



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
Carrera de Ciencias Biológicas.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR $mPR\alpha$ EN LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA MEDIADA POR LA PROGESTERONA

Tesinista: Natalia Andrea Trillini

Firma:

Director: Dr. Héctor Alejandro Guidobaldi

Firma:

Centro de Biología Celular y Molecular, FCEFyN, UNC.

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (UNC, CONICET)

Av. Vélez Sarsfield (1611), Córdoba, Argentina

**PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR mPR α EN LA RESPUESTA
QUIMIOTÁCTICA MEDIADA POR LA PROGESTERONA**

Tribunal Examinador

Laura C. Giojalas

Firma:

María A. Rivarola

Firma:

Eduardo M. Clop

Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice	Pág.
Resumen	3
Introducción	4
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Materiales y métodos	11
1-Consideraciones Éticas	11
2-Reactivos y medios de cultivo	11
3-Obtención y preparación de espermatozoides	11
4-Evaluación de la respuesta quimiotáctica	12
5-Determinación de la acumulación celular	13
6-Evaluación de la participación del receptor mPR α en la vía de señalización que regula la quimioatracción	14
7-Medición de calcio intracelular por citometría de flujo	14
8-Evaluación de los parámetros cinéticos de los espermatozoides	15
9-Análisis estadístico	15
Resultados	16
1-Characterización de la respuesta quimiotáctica inducida por 19-CH ₂ -P ₄ , agonista selectivo del receptor mPR α	16
2-Participación del receptor mPR α en la orientación quimiotáctica mediada por la progesterona	21
3-Vías de señalización intracelular que regulan la quimiotaxis mediada por el mPR α	22
a. Participación de la vía tmAC-AMPC	22
b. Participación del calcio intracelular	24
Discusión	27
Bibliografía	32
Agradecimientos	37

Resumen:

En los mamíferos, el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito es un proceso que está altamente regulado. El viaje de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación es complejo, a través de una arquitectura de pliegues y bolsillos presentes en el oviducto. El espermatozoide, durante su viaje debe madurar fisiológicamente para poder fecundar. Además de su propia movilidad, los espermatozoides son ayudados por distintos mecanismos de transporte que facilitan el encuentro con el gameto femenino, entre ellos la quimiotaxis. Esta se define como la orientación del movimiento del espermatozoide siguiendo un gradiente de concentración de un attractante. Y se ha demostrado que las células del cumulus que rodean al ovocito, secretan progesterona y que ésta, orientaría a los espermatozoides aptos para fecundar *in vivo*. Para poder detectar el gradiente de concentración, los espermatozoides necesitan de receptores. Y debido a que esta es una respuesta celular rápida, estaría participando un receptor de progesterona de membrana. Hasta el momento se han descrito numerosos receptores de la vía rápida, como el componente 1 del receptor de membrana de progesterona (PMR1), el receptor ABHD2, el canal de calcio CatSper y el receptor mPR α . Pero a pesar de ello, aún no se ha identificado si alguno de estos participa en la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona. En el caso del receptor mPR α , es una proteína de 7 pasos transmembrana asociado a proteína G y que se localiza en la pieza intermedia en espermatozoides de humano. Este tipo de receptores, participan en la respuesta quimiotáctica de espermatozoides hacia otras moléculas como *chemokines* o compuestos odoríferos. Recientemente, se ha identificado que una progestina sintética 10-etenil-19-norprogesterona (19-CH₂-P₄), actúa como agonista selectivo de alta afinidad del mPR α y que permitiría evaluar la participación de este receptor en la quimiotaxis mediada por la progesterona. Primero, caracterizamos la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄ mediante ensayos de dosis respuesta. La progestina indujo una respuesta quimiotáctica en forma de campana a concentraciones picomolares sin afectar la movilidad ni el patrón de movimiento espermático. Además, se constató, que sólo los espermatozoides aptos para fecundar respondieron quimiotácticamente. También, la presencia de la progestina inhibió la quimiotaxis inducida por la progesterona, y se verificó que la progestina activa algunas de las mismas vías de señalización que la progesterona, como la tmAC/AMPC y movilización de calcio intracelular. El conjunto de resultados obtenidos en esta tesina sugiere que la progesterona induciría quimiotaxis espermática a través del receptor mPR α .

Palabras Claves: Quimiotaxis; mPR α ; progesterona; 19-CH₂-P₄

Introducción

La fecundación es el resultado de la unión de un gameto masculino (el espermatozoide) y uno femenino (el ovocito), la cual da lugar a la formación de un nuevo individuo. Éste, es un evento complejo y en mamíferos ocurre en el interior del aparato reproductor de la hembra. El macho, deposita el semen (una sustancia viscosa compuesta por plasma seminal y los espermatozoides) en la vagina de la hembra (figura 1). Allí, los espermatozoides se liberan por su propia movilidad del plasma seminal, y comienzan un largo viaje hasta el sitio de fecundación en el oviducto. Primero deben atravesar el cérvix; que es un canal que comunica la vagina con el útero y contiene el moco cervical, que actúa como filtro dejando pasar solo a aquellos espermatozoides que presentan una morfología normal y buena movilidad (Suarez and Pacey, 2006; Tulsiani and Abou-Haila, 2012). El tránsito de los espermatozoides por el útero es rápido y está mediado por contracciones uterinas que ayudan a los espermatozoides a llegar al oviducto (Suarez and Pacey, 2006) (figura 1). Una vez en el oviducto, los espermatozoides se adhieren al epitelio en la región del istmo oviductal, formando un “reservorio espermático” (Suarez, 2002). Antes de poder fecundar, los espermatozoides deben completar un proceso de capacitación que consiste en una serie de cambios biofísico-químicos que le permitirá encontrar el ovocito, atravesar las cubiertas que lo rodean y fusionarse con él (De Jonge, 2005). La capacitación es un proceso tiempo dependiente y asincrónico, que va produciendo pequeñas subpoblaciones de espermatozoides capacitados que están disponibles en el tiempo, a la espera de un ovocito con el fin de maximizar el éxito reproductivo (Giojalas *et al.*, 2004). En tanto que, el ovocito, cuando es ovulado se encuentra inmerso en una matriz gelatinosa producida por las células del cumulus que lo rodean (figura 1); luego de la ovulación es capturado por las fimbrias del oviducto, ingresa al ampulla y es trasladado por el movimiento de las cilias del epitelio oviductal hacia el sitio de fecundación, entre el istmo y el ampulla (figura 1).

Una vez completada la capacitación, los espermatozoides se liberan del epitelio y continúan la búsqueda del gameto femenino. Sin embargo, el viaje hacia el sitio de fecundación, implica recorrer un largo camino a través de la compleja estructura de pliegues y bolsillos que presenta el oviducto (Yániz *et al.*, 2000) (figura 1). En estas condiciones, además de su propia movilidad, los espermatozoides se valen de algunos mecanismos de orientación que facilitarían el encuentro de las gametas. Hasta el momento, se han descrito que participarían mecanismos de transporte en masa, como las contracciones oviductales, que acarrearán a los espermatozoides junto con el fluido oviductal (Guidobaldi *et al.*, 2012) (figura 2). Y también, se han caracterizado mecanismos que guían de manera específica, sólo a los

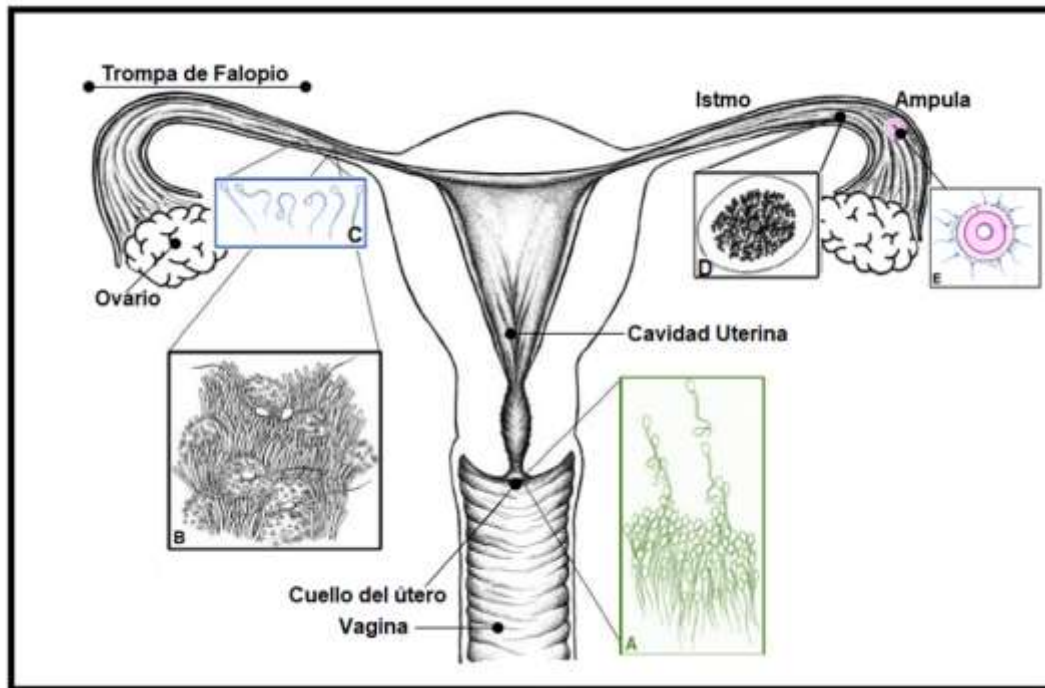


Figura 1: Representación del transporte espermático dentro del aparato reproductor femenino.

A) Espermatozoides no capacitados (verdes) depositados en vagina B) Espermatozoides adheridos al epitelio oviductal, conformando el “reservorio espermático” C) Espermatozoides capacitados (azules) D) Luz de Ámpula de la trompa de Falopio E) Fecundación.

espermatozoides capacitados como la termotaxis (Bahat *et al.*, 2005), la reotaxis (Miki and Clapham, 2013) y la quimiotaxis (figura 2). Esta última se define como la orientación del movimiento del espermatozoide siguiendo un gradiente de concentración de una sustancia atractante (Giojalas *et al.*, 2015). En mamíferos, la quimiotaxis ha sido caracterizado en humanos (Villanueva-Díaz *et al.*, 1995; Teves *et al.*, 2006), ratones (Oliveira *et al.*, 1999; Ernesto *et al.*, 2015), conejos (Fabro *et al.*, 2002; Guidobaldi *et al.*, 2008), bovinos (Gil *et al.*, 2008; Dominguez *et al.*, 2018) y equinos (Dominguez *et al.*, 2018).

Hasta el momento se han identificado numerosas sustancias quimioattractantes, siendo la progesterona la que presenta mayor relevancia fisiológica (Giojalas *et al.*, 2015) (Figura 3). Esta hormona es secretada por las células del cumulus que rodean al ovocito, formando un gradiente de concentración en la matriz del cumulus que difunde hacia las inmediaciones del mismo y que puede extenderse hacia el istmo, debido el movimiento del fluido mediado por la cilias del epitelio oviductal (Sun *et al.*, 2005; Guidobaldi *et al.*, 2008, 2012). En condiciones experimentales *in vitro*, se ha demostrado que la progesterona puede actuar como quimioattractante a concentraciones picomolares en todas las especies caracterizadas (Giojalas *et al.*, 2015), lo cual es consistente con la capacidad de secreción de progesterona cuantificada

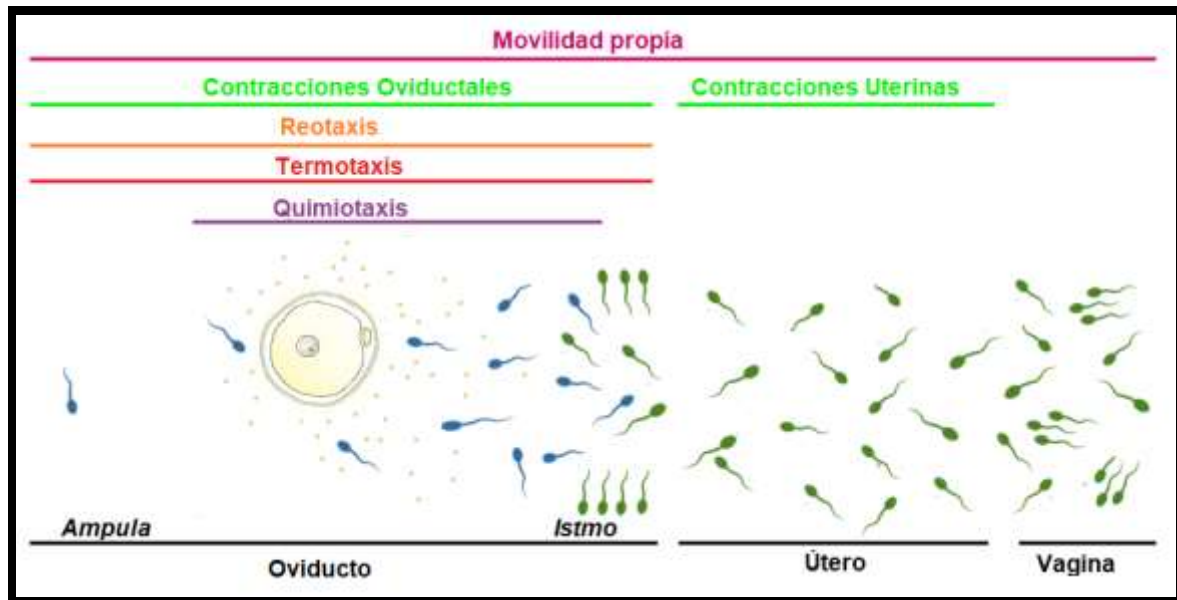


Figura 2: Eventos que participan en el transporte de los espermatozoides hacia el ovulo y sus posibles rangos de acción dentro del tracto reproductivo femenino. Espermatozoides no capacitados en verde y capacitados en azules. Moléculas de quimioattractante en amarillo.

en las células del cumulus (Guidobaldi, 2008). Por lo tanto, en base a lo referido anteriormente, la quimioatracción mediada por la progesterona facilitaría el encuentro de las gametas *in vivo*.

Por otro lado, una vez ocurrida la fecundación, es necesario evitar que otros espermatozoides lleguen a fusionarse con el ovocito para evitar la poliespermia; ya que la fusión de múltiples espermatozoides desencadena errores en la segregación de los cromosomas durante las primeras mitosis, conllevando a la degeneración del embrión (Gardner and Evans, 2006). Recientemente se ha demostrado en mamíferos, que los espermatozoides pueden ser repelidos *in vitro* por un gradiente de concentración de algunos compuestos esteroideos (acetato de ulipristal, mifepristona y levonorgestrel) y el zinc (Guidobaldi *et al.*, 2017a). Sin embargo y más importante, es que la presencia de estas sustancias puede convertir el gradiente quimioattractante de progesterona en uno quimiorepelente (Guidobaldi *et al.*, 2017a). Dado que el zinc es liberado por el ovocito inmediatamente luego de la fecundación (Kim *et al.*, 2011) es posible que la quimiorepulsión evite en una primera instancia la poliespermia. Por lo tanto, los mecanismos de quimioatracción y quimiorepulsión adquieren un papel relevante en la regulación del proceso de fecundación. Y en ambos mecanismos, participaría el gradiente de progesterona, por lo que es importante comprender los mecanismos moleculares subyacentes.

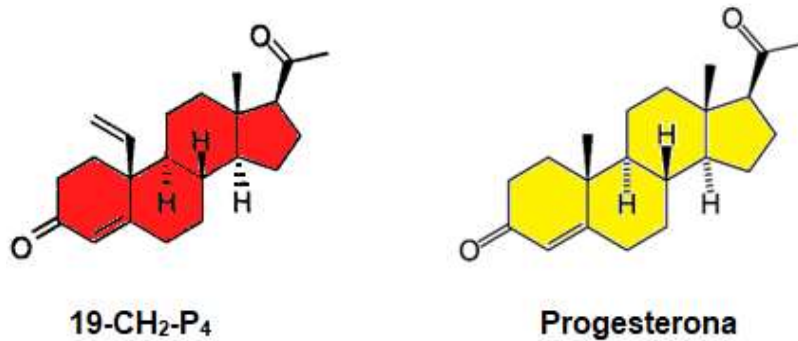


Figura 3: Estructura química de la progesterona y el agonista selectivo del mPR α : 19-CH₂-P₄

En otros modelos celulares, la señalización de la quimiotaxis y la quimiorrepulsión pueden estar mediada por las mismas moléculas (Vianello *et al.*, 2005); esto permite suponer que en los espermatozoides, ambos mecanismos de orientación podrían compartir las mismas vías de señalización o parte de ellas. Experimentos preliminares de nuestro laboratorio, han demostrado que en la quimiorrepulsión participan algunos de los elementos de la vía de señalización de la quimioatracción (Teves *et al.* 2009; Guidobaldi "Comentario personal"). Si bien la progesterona es una molécula permeable a la membrana plasmática del espermatozoides, la orientación quimiotáctica es una respuesta rápida, lo cual sugiere la necesidad de la participación de un receptor de membrana (Giojalas *et al.*, 2015). Hasta el momento se han sugerido varios receptores de progesterona de membrana, pero ninguno ha sido vinculado a la respuesta quimiotáctica.

El único estudio funcional para caracterizar un receptor de quimiotaxis se realizó en conejos utilizando anticuerpos contra el receptor nuclear de progesterona. Mediante un ensayo de bloqueo de función, se comprobó que la presencia de anticuerpos inhibía la respuesta quimioatractante de la progesterona (Guidobaldi *et al.*, 2008). Además, los ensayos de inmunocitoquímica con el mismo anticuerpo, ubican un receptor de progesterona en la cabeza del espermatozoide en conejo, y en la pieza media en humanos (Guidobaldi *et al.*, 2008). Sin embargo, los receptores nucleares de progesterona con los que fueron desarrollados estos anticuerpos tienen una distribución citoplasmática y no se ha reportado su presencia en la membrana. Por otro lado se ha demostrado que en los espermatozoides de mamíferos existe un canal de calcio específico de estas células, denominado CatSper que está asociado a movilidad y es activado por progesterona (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011), aunque no se ha identificado un sitio de unión para esta hormona en él. Sin embargo, los inhibidores de CatSper afectan la movilidad espermática por lo que no se ha podido comprobar su participación en la respuesta quimiotáctica mediada por progesterona. No obstante,

recientemente se ha reportado que el receptor ABHD2 presente en espermatozoides une progesterona y que rápidamente activaría CatSper a través de la degradación de un endocannabinoide (2-aracquidonicglicerol), que actúa como inhibidor de CatSper (Miller *et al.*, 2016). Sin embargo en ratones, la activación de CatSper está asociado al proceso de hiperactivación espermática, el cual es un movimiento vigoroso del flagelo que le permite avanzar al espermatozoide en medios altamente viscoso; en esta especie, y se ha observado que la hiperactivación mediada por CatSper está modulada por sustancias quimioattractantes (Ernesto *et al.*, 2015). Por lo tanto, la participación de CatSper como receptor de progesterona en quimiotaxis de mamíferos todavía es incierta.

Otro potencial receptor de progesterona identificado en espermatozoides es el componente 1 del receptor de membrana de progesterona (PGMRC1); esta es una proteína presente en vertebrados de 26-28 kDa con un solo dominio transmembrana, que también se asocia a las respuestas rápidas de progesterona en varios tipos de tejidos. Por lo cual, al ser la quimiotaxis una respuesta rápida, esta podría estar mediada por este receptor. El PGMRC1 presenta un abanico de ligandos de diferentes afinidades, entre ellos se puede mencionar el colesterol, glucocorticoides, la progesterona y otros esteroides; siendo la progesterona la que tiene mayor afinidad, pero no especificidad por este receptor. También se observó que esta proteína forma complejos con otras, por lo cual puede formar parte como “proteína adaptadora” de un receptor de membrana de progesterona, que le permite a la hormona iniciar sus acciones. Ahora bien, en espermatozoides más particularmente, se halló que PGMRC1 está localizado en la cabeza. Falkenstein *et al.* (1999), demostraron que el rápido aumento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a la progesterona se redujo significativamente después de la incubación de espermatozoides con un anticuerpo contra PGMRC1 en chanchos. Además, la reacción acrosómica iniciada por la progesterona fue inhibida en un 60% por este anticuerpo, lo que sugiere que el PGMRC1 estaría más asociado a la reacción acrosomal, aunque su participación en quimiotaxis no se ha comprobado (Falkenstein *et al.*, 1999; Thomas, 2008; Schwartz *et al.*, 2016)

Por otro lado, se ha identificado y caracterizado en espermatozoides de mamífero otro receptor de membrana para la progesterona, el mPR α (*membrane progesterone receptor alpha*); este es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de las adiponectinas (PAQR); con siete dominios transmembrana compuesto por 346 aa, con un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal intracelular (figura 4). Este receptor se identificó por primera vez en ovarios de teleósteos y posteriormente en otros vertebrados como ratones, ratas, cerdos, ovejas, toro y humanos (Zhu *et al.*, 2003a; Thomas, 2008; Tan *et al.*,

2014). Está presente en varios tejidos como testículos, ovarios, cerebro, hipófisis y placenta, entre otros, en consonancia con los roles reguladores conocidos de la progesterona en las funciones reproductiva y endocrina. En cuanto su localización subcelular en el espermatozoide, se observó su ubicación en la pieza media en los teleósteos y principalmente en la pieza intermedia en humanos (Thomas, 2008; Kelder *et al.*, 2010). Se sabe también que el mPR α unido a progestinas en teleósteos induce hipermovilidad a partir de activación de proteínas G (Thomas, 2008; Schwartz *et al.*, 2016). Es interesante notar, que en mamíferos, ciertos compuestos como *chemokines* o compuestos odoríferos, inducen quimioatracción a través de receptores de siete pasos transmembrana unidos a proteína G (Isobe *et al.*, 2002; Spehr *et al.*, 2003; Veitinger *et al.*, 2011b; Zuccarello *et al.*, 2011). Sin embargo, la participación del receptor mPR α en la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona tampoco ha sido evaluado. Recientemente Kelder *et al.* (2010) identificaron que la progestina sintética 10-etenil-19-norprogesterona (19-CH₂-P₄) (figura 3), actúa como agonista selectivo de alta afinidad del mPR α mostrando una mayor actividad agonista que la progesterona; y que además, no muestra ninguna actividad significativa hacia el receptor nuclear de progesterona (Thomas, 2012). Por lo tanto, la progestina 19-CH₂-P₄ se presenta como una herramienta importante para caracterizar la participación del receptor mPR α en la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona.

En base a los antecedentes planteados se propone la siguiente hipótesis: “el receptor mPR α participa en la orientación quimiotáctica mediada por la progesterona en espermatozoides de mamíferos”.

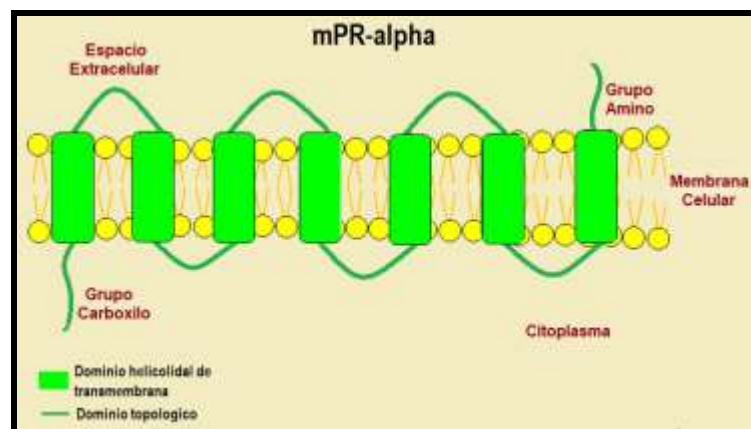


Figura 4: Representación esquemática del receptor mPR α . La proteína presenta siete dominios con un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal intracelular; localizado en la membrana plasmática de los espermatozoides.

Objetivo general

Determinar si el receptor mPR α participa en la orientación quimiotáctica en espermatozoides de mamíferos mediada por la progesterona.

Objetivos específicos

1) *Caracterizar la respuesta quimiotáctica inducida por agonistas selectivos del receptor mPR α .* Dado que el receptor de progesterona mPR α puede ser activado específicamente por la progestina sintética 19-CH₂-P₄, se evaluará si este compuesto dispuesto en forma de gradiente puede inducir quimiotaxis espermática en ensayos tipo dosis-respuesta empleando espermatozoides en distintos estados fisiológicos.

2) *Determinar si la orientación quimiotáctica hacia progesterona está mediada por el receptor mPR α .* Para determinar si el receptor mPR α participa en la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona y dado que la progestina sintética 19-CH₂-P₄ sólo activa este receptor, se realizarán ensayos de quimiotaxis empleando progesterona en forma de gradiente de concentración como attractante en presencia de dosis crecientes de la progestina formando un contra-gradiente. En caso de que la progesterona induzca quimiotaxis a través de este receptor la respuesta se debería inhibir con dosis crecientes de la progestina (inhibición competitiva).

3) *Evaluar la vía de señalización intracelular que regulan la quimiotaxis mediada por el mPR α .* En la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona se han identificado algunos elementos que participan de la vía de señalización como una adenilato ciclasa de membrana (tmAC) y la movilización de calcio. Mediante el uso de inhibidores, se evaluará si estos intermediarios participan en la respuesta quimiotáctica mediada por la progestina 19-CH₂-P₄ a través del receptor mPR α .

Materiales y métodos

1-Consideraciones Éticas:

Los experimentos se llevaron a cabo con espermatozoides humanos, los cuales se obtuvieron de muestras de semen de donantes que firmaron estar de acuerdo con su empleo para el presente trabajo; estas fueron tratadas de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Además se cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; # 06/10/E)

2- Reactivos y medios de cultivo:

Los reactivos que se emplearon fueron provistos por Sigma-Aldrich (Bs. As., Argentina) al menos que se indique lo contrario. La progestina 19-CH₂.P₄ (Org OD 02-0) fue adquirida a la empresa Axon MedChem (Groningen, Holanda).

Para realizar la separación de los espermatozoides e inducir la capacitación espermática se empleó el medio de cultivo Biggers, Whitter y Whittingham (BWW) (Biggers *et al.*, 1971) cuya formulación fue la siguiente: lactato de sodio 20 Mm; glucosa 5 mM; piruvato de sodio 0,25 mM; NaCl 95 mM; KCl 4,8 mM; CaCl₂ V; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,2 mM y NaHCO₃ 25 mM. Y fue suplementado con ácido pirúvico 0,25mM; albumina sérica bovina (BSA; fracción V) 1%, Hepes 45 mM y gentamicina 25g/ml; ajustándose el a pH 7,4.

3-Obtección y preparación de espermatozoides:

Los espermatozoides se obtuvieron de muestras de semen de donantes voluntarios y se emplearon sólo aquellas muestras que presentaban parámetros seminales normales según la organización mundial de la salud (WHO, 2010).

Los espermatozoides fueron separados del plasma seminal a través de la técnica migración sedimentación (Fabro *et al.*, 2002). Brevemente, se empleó una cámara que posee dos compartimentos cilíndricos concéntricos con diferentes profundidades como se observa en la figura 5. La cámara se llenó con 1 ml de medio BWW, colocándolo en el cilindro interior (A) y el exceso de medio completó parte del cilindro exterior (A'). Luego se colocó por fuera del tubo interior 200 µl de muestra de semen y la cámara se incubó por 60 minutos en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C. De este modo los espermatozoides salen del plasma seminal por su propia movilidad, y migran hacia el tubo interno donde inician el proceso de capacitación.

Posteriormente, se recuperó solo la suspensión contenida en el tubo interior (A), conteniendo los espermatozoides y luego, se determinó la concentración de células mediante

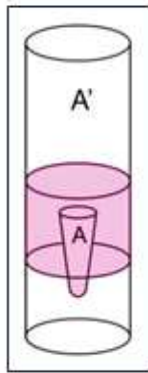


Figura 5: Cámara de Migración sedimentación de separación espermática. La cámara consta de dos tubos uno interno (A) y otro externo (A'), ambos concéntricos. Esta se llena de medio de cultivo (en color lila) y se coloca semen en el piso de A; de este modo los espermatozoides nadan hasta A de donde se recupera las células.

recuento celular en cámara de Neubauer. La suspensión de espermatozoides se ajustó a 8×10^6 células/ml y se incubó por 18hs en estufa gaseada con 5% de CO_2 a 37°C para inducir la capacitación.

4- Evaluación de la respuesta quimiotáctica:

Para evaluar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides se empleó el Ensayo de Selección Espermática (ESE) (Gatica *et al.*, 2013) que permite evaluar la quimiotaxis por medio de la acumulación celular (Giojalas *et al.*, 2015). Brevemente, el ensayo se realiza en una cámara de acrílico que consta de dos compartimentos unidos por un tubo conector de 2 mm como se puede observar en la figura 6. Para el ensayo de acumulación en gradiente ascendente, se colocaron 130 μl de la solución de espermatozoides (6×10^6 células/ml) en el compartimento 1 (W1), 20 μl de medio BWW en el tubo conector (TC) y 130 μl de la solución atrayente a diferentes concentraciones o medio BWW (control negativo) en el compartimento 2 (W2). Luego se incubó las cámaras del ESE en estufa gaseada a 37°C y 5% de CO_2 por 20 minutos. De esta manera, la sustancia atrayente forma un gradiente de concentración por difusión pasiva desde el W2 al W1, que orienta a los espermatozoides hacia el W2. Posteriormente, se recuperó la suspensión de células en el W2 y se las fijó con formol al 2% manteniéndolas en heladera hasta el momento de realizar el recuento celular para determinar la acumulación celular.

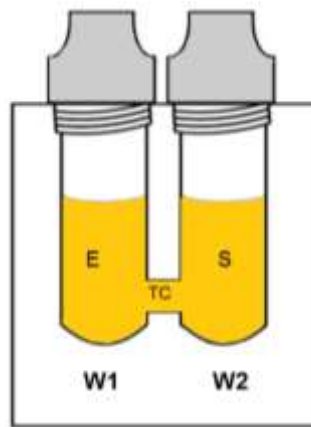


Figura 6: Cámara de selección espermática. Presenta dos compartimentos (W1 y W2) y un tubo conector (TC). E: Solución de espermatozoides, S: sustancia a evaluar.

Para corroborar que la acumulación es inducida por quimiotaxis, se realizaron sendos controles modificando el ensayo de acumulación (Gatica *et al.*, 2013). Uno de ellos, fue el ensayo de acumulación en gradiente descendente. Para ello, se colocaron 130 μl de la solución de espermatozoides (6×10^6 células/ml) junto con la sustancia atrayente en el compartimento 1 (W1), 20 μl de medio BWW en el tubo conector (TC) y 130 μl medio BWW en el compartimento 2 (W2). El otro control, fue el ensayo de acumulación en ausencia de gradiente (distribución homogénea del atrayente). Para ello, se colocaron 130 μl de la solución de espermatozoides (6×10^6 células/ml) junto con la sustancia atrayente en el compartimento 1 (W1), 20 μl de la solución atrayente en el tubo conector (TC) y 130 μl de solución atrayente en el compartimento 2 (W2). En ambos casos las cámaras se incubaron por 20 min en estufa gaseada a 37°C y 5% de CO₂ en aire. Posteriormente se recuperaron las soluciones del W2 fijándolas en formol para luego determinar la acumulación celular.

5-Determinación de la acumulación celular:

A partir de la suspensión de espermatozoides obtenidos del W2 luego de realizado el ESE, se determinó la concentración de células empleando la cámara de Neubauer. Para ello, se estableció el número de células presentes en la grilla central de la cámara en un microscopio de campo claro a 40x (Olympus CX41), y luego se calculó la concentración de células mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de células} = \text{Número de células} \times \text{Factor de dilución} \times 10.000$$

Luego, se determinó la concentración de espermatozoides recuperados en el W2 respecto de lo colocado en el W1 de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{concentración de espermatozoides en W2}}{\text{concentración inicial W1 (6x10}^6 \frac{\text{espermatozoides}}{\text{ml}})} \times 100$$

Posteriormente, para determinar la respuesta quimiotáctica se calculó el porcentaje de acumulación espermática en el W2 respecto del control negativo de medio BWW, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Espermatozoides acumulados} = \% \text{ Recuperación}_{\text{Tratamiento}} - \% \text{ Recuperación}_{\text{Medio BWW}}$$

6-Evaluación de la participación del receptor mPR α en la vía de señalización que regula la quimioatracción:

Para evaluar la participación del receptor mPR α en la vía de señalización de la quimioatracción ya descrita para progesterona (Teves *et al.*, 2009) se preincubaron los espermatozoides por 5 min con un quelante de calcio, BAPTA-AM (N,N,N',N' ácido tetraacético), o por 15 min con un inhibidor de adenilato ciclasa de membrana, el ddAdo (2',3'-didesoxiadenosina) o por 15 min con un secuestrador de AMPc (Lucchesi *et al.*, 2016).; Posteriormente se realizó el ESE enfrentando a los espermatozoides a un gradiente ascendente de la progestina 19-CH₂-P₄.

7-Medición de calcio intracelular por citometría de flujo:

Para determinar si la activación del receptor mPR α promueve una movilización de calcio, se determinó el contenido intracelular por citometría de flujo. Para ello, una suspensión de espermatozoides capacitados (1x10⁶ células/ml) fueron incubados por 15 min con 0,1 μ M de Fluo4-AM (Invitrogen), que es un marcador de calcio intracelular y 50 nM de DiSC₃, una sonda que permite determinar el potencial de membrana. Luego, los espermatozoides se lavaron por centrifugación a 1.500xg por 7 min y se resuspendieron en medio BWW en ausencia de BSA. En paralelo, se incubaron espermatozoides sólo con Fluo4-AM, DiSC₃ o sin marcar como controles necesarios para configurar los parámetros de compensación de canales de emisión en el citómetro. Luego, las células se procesaron de manera continua, agregando cada 30 s los distintos tratamientos y al final de cada experimento se agregó Ionóforo de Calcio 10 μ M y Cloruro de Manganeso 300 μ M como controles del nivel de calcio máximo y mínimo respectivamente. Para el análisis de las células, se seleccionaron los espermatozoides en un dot-plot de FSC (forward scatter) vs. SSC (side scatter). Luego, a partir de la subpoblación de

eventos seleccionados se eligió a otra subpoblación de células que presentaban hiperpolarización (DiSC₃ positivas, indicador de células con membranas intactas). A partir de estas células se determinó la intensidad calcio intracelular. Posteriormente, se determinó la intensidad de calcio relativa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Intensidad de Calcio Relativa} = \frac{\text{Intensidad Tratamiento} - \text{Intensidad Cloruro de Manganeso}}{\text{Intensidad Ionóforo de Calcio} - \text{Intensidad Cloruro de Manganeso}}$$

8-Evaluación de los parámetros cinéticos de los espermatozoides:

Los parámetros cinéticos de las células se determinaron por video-microscopía y análisis de imágenes. Para ello los espermatozoides capacitados se preincubaron por 10 min con las distintas sustancias a evaluar. Luego, se colocaron 10 µl de la suspensión entre un portaobjetos y un cubreobjetos de 18x18 mm, sellándose los bordes con vaselina, para evitar que se genere flujo del líquido debido al ingreso de aire. Luego, se colocó el portaobjetos en una platina térmica (37°C) montada en un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon Instruments Inc., NY, USA). El movimiento de las células se grabó digitalmente con una cámara Nikon Ds-Qi1Mc, a 30 Hz y durante 5 segundos, a una resolución de 640x480 pixeles utilizando el objetivo de 10X. Posteriormente, se determinaron automáticamente las trayectorias de al menos 200 células por tratamiento, empleando el programa "Fiji", plug-in Particle Tracker (Chenouard et al. 2014; Sbalzarini & Koumoutsakos, 2005) y a partir de estas se calcularon los parámetros cinéticos utilizando el programa "Fiji", empleando una macro desarrollada en nuestro laboratorio, paNoel 1.0.0 (UNC, CONICET). Los parámetros que se evaluaron fueron velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP) y los patrones de movimiento (hiperactivado, lineal y transicional).

9-Análisis estadístico:

Las diferencias entre las medias de los tratamientos se determinaron mediante un análisis de la varianza (ANAVA) y en los casos que fue necesario, se realizó una prueba a posteriori de DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002). Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces y se consideraron significativas, aquellas diferencias entre medias que presentaron un nivel de $P < 0,05$. Para todos los análisis se examinaron que se cumplieran los supuestos de normalidad. Los datos se analizaron empleando el programa InfoStat (UNC) (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Resultados:

1-Characterización de la respuesta quimiotáctica inducida por la progestina 19-CH₂-P₄, agonista selectivo del receptor mPR α .

Para determinar si la progestina 19-CH₂-P₄ induce quimiotaxis en espermatozoides humanos, realizamos un ensayo de dosis respuesta empleando el ESE. Los espermatozoides capacitados se enfrentaron a distintas concentraciones de la progestina (desde 0,1 a 10.000 pM), determinándose el porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2. Como se puede observar en la figura 7, se aprecia una acumulación significativa de células respecto del control negativo (BWW). La respuesta es dosis dependiente, con forma de campana y con un pico máximo de acumulación inducido por una concentración 1 pM del agonista, siendo este tipo de respuesta compatible con una respuesta quimioattractante (Mesibov *et al.*, 1973). En paralelo, se realizó el ESE empleando progesterona 10 pM, como control positivo de quimioatracción (Teves *et al.*, 2006; Gatica *et al.*, 2013). Se puede observar que la respuesta máxima obtenida por 1 pM de la progestina fue similar a la de la progesterona.

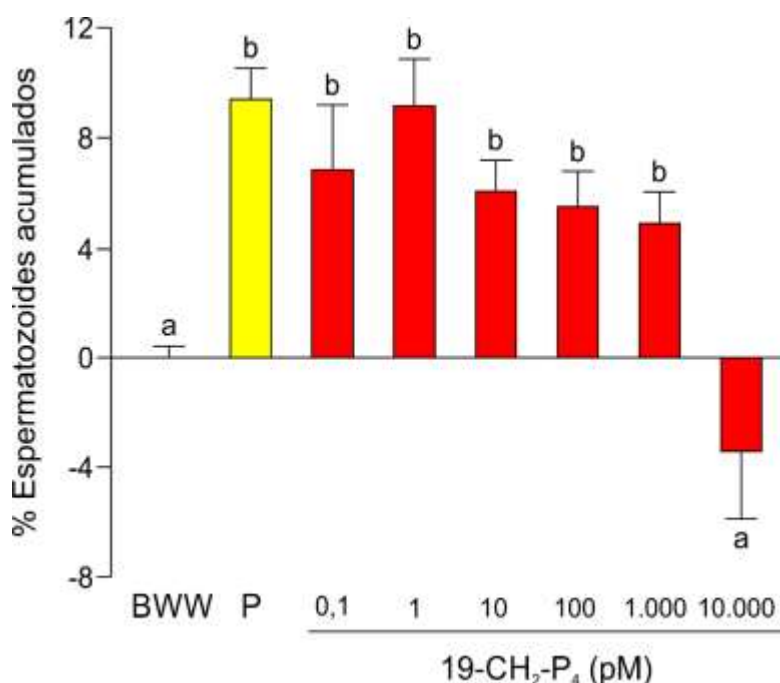


Figura 7. La progestina 19-CH₂P₄, agonista selectivo del receptor mPR α induce quimioatracción espermática. Porcentaje de espermatozoides capacitados acumulados en el W2 de las cámaras de ESE respecto del control negativo (BWW). Se realizaron entre 10 y 22 repeticiones por tratamiento. Los datos están expresados como media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). P, Progesterona 10 pM.

En los ensayos de acumulación en gradiente ascendente como el realizado previamente, el aumento en el porcentaje de células puede deberse a quimioatracción, pero también puede estar inducido por quimiotaxis (aumento de la velocidad) o atrapamiento (por inducción de hiperactivación espermática) (Giojalas *et al.*, 2015). Para descartar estos otros efectos, se realizaron ensayos de control: 1) mediante ensayos de acumulación en gradiente descendente o de distribución homogénea del atrayente, empleando la cámara del ESE (Giojalas *et al.*, 2015) y 2) evaluando parámetros cinéticos espermáticos mediante video-microscopía y análisis de imágenes (Giojalas *et al.*, 2015).

En el primer caso, a partir de la dosis del compuesto 19-CH₂-P₄ que indujo la máxima acumulación (1 pM), se realizó un nuevo set de experimentos empleando el ESE, donde se combinaron ensayos de acumulación en gradiente ascendente (los espermatozoides capacitados se cargaron en el W1 y la progesterona en el W2), en ausencia de gradiente (los espermatozoides capacitados se cargaron en el W1 y la progesterona tanto en el W1 como el W2 y el tubo conector) o en gradiente descendente (los espermatozoides capacitados y la progesterona se cargaron en el W1). En todos los casos se determinó el porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2. En la figura 8, se puede observar, que la presencia de un gradiente ascendente promueve la acumulación de células en el W2, tal como se observó anteriormente, y en proporción similar al control positivo de progesterona. Cuando el compuesto se distribuyó homogéneamente, no observó una acumulación espermática en el W2, debido a la ausencia de un gradiente que oriente a los espermatozoides. Por el contrario, en presencia de un gradiente descendente, la acumulación espermática en el W2 disminuyó significativamente. Esto es debido a que los espermatozoides que están junto con el atrayente, cuando salen del W1 detectan el gradiente atrayente en sentido contrario y se vuelven, por ello se observa una disminución del porcentaje de células acumuladas en el W2.

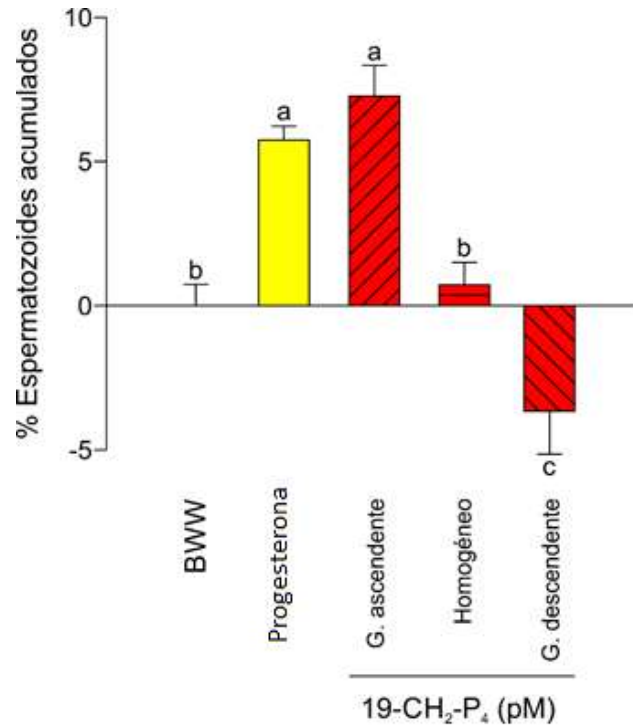


Figura 8. La acumulación espermática inducida por el gradiente ascendente de 19-CH₂P₄ en el ESE es inducida por quimiotaxis. Se observa el porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2 obtenidos a partir de distintas combinaciones de gradientes (ascendente, homogéneo o ausencia de gradiente y descendente). Esto verifica que la acumulación observada en el ensayo de gradiente ascendente es debido a quimiotaxis y no a otros mecanismos como quimioinesis o hiperactivación. Los datos están expresados como media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$); $N=8$.

También se evaluó por video-microscopía y análisis de imágenes, si las distintas concentraciones de la progestina inducen cambios en los parámetros cinéticos de los espermatozoides. Como se observa en la figura 9, no se observaron diferencias significativas en la velocidad curvilínea (VCL, Fig. 9a), la velocidad lineal (VSL, Fig. 9b), la velocidad media (VAP, Fig. 9c), así como tampoco se observaron variaciones en los patrones de movimiento (Fig. 9d) respecto del control negativo de BWW, como tampoco respecto de la Progesterona (P). En conjunto, estos resultados sugieren que la acumulación de espermatozoides inducida por el gradiente ascendente de la progestina 19-CH₂-P₄ es debido a quimioatracción.

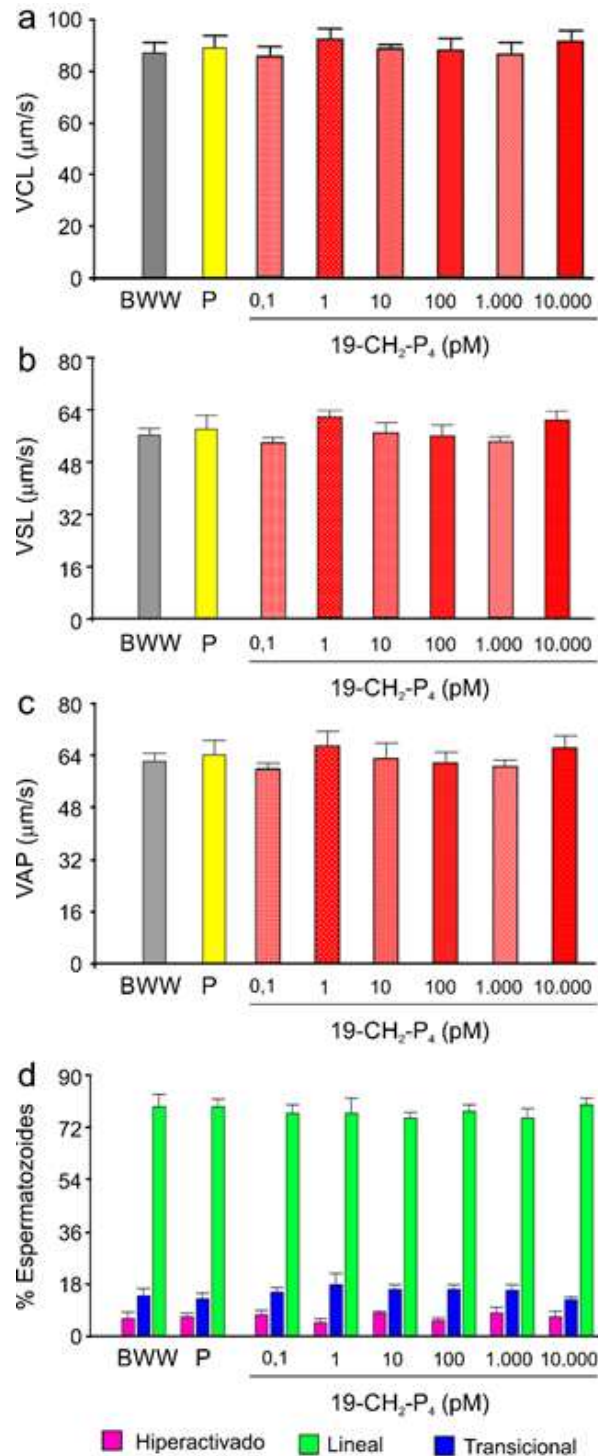


Figura 9. El agonista selectivo del receptor mPR α 19-CH₂P₄ no afecta los parámetros cinéticos de los espermatozoides. a) velocidad curvilínea b) velocidad lineal c) Velocidad promedio d) Patrones de movimiento. Los resultados están expresados como media \pm SE. N=5. Estadísticamente tanto para los diferentes tipos de velocidades como los patrones no mostraron diferencias significativas.

Debido a que la quimioatracción hacia la progesterona es una respuesta fisiológica de las células capacitadas (Teves *et al.*, 2006; Gatica *et al.*, 2013), decidimos verificar si la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄ también depende del estado fisiológico. Para ello, luego de la separación de los espermatozoides, la suspensión de espermatozoides se dividió en dos alícuotas. Una de ellas, se empleó para realizar el ESE inmediatamente (células sin capacitar) y la otra alícuota se capacitó por 18 hs en medio BWW y luego se realizó el ESE. En la figura 10, se observa que las células no capacitadas no responden a la progestina 19-CH₂-P₄, como así tampoco al control positivo de progesterona. En tanto que las mismas muestras, si presentan una respuesta quimioatractante hacia el agonista y la progesterona, luego de haber sido incubadas en condiciones capacitantes. Esto indica que la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄ es una respuesta fisiológica.

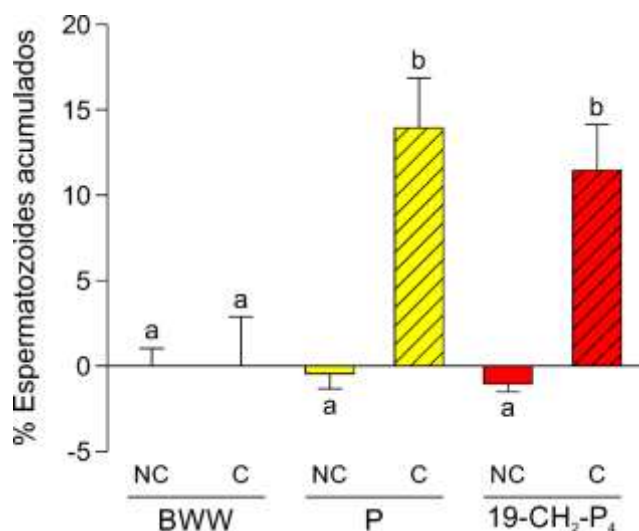


Figura 10. Sólo los espermatozoides capacitados responden quimiotácticamente al agonista selectivo del receptor mPR α (19-CH₂-P₄ 1 pM). Promedio del porcentaje de acumulación de espermatozoides en el W2 evaluados a partir de las mismas muestras, en condiciones no capacitantes (NC; inmediatamente después de separadas del plasma seminal) y en condiciones capacitantes (C; incubadas por 18 hs luego de la separación del plasma seminal en medio capacitante). Los datos están expresados como media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$); N=5. P, progesterona 10 pM.

2-Participación del receptor mPR α en la orientación quimiotáctica mediada por la progesterona.

Para determinar si el receptor mPR α participa en la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona, realizamos un ensayo de contra-gradiente entre la progestina 19-CH₂-P₄ y la progesterona. Para ello, se realizó el ESE, colocando progesterona a 10 pM como atractante en el W2 y los espermatozoides se colocaron en el W1 junto con diferentes concentraciones de la progestina 19-CH₂-P₄. Dado que ambos compuestos son quimioatractantes, al disponerlos de manera asimétrica en la cámara del ESE y enfrentados, se formará dos gradientes en sentidos opuestos (contra-gradientes), que atraerán a los espermatozoides en distintos sentidos compitiendo entre sí. En la tabla 1 se resumen los resultados esperados en caso de que ambos compuestos induzcan quimioatracción a través del mismo receptor o de dos receptores independientes.

Tabla 1: Resultados esperados en el ensayo de contra-gradientes en caso de que la respuesta quimiotáctica esté mediada por el mismo receptor para ambos esteroides o por receptores independientes.

Gradiente atractante de progesterona	Contra-gradiente atractante de progestina 19-CH ₂ -P ₄	Resultado esperado si la respuesta quimiotáctica esta mediada por el mismo receptor	Resultado esperado si la respuesta quimiotáctica esta mediada por receptores independientes
Óptima concentración quimioatractante	Baja concentración	Atracción hacia progesterona (la presencia de la progestina no afecta el gradiente de la progesterona)	Atracción hacia progesterona (la presencia de la progestina no afecta el gradiente de la progesterona)
Óptima concentración quimioatractante	Óptima concentración quimioatractante	No hay atracción (ambos esteroides atraen a las células)	No hay atracción (ambos esteroides atraen a las células)
Óptima concentración quimioatractante	Alta concentración	No hay atracción (la progestina satura al receptor por lo tanto no puede detectar el gradiente de progesterona)	Atracción hacia progesterona (la progestina satura su receptor, pero no al de progesterona que todavía puede detectar el gradiente de esta)

En la figura 11 se puede observar que, a bajas concentraciones de la progestina 19-CH₂-P₄, hay acumulación de espermatozoides en el W2, sin afectar la atracción mediada por el gradiente de progesterona. En tanto que, a medida que se incrementa la concentración de la progestina 19-CH₂-P₄, la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona se ve inhibida. Estos resultados sugieren que la progesterona y la progestina 19-CH₂-P₄ inducen quimiotaxis a través

del mismo receptor. Dado que la progestina 19-CH₂-P₄ estimula específicamente al receptor mPR α , es probable que este receptor participe en la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona.

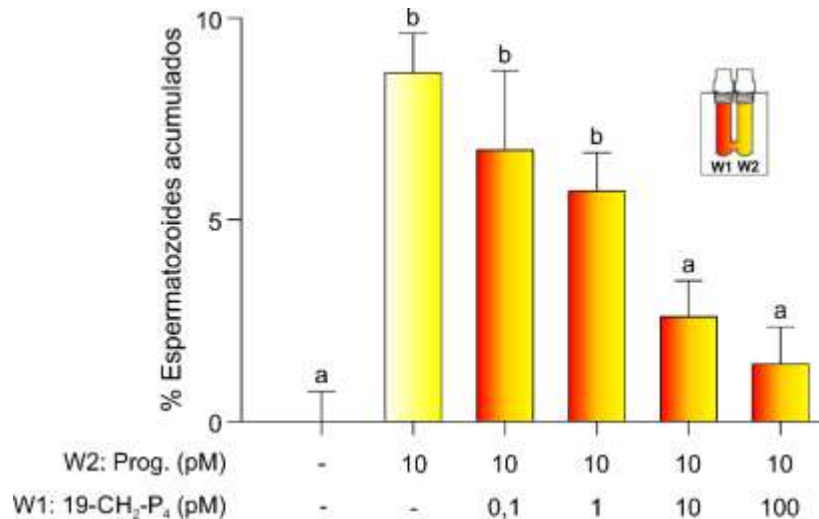


Figura 11. Ensayo de contra-gradientes de progesterona y 19-CH₂-P₄. El ESE se cargó con progesterona (Prog.) en el W2 y en el W1 se colocaron los espermatozoides con distintas concentraciones de 19-CH₂-P₄. Luego, se determinó el porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2. Los datos están expresados como media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$); N=5.

3- Vías de señalización intracelular que regulan la quimiotaxis mediada por el mPR α .

a. Participación de la vía tmAC-AMPC

Los espermatozoides de mamíferos presentan dos enzimas adenilato ciclasa, una de membrana y otra soluble, con distinta localización subcelular y a las cuales se les han atribuido distintas funciones fisiológicas (Balbach *et al.*, 2017). En humanos, se ha demostrado que la progesterona (Teves *et al.*, 2009) y otros atractantes como el burgeonal (Spehr *et al.*, 2004) inducen quimiotaxis activando una adenilato ciclasa de membrana. Dado que receptor mPR α está unido a Proteína G y que activaría una adenilato ciclasa asociada a la membrana (Tubbs and Thomas, 2009), evaluamos si en la respuesta quimiotáctica mediada por este, participa la vía tmAC-AMPC. Para ello, los espermatozoides se incubaron con distintas concentraciones de ddAdo, un inhibidor específico de la tmAC (Wiggins *et al.*, 2018). Dado que el AMPc regula la movilidad espermática, se evaluó la acumulación espermática mediante el ESE, en presencia o ausencia de un gradiente 1 pM de la progestina 19-CH₂-P₄ y se estimó la acumulación restando a cada dosis del tratamiento su respectivo control. Como se puede observar en la figura 12, la

respuesta quimiotáctica hacia la progestina disminuye de manera dosis dependiente en presencia del ddAdo, siendo significativa a una dosis de 100 μ M del inhibidor de la tmAC.

En base a este resultado, decidimos corroborar la participación del AMPc en la

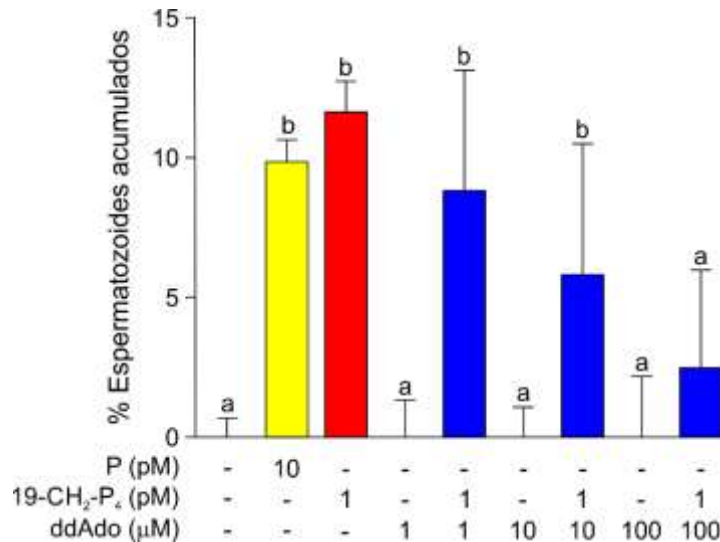


Figura 12: La tmAC participa en la respuesta quimiotáctica inducida por la progestina 19-CH₂-P₄. El porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2 de las cámaras del ESE disminuye a medida que aumenta la concentración del inhibidor de la tmAC (ddAdo). Los datos están expresados como media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$); N=6

señalización de la quimiotaxis mediada por la progestina 19-CH₂-P₄ empleando una “esponja de AMPc” (esp-AMPc) como inhibidor. La esp-AMPc, es una Proteína Kinasa A modificada, sin el sitio catalítico que secuestra las moléculas de AMPc en el citoplasma (Lucchesi *et al.*, 2016) y que fue amablemente provista por la Dra. Claudia Tomes (Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología, IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo). En paralelo se realizó un ensayo control en presencia de la esp-AMPc y en ausencia de la progestina 19-CH₂-P₄, para descartar efectos sobre la movilidad. En la figura 13, se observa que la presencia de 100 nM de la esp-AMPc inhiben la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄. Estos resultados en su conjunto indican que la vía tmAC-AMPc participaría en la respuesta quimiotáctica mediada por la progestina 19-CH₂-P₄, a través del receptor mPR α .

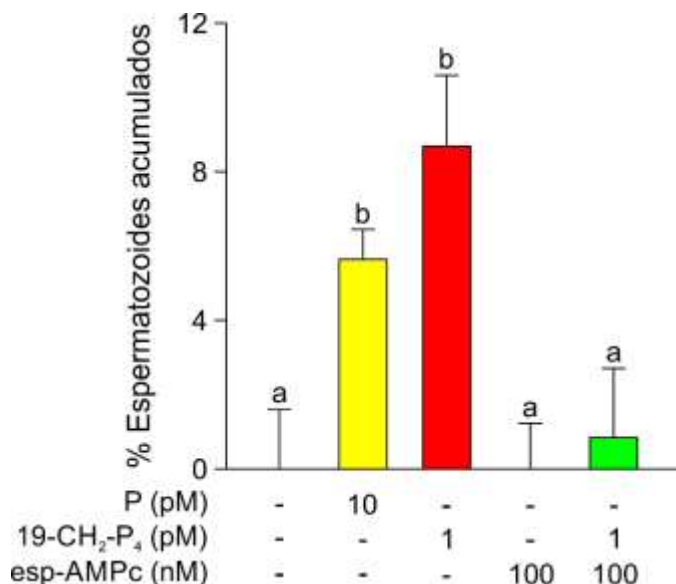


Figura 13. El AMPc participa como segundo mensajero en la vía de señalización de la quimiotaxis mediada por el receptor mPR α . Porcentaje de espermatozoides acumulados en el W2 del ensayo de selección espermática. Los datos están expresados como media \pm SE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$); N=9. Esp-AMPc, esponja de AMPc.

b. Participación del calcio intracelular

El calcio es un segundo mensajero muy importante en la fisiología espermática de mamíferos que está asociado a la movilidad (Marín-Briggiler *et al.*, 2003), la hiperactivación (Suarez, 2008) y la quimiotaxis (Teves *et al.*, 2009). Teves *et al.* (2009) demostraron que, en espermatozoides capacitados expuestos a progesterona, hay distintas instancias de ingreso de calcio desde distintas fuentes (externas e internas) y a través de distintos tipos de canales. Por lo tanto, decidimos evaluar si: 1) si el agregado de la progestina 19-CH₂-P₄ a espermatozoides capacitados induce un aumento del calcio intracelular y 2) si en la respuesta quimiotáctica inducida por la progestina 19-CH₂-P₄ participa el calcio como segundo mensajero.

Para evaluar si la activación del receptor mPR α promueve una movilización de calcio intracelular, los espermatozoides se incubaron en simultáneo con una sonda que determina hiperpolarización de membrana (DiSC3) y con una sonda fluorescente para detectar calcio intracelular (Fluo4-AM, Invitrogen). Luego, se determinó el contenido intracelular de calcio por citometría de flujo en las células vivas (hiperpolarizadas, DiSC3 positivas), agregando concentraciones crecientes de la progestina 19-CH₂-P₄, y comparándolo con la respuesta mediada por la progesterona. Como muestra la figura 14, la progestina 19-CH₂-P₄ induce un aumento de calcio intracelular en concentraciones del orden 10⁻⁶ M, en tanto que la

progesterona a partir de 10^{-8} M ya induce un aumento significativo en el nivel de calcio intracelular.

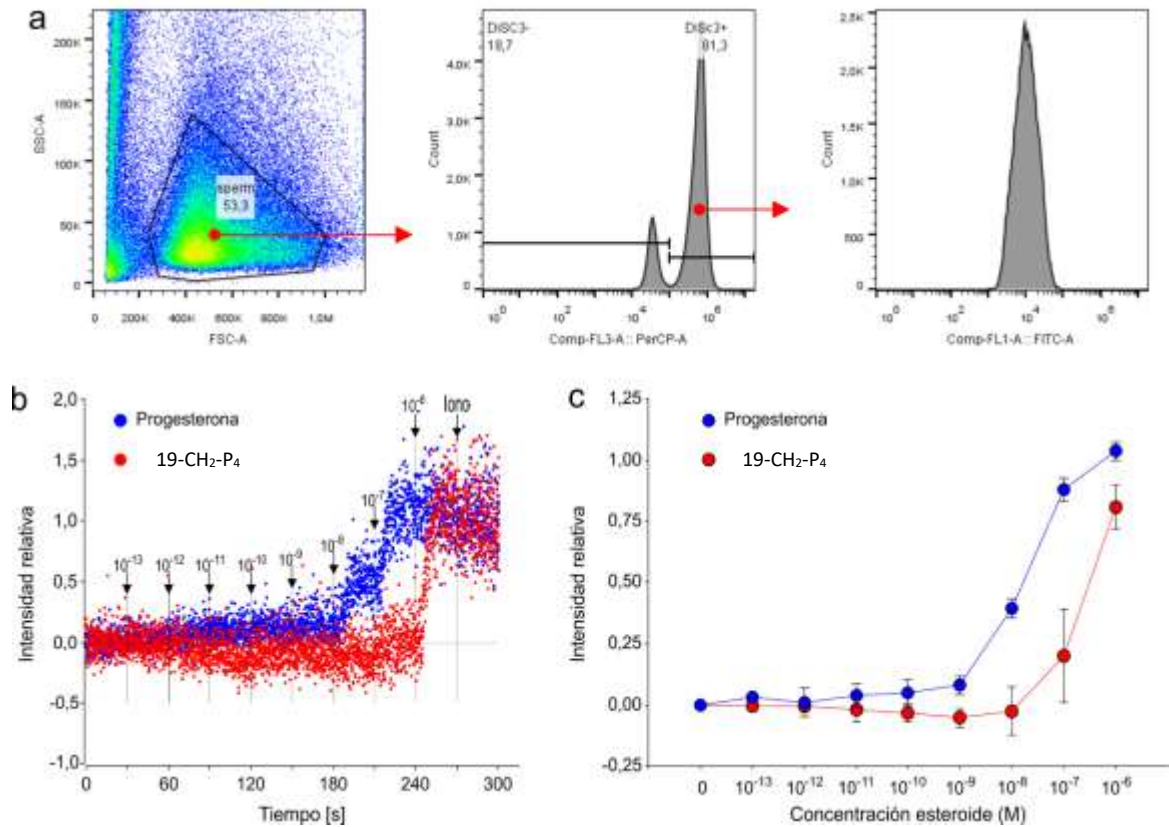


Figura 14. La progestina 19-CH₂-P₄ induce un aumento del calcio intracelular en espermatozoides capacitados. a) Para determinar la intensidad de calcio, primero se seleccionó la subpoblación de espermatozoides en función de las dispersión y tamaño celular (SSC-A vs FSC-A); luego, a partir de éstas se escogió la subpoblación de células vivas (DiSC3+) y finalmente sobre ellas, se cuantificó la intensidad de calcio. B) Cuantificación del calcio intracelular, se determinó la Intensidad de fluorescencia relativa respecto del Ionóforo de calcio (Iono), se muestra un experimento representativo. C) Intensidad relativa de fluorescencia promedio \pm EE en función de la concentración de la progestina 19-CH₂-P₄ y de la progesterona. N=3.

Por otro lado, se evaluó la participación del calcio intracelular en la respuesta quimiotáctica mediada por la progestina 19-CH₂-P₄ mediante el ESE. Para ello, se preincubaron los espermatozoides con un quelante de calcio intracelular (Bapta-AM) y luego se realizó en ensayo de selección espermática en presencia de la progestina 19-CH₂-P₄ a 1 pM, o en su ausencia comparándose entre ellos, para descartar posibles efectos del quelante en la

movilidad espermática. En la figura 15 se observa que la presencia de Bapta-AM inhibe la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄ en todas las concentraciones evaluadas.

En conjunto estos resultados sugieren la participación del calcio en la respuesta quimiotáctica mediada por la progestina 19-CH₂-P₄. Y si bien, son consistentes con la participación del calcio en la quimiotaxis hacia progesterona reportado en trabajos previos (Teves *et al.*, 2009), es necesario probar el efecto de dosis más bajas del inhibidor en las cuales se recupere la respuesta quimiotáctica y descartar así posibles efectos inespecíficos.

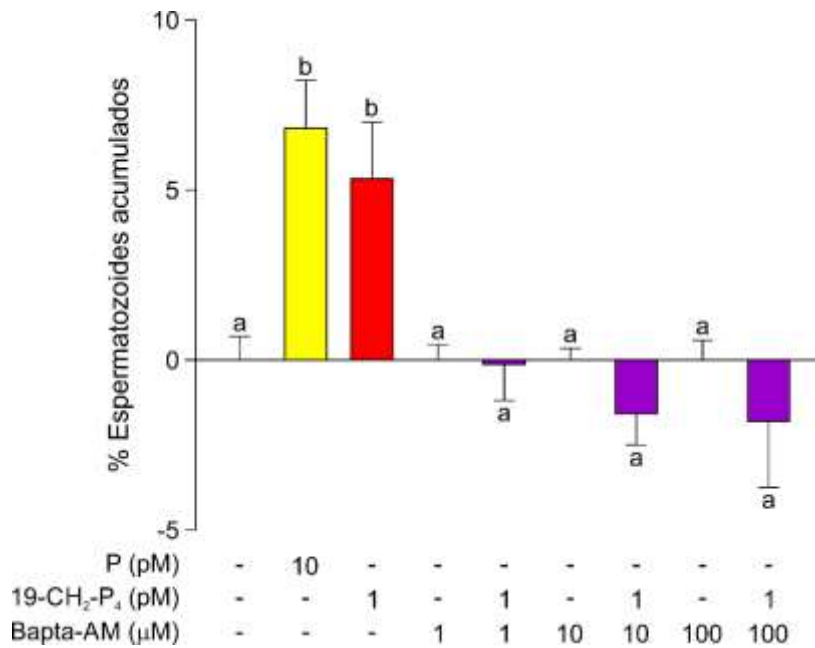


Figura 15. Participación del calcio en la vía de señalización de la quimiotaxis mediado por la progestina 19-CH₂-P₄. Porcentaje de espermatozoides acumulados después de ser pretratados con BAPTA-AM durante 5 minutos, enfrentados en el W2 de las cámaras de ESE con o sin 19-CH₂-P₄ (control negativo). Los datos están expresados como media ± SE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$); N=6.

Discusión:

En esta tesina determinamos que la progestina 19-CH₂-P₄, un agonista selectivo del receptor mPR α , puede inducir quimioatracción en espermatozoides de mamíferos en condiciones fisiológicas de fecundar. Además, esta progestina interfiere con la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona y activa parte de la misma vías de señalización de quimiotaxis que esta. En conjunto, esto sugiere que ambos compuestos podrían inducir la respuesta quimioattractante a través del mismo receptor, el mPR α .

La quimiotaxis es la orientación de la célula o una parte de ella siguiendo un gradiente de concentración de una sustancia siendo un evento ampliamente distribuido en todo el reino metazoa. En lo que respecta a su participación en el proceso de fecundación, ha sido ampliamente caracterizado en especies con fecundación externa y más recientemente en especies de fecundación interna (Morisawa and Yoshida, 2005; Eisenbach and Giojalas, 2006; Giojalas *et al.*, 2015). En mamíferos, se ha demostrado que la quimiotaxis es un mecanismo que guía a los espermatozoides hacia el ovocito (quimioatracción) para fecundarlo (Guidobaldi *et al.*, 2012; Giojalas *et al.*, 2015) y que también podría alejarlos (quimiorepulsión) para evitar la poliespermia (Guidobaldi *et al.*, 2017a). Esta característica dual de la quimiotaxis permitiría regular el proceso de fecundación, maximizando el éxito reproductivo. Se ha demostrado que distintos compuestos pueden inducir quimiotaxis en mamíferos, siendo la progesterona la que presentaría mayor relevancia fisiológica (Giojalas *et al.*, 2015). En mamíferos la progesterona es secretada por las células del cumulus que rodean al ovocito (Guidobaldi *et al.*, 2008; Oren-Benaroya *et al.*, 2008) y actúa como quimioattractante en rangos de concentración picomolar en condiciones *in vitro* (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2017b; Dominguez *et al.*, 2018). Para que los espermatozoides puedan detectar el gradiente y orientarse, deberían contar con receptor asociado a la membrana, que le permita dar una respuesta rápida a los cambios de concentración del attractante. Hasta el momento, se ha realizado un solo estudio funcional para caracterizar el receptor de progesterona asociado a la quimioatracción (Guidobaldi *et al.*, 2008). Sin embargo, el anticuerpo utilizado en dicho estudio estaba desarrollado contra el receptor nuclear de progesterona (nPR) que tiene una distribución citoplasmática. Y, a pesar de inhibir la quimioatracción hacia progesterona en ensayos de bloqueo de función, aún no se ha descrito ningún receptor de membrana que posea una secuencia similar al nPR, con lo cual la identidad del receptor de membrana permanece como una incógnita. En estas últimas dos décadas, se han descrito y caracterizado otros receptores de progesterona en la membrana espermática, que no comparten homología con el nPR, sin embargo tampoco se ha probado la relación de estos con la quimiotaxis espermática (Thomas, 2008; Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011;

Miller *et al.*, 2016). Entre estos, se destaca el mPR α (por sus siglas en inglés, *membrane Progesterone Receptor alpha*) que fue descrito y caracterizado por primera vez en ovocitos de *Cynoscion nebulosus* (Zhu *et al.*, 2003b). Este receptor presenta 7 pasos transmembrana, está asociado a Proteína G (Zhu *et al.*, 2003b) y está presente en numerosos tejidos y distribuido en numerosas especies (Thomas, 2012). En mamíferos, algunos compuestos quimioattractantes como *chemokines* (Isobe *et al.*, 2002; Zuccarello *et al.*, 2011) o compuestos odoríferos (Spehr *et al.*, 2003; Veitinger *et al.*, 2011a) inducirían quimiotaxis a través de este tipo de receptores. Un estudio reciente, identificó que la progestina 19-CH₂-P₄ (10-etenil-19-norprogesterona) es un agonista selectivo de alta afinidad para el receptor mPR α , mostrando mayor afinidad que la propia progesterona y que además, no muestra ninguna actividad significativa hacia el receptor de progesterona nuclear (Kelder *et al.*, 2010). Estas características de la progestina 19-CH₂-P₄, permitirían utilizarla como una herramienta para dilucidar si el receptor mPR α participa en la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona.

En primera instancia, caracterizamos si la progestina 19-CH₂-P₄ induce quimiotaxis en espermatozoides de mamíferos. Los resultados obtenidos en los ensayos de acumulación del ESE demuestran que la progestina 19-CH₂-P₄ induce quimioatracción de manera dosis dependiente; presentando una respuesta en forma de campana, típica de la respuesta quimiotáctica (Adler, 1973). Además, la máxima respuesta se observó a una concentración 1pM, lo cual es un orden magnitud menor que la observada para la progesterona (Teves *et al.*, 2006) y podría deberse a la mayor afinidad que presentan la progestina por el receptor (Kelder *et al.* 2010). Los ensayos en gradiente descendente y a concentración homogénea de la progestina realizados en el ESE, así como el análisis de la cinética espermática evaluada por video-microscopía y análisis de imagen apoyan la idea de que la acumulación espermática inducida por la progestina 19-CH₂-P₄ es mediada por quimiotaxis, descartando otros mecanismos como la quimiocinesis o el atrapamiento (Giojalas *et al.*, 2015).

Un aspecto esencial y de relevancia fisiológica es que sólo los espermatozoides capacitados, aquellos que están aptos para fecundar (De Jonge, 2005), pueden responder quimiotácticamente hacia la progesterona (Teves *et al.*, 2006). En los ensayos realizados con espermatozoides recién separados del plasma seminal (sin capacitar), se observó que estos no fueron quimioatraídos por la progestina 19-CH₂-P₄, sin embargo, esto fue revertido cuando las mismas muestras se dejaron capacitando por 18 hs. Esto sugiere que el receptor activado por la progestina 19-CH₂-P₄ tiene relevancia fisiológica similar al inducido por la progesterona.

Habiendo caracterizado la respuesta quimiotáctica de la progestina 19-CH₂-P₄ decidimos evaluar si la progesterona activa la respuesta quimiotáctica a través del mismo

receptor que esta. La respuesta quimiotáctica, como se mencionó anteriormente, presenta una forma de campana en ensayos dosis-respuesta; esto se debe a que a bajas concentraciones del attractante, no se estimulan una cantidad suficiente de receptores y por lo tanto no hay respuesta quimiotáctica (Adler, 1973). En tanto que a altas concentraciones del attractante, los receptores se saturan y por ende no puede detectar los cambios de concentración quedando así, un rango óptimo en el cual las células pueden responder quimiotácticamente (Adler, 1973). En otros modelos, como los de crecimiento del cono axónico, las células están expuestas simultáneamente a numerosos gradientes de sustancias attractantes *in vivo*, y estas responden independientemente a ellos a través de distintos receptores (Sloan *et al.*, 2015). Es decir que las células pueden orientarse quimiotácticamente activando distintos receptores, independiente de la presencia de dos o más attractantes. En base a esto, para evaluar si la progestina 19-CH₂-P₄ y la progesterona inducen quimiotaxis a partir del mismo receptor realizamos un ensayo de contra-gradientes (Guidobaldi *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos, muestran que concentraciones crecientes de la progestina inhiben la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona, sugiriendo que ambos están actuando sobre el mismo receptor de quimiotaxis. No obstante, es necesario confirmar estos resultados con otros experimentos como, por ejemplo, ensayos de bloqueo de la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona empleando anticuerpos específicos contra el receptor mPR α .

Para ampliar la caracterización de la respuesta quimiotáctica mediada por la progestina 19-CH₂-P₄ a través del receptor mPR α , decidimos evaluar si esta comparte algunos segundos mensajeros de la vía de señalización de la respuesta quimiotáctica mediada por la progesterona. El espermatozoide es una célula transcripcionalmente inactiva, lo cual limita la aplicación de técnicas moleculares. Por ello, el uso de inhibidores la principal herramienta que se puede emplear para estudiar la señalización intracelular en la quimiotaxis. En espermatozoides humanos, se ha demostrado la participación de la vía AC/AMPC/PKA en la respuesta quimiotáctica hacia progesterona (Teves *et al.*, 2009). En mamíferos, se han identificado dos tipos de adenilato ciclasa en los espermatozoides: la soluble (sACs) y la transmembrana (tmAC) (Balbach *et al.*, 2017). La sACs, es una enzima específica de espermatozoides, que es activada por bicarbonato e insensible a proteína G, y se las ha relacionado con la capacitación y la movilidad espermática (Esposito *et al.*, 2004; Balbach *et al.*, 2017; Wiggins *et al.*, 2018). En tanto que la tmAC ha sido asociada a quimiotaxis (Teves *et al.*, 2009), sin embargo, existe cierta controversia sobre la presencia o no de las tmAC en espermatozoides. Ya que, algunos estudios demostraron un aumento en el nivel AMPC después de exponer los espermatozoides a fármacos que estimulan esta enzima, mientras que

otros no lo observaron (Esposito et al. 2004; Libera et al. 2005). No obstante, la 2',3'-didesoxiadenosina (ddAdo) es un inhibidor selectivo de la tmAC que no afecta a la sAC en concentraciones menores 100 μ M (Wiggins et al., 2018), así como tampoco a la movilidad espermática (Teves et al., 2009). En los ensayos de inhibición empleando ddAdo, observamos una disminución en la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄ sugiriendo la participación de la tmAC en dicha respuesta. Y la activación de la vía tmAC/AMPc fue confirmada al inhibir la respuesta quimiotáctica hacia la progestina empleando una esponja de AMPc, que secuestra este segundo mensajero (Lucchesi et al., 2016).

Otro segundo mensajero involucrado en la respuesta quimiotáctica es el calcio (Teves et al., 2009), que además tiene una participación muy importante en la movilidad espermática (Marín-Briggiler et al., 2003) e hiperactivación (Suarez, 2008). Primero determinamos que la progestina 19-CH₂-P₄ indujera la movilización de calcio intracelular mediante citometría de flujo. Los resultados indican que dosis micromolar de la progestina inducen un aumento del calcio intracelular, en tanto que el influjo de calcio mediado por la progesterona lo hizo a dos órdenes de magnitud menores. Si bien, la progestina presenta más afinidad por el receptor mPR α que la progesterona, el espermatozoide posee numerosos receptores, incluso algunos de ellos son (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011) o están asociados directamente a canales de calcio (Miller et al., 2016). Esto, podría explicar esta diferencia en la sensibilidad al calcio observada por citometría. No obstante, la concentración a la cual se induce la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona y hacia la progestina es varios órdenes de magnitud menor a los cuales se observó el influjo masivo de calcio en todas las células. Entonces, para probar la participación del calcio en la respuesta quimiotáctica de la progestina, se empleó un quelante de calcio intracelular permeable, el Bapta-AM. Este ingresa a la célula y las esterasas citoplasmáticas liberan el Bapta quedado retenido en el interior, secuestrando el calcio citoplasmático independientemente de si proviene de depósitos intracelulares o del medio extracelular. La presencia de Bapta inhibió la respuesta quimiotáctica hacia la progestina 19-CH₂-P₄, sugiriendo la participación del calcio de manera similar a lo observado en la respuesta quimiotáctica hacia la progesterona (Teves et al., 2009). La inhibición de la respuesta quimiotáctica hacia concentraciones picomolares de la progestina 19-CH₂-P₄ mediada por el Bapta sugiere que durante la orientación habría al menos un incremento de calcio. Sin embargo, ¿por qué no se observan incrementos en el calcio intracelular por citometría a concentraciones picomolares? Existen dos posibles explicaciones. Una tiene que ver con que la respuesta quimiotáctica se produce en respuesta a un gradiente de concentración, y no a una concentración constante como la que está presente durante el ensayo de citometría, ya que la

forma de aplicación de los esteroides podría inducir respuestas diferentes (Uñates *et al.*, 2014). La otra explicación, tiene que ver con la dinámica del aumento del calcio. El espermatozoide es una célula rápida y requiere estar censando de manera permanente la concentración del attractante, con el fin de corregir el rumbo rápidamente. Por lo tanto, los influjos y eflujos de calcio deben ser del orden de los milisegundos, y probablemente esa resolución temporal no pueda ser alcanzada en la medición por citometría.

En conclusión, la progestina 19-CH₂-P₄ induce quimioatracción en espermatozoides humanos capacitados, inhibe la quimiotaxis inducida por la progesterona y activa parte de la misma vía de señalización quimiotáctica que la progesterona. Y dado que esta progestina 19-CH₂-P₄ activa de manera específica al receptor mPR α , el conjunto de resultados obtenidos en esta tesina sugiere que la progesterona induciría quimiotaxis espermática a través del receptor mPR α .

Bibliografía:

- Adler J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1973;**74**:77–91.
- Bahat A, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Perioovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod* 2005;**20**:2118–2121.
- Balbach M, Beckert V, Hansen JN, Wachten D. Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2017; Elsevier Ireland Ltd
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. *The culture of mouse embryos in vitro. Methods Mamm Embryol* 1971; San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005;**11**:205–214.
- Dominguez EM, Moreno-Irusta A, Guidobaldi HA, Tribulo H, Giojalas LC. Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis. *Theriogenology* 2018;**122**:1–8.
- Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;**7**:276–285.
- Ernesto JI, Weigel Munoz M, Battistone MA, Vasen G, Martinez-Lopez P, Orta G, Figueiras-Fierro D, la Vega-Beltran JL De, Moreno IA, Guidobaldi HA, *et al.* CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol* 2015;**210**:1213–1224.
- Espósito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken M a M, Robben TJ a a, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL a, Duin M van, Conti M, *et al.* Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:2993–2998.
- Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, Giojalas LC. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod* 2002;**67**:1565–1571.
- Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meizel S, Wehling M. Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺-fluxes in sperm. *Endocrinology* 1999;**140**:5999–6002.
- Gardner AJ, Evans JP. Mammalian membrane block to polyspermy: New insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 2006;**18**:53–61.
- Gatica L V., Guidobaldi HA, Montesinos MM, Teves ME, Moreno a. I, Uñates DR, Molina RI, Giojalas LC. Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**:559–569.
- Gil PI, Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Sanchez R, Giojalas LC. Chemotactic response of frozen-thawed bovine spermatozoa towards follicular fluid. *Anim Reprod Sci* 2008;**108**:236–246.

- Giojalas LC, Guidobaldi HA, Sánchez R. Sperm Chemotaxis in Mammals. In Cosson J, editor. *Flagellar Mech Sperm Guid* 2015;, p. 272–307. Bentham Science Publishers: Sharjah, Emiratos Árabes Unidos.
- Giojalas LC, Rovasio RA, Fabro G, Gakamsky A, Eisenbach M. Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril* 2004;**82**:247–249.
- Guidobaldi HA, Cubilla M, Moreno A, Molino MV, Bahamondes L, Giojalas LC. Sperm chemorepulsion, a supplementary mechanism to regulate fertilization. *Hum Reprod* 2017a;**32**:1560–1573.
- Guidobaldi HA, Hirohashi N, Cubilla M, Buffone MG, Giojalas LC. An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2017b;**84**:310–315.
- Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Anastasía A, Giojalas LC. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One* 2008;**3**:e3040.
- Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Giojalas LC. Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction* 2012;**143**:587–596.
- Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod* 2002;**17**:1441–1446.
- Kelder J, Azevedo R, Pang Y, Vlieg J de, Dong J, Thomas P. Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific. *Steroids* 2010;**75**:314–322.
- Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran T V. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem Biol* 2011;**6**:716–723.
- Lishko P V., Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 2011;**471**:387–391.
- Lucchesi O, Ruete MC, Bustos MA, Quevedo MF, Tomes CN. The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLC ϵ /IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2016;**1863**:544–561.
- Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría F, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 2003;**79**:1396–1403.
- Mesibov R, Ordal GW, Adler J. The range of attractant concentrations for bacterial chemotaxis and the threshold and size of response over this range. Weber law and related phenomena. *J Gen Physiol* 1973;**62**:203–223.

- Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides Mammalian sperm. *Curr Biol* 2013;**23**:443–452.
- Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko P V. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science* 2016;**6887**..
- Morisawa M, Yoshida M. Activation of motility and chemotaxis in the spermatozoa: From invertebrates to humans. *Reprod Med Biol* 2005;**4**:101–114.
- Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod Fertil* 1999;**115**:23–27.
- Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky a, Pinchasov M, Eisenbach M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod* 2008;**23**:2339–2345.
- Rienzo J a, Di, Guzman a. W, Casanoves F. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 2002;**7**:129–142.
- Rienzo JA Di, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat. 2011; Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Schwartz N, Verma A, Bivens CB, Schwartz Z, Boyan BD. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochim Biophys Acta* 2016;**1863**:2289–2298.
- Sloan TFW, Qasaimeh MA, Juncker D, Yam PT, Charron F. Integration of Shallow Gradients of Shh and Netrin-1 Guides Commissural Axons. *PLoS Biol* 2015;**13**:1–24.
- Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell J a, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 2003;**299**:2054–2058.
- Spehr M, Schwane K, Riffell J a, Barbour J, Zimmer RK, Neuhaus EM, Hatt H. Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol Chem* 2004;**279**:40194–40203.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011;**471**:382–386.
- Suarez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 2002;**37**:140–143.
- Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:647–657.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:23–37.
- Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas LC, Tur-kaspa I, Eisenbach M. Human

- sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod* 2005;**20**:761–767.
- Tan W, Aizen J, Thomas P. Membrane progesterin receptor alpha mediates progesterin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Gen Comp Endocrinol* 2014;**200**:18–26.
- Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* 2006;**86**:745–749.
- Teves ME, Guidobaldi HA, Uñates DR, Sanchez R, Miska W, Publicover SJ, Morales Garcia AA, Giojalas LC. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One* 2009;**4**:e8211.
- Thomas P. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol* 2008;**29**:292–312.
- Thomas P. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen Comp Endocrinol* 2012;**175**:367–383.
- Tubbs C, Thomas P. Progesterin signaling through an olfactory G protein and membrane progesterin receptor-alpha in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. *Endocrinology* 2009;**150**:473–484.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica (Cairo)* 2012;**2012**:607427.
- Uñates DR, Guidobaldi HA, Gatica LV, Cubilla MA, Teves ME, Moreno A, Giojalas LC. Versatile action of picomolar gradients of progesterone on different sperm subpopulations. *PLoS One* 2014;**9**:e91181.
- Veitinger T, Riffell JR, Veitinger S, Nascimento JM, Triller A, Chandsawangbhuwana C, Schwane K, Geerts A, Wunder F, Berns MW, *et al.* Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *J Biol Chem* 2011a;**286**:17311–17325.
- Veitinger, Veitinger T, Riffell JR, Veitinger S, Nascimento JM, Triller A, Chandsawangbhuwana C, Schwane K, Geerts A, Wunder F, *et al.* Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *J Biol Chem* 2011b;**286**:17311–17325.
- Vianello F, Olszak IT, Poznansky MC. Fugetaxis: active movement of leukocytes away from a chemokinetic agent. *J Mol Med (Berl)* 2005;**83**:752–763.
- Villanueva-Díaz C, Arias-Martínez J, Bermejo-Martínez L, Vadillo-Ortega F. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil Steril* 1995;**64**:1183–1188.
- WHO. *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. In Cooper TG, Aitken J, Auger J, Baker H, Barratt CLR, Behre HM, Björndahl L, Brazil C,

Jonge C De, Doncel G, et al., editors. 2010; WHO Press: Switzerland.

Wiggins S V., Steegborn C, Levin LR, Buck J. Pharmacological modulation of the CO₂/HCO₃⁻/pH-, calcium-, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. *Pharmacol Ther* 2018;**190**:173–186.

Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 2000;**260**:268–278.

Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003a;**100**:2237–2242.

Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003b;**100**:2231–2236.

Zuccarello D, Ferlin a, Garolla a, Menegazzo M, Perilli L, Ambrosini G, Foresta C. How the human spermatozoa sense the oocyte: a new role of SDF1-CXCR4 signalling. *Int J Androl* 2011;**34**:e554-65.

Agradecimientos:

- ◆ Agradezco al Centro de Biología Celular y Molecular perteneciente a FCEFyN de la UNC por brindarme el espacio y los elementos para poder llevar a cabo mi trabajo; como a todos sus integrantes.
- ◆ Al mi director Dr. Alejandro Guidobaldi por darme la oportunidad de formar parte de su proyecto de investigación, por su acompañamiento continuo, su paciencia, su confianza y sus conocimientos.
- ◆ A los profesores en los que me encontré en el recorrido de mi formación académica por brindarme las herramientas para llegar hasta aquí.
- ◆ A los integrantes de mi Tribunal de Tesina, Dra. Laura Giojalas, Dra. Angélica Rivarola y el Dr. Eduardo Clop que de manera altruista formaron parte de este proceso.
- ◆ A personitas especiales con que me tope en la facu: Mica, Sofi, Agos, que me hicieron pasar buenos momentos y me acompañaron en este camino.
- ◆ A mis amigas/os de toda la vida por estar ahí.
- ◆ A mis padres por ser mis pilares fundamentales; por darme la oportunidad de poder haber realizado mi carrera de grado acompañándome en todo momento y brindándome lo que necesitaba.
- ◆ A mi hermana Marina por sus consejos, explicaciones de química y compañía. A mi hermano Joaquín por darme una chispa de frescura cada día. ¡A ambos los quiero mucho!
- ◆ A Matías por formar parte de mi vida, su amor, su acompañamiento continuo, sus consejos, por darme las fuerzas en los tiempos difíciles y por creer en mí.