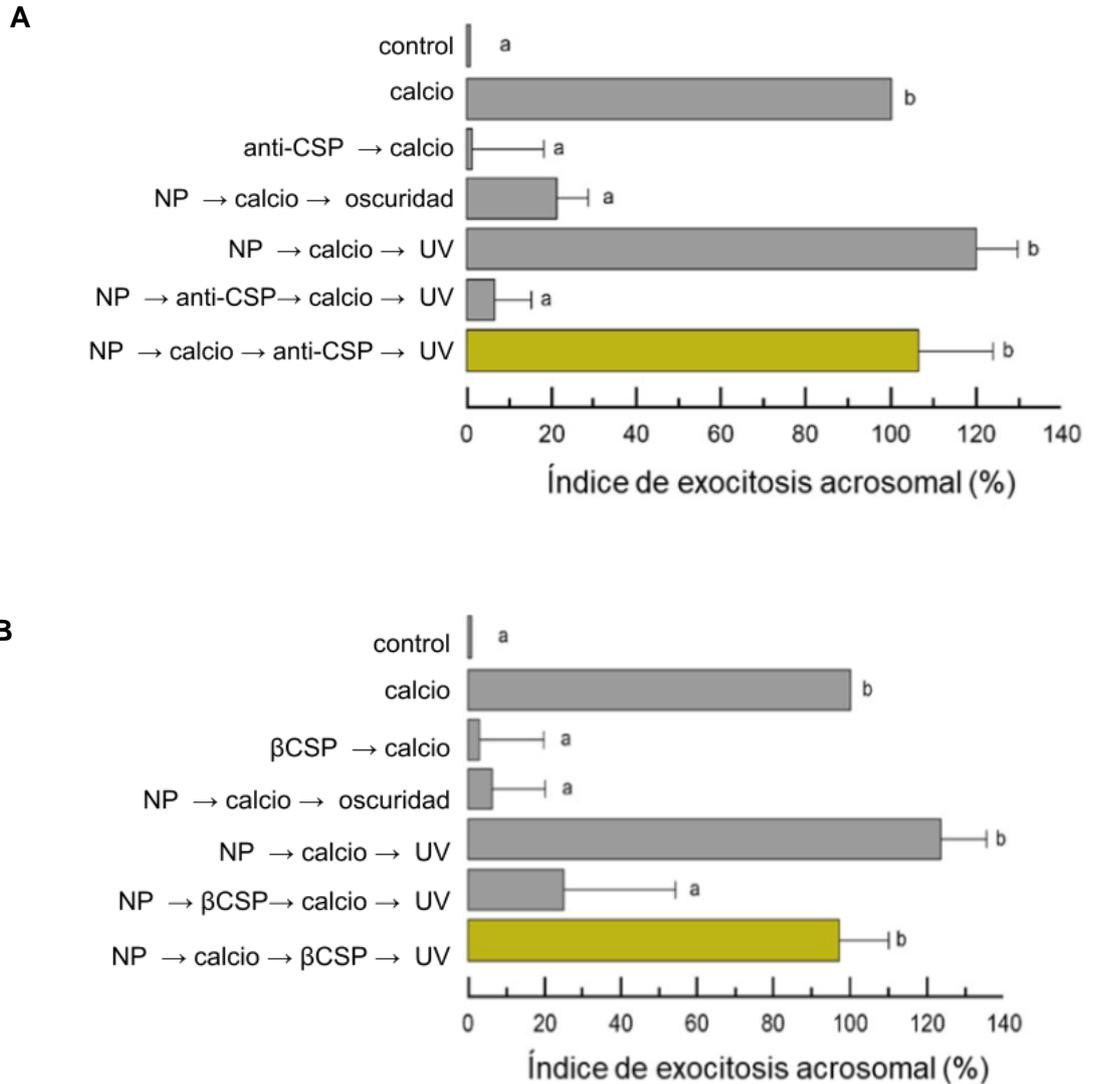
## ***2.7. Localización de la acción de $\beta\text{CSP}$ endógena y recombinante en la cascada de señalización.***

Como ya explicamos en la *Sección de Antecedentes*, la vía de señalización que conduce a la liberación del acrosoma tiene un punto de bifurcación cuando actúa Epac. Se propuso que antes de la activación de Epac por cAMP hay una secuencia lineal de reacciones, pero aguas abajo de cAMP/Epac la vía se divide en dos. Una ruta, donde actúan los principales efectores de la maquinaria de fusión, como Rab3A, PTP1B,  $\alpha$ -SNAP/NSF y las SNARE. Y la otra ruta, denominada rama de movilización de calcio, contiene Rap1 y una fosfolipasa C, donde su propósito final es movilizar el calcio intracelular desde el acrosoma hacia el citoplasma (Ruete et al. 2014). Teniendo esto en cuenta, nuestro siguiente objetivo fue estudiar en qué etapa de la reacción acrosomal, antes o después de la salida de calcio del acrosoma,  $\beta\text{CSP}$  ejerce su función. Para esto, realizamos ensayos funcionales en espermatozoides permeabilizados, en los que se adicionó un agente quelante de calcio llamado O-nitrofenil EGTA-acetoximetil éster (NP-EGTA-AM). El NP-EGTA-AM es una molécula fotosensible que atraviesa la membrana plasmática a través de los poros generados por la permeabilización con SLO hacia el citosol y luego ingresa por difusión al acrosoma. Al ingresar al acrosoma, el grupo AM es clivado por esterasas dejando el NP-EGTA retenido en la organela. El NP-EGTA posee una alta afinidad por calcio y lo secuestra eficazmente. En oscuridad, el NP-EGTA secuestra el calcio

acrosomal inhibiendo la RA, pero al ser sometido a luz ultravioleta (UV) el NP-EGTA se destruye dando lugar a compuestos de baja afinidad por calcio, que dejan altas concentraciones de calcio libre y restauran las condiciones iniciales, permitiendo su salida del acrosoma y restaurando la exocitosis. Utilizamos esta técnica para dilucidar el momento en el que  $\beta$ CSP endógena ejerce su función y luego corroboramos los resultados utilizando la misma técnica, pero agregando la proteína  $\beta$ CSP recombinante. En espermatozoides permeabilizados y cargados con NP-EGTA, la RA no tiene lugar en tanto se mantenga la oscuridad aun estimulando las células con calcio exógeno (Figura 39\*, NP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$  oscuridad). Esto confirma que el eflujo de calcio de reservorios intracelulares es esencial para la exocitosis y no puede ser compensado con calcio extracelular. Cuando los espermatozoides son expuestos a luz UV se restaura la disponibilidad de calcio intra acrosomal y se completan todas las etapas de la RA (Figura 39, NP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$  UV). Posteriormente cargamos los espermatozoides permeabilizados con NP-EGTA y estimulamos la RA con calcio, de manera de que todas las etapas procedan hasta el punto en que se requiere la salida de calcio acrosomal. En este punto agregamos el anticuerpo anti-CSP o la proteína recombinante  $\beta$ CSP-GST. Ninguno inhibió la exocitosis acrosomal al agregarlos en esta secuencia (Figura 39A, NP  $\rightarrow$  anti-CSP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$  UV o Figura 36B, NP  $\rightarrow$   $\beta$ CSP  $\rightarrow$  calcio  $\rightarrow$  UV). Estos resultados nos indican que CSP endógena y recombinante ejercen su función antes de la salida del calcio acrosomal ya que el anticuerpo anti-CSP bloqueó la exocitosis cuando fue agregado antes, pero no después del inicio de la RA disparada por calcio (Figura 39A) y el agregado de  $\beta$ CSP-GST inhibió la RA cuando se puso en presencia de los espermatozoides antes de la iniciación de la RA por calcio y no cuando fue agregado después (Figura 39B).

---

\* Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al., 2023*.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>



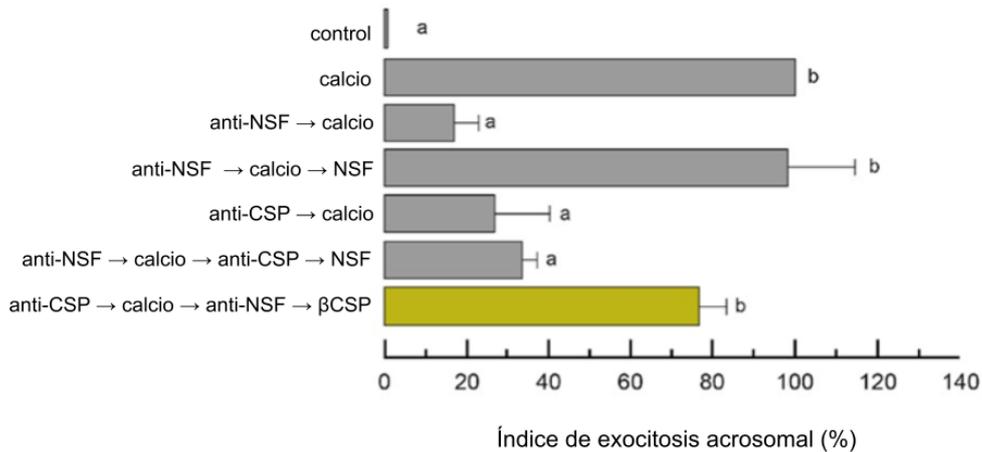
**Figura 39: CSP endógena y recombinante ejercen su función antes de la salida de calcio del acrosoma.**

Los espermatozoides permeabilizados se cargaron con 10  $\mu\text{M}$  NP-EGTA-AM (NP) durante 10 min a 37 °C para quelar el calcio intracromosomal. Luego la RA se inició con 0,5 mM calcio, por 10 min a 37 °C para permitir que la RA proceda hasta el punto en que se requiere la salida del calcio acrosomal. Las células se trataron por 10 min a 37 °C con 70 nM de anti-CSP o 140 nM de  $\beta\text{CSP}$  recombinante. Todas estas incubaciones se hicieron en oscuridad. La fotólisis del quelante con luz UV se indujo al final de las incubaciones (UV) y las muestras se incubaron por 10 min adicionales a 37 °C. Se realizaron varios controles en forma simultánea, de la RA espontánea en ausencia de estímulo (control), la RA estimulada con 0,5 mM calcio (calcio), el efecto inhibitorio del NP-EGTA-AM en oscuridad (NP → calcio → oscuridad) y la recuperación de la RA luego de iluminar con luz UV (NP → calcio → UV). El efecto de los inhibidores utilizados en el experimento se probó agregándolos antes de estimular la RA (NP → inhibidor → calcio → UV) o después de estimular la RA con calcio (NP → calcio → inhibidor → UV). En ambos experimentos, los espermatozoides se tiñeron y se contaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

Para seguir investigando en qué momento actúa  $\beta$ CSP, pero ahora en relación a la rama donde se encuentran los principales actores de la fusión de membranas, decidimos investigar si lo hacía antes o después que la proteína NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) ejerciera su función. La ATPasa NSF junto con su cofactor  $\alpha$ SNAP desensamblan los complejos SNARE que se encuentran en configuración *cis*, incompetentes para la fusión, promoviendo su paso a un estado monomérico y de esa forma que estén disponibles para el apareamiento y su ensamble en configuración *trans* (Ruete et al. 2014; Ruete et al. 2019). Basándonos en esto, nosotros hipotetizamos que el secuestro de la proteína endógena con el anticuerpo anti-NSF, mantendría a las SNARE en configuración *cis* y por lo tanto no habría RA. En estas condiciones demostramos que el proceso se podía revertir con el agregado de la proteína NSF recombinante, por lo que nuestro siguiente paso fue producir NSF unida a un tag de His<sub>6</sub> (para más detalles ver la *Sección de Materiales y Métodos*). Una vez producida con éxito la proteína, nos dispusimos a realizar los ensayos funcionales. Primero, corroboramos que el agregado del anticuerpo anti-NSF (3,3 ug/mL) a espermatozoides permeabilizados por 10 minutos a 37 °C y luego estimulados con calcio, por 10 minutos a 37 °C, inhibe la RA (Figura 40\*, anti-NSF → calcio). Luego, los espermatozoides permeabilizados fueron incubados con el anticuerpo anti-NSF por 10 minutos a 37 °C, la RA fue estimulada con 0,5 mM de calcio por 10 minutos a 37 °C y por último incubados con la proteína recombinante NSF (Figura 40, anti-NSF → calcio → NSF). Como podemos ver el sistema de par reversible funcionó con éxito, ya que se restableció la RA. Para determinar si  $\beta$ CSP ejerce su función antes o después de NSF, incubamos a los espermatozoides permeabilizados con el anticuerpo anti-CSP (70 nM) por 10 minutos a 37 °C y luego estimulamos la RA con 0,5 mM de calcio por 10 minutos a 37 °C. En este punto, de acuerdo con nuestra hipótesis, asumimos que como la chaperona  $\beta$ CSP está secuestrada por el anticuerpo, las proteínas SNARE no pueden alcanzar una configuración *trans*. A continuación, los espermatozoides se incubaron con el anticuerpo anti-NSF por 10 minutos a 37 °C, secuestrando la proteína NSF endógena y bloqueando el desensamble de las SNARE y por último los espermatozoides se incubaron con la proteína CSP recombinante (140 nM) reaccionando con normalidad (Figura 40, anti-CSP → calcio → anti-NSF →  $\beta$ CSP). Este resultado nos indica que la proteína CSP endógena ejerce su función después que NSF, ya que el bloqueo de NSF endógena tardío no inhibió la RA.

---

\* Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al., 2023*.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>



**Figura 40: CSP endógena ejerce su función después de la proteína NSF.** Los espermatozoides permeabilizados se incubaron con anti-NSF por 10 min a 37 °C, luego la RA se inició con 0,5 mM calcio por 10 min a 37 °C para permitir que la RA proceda hasta el punto en que se haya bloqueado intencionalmente, posteriormente las células se trataron por 10 min a 37 °C con 70 nM de anti-CSP y finalmente con NSF recombinante por 10 minutos a 37 °C (anti-NSF → calcio → anti-CSP → NSF). En otra de las condiciones los espermatozoides permeabilizados se incubaron con anti-CSP por 10 min a 37 °C, luego estimulados con 0,5 mM calcio por 10 min a 37 °C, incubados con anti-NSF por 10 min a 37 °C y finalmente con 140 nM de CSP recombinante durante 10 minutos a 37 °C (anti-CSP → calcio → anti-NSF → CSP). Se realizaron varios controles en forma simultánea, de la RA espontánea en ausencia de estímulo (control), la RA estimulada con 0,5 mM calcio (calcio), el efecto inhibitorio del anticuerpo anti-NSF (anti-NSF → calcio), la recuperación de la RA a través del par reversible (anti-NSF → calcio → NSF) y el efecto inhibitorio del anticuerpo anti-CSP (anti-CSP → calcio). En todos los experimentos, los espermatozoides se tiñeron y se contaron como se describe en Materiales y Métodos. Los datos mostrados representan el promedio ± SEM de al menos tres experimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

**Objetivo específico 3:** *Establecer los cambios en la configuración de los complejos SNARE bloqueando la acción de las proteínas/chaperonas.*

Hasta el momento, los resultados que habíamos obtenido eran muy prometedores, ya que gracias a la utilización del reactivo NP-EGTA-AM, pudimos determinar que la proteína βCSP ejercía su rol antes de la salida de calcio del acrosoma y gracias a la aplicación del par reversible anti-NSF/NSF concluimos que βCSP ejercía su función después de la proteína NSF, lo que ponía en el contexto indicado a nuestra proteína para el rol que habíamos hipotetizado. Nuestro siguiente paso fue determinar si βCSP estaba involucrada en los cambios conformacionales que sufren las proteínas SNARE, para llevar a cabo el

acercamiento de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y que ocurra finalmente la exocitosis del acrosoma.

### **3.1 La proteína $\beta$ CSP es necesaria para el ensamble de las SNARE en configuración *trans***

La utilización de las neurotoxinas botulínicas y tetánica, como herramientas que escinden selectivamente a las proteínas SNARE, junto con el uso de anticuerpos específicos, ha permitido determinar que las proteínas SNARE son requeridas durante la RA en espermatozoides humanos (Tomes et al. 2002; De Blas et al. 2005). Estudios previos realizados con neurotoxinas sugieren que en espermatozoides en reposo las proteínas SNARE se encuentran formando complejos *cis* heterotriméricos tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal externa. Cuando se inicia la RA, comienza el desensamble de los complejos *cis* y las SNAREs pasan a un estado monomérico donde son sensibles a la escisión por neurotoxinas. Luego, gracias a la ayuda de múltiples chaperonas las SNARE comienzan a ensamblarse en complejos *trans* y permanecen en este estado por acción de la complexina (Roggero et al. 2007) hasta que la salida de calcio acrosomal activa a sinaptotagmina. Posteriormente sinaptotagmina-calcio remueve la complexina, logrando el completo ensamblado de las SNARE en configuración *trans* y finalmente la fusión de las membranas (De Blas et al. 2005). Como nuestros resultados previos indicaban que la proteína  $\beta$ CSP ejerce su función después de NSF, nosotros hipotetizamos que podrían estar colaborando con las SNARE para que estas adquieran una configuración *trans*.

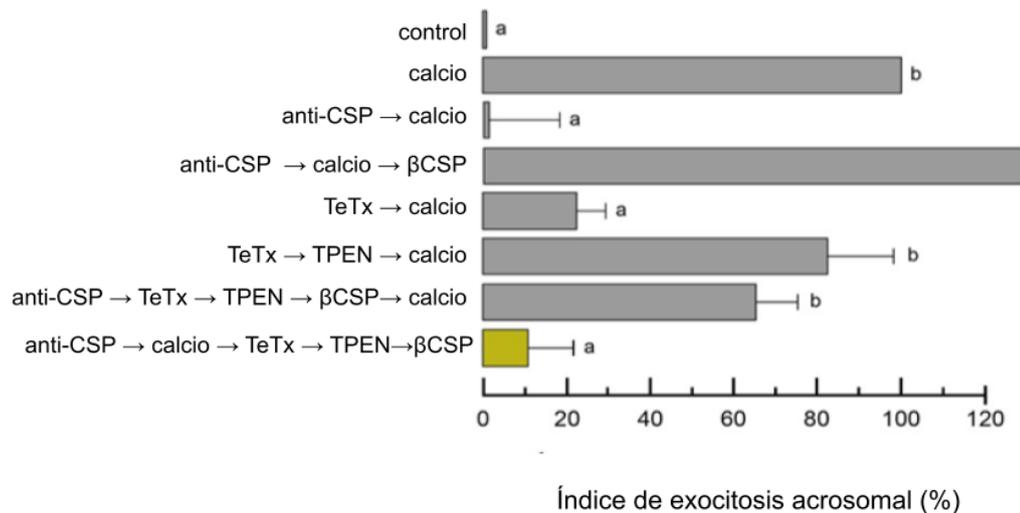
Para comprobar si la proteína  $\beta$ CSP participaba como chaperona en el ensamblado de las proteínas SNARE en configuración *trans*, nosotros planteamos ensayos funcionales utilizando como herramienta a la cadena liviana de la toxina tetánica (TeTx) que cliva e inhabilita a una de las SNARE, sinaptobrevina-2, cuando esta se encuentra en un estado monomérico, impidiendo de esta forma la fusión de las membranas. Se incubaron espermatozoides permeabilizados con la toxina TeTx por 10 minutos a 37 °C y luego se estimuló la RA con 0,5 mM de calcio por 10 minutos a 37 °C. De esta forma, las proteínas SNARE que estaban formando complejos en configuración *cis*, pasan a un estado monomérico, donde sinaptobrevina-2 puede ser escindida por la neurotoxina, evitando que las SNARE alcancen una configuración *trans* e inhibiendo la RA (Figura 41\*, TeTx → calcio).

---

\* Datos publicados recientemente en Flores-Montero et al., 2023.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>

Para detener la acción de la neurotoxina usamos TPEN, un quelante de  $Zn^{+2}$  necesario para la actividad proteolítica de la neurotoxina. Como podemos ver en la Figura 41 (TeTx → TPEN → calcio) los espermatozoides permeabilizados fueron incubados por 10 minutos a 37 °C con la toxina TeTx, luego incubados con TPEN por 10 minutos a 37 °C y finalmente estimulados con 0,5 mM de calcio. En esta oportunidad la RA ocurrió normalmente, ya que cuando las SNARE estuvieron en presencia de TeTx, la cascada de señalización estimulada por calcio aún no había comenzado, y los complejos se mantenían en una configuración *cis* y antes de estimular la reacción con calcio se agregó al medio TPEN, que secuestra el  $Zn^{+2}$ , inhabilitándola.

Para interpretar los resultados que siguen es necesario recordar el efecto reversible de anti-CSP por el agregado de  $\beta$ CSP en la RA descrito anteriormente (Figura 35, anti-CSP → calcio →  $\beta$ CSP). Agregamos los reactivos a espermatozoides permeabilizados incubando con 70 nM del anticuerpo anti-CSP por 10 minutos a 37 °C, luego por otros 10 minutos a 37 °C con la toxina TeTx y posteriormente con TPEN por 10 minutos a 37 °C, posteriormente adicionando la proteína  $\beta$ CSP recombinante, para restablecer la cascada de señalización y finalmente el estímulo de la RA con el agregado de 0,5 mM de calcio. Como podemos ver en la Figura 41 en la secuencia anti-CSP → TeTx → TPEN →  $\beta$ CSP → calcio, el agregado de los inhibidores y estímulos, no inhibió la exocitosis del acrosoma. Esto nos lleva a razonar que el agregado de anti-CSP no interfiere mientras la toxina está presente en el sistema, y que la presencia de  $\beta$ CSP antes de la inducción de la RA con calcio, permite que la exocitosis se desarrolle normalmente. Sin embargo, cuando los espermatozoides permeabilizados, se incubaron en la secuencia anti-CSP → calcio → TeTx → TPEN →  $\beta$ CSP (Figura 41), el agregado inicial del anticuerpo anti-CSP (70 nM), nos permite hipotetizar que, al secuestrar la proteína endógena, y el agregado inmediato de calcio para estimular la RA impediría que las SNARE alcancen una configuración *trans*. Por lo tanto, al exponer en este punto a los espermatozoides a la neurotoxina TeTx, la misma puede ejercer su actividad proteolítica sobre sinaptobrevina-2, ya que las SNAREs pasaron a un estado monomérico cuando se estimuló a los espermatozoides con calcio y a su vez se bloqueó a la chaperona  $\beta$ CSP. La inhibición de la RA en esta condición confirma nuestra hipótesis que  $\beta$ CSP es necesaria para que las SNARE pasen de un estado monomérico a una configuración *trans*.



**Figura 41: La proteína  $\beta$ CSP es necesaria para que el complejo SNARE se ensamble en configuración trans.** Los espermatozoides permeabilizados se incubaron con anti-CSP por 10 min a 37 °C, luego la RA se inició con 0,5 mM calcio por 10 min a 37 °C para permitir que las SNAREs alcancen sucesivos estados, hasta el punto en que se haya bloqueado intencionalmente. Posteriormente las células se incubaron con la neurotoxina TeTx por 10 min a 37 °C y para detener su actividad proteolítica, se incubaron por 10 minutos a 37 °C con 2, 5 uM de TPEN. En ese punto, se agregó la proteína CSP recombinante para revertir el secuestro de la proteína endógena, pero como podemos ver la RA fue inhibida (anti-CSP → calcio → TeTx → TPEN → CSP). Se realizaron varios controles en forma simultánea, de la RA espontánea en ausencia de estímulo (control), la RA estimulada con 0,5 mM calcio (calcio), el efecto inhibitorio del anticuerpo anti-CSP (anti-CSP → calcio), la recuperación de la RA a través del par reversible (anti-CSP → calcio → CSP), el efecto proteolítico de la neurotoxina TeTx sobre las SNAREs, que inhibe la RA (TeTx → calcio), el efecto inhibitorio de TPEN sobre la toxina TeTx (TeTx → TPEN → calcio). En todos los experimentos, los espermatozoides se tiñeron y se contaron como se describe en Materiales y Métodos. Los datos mostrados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

### **3.2. El secuestro de la proteína $\beta$ CSP endógena evita la aposición de las membranas plasmática y acrosomal externa, impidiendo la formación de los complejos trans-SNARE**

Nuestros resultados previos confirmaron que la exocitosis acrosomal se inhibe al bloquear la función de  $\beta$ CSP endógena. Además, demostramos que esta inhibición se debía a que las SNARE no podían ensamblarse en configuración *trans*. Esto nos llevó a preguntarnos sobre el mecanismo y los cambios morfológicos que ocurren en los espermatozoides cuando la proteína  $\beta$ CSP endógena es secuestrada por el anticuerpo anti-CSP. Mediante el uso de la

microscopía electrónica de transmisión (TEM por su sigla en inglés, *Transmission Electron Microscope*), analizamos la morfología del acrosoma y las membranas (plasmática, acrosomal interna y externa) de la cabeza del espermatozoide cuando se bloquea la acción de  $\beta$ CSP endógena y, en consecuencia, se altera la exocitosis acrosomal.

Para analizar estos cambios realizamos ensayos con espermatozoides permeabilizados incubados con el anticuerpo anti-CSP (70 nM) que luego fueron estimulados con 0,5 mM de calcio. Utilizamos como control negativo a espermatozoides no estimulados y como control positivo a los que solo fueron estimulados con 0,5 mM de calcio. Por lo tanto, comparamos el hinchamiento de los acrosomas de nuestra condición experimental con los controles realizados en paralelo. En la Figura 42\*A, podemos ver imágenes representativas de los diferentes patrones de la cabeza de espermatozoides tomados a través de TEM, que encontramos con los distintos tratamientos. En la condición (a), se muestra un espermatozoide con el acrosoma denso intacto y la membrana acrosomal externa plana proximal y paralela a la membrana plasmática. En las condiciones (b) y (c), se observan espermatozoides con acrosomas morfológicamente alterados, específicamente en (b) se observó un acrosoma hinchado, con ondulaciones en sus membranas y en (c) un fenotipo similar, pero con la membrana plasmática y acrosomal externas formando apocisiones (en c, puntas de flecha). En la condición (d) observamos un espermatozoide reaccionado que carece del acrosoma y donde la membrana acrosomal interna se convierte en parte de la membrana limitante de la célula. Finalizados los tratamientos, analizamos cada condición y evaluamos el porcentaje de repetición de los diferentes patrones mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 40B). Como podemos observar, en nuestra condición experimental (anti-CSP  $\rightarrow$  calcio) sólo reaccionaron el  $6,75 \pm 0,4$  % de los espermatozoides en comparación con el control positivo (calcio), en el cual perdieron el acrosoma el  $41 \pm 0,7$  % de las células (Figura 42B, barras naranjas). Morfológicamente pudimos observar que en nuestra condición experimental (anti CSP  $\rightarrow$  calcio) prevalecía el patrón hinchado y ondulado ( $60,7 \pm 0,7$  %) en comparación con el control positivo (calcio), que solo tenía un  $18,9 \pm 1,4$  % de las células hinchadas y onduladas (Figura 42B, "hinchado y ondulado", barras grises). Estos resultados confirman nuevamente que el bloqueo de la función de  $\beta$ CSP endógena con el anticuerpo inhibe la exocitosis acrosomal, restringiendo la asociación del complejo *trans*-SNARE y nos brinda un poco de luz, para dilucidar el mecanismo por el cual se bloquea la RA. Nosotros hipotetizamos que al secuestrar la proteína  $\beta$ CSP endógena y estimular la reacción acrosomal con calcio, la cascada de señalización continua normalmente (por eso podemos observar un gran número de espermatozoides con su acrosoma hinchado y con

---

\* Datos publicados recientemente en *Flores-Montero et al., 2023*.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196>

membranas onduladas) hasta el punto donde es necesaria  $\beta$ CSP. Estos resultados se condicen con nuestra hipótesis de que  $\beta$ CSP estaría ejerciendo su rol de chaperona con las proteínas SNARE, asistiéndolas en su ensamblado en configuración *trans*, es decir al bloquear a  $\beta$ CSP endógena, estaríamos bloqueando finalmente el acercamiento de las membranas que llevan a cabo el complejo *trans*-SNARE, que nosotros visualizamos como aposiciones.

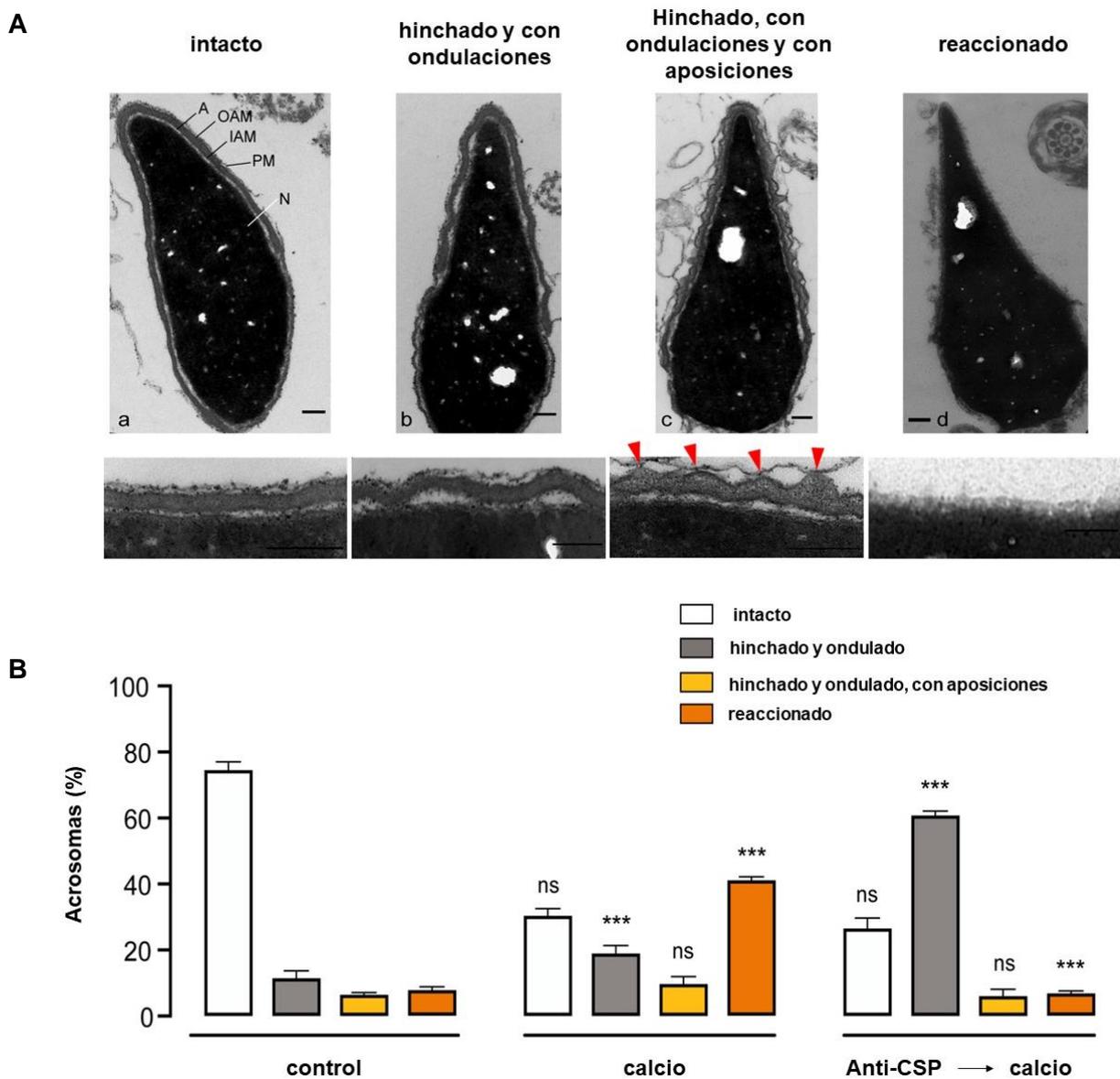
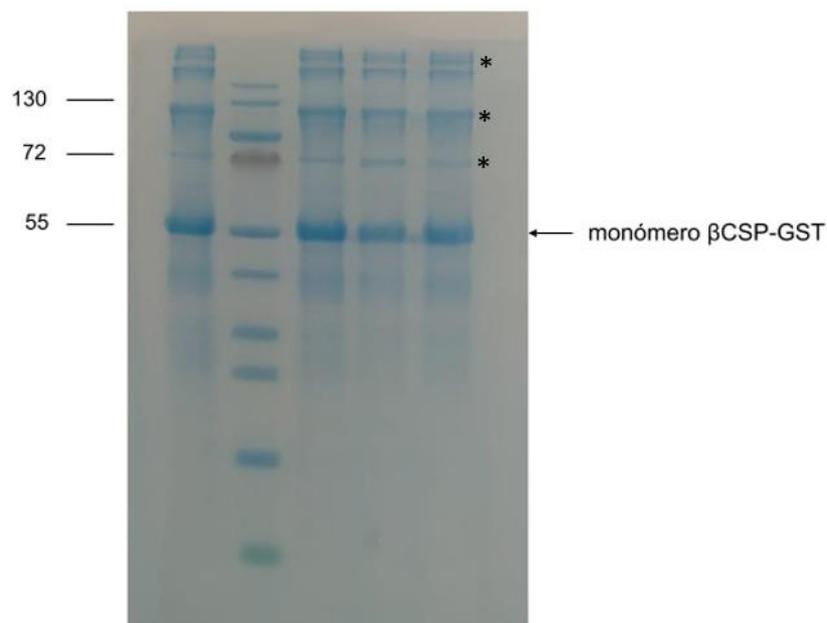


Figura 42: La inhibición de la proteína CSP endógena, no permite la aposición de la membrana plasmática y la MAE, evitando la formación de los complejos SNARE en configuración *trans*. A: Microscopía electrónica

de transmisión de espermatozoides en diferentes estados, cuando son estimulados por calcio. (a) Cuando el espermatozoide tiene el acrosoma intacto, (b) el espermatozoide estimulado contiene un acrosoma hinchado con membranas onduladas, (c) el acrosoma está hinchado, pero con la membrana plasmática y acrosomal externa formando aposiciones, y (d) un espermatozoide reaccionado, sin acrosoma. **B**: Se cuantificaron los espermatozoides fijados y tratados para TEM con los distintos patrones acrosomales. Se contaron alrededor de 100 células por condición y se clasificaron en los siguientes patrones: células con acrosomas intactos (barra blanca), células con acrosomas hinchados y ondulados (barra gris), células con acrosoma hinchado, ondulado y con aposiciones (barra amarilla) y células reaccionadas (barra naranja). Se puede observar la cuantificación de los espermatozoides con distintos patrones del acrosoma en tres condiciones diferentes: control (espermatozoides sin estímulo), calcio (espermatozoides estimulados) y anti-CSP → calcio (espermatozoides incubados con el anticuerpo anti-CSP y luego estimulado con calcio). Los resultados representan la media del número de espermatozoides analizados (\*\*\*)  $p < 0.001$ . (Barra = 200nm).

### 3.3. La agregación de la proteína $\beta$ CSP-GST impide su unión a membrana

Como mencionamos anteriormente, la proteína CSP se caracteriza por tener una región rica en cisteínas. Se ha reportado que se produce con facilidad una autoasociación de CSP para formar oligómeros y que la secuencia de aminoácidos altamente conservada entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  que va del aminoácido 83 al 136 son los responsables de la formación de oligómeros (Swayne et al. 2003). Cuando se escaló la producción de la proteína  $\beta$ CSP-GST de 200 ml de cultivo a 4L de cultivo, se pudo observar que la proteína formaba agregados estables en SDS-PAGE (Figura 43).



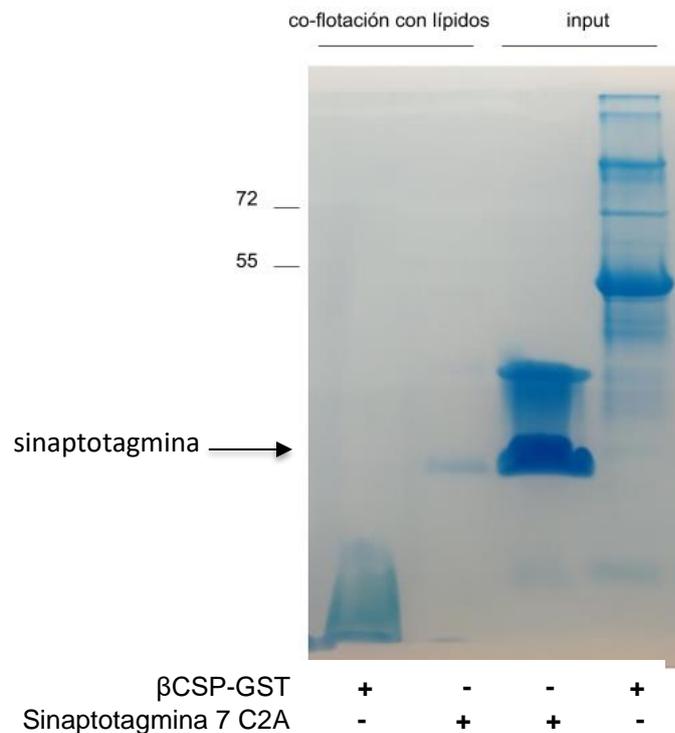
**Figura 43: Formación de agregados por parte de  $\beta$ CSP-GST.** Se puede observar en un gel de poliacrilamida al 10% los eluidos de una producción de 4 L de cultivo. Se muestra el monómero de  $\beta$ CSP recombinante y las demás bandas de mayor peso molecular (\*) que confirman la agregación de la proteína. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

Estos resultados son consistentes con múltiples investigaciones que reportan la agregación de la proteína, salvo en los constructos del dominio J y el C-terminal, remarcando que el dominio rico en cisteínas es el que está involucrado en este proceso (Swayne et al. 2003). Se ha descrito que el dominio de CSP rico en cisteína juega un papel doble en la promoción de la unión estable a la membrana. En primer lugar, la hidrofobicidad general de esta región puede permitir la interacción transitoria con la membrana de la proteína no palmitoilada, lo que le permite conectarse con palmitoiltransferasas Asp-His-Cys (DHHC) unidas a la membrana. Luego de que se palmitoile el dominio de cisteína, se promueve la unión estable a la membrana, lo que facilita el tráfico hacia las vesículas secretoras y la membrana plasmática (Greaves et al. 2012). Parece ser que el grado de oligomerización de la proteína endógena y recombinante varía por las modificaciones postraduccionales que tiene la proteína endógena y que la recombinante no puede obtener, ya que se genera en un sistema procariota (Swayne et al. 2003). En este contexto, han sido ampliamente estudiadas las mutaciones L116 y L115R (pertenecientes al dominio rico en cisteínas), ya que podrían perturbar la unión a la membrana, la palmitoilación o la multimerización de CSP. Además, se ha reportado que estas mutaciones generan la enfermedad neurodegenerativa llamada Lipofuscinosis Ceroidea Neuronal. Sin embargo, la mayoría de los estudios y análisis de los efectos de las mutaciones se ha utilizado principalmente en el modelado *in silico* (Greaves et al. 2012). En este punto, nos preguntamos si nuestra proteína agregada tenía la capacidad de unirse a la membrana. Para responder esto, realizamos un ensayo de coflotación<sup>†</sup>. Primero armamos los liposomas (para más detalles, ver la *Sección de Materiales y Métodos*) en una relación lípido:proteína 500:1, a los cuales probamos si se unía o no nuestra proteína  $\beta$ CSP agregada. Los liposomas llevaron en el lípido PE, un pigmento rosado para facilitar su selección (NBD-PE), cuando estén arriba de la columna. Cuando terminamos de armar la mezcla de lípidos, se secaron con gas nitrógeno y se dejó toda la noche al vacío. Al día siguiente se mezclaron 4 $\mu$ M de la proteína  $\beta$ CSP-GST y de Sinaptotagmina 7 C2A (que se usó como control positivo) y 16.5  $\mu$ l de liposoma reconstituido en Buffer RB<sub>150</sub> G10 (HEPES

---

<sup>†</sup> Ensayo realizado durante una estancia de investigación en University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, EE. UU.

25 mM, pH 7.4, KCl 100 mM, glicerol 10%) a un volumen final de 165  $\mu$ l y se incubaron a 4  $^{\circ}$ C durante 1 h. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de HistoDenz al 80 % (p/v) y se pasaron al fondo de tubos de ultracentrífuga Beckman. A continuación, se agregó lentamente 150  $\mu$ l de HistoDenz al 35 % (p/v) y 150  $\mu$ l de HistoDenz al 30 % (p/v), generando un gradiente denso. Se adicionaron lentamente 50  $\mu$ l de RB<sub>150</sub> G10 en la parte superior del gradiente de densidad. Las muestras se centrifugaron a 48.000 rpm con un rotor SW55 (Beckman) durante 4 h a 4  $^{\circ}$ C. A continuación, se tomó la parte superior del gradiente de cada tubo (150  $\mu$ L), se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% y se tiñó con Coomassie Blue (Figura 44). Como podemos ver en el gel de poliacrilamida, la proteína  $\beta$ CSP-GST agregada no aparece en el carril donde se sembró la parte superior del tubo, pero si lo hace sinaptotagmina. Se corrieron también, las proteínas recombinantes sin presencia de liposomas (input).



**Figura 44: La agregación de la proteína  $\beta$ CSP-GST impide su unión a membrana.** Podemos observar la imagen de un SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue de un ensayo de coflotación de lípidos para analizar la unión a membrana de  $\beta$ CSP-GST agregada. Se utilizó como control positivo la proteína sinaptotagmina, que como puede verse (flecha) se une a membrana. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

Estos resultados estarían indicándonos que cuando la proteína recombinante (sin palmitoilar), deja expuestos los residuos aminoacídicos necesarios para su autoasociación, la proteína se agrega fácilmente. No podemos asegurar, si estando agregada  $\beta$ CSP puede interactuar con Hsc70, pero si podemos inferir que en ese estado la proteína  $\beta$ CSP no puede unirse a la membrana, lo que genera una deslocalización de la chaperona. Nuestros resultados, están en concordancia con otras investigaciones, ya que por ejemplo un análisis *in silico* reveló que las mutaciones causantes de la lipofucinosis reducen la propensión del dominio rico en cisteínas a pasar del agua a una interfaz de bicapa de fosfolípida, lo que reduce la afinidad a membrana de CSP (Greaves et al. 2012).

**Objetivo específico 4:** *Examinar la modulación del proceso de ensamblado de los SNARE mediante la introducción al citosol de proteínas exógenas acopladas a péptidos de penetración celular (CPPs) en espermatozoides humanos.*

#### **4.1. *Diseño de la proteína $\beta$ CSP permeable unida a un tag de His<sub>6</sub> para evaluar su función en espermatozoides vivos***

Como mencionamos anteriormente, el espermatozoide es una célula altamente diferenciada con un único propósito, la fertilización. Además de no poseer algunas organelas como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, se sabe que durante su maduración se silencian los mecanismos de transcripción y traducción de proteínas (Jones *et al.*, 2013). Estas características hacen que el estudio de los diversos mecanismos que regulan la actividad de los espermatozoides se vea limitada. Ante esto, utilizamos una herramienta que nos permite introducir nuestra proteína de estudio a espermatozoides humanos vivos y móviles. Los CPPs (del inglés, *cell-penetrating peptides*) tienen la capacidad de acceder al interior de la célula por medio de diferentes mecanismos y llevar cargas dentro de las células (Zorko, Jones and Langel, 2022). Se ha reportado que el espermatozoide maduro carece de la maquinaria proteica requerida para los mecanismos endocíticos convencionales que requieran el reciclaje activo de lípidos, por lo que, se postula que la incorporación de estos péptidos podría darse a través de un mecanismo de translocación directa (Howl *et al.*, 2022). En nuestro laboratorio diseñamos un constructo que posee la proteína  $\beta$ CSP humana (Figura 45), unida a un péptido TAT (que le confiere permeabilidad a membranas) y una secuencia

de 6 histidinas (para la purificación con resinas de Ni-NTA-agarosa y detección con anticuerpos anti-His<sub>6</sub>). El constructo fue clonado en el plásmido pET-28a+ para su expresión en *E.coli*.

**A**



**B**

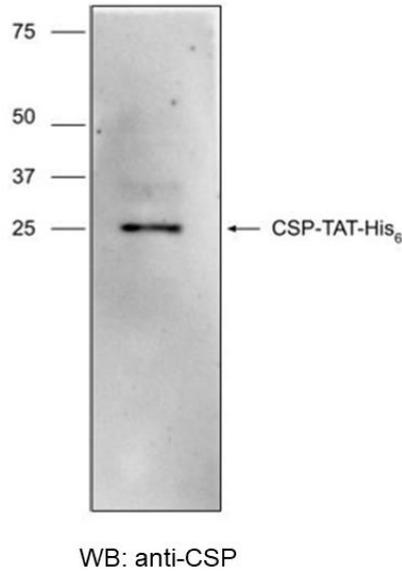
```

ATGGCGTGCAACATCCCGAACCGAGCGTCAACGTACCCTGAGCACCACCGGCGAGGCGCTGTACGAAATCC
TGGGTCTGCACAAGGGCGCGAGCAACGAGGAAATTAAGAAAACCTATCGTAAGCTGGCGCTGAAACACC
ACCCGGACAAAAACCCGGACGATCCGGCGGCGACCGAGAAGTTCAAAGAAATCAACAACGCGCACGCGA
TCCTGACCGACATTAGCAAGCGTAGCATTACGATAAATATGGTAGCCTGGGCTGTACGTGGCGGAGCAG
TTCGGTGATGAAAACGTTAACACCTATTTATGCTGAGCTCCTGGTGGGCGAAGGCGCTGTTCTGTATTGTT
GGTCTGCTGACCGGCTGCTACTTTTGCTGCTGCCTGTGCTGCTGCTGCAACTGCTGCTGCGGTCCTGCGC
TCCGGAGAGCAGCGTGCCGGAGGAAGACTTTTATGTTAGCCCGGAGGATCTGGAGGAACAAATCAAGAG
CGACATGGAAAAAGACGTGGATTTCCCGGTTTTTCTGCAGCCGACCAACGCGAACGAGAAGACCCAACTG
ATTAAAGAAGGCAGCCGTAGCTACTGCACCGATAGC

```

**Figura 45: Estructura de la proteína permeable betaCSP humana.** **A:** Esquema representativo de la estructura de la proteína, diferenciando el tag de purificación (His<sub>6</sub>-tag), seguido del péptido de penetración celular CPP (TAT). **B:** Secuencia de aminoácido de la proteína betaCSP permeable.

Para confirmar la producción exitosa de la proteína realizamos un Western blot anti-CSP. En la Figura 46 podemos observar una única banda clara a la altura de los 25 kDa, peso que se corresponde con nuestro constructo. Esto no solo nos confirma la producción eficiente de la proteína betaCSP-TAT-His<sub>6</sub>, sino que también nos corrobora que la proteína recombinante es reconocida por el anticuerpo anti-CSP.

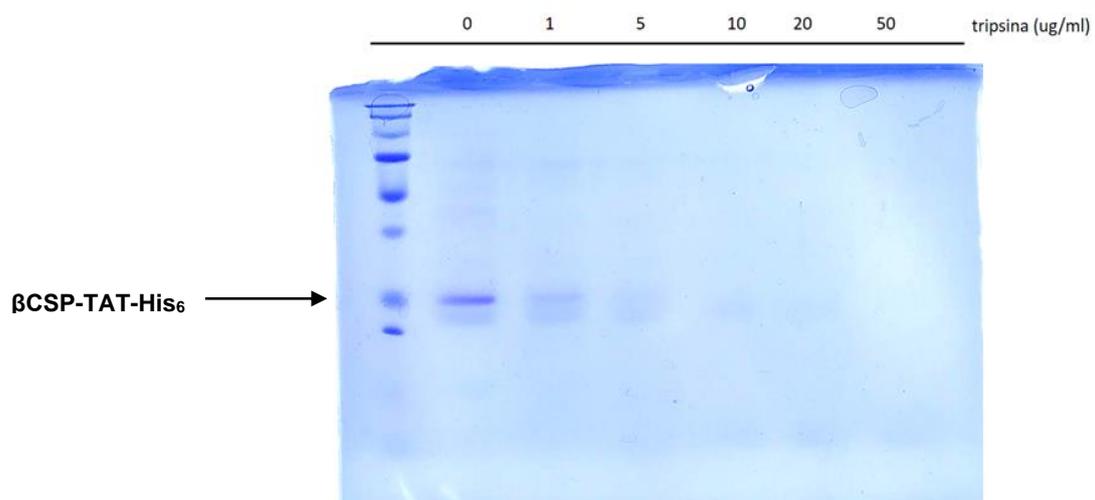


**Figura 46: Producción exitosa de la proteína recombinantes  $\beta$ CSP-TAT-His6.** La proteína recombinante se corrió en gel de poliacrilamida al 15%, luego se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se reveló por WB con el anticuerpo anti-CSP como se describe en *Materiales y Métodos*. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

#### **4.2. Digestión completa de $\beta$ CSP-His6**

Con el objeto de comprobar la incorporación efectiva de  $\beta$ CSP permeable a los espermatozoides, es necesario luego de incubarlos con la proteína, ponerlos en presencia de tripsina. La tripsina es una enzima que hidroliza las proteínas formando péptidos de menor tamaño. De esta manera, al incubar los espermatozoides con tripsina luego de los tratamientos con la proteína permeable, nos aseguramos de que la proteína que no haya ingresado a la célula sea degradada. La  $\beta$ CSP que fue incorporada queda protegida de la digestión con la enzima. Por lo tanto, antes de comenzar con nuestros experimentos de interés, evaluamos la concentración de tripsina necesaria para digerir  $1 \mu\text{M}$  de la proteína  $\beta$ CSP permeable. Este dato era necesario, ya que necesitábamos saber la concentración a la cual la enzima degrada por completo nuestra proteína, para poder realizar experimentos *in vitro* (para más detalles ver la *Sección de Materiales y Métodos*). Se tomó  $1 \mu\text{M}$  de la proteína  $\beta$ CSP y se la incubó con cantidades crecientes de tripsina (de 0 a  $50 \mu\text{g/ml}$ ) durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Finalizado ese tiempo, cada tratamiento se resuspendió en sample buffer y se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 15%. Posteriormente se tiñó el gel

con Coomassie Blue. Como podemos observar en la Figura 47, la mínima concentración de tripsina que impidió la detección de  $\beta$ CSP permeable fue de 30  $\mu$ g/ml y por lo tanto seleccionamos esta concentración de enzima para los siguientes experimentos. Es válido aclarar, que no pudimos observar los productos de degradación de  $\beta$ CSP a través de un Western blot, debido a los muchos sitios de escisión de la tripsina en la secuencia de nuestra proteína (evaluada por *ExpASy* y *Peptide Cutter*), incluso uno muy cerca de nuestro *tag* de His<sub>6</sub>. Por lo que cuando la tripsina corta a  $\beta$ CSP en este sitio, los fragmentos no son visibles con el anticuerpo anti-His<sub>6</sub>.



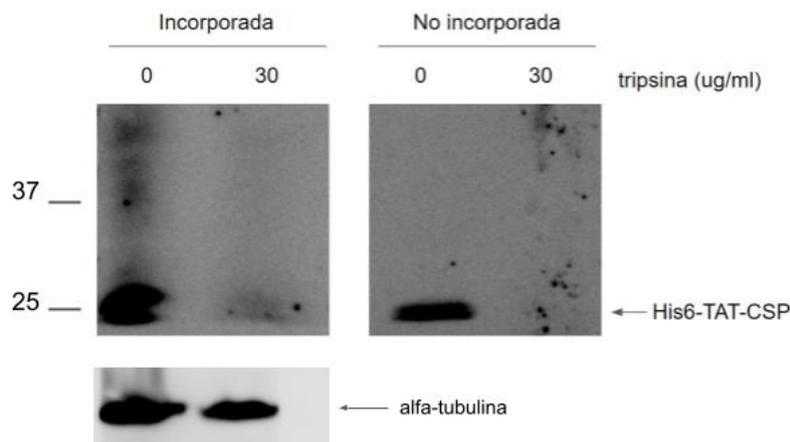
**Figura 47. Digestión de la proteína  $\beta$ CSP permeable por acción de la tripsina.** 1  $\mu$ M de  $\beta$ CSP permeable fueron incubados con concentraciones crecientes de tripsina (0 a 50  $\mu$ g/ml) durante 20 minutos a 37°C. Finalizado el tratamiento las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15% que se tiñó con Coomassie Blue.

#### **4.3. Incorporación de la proteína CSP permeable a espermatozoides intactos**

Como explicamos anteriormente, la remodelación de la cromatina que sufren los espermatozoides durante la espermiogénesis implica el desplazamiento de las histonas nucleares y su sustitución por protaminas. La protaminación de la cromatina es la responsable del cambio radical que sufre el núcleo espermático, como remoción y degradación de las histonas nucleares, silenciamiento transcripcional y traduccional, reducción del volumen

nuclear, entre otros (Kaur Gill-Sharma, Choudhuri and D'Souza, 2011). Debido a la ausencia de los procesos de transcripción y traducción, no es posible evaluar la función o efecto de una proteína mediante su sobreexpresión o silenciamiento en espermatozoides, herramientas comunes utilizadas en otros sistemas celulares. Como ya demostramos, una alternativa es permeabilizar de forma controlada con SLO la membrana plasmática (Yunes et al., 2000). Otra opción es el uso de proteínas permeables que pueden atravesar la membrana plasmática llevando con ellas proteínas o reactivos de interés (Zorko, Jones and Langel, 2022). Eligiendo esta estrategia y habiendo producido con éxito la proteína  $\beta$ CSP permeable, nos propusimos evaluar el efecto de la proteína en espermatozoides intactos (es decir, sin permeabilizar).

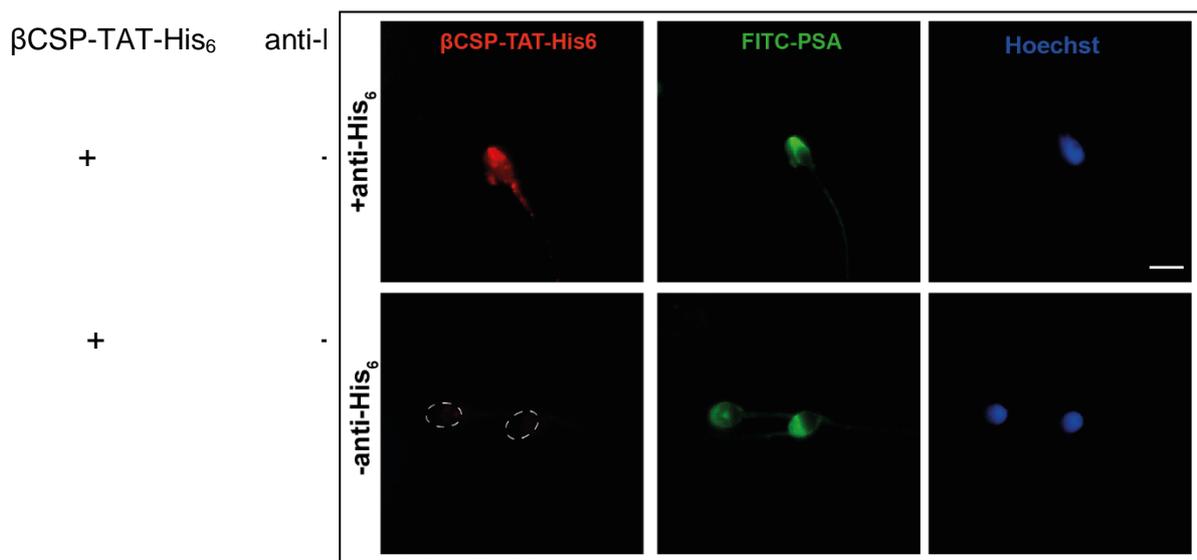
Lo primero que hicimos fue corroborar la incorporación de la proteína. Para esto, se incubaron dos condiciones de 40 millones de células cada una con  $1,25 \mu\text{M}$  de  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub> por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente una de las condiciones fue tratada con  $30 \mu\text{g/mL}$  de tripsina por 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , para que toda la proteína que no haya ingresado a la célula sea degradada por la enzima. Los extractos obtenidos fueron corridos en geles de poliacrilamida al 15% y analizados por Western blot con anticuerpos anti-His<sub>6</sub> para detectar la proteína incorporada en los espermatozoides, es decir protegida del corte por tripsina. Los resultados mostrados en la Figura 48, corroboran que  $\beta$ CSP ingresa a los espermatozoides en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 48: La proteína permeable  $\beta$ CSP es incorporada en espermatozoides humanos.** Espermatozoides humanos capacitados se incubaron con  $1,25 \mu\text{M}$  de  $\beta$ CSP permeable durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Luego se adicionó 0 o  $30 \mu\text{g/mL}$  de tripsina y se incubó durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$  para degradar la proteína no incorporada en espermatozoides. La detección de la proteína incorporada a las células (incorporada), como el restante que quedó

en el medio extracelular (no incorporada) se analizó por Western blot con el anticuerpo anti-His<sub>6</sub>. Además, se realizó un Western blot con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga de proteína de espermatozoides. Se muestra un experimento representativo de dos repeticiones. Los marcadores de peso molecular ( $\times 10^3$ ) se indican a la izquierda.

Una vez que determinamos que la proteína permeable ingresaba efectivamente a los espermatozoides, decidimos evaluar el porcentaje y sitio de incorporación de la proteína  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub> a los espermatozoides. Para esto llevamos a cabo una inmunofluorescencia indirecta de células incubadas con la proteína y posteriormente tratadas con tripsina para distinguir entre la proteína incorporada y la simplemente adherida a la membrana celular. Luego de la digestión con tripsina, las células fueron fijadas y se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (para más detalles ver la *Sección de Materiales y Métodos*). Se utilizó como control células tratadas sólo con el anticuerpo anti-rabbit-Cy3 para comprobar la especificidad del anticuerpo primario. Las células fueron observadas en microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron procesadas con los programas Image J. Pudimos observar que alrededor del 69% de células estaban marcadas con el anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (Figura 49, panel rojo superior), como resultado de las incubaciones con la proteína permeable. En ausencia del anticuerpo primario (panel rojo inferior) no se observaron células marcadas, corroborando que la marca de la proteína fue específica. A partir de estos resultados, pudimos comprobar que  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub> fue incorporada en la cabeza de espermatozoides en un alto porcentaje.

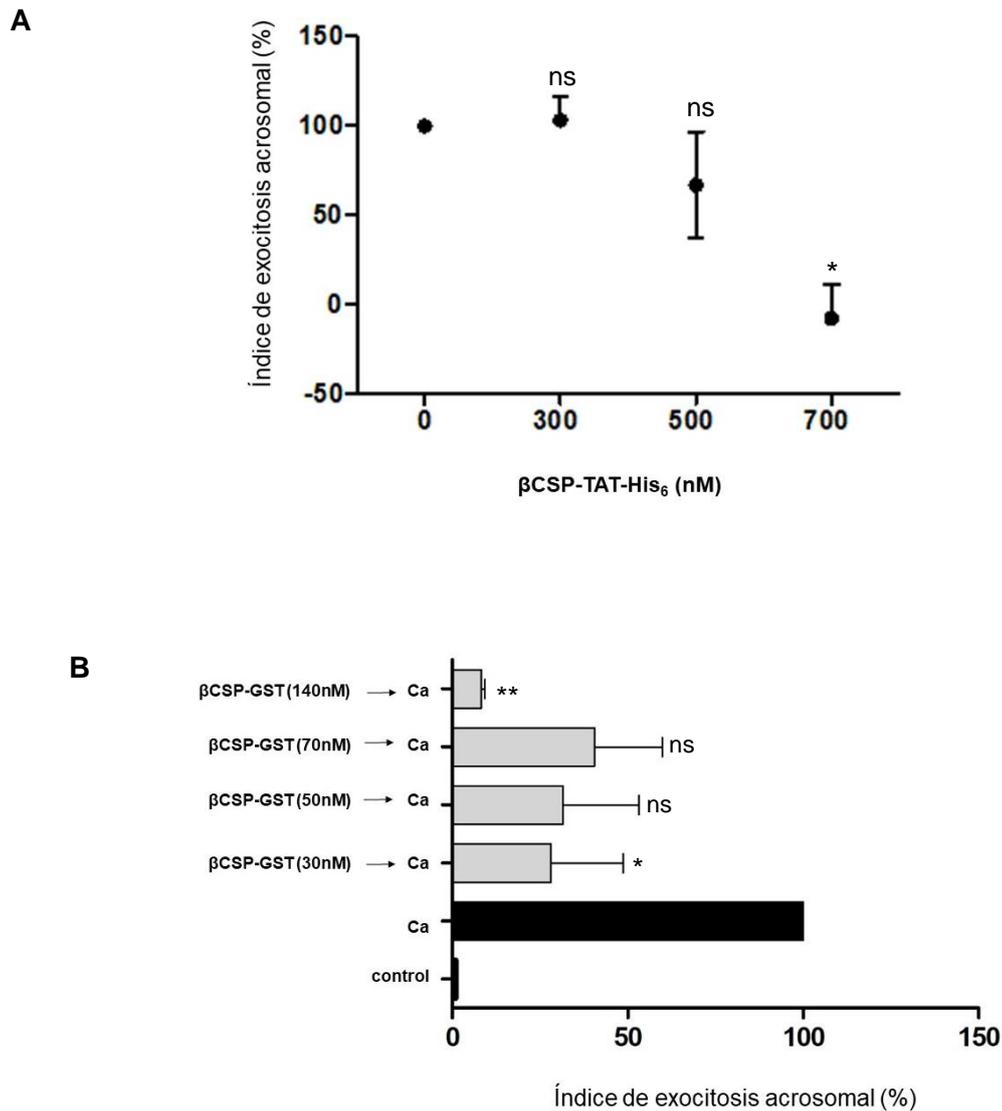


**Figura 49:** La proteína permeable  $\beta$ CSP es incorporada en espermatozoides humanos. Espermatozoides

capacitados fueron incubados con 1,25  $\mu$ M de la proteína  $\beta$ CSP permeable durante 30 minutos a 37 °C. Luego se agregó a todas las condiciones 30  $\mu$ g/ml de tripsina, para escindir la proteína que no haya ingresado a los espermatozoides. Posteriormente, espermatozoides tratados fueron pegados a cubreobjetos con polilisina, fijados con PAF 2% y luego neutralizados con glicina 100 mM pH 7.4. Luego de la permeabilización con tritón X-100 0,1%, los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 5% y luego las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-His<sub>6</sub>. Se realizó una triple tinción con el anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a Cy3 (paneles rojos), la lectina PSA-FITC (tiñe la matriz acrosomal, paneles verdes) y el colorante Hoechst 33342 (tiñe los núcleos celulares, paneles azules). Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones. (Barras = 5  $\mu$ m).

#### **4.4. $\beta$ CSP permeable ejerce la misma función en espermatozoides intactos que su par CSP-GST en espermatozoides permeabilizados.**

Una vez que corroboramos el ingreso exitoso de la proteína permeable a espermatozoides intactos (sin generar poros en la membrana plasmática), analizamos su efecto sobre la RA. Luego de la capacitación, los espermatozoides fueron lavados con HTF y posteriormente separados en alícuotas de 50  $\mu$ L para realizar ensayos funcionales con concentraciones crecientes de la proteína recombinante. Se incubaron los espermatozoides intactos con la proteína permeable (300 nM, 500 nM y 700 nM) por 15 minutos a 37 °C, luego se estimuló la RA con el ionóforo de calcio, A23187 (A23). Como podemos observar en la Figura 50A, la incorporación de la proteína  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub> inhibió la RA estimulada por A23, de una manera dependiente de la concentración. Estos resultados se corresponden con los resultados obtenidos en espermatozoides permeabilizados, cuando fueron incubados con la proteína  $\beta$ CSP-GST y luego estimulados con calcio (Figura 50B). Cuando comparamos las concentraciones usadas de las proteínas recombinantes  $\beta$ CSP, podemos ver una amplia diferencia en sus valores. Esto se debe, a que cuando incubamos espermatozoides intactos con proteínas permeables, debemos considerar que no toda la proteína en el medio ingresa a la célula. Como bien explicamos anteriormente, nosotros hipotetizamos que la proteína recombinante (ya sea permeable o no) al ingresar al espermatozoide forma complejos no funcionales, uniéndose a sus proteínas *partner*, como la Hsc70 y disminuyendo las probabilidades de que Hsc70 forme complejos con la proteína endógena. La formación de estos complejos no funcionales impediría su rol de chaperonas con las proteínas SNARE, inhibiendo finalmente la exocitosis del acrosoma.



**Figura 50: La proteína  $\beta$ CSP permeable inhibe la RA en espermatozoides no permeabilizados. A:** Los espermatozoides humanos intactos se lavaron con HTF y luego se trataron por 30 min a 37 °C con concentraciones crecientes de la proteína permeable. La RA se inició subsecuentemente con la adición de 10  $\mu$ M de A23 y se incubó por 20 min a 37 °C. **B:** Los espermatozoides humanos permeabilizados con SLO se trataron por 15 min a 37 °C con concentraciones crecientes de la proteína  $\beta$ CSP-GST. La RA se inició subsecuentemente con la adición de 0,5 mM de calcio y se incubó por 15 min a 37 °C. La exocitosis se evaluó por microscopía de fluorescencia con lectina PSA-FITC y los datos se normalizaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Los resultados graficados representan el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes (\*\*  $p < 0.05$  vs calcio, ns: no existe diferencia significativa).

# Discusión

El complejo trimérico que forman las proteínas CSP-Hsc70-SGTA ha sido estudiado ampliamente por diversos grupos de investigación, ya que son actores esenciales en la maquinaria de fusión que regula procesos clave como la liberación de neurotransmisores (Sharma et al. 2011); Chamberlain and Burgoyne 1997). Se ha intentado dilucidar el mecanismo de acción de estas chaperonas en diversos modelos celulares como las neuronas o las células neuroendocrinas, pero no se han reportado estudios previos de este complejo en espermatozoides humanos. Aunque estas chaperonas moleculares han ganado importancia como factores críticos en las vías de señalización, no se había descrito anteriormente el papel de las proteínas CSP, Hsc70 y SGTA en la exocitosis acrosomal.

Nuestro laboratorio ha contribuido en la identificación de los mecanismos moleculares que conducen a la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos, identificando y caracterizando el rol y los puntos de acción de un gran número de componentes de la maquinaria de fusión (Tomes 2007; Tomes et al. 2005). En este trabajo, a través de ensayos funcionales, en los cuales agregamos a los espermatozoides permeabilizados, anticuerpos que secuestran a las proteínas de estudio, informamos que las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA están presentes en los espermatozoides humanos y localizadas específicamente en la cabeza de estos, resultado consistente con que las proteínas están involucradas en la reacción del acrosoma (Ito and Toshimori 2016) y al menos dos de ellas ( $\beta$ CSP y Hsc70), participan de forma directa.

Basados en los datos de que la isoforma con mayor presencia en los espermatozoides humanos es la proteína  $\beta$ CSP (Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>) y de la literatura que reporta su presencia en el tejido testicular (Fernández-Chacón et al. 2004), se reforzó nuestra idea de que  $\beta$ CSP podría estar involucrada en la fisiología de los espermatozoides. Este proyecto de doctorado describió por primera vez a través de técnicas de Western blot e inmunofluorescencia indirecta a la proteína  $\beta$ CSP en la región acrosomal de espermatozoides humanos (Figura 26 y 30) y su participación en la exocitosis acrosomal, dejando plasmados los resultados en una publicación reciente “The molecular chaperone cysteine string protein is required for monomeric SNARE proteins to assemble in trans-complexes during human sperm acrosomal exocytosis” ([https://doi.org/10.1093/biolre/10ac196](https://doi.org/10.1093/biolre/ioac196)), en la revista *Biology of Reproduction*. Actualmente, estamos trabajando en colaboración con un grupo de investigación liderado por el Dr. Cameron Gundersen (Department of Molecular and Medical Pharmacology, UCLA, USA) quien nos envió el anticuerpo específico de la isoforma beta de CSP, cuyos resultados serán publicados en una próxima publicación.

La proteína Hsc70 había sido relacionada en estudios anteriores con espermatozoides de otros mamíferos, en el proceso de almacenamiento de los espermatozoides y su sobrevivencia en los conductos oviductales (Daugaard et al. 2007), así como una isoforma de Hsc70 (HSPA2) que fue descrita en el proceso de mediación de la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito (Redgrove et al. 2013). En este trabajo demostramos por primera vez, a través de técnicas de Western blot y de inmunofluorescencia indirecta, la presencia de Hsc70 en la región acrosomal de los espermatozoides humanos (Figura 26 y 30). De la misma forma describimos la presencia de la proteína SGTA (Figura 26 y 30), que se sabe que la ablación total de su gen confiere subfertilidad y limita la viabilidad y el crecimiento de la descendencia en ratones (Philp et al. 2016). Estos resultados, nos llevaron a preguntarnos si las tres proteínas participaban de forma directa en la exocitosis del acrosoma. Como mencionamos anteriormente, los espermatozoides no cuentan con procesos de transcripción ni traducción activos, por lo que resulta imposible sobreexpresar o abolir la expresión de una proteína para estudiar sus efectos (Ren et al., 2017). En nuestro laboratorio se ha adaptado de forma exitosa el sistema de permeabilización con SLO (Yunes et al., 2000) para generar poros en la membrana plasmática de la célula y de esta forma, introducir proteínas, anticuerpos y otras moléculas no permeables (Díaz et al., 1996). Este sistema ha permitido estudiar la función de múltiples proteínas relevantes en las vías de señalización involucradas en la RA. A través de ensayos funcionales, logramos introducir en espermatozoides permeabilizados anticuerpos específicos que secuestran las proteínas endógenas. De esta forma, estimulando la reacción acrosomal mediante el agregado de calcio, logramos poner en marcha la maquinaria exocítica del acrosoma y evaluar los cambios ocasionados por el secuestro de las proteínas  $\beta$ CSP, SGTA y Hsc70 endógenas. Como habíamos hipotetizado, las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 cumplen un rol directo sobre la RA, ya que observamos que a medida que aumentamos la concentración de anticuerpos en los espermatozoides permeabilizados, la RA se inhibe (Figura 31). Sorprendentemente no observamos la misma inhibición dependiente de la concentración con la proteína SGTA (Figura 32). Este resultado se condice con otros ya reportados, en los que se menciona la interacción funcional de un complejo formado solo por las proteínas CSP y Hsc70, como en la exocitosis de los gránulos corticales (Smith et al. 2005) o cuando el complejo promueve la degradación proteosomal del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) (Schmidt et al. 2009). Este dato, llamó nuestra atención, ya que nosotros hipotetizábamos que el complejo trimérico participaba en la exocitosis del acrosoma. Revisando el Atlas de Proteínas Humanas, pudimos conocer los niveles de expresión en las espermátidas tardías de las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA. De acuerdo con esta base de datos, las proteínas Hsc70 y  $\beta$ CSP tienen altos niveles de expresión en las espermátidas tardías, mientras que SGTA tiene bajos niveles. Consideramos que esta característica determinó en parte nuestra investigación, ya que

cuando realizamos los ensayos funcionales no pudimos demostrar la inhibición de la RA al secuestrar a SGTA. Consideramos que, si el nivel de expresión de la proteína en espermatozoides es bajo, necesitamos una alta concentración de anticuerpos para secuestrarla y evaluar su supresión en el proceso de la exocitosis acrosomal. Pudimos confirmar la presencia de SGTA en espermatozoides humanos y su localización en la región acrosomal, pero estimamos que son necesarios más estudios para determinar su participación o no, en la RA. Además, como mencionamos en la *Sección de Resultados*, intentamos repetidas veces producir la proteína SGTA recombinante para evaluar la RA en espermatozoides permeabilizados con el agregado de la proteína. Actualmente, seguimos trabajando en esto para encontrar las condiciones necesarias para su producción y poder obtener resultados para una próxima publicación.

En las neuronas, CSP se une a la membrana de la vesícula sináptica mediante palmitoilación (Zinsmaier et al., 1990). Nosotros quisimos indagar acerca de las características químicas de la proteína y para esto usamos un ensayo de partición celular con Triton X-114 y uno de fraccionamiento subcelular con un buffer hipoosmótico. Observamos que  $\beta$ CSP se localiza en la fracción particulada y se reparte en la fase de detergente, lo que nos indica que  $\beta$ CSP endógena tiene características hidrofóbicas y está asociada a las membranas (Figura 27). Además, el peso molecular de  $\beta$ CSP endógena corresponde a una versión totalmente palmitoilada (Coppola and Gundersen, 1996). Asimismo, el tratamiento con hidroxilamina mostró un cambio en la movilidad de  $\beta$ CSP, evidenciando su palmitoilación en el espermatozoide humano (Figura 28).

Los experimentos que bloquearon la función de CSP endógena con el anticuerpo inhibieron la exocitosis desencadenada por calcio, lo que nos indica que la función de  $\beta$ CSP es necesaria para la exocitosis acrosomal. Como propusimos en un trabajo reciente con una proteína diferente (Ruete et al., 2014), los mecanismos de rescate de esta inhibición mediante la adición de  $\beta$ CSP recombinante podrían explicarse por la competencia entre CSP endógena y recombinante para unirse al anticuerpo. La adición de 70 nM de  $\beta$ CSP recombinante a los espermatozoides que han sido incubados con el anticuerpo anti-CSP, permite que continúe la exocitosis y confirma nuevamente que el anticuerpo anti-CSP reconoce a  $\beta$ CSP. De acuerdo con nuestra hipótesis, concluimos que estos resultados sustentan la noción de que se requiere CSP para la exocitosis acrosomal y confirman el papel crítico de CSP en este proceso (Figura 35). Un dato que nos pareció muy interesante fue que al agregar  $\beta$ CSP-GST (140 nM) a los espermatozoides permeabilizados, la RA se inhibió. Como mencionamos anteriormente la proteína recombinante fue producida en bacterias, las cuales carecen de las enzimas necesarias para realizar modificaciones postraduccionales, en este caso palmitoilar a CSP. Ante estos resultados y teniendo en mente que CSP no sería totalmente funcional *per*

se, nosotros hipotetizamos, que la proteína  $\beta$ CSP recombinante estaría formando complejos no funcionales con otras proteínas, cuando se estimula la RA con calcio. Como describimos anteriormente, CSP forma un complejo con la proteína Hsc70, por lo que pensamos que podría estar uniendo y secuestrando a la Hsc70 endógena. Teniendo en cuenta esta hipótesis y para verificar si este era un posible mecanismo para explicar la inhibición que vimos, a través de un ensayo funcional investigamos que sucedía con la RA si intentábamos recuperar la RA con el agregado de la proteína Hsc70 recombinante a los espermatozoides permeabilizados previamente incubados con  $\beta$ CSP recombinante (140 nM) (Figura 36). Efectivamente, logramos revertir la inhibición de la exocitosis acrosomal agregando Hsc70 recombinante (140 nM). Esto nos permite postular que el agregado de la Hsc70 recombinante desplazaría el equilibrio, permitiendo la liberación de la Hsc70 endógena y dejándola disponible para la interacción con la CSP endógena y de esta manera reestableciendo la RA. Este resultado apoya nuestra hipótesis, de que se podrían formar complejos no funcionales entre la proteína  $\beta$ CSP-GST y la proteína Hsc70 endógena, que se encuentran mal localizados en el momento en el que son necesarios, probablemente por la falta de palmitoilación de  $\beta$ CSP recombinante. Además, estos resultados se condicen con otras investigaciones, donde se había reportado que la sobreexpresión de la proteína CSP, generaba la inhibición de la exocitosis de los gránulos corticales, también secuestrando a la proteína Hsc70 (Smith et al. 2005). Nuestra hipótesis se refuerza con lo demostrado en la Figura 44, que indican que cuando la proteína CSP no está palmitoilada, forma agregados fácilmente y esto repercute en su capacidad para unirse a membrana. No podemos determinar si  $\beta$ CSP agregada puede interactuar con Hsc70, pero de ser así podría el complejo de chaperonas ser incapaz de unirse a membrana y asistir a las proteínas SNARE. Tampoco podemos asegurar que la proteína  $\beta$ CSP recombinante agregada sea incapaz de unirse a la membrana por el hecho de estar agregada o por su falta de palmitatos. Si sabemos, que existe evidencia de que CSP puede unirse a membrana sin estar palmitoilada, pero la falta de palmitatos produciría una deslocalización de la proteína. Creemos que se requiere más experimentación para revelar la naturaleza dinámica de estos procesos.

Cuando determinamos de forma indirecta mediante ensayos funcionales la formación de complejos entre  $\beta$ CSP y Hsc70, quisimos indagar a través de la técnica del Dot Blot, si  $\beta$ CSP interactuaba con Hsc70. En este ensayo evaluamos la interacción de la proteína  $\beta$ CSP con Hsc70 recombinantes (Figura 37), demostrando una alta interacción entre las proteínas. Estos resultados se suman a los pocos reportes que existen acerca de la interacción de la isoforma  $\beta$  de CSP con la proteína Hsc70. Posteriormente, quisimos indagar más acerca de la interacción entre  $\beta$ CSP y Hsc70, pero utilizando una de las proteínas endógena del espermatozoide (Figura 38). En este caso, realizamos un Dot blot donde verificamos la

interacción de la proteína  $\beta$ CSP recombinante con Hsc70 endógena. Este novedoso resultado, confirma nuestra hipótesis de que  $\beta$ CSP y Hsc70 forman complejos en el espermatozoide humano.

Una vez que, demostramos la presencia de estas proteínas en la región acrosomal del espermatozoide y su participación en la RA, quisimos indagar sobre los cambios morfológicos que se llevan a cabo en la fusión de membranas, pasos previos a la exocitosis del acrosoma. El hinchamiento del acrosoma es crucial para la aproximación de las membranas plasmática y acrosomal externa que conducen a la exocitosis acrosomal (Zanetti and Mayorga, 2009). Se propone que los complejos *trans*-SNARE se ensamblan en regiones de aposición de membrana y preludian el proceso de fusión. Muchos factores interactúan con el complejo *trans*-SNARE para regular su ensamble, pero aún no está claro cómo estas interacciones ocurren (Rizo and Rosenmund, 2008). Utilizando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) obtuvimos imágenes donde observamos "acrosomas hinchados y ondulados" en presencia de anti-CSP junto con la ausencia de aposiciones de membrana, coincidiendo con nuestros hallazgos de que CSP es necesaria para la exocitosis y sugiriendo su participación en el ensamble del complejo *trans*-SNARE (Figura 42). Además, mostramos que CSP endógena participa en la cascada de señalización antes de la liberación de calcio intra acrosomal (Figura 39A) y que su par, la proteína  $\beta$ CSP recombinante ejerce su función en el mismo momento (Figura 39B). Este resultado es consistente con la necesidad de CSP para ensamblar complejos *trans*-SNARE (Figura 41). Trabajos previos de nuestro laboratorio indicaron que los *cis*-SNARE son desensamblados por NSF/ $\alpha$  SNAP (De Blas *et al.*, 2005) y por eso quisimos investigar si  $\beta$ CSP ejercía su función después de estas chaperonas, lo cual iría de acuerdo con nuestra hipótesis del rol de CSP en la RA. A través de ensayos funcionales y poniendo en práctica la herramienta de pares reversibles, pudimos revelar que CSP endógena cumple su función aguas abajo de NSF en la exocitosis acrosomal bajo estas condiciones experimentales (Figura 40). Nuestros resultados están en consonancia con los estudios en células cromafines en las que también hay un único evento de fusión. Graham y Burgoyne (Graham and Burgoyne, 2000) demostraron que  $\alpha$ -SNAP actúa en los primeros pasos de la fusión y que CSP desempeña su papel cerca del proceso de fusión.

Para corroborar los resultados obtenidos a través de la técnica de TEM, quisimos indagar con más profundidad la función de  $\beta$ CSP en el ensamble en *trans* de las SNARE. Para esto, utilizamos como herramienta molecular a la neurotoxina tetánica (TeTx) que se ha reportado que escinde a sinaptobrevina en su estado monomérico, una de las proteínas SNARE, evitando la formación de los complejos SNARE en configuración *trans*. Ideamos un ensayo donde se inhibe reversiblemente la salida de calcio del acrosoma y se bloquea la exocitosis antes de que se ensamble el complejo *trans*-SNARE. La inhibición de la exocitosis acrosomal

al bloquear la función de CSP mostró que la sinaptobrevina-2 se vuelve sensible a TeTx (Figura 41). Esta observación es consistente con nuestros hallazgos, donde no hay aposiciones de membrana porque no se formaron complejos *trans* en presencia de anti-CSP. Estos resultados muestran que CSP estabiliza la configuración *trans* (Figura 41), lo que respalda el papel de CSP promoviendo la preservación de la maquinaria SNARE y destaca la importancia de pensar en el estudio de esta proteína en casos de infertilidad idiopática.

Cuando realizamos un escalamiento en la producción de la proteína  $\beta$ CSP recombinante, nos encontramos con un inconveniente. La proteína formaba agregados resistentes a DTT que eran estables en SD-PAGE (Figura 43). Estos resultados, estaban en concordancia con numerosas investigaciones, donde se reportaba que la proteína CSP podía formar agregados a través de su dominio rico en cisteínas (Greaves et al. 2012). Cuando la proteína endógena está palmitoilada, la región rica en cisteínas está cubierta de grupos palmitatos, imposibilitando la formación de agregados (Swayne et al. 2003). Está descrito que cuando se producen mutaciones en esta región, y se pierde en parte la palmitoilación se desarrollan enfermedades neurodegenerativas, como la lipofucinosis ceroidea (Greaves et al. 2012). Como ya explicamos, la proteína  $\beta$ CSP fue producida en un sistema procariota, lo que imposibilita su palmitoilación, dejando la región rica en cisteínas al descubierto para la formación de agregados. Ante esta situación, quisimos evaluar si la proteína agregada tenía la capacidad de unirse a membrana. Para esto, realizamos un ensayo de coflotación (Figura 44), en el que mezclamos nuestra proteína con liposomas en un gradiente denso y luego de una ultracentrifugación verificamos que  $\beta$ CSP no podía unirse a la membrana. Ante este resultado, podemos hipotetizar dos supuestos. Primero, es posible que la proteína  $\beta$ CSP agregada no pueda unirse a membrana, por el hecho de alcanzar una estructura tridimensional que no exponga la región necesaria para su unión inicial a membrana. Segundo, numerosas investigaciones proponen que la palmitoilación, sería necesaria para su unión a membrana, por lo que esto explicaría por qué no se unió a los liposomas. Cualquiera sea la causa, nuestro resultado indica que  $\beta$ CSP es incapaz de unirse a la membrana, por lo que podría estar mal localizada en el momento que sea necesaria en su acción en la RA. Además, se ha descrito que las proteínas agregadas pierden su capacidad de chaperona, por lo que esto podría explicar su relación con las enfermedades neurodegenerativas.

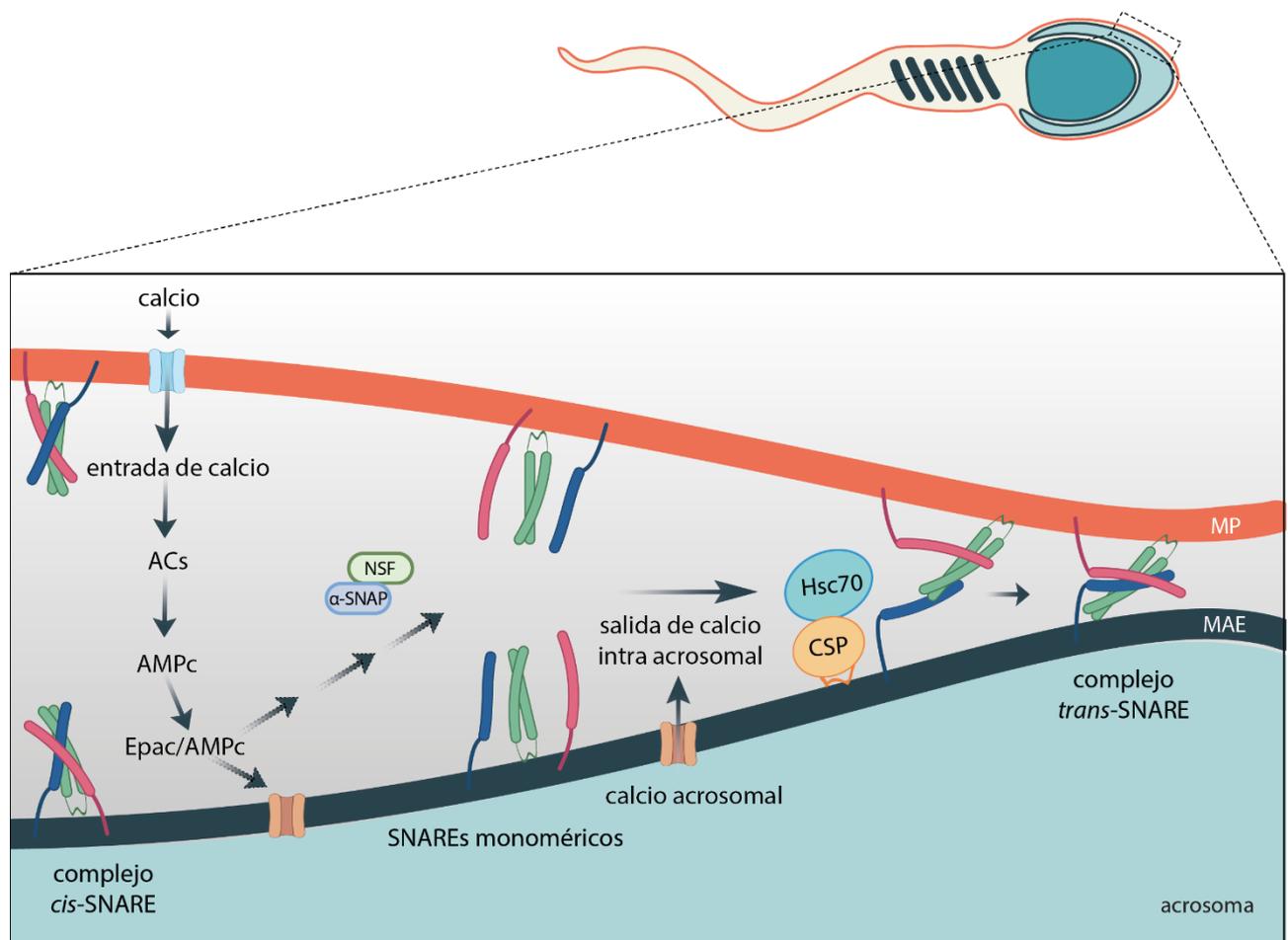
Hasta este punto, todos los ensayos que realizamos para la investigación de la función de las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA fue en espermatozoides permeabilizados. Como ya mencionamos, nuestro laboratorio utiliza exitosamente el sistema de permeabilización de la membrana plasmáticas con SLO (Yunes et al., 2000) para generar poros y poder introducir proteínas, anticuerpos y otras moléculas no permeables a los espermatozoides. Si bien este sistema ha permitido estudiar la función de múltiples proteínas relevantes en las vías de

señalización involucradas en la RA, tiene algunas limitaciones. Trabajar con espermatozoides intactos permite evaluar la función de una proteína o una droga permeable en condiciones más próximas a las fisiológicas, es decir, en células vivas y motiles. Esto nos llevó a producir la proteína  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub>, que al estar unida a un péptido de penetración celular (TAT), le permite atravesar la membrana sin necesidad de generar poros. Después de realizar los controles necesarios para verificar que la proteína ingresaba eficazmente a la célula (Figura 48 y 49) nos propusimos indagar si el agregado de la proteína CSP permeable ejercía la misma función en los espermatozoides, que su par no permeable. A través de ensayos funcionales pudimos verificar que el agregado de la proteína CSP recombinante inhibía la RA en ambos modelos (Figura 50). Estas observaciones sugieren que la transducción de  $\beta$ CSP-TAT-His<sub>6</sub> a través de la membrana plasmática en espermatozoides no permeabilizados es al menos tan eficiente y cuantitativa como su difusión en células permeabilizadas.

El complejo trimérico formado por CSP-Hsc70-SGTA ha sido el objetivo de estudio de numerosas investigaciones, por la función esencial que cumplen asistiendo como chaperonas a las proteínas SNARE. Además, se ha descrito que estas chaperonas están involucradas en diferentes enfermedades humanas, como por ejemplo la enfermedad neurodegenerativa lipofusinosis ceroida, causada por una mutación en la región rica en cisteínas de CSP, por lo cual también han sido blanco de numerosos estudios. Poder evaluar la función e interacción que surge entre estas proteínas en modelos más simples, como los espermatozoides, nos permite dar luz a modelos más complejos, como las neuronas. En conjunto, todos nuestros hallazgos indican que queda mucho por aprender sobre el papel de las proteínas chaperonas en las vías de secreción celular, pero intentan dilucidar los mecanismos que gobiernan la fusión de membranas en el proceso de la exocitosis acrosomal.

Además, los resultados de este proyecto serán de utilidad para entender aspectos fundamentales de la biología espermática, así como también, para avanzar en el conocimiento de las vías de señalización que conducen a la exocitosis acrosomal, ayudando en particular a desentrañar los mecanismos moleculares involucrados en los procesos que conducen a la fertilización. Esto podría contribuir en un futuro a comprender algunas posibles causas que conducen a la infertilidad masculina. Actualmente, una subpoblación de hombres tiene infertilidad masculina inexplicada o idiopática, a pesar de tener un análisis de semen normal. En la búsqueda de posibles actores involucrados en la disfunción celular del espermatozoide, el presente estudio intenta dilucidar el rol de las proteínas CSP-Hsc70-SGT, centrándose en el papel de la CSP en la exocitosis del acrosoma en los espermatozoides humanos, ya que este evento es crucial para la fertilización del ovocito.

A modo de conclusión proponemos que cuando los espermatozoides son estimulados y se activa la maquinaria de exocitosis del acrosoma, antes de que se produzca la salida del calcio desde el acrosoma hacia el citosol, la proteína  $\beta$ CSP interactúa con la proteína Hsc70, formando un complejo de chaperonas que asisten a las proteínas SNARE, después de que NSF/ $\alpha$ SNAP, las hayan desensamblado, dejándolas en un estado monomérico. En ese punto, el complejo de chaperonas colabora en el ensamble en configuración *trans* de las SNARE, produciendo el acercamiento de la membrana plasmática y acrosomal externa. Nuestra contribución al campo de la biología reproductiva fue presentar evidencia directa sobre la función de las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 en la exocitosis de los espermatozoides humanos. En la Figura 51 podemos observar el modelo propuesto, con sus actores principales.



**Figura 51. Modelo de la cascada de señalización que conduce a la RA.** Cuando el calcio entra a la célula a través de los poros generados por la SLO o mediante el tratamiento con el ionóforo A23187, se activa la adenilato ciclasa soluble (ACs) y se produce un incremento en los niveles de AMPc endógenos. El AMPc sintetizado estimula

a Epac y, a partir de este punto, la cascada de señalización se divide en dos ramas. En una de ellas se lleva a cabo la movilización de calcio acrosomal por la activación de canales presentes en la membrana acrosomal. La otra vía se caracteriza por el ensamble de complejos SNARE competentes para la fusión. Primero activando a NSF/ $\alpha$ SNAP para el desensamble de los complejos *cis*-SNARE a su estado monomérico. Y luego la participación de las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 auxiliando a las SNARE en su ensamble en configuración trans. El paso catalizado por las SNARE activas converge con el incremento local de calcio que proviene del acrosoma para lograr los pasos finales de la fusión de la membrana plasmática (MP) y la membrana acrosomal externa (MAE).

# **CONCLUSIONES**

## **Objetivos específicos:**

- 1. *Identificar y caracterizar la maquinaria molecular involucrada en el ensamblado de los complejos SNARE durante la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos.***

Determinamos la presencia de las proteínas  $\beta$ CSP, Hsc70 y SGTA en espermatozoides humanos y su localización en la región acrosomal. Caracterizamos químicamente a las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70, demostrando que  $\beta$ CSP tiene características hidrofóbicas y está unida a membrana, mientras que Hsc70 tiene características hidrofílicas. Además, reportamos el estado palmitoilado de la proteína  $\beta$ CSP en espermatozoides humanos.

- 2. *Establecer la función de las proteínas y chaperonas moleculares que participan en el ensamblado de los complejos SNARE en espermatozoides humanos.***

Demostramos la participación de  $\beta$ CSP y Hsc70 en la reacción acrosomal. No encontramos una relación directa de la proteína SGTA con la exocitosis del acrosoma. Produjimos exitosamente a las proteínas  $\beta$ CSP y Hsc70 de manera recombinante y logramos dilucidar el momento de acción de la proteína  $\beta$ CSP en la cascada de señalización que lleva a la RA. Demostramos que la proteína  $\beta$ CSP actúa antes de la salida del calcio acrosomal y aguas abajo de la chaperona NSF/ $\alpha$ SNAP.

- 3. *Establecer los cambios en la configuración de los complejos SNARE al bloquear la acción de las proteínas/chaperonas.***

Comprobamos que la proteína  $\beta$ CSP participa en el ensamblado de las SNARE en configuración *trans*. Además, pudimos determinar que el secuestro de la proteína  $\beta$ CSP impide las aposiciones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa.

- 4. *Examinar la modulación del proceso de ensamblado de los SNARE mediante la introducción al citosol de proteínas exógenas acopladas a péptidos de penetración celular (CPPs) en espermatozoides humanos.***

Diseñamos una proteína permeable capaz de ingresar a espermatozoides humanos por difusión a través de la membrana plasmática y formar complejos no funcionales con la proteína endógena Hsc70, inhibiendo la RA. Pudimos comparar exitosamente los modelos de trabajo en espermatozoides permeabilizados e intactos.

# REFERENCIAS

- Ackermann, F., Zitanski, N., Heydecke, D., Wilhelm, B., Gudermann, T., & Boekhoff, I. (2008). The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid raft-associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 757–768.
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333.
- Almers, W. (1990). Exocytosis. *Annual Review of Physiology*, 52, 607–624.
- Alvarez Sedó, C., Rawe, V. Y., & Chemes, H. E. (2012). Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Human Reproduction*, 27(7), 1912–1921.
- Arnold, C., Reisch, N., Leibold, C., Becker, S., Prüfert, K., Sautter, K., Palm, D., Jatzke, S., Buchner, S., & Buchner, E. (2004). Structure–function analysis of the cysteine string protein in *Drosophila*: cysteine string, linker and C terminus. *The Journal of Experimental Biology*, 207(8), 1323–1334.
- Barrachina, F., Battistone, M. A., Castillo, J., Mallofré, C., Jodar, M., Breton, S., & Oliva, R. (2022). Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. *Human Reproduction*, 37(4), 651–668.
- Belmonte, S. A., Mayorga, L. S., & Tomes, C. N. (2016). The Molecules of Sperm Exocytosis. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 220, 71–92.
- Benitez, B. A., Alvarado, D., Cai, Y., Mayo, K., Chakraverty, S., Norton, J., Morris, J. C., Sands, M. S., Goate, A., & Cruchaga, C. (2011). Exome-sequencing confirms DNAJC5 mutations as cause of adult neuronal ceroid-lipofuscinosis. *PloS One*, 6(11), e26741.
- Bertolla, R. P. (2020). Sperm biology and male reproductive health. *Scientific Reports*, 10(1), 21879.
- Boguenet, M., Bouet, P.-E., Spiers, A., Reynier, P., & May-Panloup, P. (2021). Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Human Reproduction Update*, 27(4), 697–719.
- Bohring, C., & Krause, W. (1999). The characterization of human spermatozoa membrane proteins--surface antigens and immunological infertility. *Electrophoresis*, 20(4-5), 971–976.
- Bonam, S. R., Ruff, M., & Muller, S. (2019). HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080849>
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(4), 1604–1607.

- Braun, J. E., Wilbanks, S. M., & Scheller, R. H. (1996). The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 25989–25993.
- Brunger, A. T. (2005). Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 38(1), 1–47.
- Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2014). Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(12 Pt B), 2610–2620.
- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (1993). Regulated exocytosis. *Biochemical Journal*, 293 ( Pt 2)(Pt 2), 305–316.
- Bustos, M. A., Lucchesi, O., Ruete, M. C., & Tomes, C. N. (2018). Membrane-permeable Rab27A is a regulator of the acrosome reaction: Role of geranylgeranylation and guanine nucleotides. *Cellular Signalling*, 44, 72–81.
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5).  
<https://doi.org/10.3390/ijms21051728>
- Carrasquel Martínez, G., Aldana, A., Carneiro, J., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2022). Acrosomal alkalization occurs during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 28(3), gaac005.
- Chadari, A. (2019). Molecular chaperones biochemistry and role in neurodegenerative diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 396–411.
- Chamberlain, L. H., & Burgoyne, R. D. (1997). The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31420–31426.
- Chamberlain, L. H., & Burgoyne, R. D. (2000). Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *Journal of Neurochemistry*, 74(5), 1781–1789.
- Coorssen, J. R., & Zorec, R. (2012). Regulated exocytosis per partes. *Cell Calcium*, 52(3-4), 191–195.
- Coppola, T., & Gunderson, C. (1996). Widespread expression of human cysteine string proteins. *FEBS Letters*, 391(3), 269–272.
- Dai, C., Zhang, Z., Shan, G., Chu, L.-T., Huang, Z., Moskovtsev, S., Librach, C., Jarvi, K., & Sun, Y. (2021). Advances in sperm analysis: techniques, discoveries and applications. *Nature Reviews. Urology*, 18(8), 447–467.

- Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernández-González, E. O., Nishigaki, T., Treviño, C. L., Wood, C., & Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, *131*(6), 977–988.
- Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, *581*(19), 3702–3710.
- De Blas, G. A., Roggero, C. M., Tomes, C. N., & Mayorga, L. S. (2005). Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biology*, *3*(10), e323.
- De Blas, G., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A., & Mayorga, L. S. (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(51), 49326–49331.
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, *13 Suppl 1*, 1–8.
- Díaz, A., Domínguez, L., Fornés, M. W., Burgos, M. H., & Mayorga, L. S. (1996). Acrosome content release in streptolysin O permeabilized mouse spermatozoa. *Andrologia*, *28*(1), 21–26.
- Du, L., Chen, W., Cheng, Z., Wu, S., He, J., Han, L., He, Z., & Qin, W. (2021). Novel Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis. *Cells*, *10*(3).  
<https://doi.org/10.3390/cells10030666>
- Dunleavy, J. E. M., O'Bryan, M. K., Stanton, P. G., & O'Donnell, L. (2019). The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*, *157*(2), R53–R72.
- Dun, M. D., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, *18*(4), 420–435.
- Eddy, E. M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Reviews of Reproduction*, *4*(1), 23–30.
- Edmonds, M. J., Geary, B., Doherty, M. K., & Morgan, A. (2017). Analysis of the brain palmitoyl-proteome using both acyl-biotin exchange and acyl-resin-assisted capture methods. *Scientific Reports*, *7*(1), 3299.
- Evans, G. J. O., & Morgan, A. (2005). Phosphorylation of cysteine string protein in the brain: developmental, regional and synaptic specificity. *The European Journal of Neuroscience*, *21*(10), 2671–2680.

- Evans, G. J., Wilkinson, M. C., Graham, M. E., Turner, K. M., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2001). Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47877–47885.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15781–15786.
- Fayomi, A. P., & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*, 29, 207–214.
- Fernández-Chacón, R., Wölfel, M., Nishimune, H., Tabares, L., Schmitz, F., Castellano-Muñoz, M., Rosenmund, C., Montesinos, M. L., Sanes, J. R., Schneggenburger, R., & Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron*, 42(2), 237–251.
- Fraser, L. R., Adeoya-Osiguwa, S. A., Baxendale, R. W., & Gibbons, R. (2006). Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, 1636–1645.
- Gadella, B. M., & Evans, J. P. (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 713, 65–80.
- Gage, M. J. (1998). Mammalian sperm morphometry. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 265(1391), 97–103.
- Graham, M. E., & Burgoyne, R. D. (2000). Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant alpha-SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1281–1289.
- Greaves, J., Lemonidis, K., Gorleku, O. A., Cruchaga, C., Grefen, C., & Chamberlain, L. H. (2012). Palmitoylation-induced aggregation of cysteine-string protein mutants that cause neuronal ceroid lipofuscinosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 37330–37339.
- Greaves, J., Salaun, C., Fukata, Y., Fukata, M., & Chamberlain, L. H. (2008). Palmitoylation and membrane interactions of the neuroprotective chaperone cysteine-string protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 25014–25026.
- Gundersen, C. B. (2020). Cysteine string proteins. *Progress in Neurobiology*, 188, 101758.

- Gundersen, C. B., Kohan, S. A., Souda, P., Whitelegge, J. P., & Umbach, J. A. (2010). Cysteine string protein beta is prominently associated with nerve terminals and secretory organelles in mouse brain. *Brain Research*, 1332, 1–11.
- Gundersen, C. B., & Umbach, J. A. (1992). Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel. *Neuron*, 9(3), 527–537.
- Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., & Sun, F. (2019). Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 17(1), 66.
- Harper, C. V., Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., & Kirkman-Brown, J. C. (2006). Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 75(6), 933–939.
- Henderson, M. X., Wirak, G. S., Zhang, Y.-Q., Dai, F., Ginsberg, S. D., Dolzhanskaya, N., Staropoli, J. F., Nijssen, P. C. G., Lam, T. T., Roth, A. F., Davis, N. G., Dawson, G., Velinov, M., & Chandra, S. S. (2016). Neuronal ceroid lipofuscinosis with DNAJC5/CSP $\alpha$  mutation has PPT1 pathology and exhibit aberrant protein palmitoylation. *Acta Neuropathologica*, 131(4), 621–637.
- Hernández-Silva, G., & Chirinos, M. (2019). Proteins from male and female reproductive tracts involved in sperm function regulation. *Zygote*, 27(1), 5–16.
- Hernández-Silva, G., Durand, M., Larrea, F., & Chirinos, M. (2018). Proteomic changes in uterine flushings after levonorgestrel treatment and effects on sperm function. *Reproduction*, 156(6), 477–486.
- Hess, R. A., & Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636, 1–15.
- Hiller, S. (2019). Chaperone-Bound Clients: The Importance of Being Dynamic. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(6), 517–527.
- Hinault, M.-P., Ben-Zvi, A., & Goloubinoff, P. (2006). Chaperones and proteases: cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 30(3), 249–265.
- Hirohashi, N., & Yanagimachi, R. (2018). Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of Reproduction*, 99(1), 127–133.
- Howl, J., Silva, J. V., Fardilha, M., & Jones, S. (2022). Protein Mimicry and the Design of Bioactive Cell-Penetrating Peptides: The Genesis of STOPSPERM Biopptides. *Methods in Molecular Biology*, 2383, 293–306.

- Hutt, D. M., Baltz, J. M., & Ngsee, J. K. (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(21), 20197–20203.
- Inaba, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*, *17*(8), 524–538.
- Ito, C., & Toshimori, K. (2016). Acrosome markers of human sperm. *Anatomical Science International*, *91*(2), 128–142.
- Jahn, R., Lang, T., & Südhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell*, *112*(4), 519–533.
- Jahn, R., & Südhof, T. C. (1999). Membrane Fusion and Exocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *68*(1), 863–911.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, *70*(1), 219–228.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 4892–4896.
- Jones, S., Lukanowska, M., Suhorutsenko, J., Oxenham, S., Barratt, C., Publicover, S., Copolovici, D. M., Langel, Ü., & Howl, J. (2013). Intracellular translocation and differential accumulation of cell-penetrating peptides in bovine spermatozoa: evaluation of efficient delivery vectors that do not compromise human sperm motility. *Human Reproduction*, *28*(7), 1874–1889.
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(8), 579–592.
- Kaur Gill-Sharma, M., Choudhuri, J., & D'Souza, S. (2011). Sperm Chromatin Protamination: An Endocrine Perspective. *Protein and Peptide Letters*, *18*(8), 786–801.
- Khvotchev, M., & Soloviev, M. (2022). SNARE Modulators and SNARE Mimetic Peptides. *Biomolecules*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/biom12121779>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*, 323–355.
- Kim, Y.-H., Haidl, G., Schaefer, M., Egner, U., Mandal, A., & Herr, J. C. (2007). Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology*, *302*(2), 463–476.

- Kubota, S., Doi, H., Koyano, S., Tanaka, K., Komiya, H., Katsumoto, A., Ikeda, S., Hashiguchi, S., Nakamura, H., Fukai, R., Takahashi, K., Kunii, M., Tada, M., Takeuchi, H., & Tanaka, F. (2021). SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative diseases. *Molecular Brain*, 14(1), 59.
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), 508–520.
- Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction*, 97(4), 522–536.
- Leung, M. R., Ravi, R. T., Gadella, B. M., & Zeev-Ben-Mordehai, T. (2021). Membrane Remodeling and Matrix Dispersal Intermediates During Mammalian Acrosomal Exocytosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 765673.
- Leveque, C., Pupier, S., Marqueze, B., Geslin, L., Kataoka, M., Takahashi, M., De Waard, M., & Seagar, M. (1998). Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13488–13492.
- Li, G. C., Li, L. G., Liu, Y. K., Mak, J. Y., Chen, L. L., & Lee, W. M. (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1681–1685.
- Liu, S.-T., & Wang, C. (2005). Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(2), 253–263.
- Lishko, P. V., & Mannowetz, N. (2018). CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. *Current Opinion in Physiology*, 2, 109–113.
- Liu, F. H., Wu, S. J., Hu, S. M., Hsiao, C. D., & Wang, C. (1999). Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34425–34432.
- Li, Y.-Y., Jia, Y.-P., Duan, L.-Y., & Li, K.-M. (2020). Participation of the inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channel in the zona pellucida- and progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 22(2), 192–199.
- Lopez, C. I., Belmonte, S. A., De Blas, G. A., & Mayorga, L. S. (2007). Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(14), 4121–4130.

- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A., & Treviño, C. L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, *20*(7), 619–629.
- Magalhães, J. A., Ribeiro, L. S., Rego, J. P. A., & Andrade, C. R. de. (2021). Current markers for infertility in men. *JBRA Assisted Reproduction*, *25*(4), 592–600.
- Martin, T. F. J. (2003). Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1641*(2), 157–165.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *62*(6), 670–684.
- Mayorga, L., Altamirano, K., Zanni Ruiz, E., & Pavarotti, M. (2020). Human sperm capacitation is necessary for SNARE assembly in neurotoxin-resistant complexes. *Andrology*, *8*(2), 442–449.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N., & Belmonte, S. A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life*, *59*(4-5), 286–292.
- Meizel, S., & Turner, K. O. (1991). Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *77*(1-3), R1–R5.
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., & Tesarik, J. (1992). Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *Journal of Reproduction and Fertility*, *95*(3), 755–763.
- Moreno, R. D. (2023). Human globozoospermia-related genes and their role in acrosome biogenesis. *WIREs Mechanisms of Disease*, *15*(2), e1589.
- Morgan, A., & Burgoyne, R. D. (1995). Is NSF a fusion protein? *Trends in Cell Biology*, *5*(9), 335–339.
- Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 895502.
- Mundy, A. J., Ryder, T. A., & Edmonds, D. K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Human Reproduction*, *10*(1), 116–119.

- Narberhaus, F. (2002). Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(1), 64–93; table of contents.
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26.
- Ohtsuka, K. (1993). Cloning of a cDNA for Heat-Shock Protein hsp40, a Human Homolog of Bacterial DnaJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(1), 235–240.
- Okabe, M. (2016). The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 220, 1–13.
- Patel, P., Prescott, G. R., Burgoyne, R. D., Lian, L.-Y., & Morgan, A. (2016). Phosphorylation of Cysteine String Protein Triggers a Major Conformational Switch. *Structure*, 24(8), 1380–1386.
- Pathak, U. I., Gabrielsen, J. S., & Lipshultz, L. I. (2020). Cutting-Edge Evaluation of Male Infertility. *The Urologic Clinics of North America*, 47(2), 129–138.
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 92(3-4), 255–266.
- Pencheva, M., Keskinova, D., Rashev, P., Koeva, Y., & Atanassova, N. (2021). Localization and Distribution of Testicular Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) in Neck and Mid-Piece of Spermatozoa from Infertile Men in Relation to Sperm Motility. *Cells*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/cells10123572>
- Philp, L. K., Day, T. K., Butler, M. S., Laven-Law, G., Jindal, S., Hickey, T. E., Scher, H. I., Butler, L. M., & Tilley, W. D. (2016). Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein Alpha (SGTA) Ablation Limits Offspring Viability and Growth in Mice. *Scientific Reports*, 6, 28950.
- Pink, D., Donnelier, J., Lewis, J. D., & Braun, J. E. A. (2021). Cysteine String Protein Controls Two Routes of Export for Misfolded Huntingtin. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 762439.
- Plachot, M. (2000). Fertilization. *Human Reproduction*, 15 Suppl 4, 19–30.
- Prescott, G. R., Jenkins, R. E., Walsh, C. M., & Morgan, A. (2008). Phosphorylation of cysteine string protein on Serine 10 triggers 14-3-3 protein binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(3), 809–814.

- Pryde, J. G., & Phillips, J. H. (1986). Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton X-114. Application to subcellular fractions of the adrenal medulla. *Biochemical Journal*, 233(2), 525–533.
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 72.
- Qiu, X.-B., Shao, Y.-M., Miao, S., & Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(22), 2560–2570.
- Quan, S., & Bardwell, J. C. A. (2012). Chaperone discovery. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 34(11), 973–981.
- Redgrove, K. A., Anderson, A. L., McLaughlin, E. A., O'Bryan, M. K., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2013). Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition. *Molecular Human Reproduction*, 19(3), 120–135.
- Ren, X., Chen, X., Wang, Z., & Wang, D. (2017). Is transcription in sperm stationary or dynamic? *The Journal of Reproduction and Development*, 63(5), 439–443.
- Reynolds, S., Ismail, N. F. B., Calvert, S. J., Pacey, A. A., & Paley, M. N. J. (2017). Evidence for Rapid Oxidative Phosphorylation and Lactate Fermentation in Motile Human Sperm by Hyperpolarized <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectroscopy. *Scientific Reports*, 7(1), 4322.
- Rizo, J., & Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 665–674.
- Roberts, J. D., Thapaliya, A., Martínez-Lumbreras, S., Krysztofinska, E. M., & Isaacson, R. L. (2015). Structural and Functional Insights into Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2, 71.
- Roggero, C. M., De Blas, G. A., Dai, H., Tomes, C. N., Rizo, J., & Mayorga, L. S. (2007). Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26335–26343.
- Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M. H., Helin, K., Nylandsted, J., & Jäättelä, M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & Development*, 19(5), 570–582.
- Ruete, M. C., Lucchesi, O., Bustos, M. A., & Tomes, C. N. (2014). Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm's acrosome during exocytosis. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 12, 43.

- Ruete, M. C., Zarelli, V. E. P., Masone, D., de Paola, M., Bustos, D. M., & Tomes, C. N. (2019). A connection between reversible tyrosine phosphorylation and SNARE complex disassembly activity of N-ethylmaleimide-sensitive factor unveiled by the phosphomimetic mutant N-ethylmaleimide-sensitive factor-Y83E. *Molecular Human Reproduction*, *25*(7), 344–358.
- Ruggieri, A., Saredi, S., Zanotti, S., Pasanisi, M. B., Maggi, L., & Mora, M. (2016). DNAJB6 Myopathies: Focused Review on an Emerging and Expanding Group of Myopathies. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *3*, 63.
- Rupawala, H., Shah, K., Davies, C., Rose, J., Colom-Cadena, M., Peng, X., Granat, L., Aljuhani, M., Mizuno, K., Troakes, C., Perez-Nievas, B. G., Morgan, A., So, P.-W., Hortobagyi, T., Spires-Jones, T. L., Noble, W., & Giese, K. P. (2022). Cysteine string protein alpha accumulates with early pre-synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain Communications*, *4*(4), fcac192.
- Ryu, J.-K., Jahn, R., & Yoon, T.-Y. (2016). Review: Progresses in understanding N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) mediated disassembly of SNARE complexes. *Biopolymers*, *105*(8), 518–531.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(10), 630–642.
- Schluter, O. M., Khvotchev, M., Jahn, R., & Sudhof, T. C. (2002). Localization versus function of Rab3 proteins: evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(43), 40919–40929.
- Schmidt, B. Z., Watts, R. J., Aridor, M., & Frizzell, R. A. (2009). Cysteine string protein promotes proteasomal degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by increasing its interaction with the C terminus of Hsp70-interacting protein and promoting CFTR ubiquitylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4168–4178.
- Schmitz, F., Tabares, L., Khimich, D., Strenzke, N., de la Villa-Polo, P., Castellano-Muñoz, M., Bulankina, A., Moser, T., Fernández-Chacón, R., & Südhof, T. C. (2006). CSPalpha-deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2926–2931.
- Schoch, S., Deák, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T. C., & Kavalali, E. T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science*, *294*(5544), 1117–1122.
- Sharma, M., Burré, J., & Südhof, T. C. (2011). CSPα promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature Cell Biology*, *13*(1), 30–39.

- Shirafuji, T., Ueyama, T., Adachi, N., Yoshino, K.-I., Sotomaru, Y., Uwada, J., Kaneoka, A., Ueda, T., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N., & Sakai, N. (2018). The Role of Cysteine String Protein  $\alpha$  Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase C $\gamma$  for Presynaptic Maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(2), 278–290.
- Simons, J., & Fauci, L. (2018). A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Bulletin of Mathematical Biology*, 80(9), 2481–2501.
- Sisti, G., Kanninen, T. T., Ramer, I., & Witkin, S. S. (2015). Interaction between the inducible 70-kDa heat shock protein and autophagy: effects on fertility and pregnancy. *Cell Stress & Chaperones*, 20(5), 753–758.
- Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A., & Lee, J. E. (2021). The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *The Journal of Cell Biology*, 220(10). <https://doi.org/10.1083/jcb.202102146>
- Smith, G. B., Umbach, J. A., Hirano, A., & Gundersen, C. B. (2005). Interaction between constitutively expressed heat shock protein, Hsc 70, and cysteine string protein is important for cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32669–32675.
- Söllner, T. H. (2003). Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Molecular Membrane Biology*, 20(3), 209–220.
- Stahl, B., Tobaben, S., & Südhof, T. C. (1999). Two distinct domains in hsc70 are essential for the interaction with the synaptic vesicle cysteine string protein. *European Journal of Cell Biology*, 78(6), 375–381.
- Stojilkovic, S. S. (2005). Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 16(3), 81–83.
- Stricher, F., Macri, C., Ruff, M., & Muller, S. (2013). HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, 9(12), 1937–1954.
- Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>
- Sun, P., Wang, Y., Gao, T., Li, K., Zheng, D., Liu, A., & Ni, Y. (2021). Hsp90 modulates human sperm capacitation via the Erk1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 19(1), 39.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347–353.

- Swayne, L. A., Blattler, C., Kay, J. G., & Braun, J. E. A. (2003). Oligomerization characteristics of cysteine string protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(4), 921–926.
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J., & Südhof, T. C. (2006). A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 126(6), 1175–1187.
- Thorn, P., Zorec, R., Rettig, J., & Keating, D. J. (2016). Exocytosis in non-neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, 137(6), 849–859.
- Tiwari, S. S., d'Orange, M., Troakes, C., Shurovi, B. N., Engmann, O., Noble, W., Hortobágyi, T., & Giese, K. P. (2015). Evidence that the presynaptic vesicle protein CSPalpha is a key player in synaptic degeneration and protection in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 8, 6.
- Tobaben, S., Thakur, P., Fernández-Chacón, R., Südhof, T. C., Rettig, J., & Stahl, B. (2001). A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron*, 31(6), 987–999.
- Tobaben, S., Varoqueaux, F., Brose, N., Stahl, B., & Meyer, G. (2003). A brain-specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein binds to Hsc70 and the cysteine string protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38376–38383.
- Tomes, C. N. (2007). Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 275–291.
- Tomes, C. N., De Blas, G. A., Michaut, M. A., Farré, E. V., Cherhitin, O., Visconti, P. E., & Mayorga, L. S. (2005).  $\alpha$ -SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction*, 11(1), 43–51.
- Tomes, C. N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., & Mayorga, L. S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Developmental Biology*, 243(2), 326–338.
- Toshimori, K., & Ito, C. (2003). Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of Histology and Cytology*, 66(5), 383–396.
- Touré, A., Martinez, G., Kherraf, Z.-E., Cazin, C., Beurois, J., Arnoult, C., Ray, P. F., & Coutton, C. (2021). The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Human Genetics*, 140(1), 21–42.
- Trotta, A. P., Need, E. F., Butler, L. M., Selth, L. A., O'Loughlin, M. A., Coetzee, G. A., Tilley, W. D., & Buchanan, G. (2012). Subdomain structure of the co-chaperone SGTA and activity of its androgen receptor client. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(2), 57–68.

- Ward, W. S., Steven Ward, W., & Coffey, D. S. (1991). DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cell. In *Biology of Reproduction* (Vol. 44, Issue 4, pp. 569–574). <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569>
- Wassarman, P. M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, *96*(2), 175–183.
- Wu, M. N., Fergestad, T., Lloyd, T. E., He, Y., Broadie, K., & Bellen, H. J. (1999). Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo. *Neuron*, *23*(3), 593–605.
- Wu, S., Yan, M., Ge, R., & Cheng, C. Y. (2020). Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. *Trends in Molecular Medicine*, *26*(2), 215–231.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., & Mayorga, L. S. (2000). Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *62*(4), 1084–1089.
- Zabeo, D., Heumann, J. M., Schwartz, C. L., Suzuki-Shinjo, A., Morgan, G., Widlund, P. O., & Höög, J. L. (2018). A lumenal interrupted helix in human sperm tail microtubules. *Scientific Reports*, *8*(1), 2727.
- Zanetti, N., & Mayorga, L. S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, *81*(2), 396–405.
- Zaneveld, L. J. D., De Jonge, C. J., & Anderson, R. A. (1991). Opinion: human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human*. <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/6/9/1265/616099>
- Zeginiadou, T., Papadimas, J., & Mantalenakis, S. (2000). Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, *32*(6), 335–343.
- Zhang, Y., & Hughson, F. M. (2021). Chaperoning SNARE Folding and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, *90*, 581–603.
- Zinsmaier, K. E., Hofbauer, A., Heimbeck, G., Pflugfelder, G. O., Buchner, S., & Buchner, E. (1990). A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics*, *7*(1), 15–29.
- Zorko, M., Jones, S., & Langel, Ü. (2022). Cell-penetrating peptides in protein mimicry and cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *180*, 114044.