

00381

46



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INTERACCION DE GAMETOS DE CERDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

HECTOR FERNANDO SERRANO

300012

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Fertilización y Desarrollo Embrionario Temprano del Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Indice

	Páginas
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II, III
Resumen	IV
Abstract	V
Prefacio	1,2
Capítulo 1	
Interacción de gametos	3-18
Ovocitos y espermatozoides.....	4 - 6
Interacciones iniciales	7 - 8
Capacitación	9 - 11
Substancias de atracción de espermatozoides.....	12 -13
Reacción acrosomal.....	14 - 17
Interacción ovocito-espermatozoide.....	18 - 21
Consideraciones finales.....	22
Referencias.....	23-28
Capítulo 2	
Aportaciones al campo	29 - 47
Actividad atrayente de espermatozoides.....	30 - 33
Integridad membranal de espermatozoides.....	34 - 41
Agregación de espermatozoides.....	42 - 47

DEDICATORIA

A mi querida familia, el tesoro que me permite buscar nuevos horizontes.

**A Lolis, mi compañera y esposa.
Tú eres lo más hermoso que existe en mi vida.**

A mis adorados hijos:

Tu inteligencia Héctor Daniel, es un reto que se renueva y vigoriza día con día.

Fey, mi preciosa bailarina que siempre trata de ser una inteligente ganadora.

A mis hermanos, el apoyo perenne y la enseñanza del firme respeto.

A mis sobrinos, que considero como mis hermanos. Su ánimo y afán de superación me contagian.

A la memoria de mi madre, ELODIA SERRANO

**De ti aprendí a no rendirme,
a extender mi mano
para ayudar a quien lo necesite,
a tratar de ir siempre, un paso adelante.**

Tu ejemplo siempre nos guía. Te quiero por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los integrantes del jurado su paciencia y comprensión en la revisión de este trabajo.

Especialmente agradezco las enseñanzas del Dr. Adolfo Rosado García quien aún sin proponérselo, nos permite aprender la forma en que debe hacerse la Investigación Científica con su ejemplo y constantes cuestionamientos, sin perder nunca la calidad humana.

Al Dr. Miguel Betancourt, por haberme iniciado en la vida Académica.

Tres personas han tenido gran influencia en el desarrollo de los trabajos que me permiten aspirar a ser Investigador:

Dr. Jerry Hedrick quien además de Maestro, es parte de mi familia que me abrió las puertas de su laboratorio y, junto a su esposa Karel, las de su casa.

Nate Wardrip (q.e.p.d.) por sus sólidos conocimientos, su amistad, lealtad y ayuda en mi primera aventura americana.

A mis amigos a ambos lados del Río Bravo. No importa cuán separados estemos, siempre tendré un pensamiento positivo de cada uno de ustedes. Por su amistad y apoyo, GRACIAS.

A mis compañeros del pequeño mundo que es la UAM, especialmente a José Luis Gómez, Enrique Mendieta, Maru Fraile, Tere Fonseca, Jorge Morales y Blanca Rivero.

A mis amigos de licenciatura Carmen Rosales, Alejandro Miranda, Javier Alvarez y sus respectivas familias. Incluimos también a los lejanos Olivia y Ricardo pues en cada reunión están en nuestros pensamientos y recuerdos.

**The best tool for research
is an educated brain to
process information**

**Harrison "Jack" Schmitt
First Nerd on the moon
(Astronauta, Apolo XVII)**

RESUMEN.

En cerdos, como en otros mamíferos, el proceso de fertilización implica diversos aspectos funcionales tanto de los organismos adultos como de los gametos que producen. El depósito de gametos masculinos es sólo el inicio de varios cambios tanto funcionales como moleculares que le permitirán interactuar con el ovocito.

Varios autores han propuesto la presencia de moléculas que actúan como quimioatrayentes al espermatozoide permitiéndole dirigirse preferencialmente al sitio en donde se llevará a cabo la fertilización, aunque su naturaleza es muy discutida.

Una vez que ha interactuado con la cubierta del ovocito, el espermatozoide sufre un proceso excitósico altamente regulado conocido como reacción acrosomal. Este proceso implica la pérdida parcial de la membrana plasmática y la exposición de una membrana interna. Finalmente, la interacción entre el ovocito y el espermatozoide puede interferirse con moléculas que cubran a uno u otro gameto, como es el caso de las lectinas.

En este trabajo, tratamos de caracterizar al posible factor atrayente de espermatozoides de cerdo presente en el líquido folicular, de detectar los cambios en los carbohidratos presentes en la membrana plasmática producto de la reacción acrosomal y de determinar el efecto de una lectina en la interacción de gametos de cerdo.

Encontramos que el factor atrayente del líquido folicular del cerdo es una proteína de 8.6 kilodaltones cuya secuencia amino terminal es similar a la de la apolipoproteína B2 (Serrano et al, 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 782-784). La integridad de la membrana plasmática que cubre la región acrosomal de los espermatozoides de cerdo y humano pueden ser detectada mediante el uso de la lectina de cacahuete y esta integridad puede alterarse por la estructura tridimensional de la cubierta del ovocito (Serrano et al. 2001. *Arch. Androl.* 47: 59-65). Finalmente, la lectina presente en los tallos de dos especies de *Bursera* son capaces de aglutinar los espermatozoides de cerdo y humanos y esta capacidad depende de la presencia de los carbohidratos de la lectina (Serrano y García-Suárez, 2001. *Arch. Androl.* 46: 15-20).

ABSTRACT

In pig, as in other mammals, fertilization is a process that involves several functional aspects of the adult animal and the gamete they produce. Male gamete deposition into the female genital tract is just the beginning of all molecular and physiological changes the sperm cell have to had in order to interact properly with the oocyte.

Several authors have proposed the existence of very different molecules with sperm attracting activity that supposedly enable them to travel to the place where the oocyte is. The nature of these molecules is not yet really disclosed.

Once the sperm cells interact with the egg vestment, a highly exocytic event takes place: the acrosome reaction. During this process, the sperm plasma membrane is partially removed exposing the inner acrosomal membrane. Finally, sperm-egg interaction can be interfered by using lectins that could interact with the carbohydrate residues on either gamete.

In this work, we try to isolate and characterize the sperm attracting activity from the pig follicular fluid, to detect the changes on the sperm plasma membrane in response to acrosome reaction-inducing substances and to determine the effect of a plant-derived lectin on gamete interaction.

We found that the sperm attracting activity in pig follicular fluid is associated to an 8.6 kilodalton protein whose N-end sequence is similar to that of apolipoprotein B2 (Serrano et al, 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 782-784). Sperm membrane integrity on the acrosome region of pig and human spermatozoa can be evaluated by using peanut agglutinin (PNA) and the acrosome-reaction inducing capacity of the pig zona pellucida depends on its three dimensional structure (Serrano et al, 2001. *Arch. Androl.* 47: 59-65). Finally, lectins present in stems of two *Bursera* species agglutinate human and pig capacitated spermatozoa and their binding is dependent on the carbohydrate moiety of the lectin (Serrano y Garcia-Suarez, 2001. *Arch. Androl.* 46:15-20).

PREFACIO

La presente tesis es el resultado de investigaciones tanto bibliográficas como experimentales acerca de la interacción de gametos que hemos realizado. Su estructura permite pasar de un plano global a los resultados particulares de la interacción de los gametos del cerdo.

En el primer capítulo hemos tratado de describir los aspectos moleculares más característicos del proceso de fertilización tomando como punto de partida las características que presentan los gametos utilizados en los estudios del proceso de fertilización, enumerando solo algunos detalles de su superficie y que sirven de preámbulo.

A lo largo del primer capítulo, incorporamos algunas de las evidencias experimentales que se han encontrado utilizando gametos de roedores, ovinos, bovinos e incluso humanos tratando de desarrollar un modelo que permita explicar los eventos de las diferentes etapas de la fertilización.

Debido a que existen pocas evidencias experimentales sin que esto les resté importancia, los temas referentes a la formación de reservorios de espermatozoides en diferentes regiones del tracto genital femenino y del efecto quimioatrayente que tiene el líquido folicular, son tratados de manera muy sucinta.

Nuestros estudios acerca de una proteína con capacidad quimioatrayente es uno de los primeros en la identificación y caracterización de la fracción proteica presente en el líquido folicular.

Los modelos de regulación de la reacción acrosomal que se incorporan en el primer capítulo permiten explicar la importancia de nuestro trabajo acerca de su evaluación en cerdos utilizando lectina de cacahuete y pone de manifiesto la importancia de la estructura tridimensional de la zona pelúcida en la inducción de la reacción acrosomal, aspecto que también está presente en el mismo trabajo.

La barrera final de la interacción de los gametos es la fusión de sus membranas (Rosado, 2001) por lo que los últimos apartados del capítulo uno tienen que ver propiamente con ella.

Aunque no de manera exhaustiva, hemos tratado de describir la forma en la cual los carbohidratos de la zona pelúcida de roedores y de cerdo interactúan con las proteínas de la membrana espermática en donde las evidencias experimentales indican la presencia de moléculas tan diversas como glicosiltransferasas, homólogas a factores de coagulación e incluso enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y acrosina.

Finalizamos el primer capítulo con la descripción del modelo de fusión de membranas de los gametos descrito con mayor detalle en el cual los actores principales son proteínas heterodiméricas formadas por la fertilina α - β por parte del espermatozoide y la integrina $\alpha v \beta 1$ de la membrana del ovocito el cual fue descrito inicialmente para roedores pero que se encuentra en otras especies como el cerdo y humanos. En este último caso, con evidencias contrastantes.

El último artículo del capítulo 2 en donde reportamos el uso de una proteína aislada de un vegetal, es solo una muestra de las estrategias que se pueden utilizar para disminuir la interacción entre gametos. En la primera etapa que nos encontramos de estas investigaciones demostramos que una glicoproteína aislada tanto de las hojas como de los tallos de dos especies de *Bursera* evitan la interacción de gametos de cerdo in vitro y que este efecto depende de la presencia de los carbohidratos, comportamiento típico de una lectina.

CAPITULO 1

INTERACCION DE GAMETOS

Ovocitos y espermatozoides

La fertilización es un proceso que al mismo tiempo es tanto el fin como el principio (Rosado, 2001). Por una lado, marca el fin de la ovogénesis y la espermatogénesis. Por otro lado, es el punto de partida del desarrollo y diferenciación de un nuevo organismo.

Algunos aspectos del proceso, se han descrito usando metodologías tan diferentes que van desde el análisis al microscopio, hasta animales manipulados genéticamente por lo que no expresa sólo un gene de todo su acervo (animales "knock out") o que expresan genes que no corresponden a su especie (animales transgénicos).

Mucho de lo que se conoce actualmente de los aspectos bioquímico y moleculares se ha demostrado en las últimas dos décadas pero, aún y cuando la gran cantidad de información dista mucho de disminuir, existen algunas etapas que aún se conocen muy poco.

En esta revisión no se pretende mostrar un conocimiento total de la fertilización, que por otro lado han sido cubiertos excepcionalmente por las revisiones de Rosado (2001), Wassarman y Albertini (1994), y Yanagimachi (1994), sino de ensamblar algunos de los modelos que se han descrito para explicar diversos aspectos del proceso de fertilización desde el enfoque del espermatozoide y tratar de simplificarlos para detectar las porciones poco entendidas de cada modelo. Este ensamble trata de incorporar solamente las evidencias recientes, aunque en algunos casos se incorporan las evidencias fundamentales.

La interacción entre los gametos en condiciones fisiológicas normales puede estudiarse a diferentes niveles. Si bien es obligatorio el uso de gametos, estos pueden encontrarse en diferentes etapas de desarrollo por lo que debe tomarse en cuenta el tipo de células que se está estudiando. Así pues, los espermatozoides pueden obtenerse tanto del epidídimo, como en eyaculados de animales maduros sexualmente.

Las glicoproteínas que se encuentran en la membrana plasmática del espermatozoide eyaculado tienen un origen muy diverso. Algunas se encuentran en dominios característicos que se estructuran como parte de la actividad de síntesis proteica y el transporte de membranas mientras la célula lleva a cabo el proceso de espermatogénesis (Yanagimachi, 1994).

Estos dominios no son permanentes, sino que pueden reflejar modificaciones producidas en respuesta a las condiciones fisiológicas particulares a que son expuestos los espermatozoides en las diferentes etapas del proceso. Así por ejemplo, los resultados de Shur y Neely (1988) muestran que una enzima que participa en la interacción del espermatozoide con la cubierta glicoproteica del ovocito de rata, la galactosil-transferasa, se puede detectar en la superficie del espermatozocito y sobre la región postacrosomal de los espermatozoides recuperados de la luz de los túbulos seminíferos, mientras que si se utilizan espermatozoides recuperados del tracto genital femenino, esta enzima cubre solamente la región del acrosoma.

Otras proteínas no son producto del aparato de síntesis proteica del espermatozocito sino que son secretadas por células epiteliales que delinean al epidídimo, como es el caso de la proteína DE que se localiza en espermatozoides de rata (Cameo y Blaquier, 1976, Cohen et al, 2000). Otras más provienen de las glándulas accesorias del macho, principalmente como producto de las secreciones de la próstata, o del mismo tracto genital femenino como la proteína específica del oviducto OSP que es importante tanto en la fertilización como el desarrollo embrionario temprano (Kuoba et al, 2001).

El origen tan diverso forma de facto dominios de la membrana espermática cuya función durante la fertilización es muy diversa. Algunas de las moléculas que se transportan a la membrana durante la espermiogénesis pueden procesarse posteriormente ya sea por los productos secretados en la próstata o en el tracto genital femenino de tal forma que toman su estructura activa que, de otro modo, no podría obtener. Este es el caso de la fibronectina que puede detectarse solamente después que el proceso de capacitación de los espermatozoides humanos se ha llevado a cabo (Fusi y Bronson, 1992; Fusi et al, 1992).

Este tipo de procesamiento brinda una nueva dimensión al fenómeno dado que las modificaciones se llevan a cabo en el lugar preciso y en el momento adecuado de tal manera que la molécula adquiere su forma activa solo cuando se requiere.

Muy variadas metodologías se han utilizado para estudiar este fenómeno, por ejemplo, los cambios en los azúcares terminales de glicoproteínas o glicolípidos se han detectado mediante lectinas marcadas (Fierro et al, 1996) o anticuerpos específicos y los genes de algunas de ellas se han clonado o se ha suprimido la expresión de ese gene particular.

De manera análoga, los ovocitos pueden tomarse directamente de los folículos en diferentes etapas de madurez o bien, una vez que han sido liberados del folículo. En diferentes especies animales en las cuales la

hembra ovula un número muy limitado de ovocitos, se le puede inducir a producir mayor número de ovocitos por tratamiento hormonal. Los requerimientos de los experimentos son determinantes en la selección del tipo de gametos requeridos, con las consecuentes características que implica la estimulación.

A diferencia de lo que ocurre con los espermatozoides, la cubierta que cubre a los ovocitos podría considerarse como constante desde que se sintetiza mientras se encuentra en crecimiento. Las proteínas que constituyen la zona pelúcida (ZP) no sufren modificaciones una vez que se ha ensamblado esta cubierta acelular (Wassarman, 1999) con lo que la interacción inicial entre el ovocito y el espermatozoide implica modificaciones principalmente en la superficie de éste último.

Interacciones iniciales con el tracto genital femenino.

Una vez que los espermatozoides son depositados en el tracto genital femenino, interactúan con diferentes componentes de características muy variables. Algunos de estos se depositan al mismo tiempo que lo hacen los espermatozoides, tal es el caso de los componentes provenientes de las secreciones prostáticas.

Algunos otros compuestos, como las mucinas, que se producen en el tracto genital femenino, se combinan con las moléculas del eyaculado por lo que al menos momentáneamente, los espermatozoides se enfrentan a una primera barrera de selección que sólo después de cierto tiempo, los de mayor movilidad pueden liberarse de esta primera barrera (Yanagimachi, 1994).

En la mayoría de los casos y dada la dificultad de estudiar las interacciones iniciales entre el espermatozoide, los componentes del moco cervical, y los del líquido seminal, no existe evidencia suficiente de estudios in vivo que los expliquen. Esto ha permitido que, para algunos investigadores, las evidencias que se han obtenido en experimentos in vitro sean solo algunas respuestas que presentan los espermatozoides bajo condiciones específicas, que reflejar fenómenos que tendrían los espermatozoides bajo condiciones fisiológicas.

En la mayoría de los euterios, aún cuando se depositan varios millones de espermatozoides en las porciones iniciales del tracto genital, sólo una mínima parte es capaz de liberarse. Especies como los bovinos, ovinos, porcinos y roedores, presentan especializaciones anatómicas o funcionales que sirven de reservorios de los cuales se liberan los espermatozoides por mecanismos de naturaleza variada (Revah et al, 2000) y que dependen del estado hormonal de la hembra para liberarse (Suarez et al, 1991).

En bovinos, se demostró que la interacción entre un receptor para fucosa localizado en la membrana del espermatozoide permite que interactúen con los residuos de fucosa de las glicoproteínas de la membrana de las células epiteliales que delimitan el útero y oviductos de las hembras.

Cuando se modifica este receptor membranal, la interacción entre los espermatozoides y las células epiteliales se ve alterada. Esto indica que es a través de este receptor que los espermatozoides se mantienen en este reservorio funcional de tal manera que puedan ser detenidos al menos

momentáneamente antes de continuar su viaje hacia el sitio donde se llevará a cabo la fertilización.

Al mismo tiempo, la modificación de este receptor a fucosa permite que se exponga una molécula capaz de unirse a manosa por lo que se facilita la interacción entre el espermatozoide y el ovocito (Revah et al, 2000).

Capacitación

Una vez que los espermatozoides se han liberado de las mucinas o la interacción con las células epiteliales ha disminuido, son sujetos de diversos fenómenos que no están completamente entendidos ya que varias etapas bioquímicas del proceso no se han caracterizado.

Durante el proceso de capacitación, los espermatozoides adquieren la habilidad de interactuar con el gameto femenino y fertilizarlo. Se han desarrollado varias técnicas que evalúan alguno de los rasgos característicos de la capacitación. El método de la clorotetraciclina, por ejemplo, permite evaluar con un patrón característico a los espermatozoides en los que se ha completado la capacitación, que han llevado a cabo la reacción acrosomal, o cuyas membranas se encuentran alteradas (Visconti et al, 1999).

El fenómeno de capacitación se ha tratado de estudiar con base en las evidencias que se pueden adquirir in vitro. La albúmina es un componente característico de los medios de cultivo en los cuales se colocan los espermatozoides para llevar a cabo la capacitación.

Aparentemente, la albúmina ayuda a incrementar la fluidez membranal al remover el colesterol (Go and Wolf, 1985). Esta remoción facilita la interacción de los receptores de la cubierta del ovocito que, como veremos posteriormente, inicia uno de los eventos exocíticos más dramáticos y regulados: la reacción acrosomal.

Ahora bien, bajo condiciones in vivo, ¿quien es la responsable de esta remoción? Therien y colaboradores (2001) proponen que en espermatozoides de bovino la remoción de colesterol se lleva a cabo en dos etapas. La primera es producto de la interacción breve con el plasma seminal. La proteína del líquido seminal de bovino a la que denominaron BSP por sus siglas en inglés, se encarga de retirar una gran cantidad de colesterol así como cantidades relativamente bajas de otros lípidos membranales, mientras que la proteína BSP se mantiene unida.

Al mismo tiempo, y gracias a que la unión de la proteína BSP a la membrana del espermatozoide se lleva a cabo a través de su interacción con la fosfatidilcolina membranal, actúa como estabilizante de la fluidez membranal evitando una pérdida adicional de fosfolípidos.

La segunda fase del proceso se inicia en el tracto genital femenino cuando la lipoproteína de alta densidad presente en el líquido folicular (FF-HDL, por sus siglas en inglés) retira a la BSP de la superficie de la membrana con lo que ahora otras proteínas de menor afinidad, dentro de las que se encuentra posiblemente la albúmina, remueven nuevamente una cantidad considerable de fosfolípidos y colesterol, incrementando la fluidez membranal (Therien et al, 2001).

La detección de calmodulina (CaCM) en la cabeza y cola de espermatozoides de ratón ha llevado a investigar la posibilidad de que esta proteína pueda tener un papel en el proceso de capacitación si se toma en cuenta que este proceso requiere de Calcio extracelular.

En el ratón, Si y Olds-Clarke (2000), encontraron resultados que indican que la calmodulina posiblemente active a la adenilato ciclasa, aunque la inhibición de la CaCM no disminuye la fosforilación de residuos de proteínas características que se encuentran en espermatozoides capacitados.

Estos autores explican esta aparente controversia indicando que mientras que el cAMP es necesario para la activación de algunas protein cinasas, igualmente puede actuar a muy bajas concentraciones, por debajo de los límites necesarios para la activación de los procesos que requieren de la CaCM.

Cuando se evalúa el patrón característico de movimiento de la cola espermática conocido como hiperactivación como otro indicador de capacitación, estos mismos autores encuentran que no es un proceso dependiente de cAMP, pero sí de la acción de la CaCM (Si y Olds-Clarke, 2000).

En el humano, los cambios asociados a la capacitación dependen principalmente del transportador de bicarbonato asociado al metabolismo de cAMP. En el modelo propuesto por Visconti et al (1999), la fosforilación de proteínas asociada a la capacitación, es producto tanto de la activación de una proteína cinasa A (PKA), como de alguna otra vía (Visconti et al, 1999).

Una vía adicional que podría explicar la fosforilación de proteínas que se observa durante la capacitación sería a través de las especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico (NO). La presencia de NO afecta las señales más evidentes de la capacitación como son la hiperactivación y la interacción entre el espermatozoide y las cubiertas del ovocito.

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento con compuestos que producen NO se correlaciona con el nivel de proteínas fosforiladas en espermatozoides humanos (Herrero et al, 1999). La interacción de NO y cAMP tiene un efecto estimulante sobre la fosforilación específica de

proteínas. Aparentemente, NO puede estimular mediante la transfosforilación dependiente de PKA o mediante la inhibición de la fosfodiesterasa.

Si se analiza la definición propuesta por Chang (1984) basada en el tiempo a la luz de las características bioquímicas y fisiológicas que se toman en cuenta actualmente (Visconti et al, 1995a), es evidente que a pesar del gran avance que ha tenido este aspecto, nuestro conocimiento del fenómeno está aún muy lejos de entenderse completamente.

Substancias de atracción de espermatozoides.

En el tracto genital femenino, los espermatozoides deben mantenerse utilizando diferentes fuentes de energía. Las secreciones vaginales, del oviducto y el contenido folicular pueden modificar no sólo las características exteriores del espermatozoide, sino también su movilidad y capacidad de respuesta a estímulos. Los ensayos *in vitro* han tratado de simular los diferentes medios en los cuales se encuentra el espermatozoide a lo largo de su viaje hacia el sitio donde ocurrirá la fertilización (Hong et al, 1993; Yanagimachi, 1994).

La movilidad de los espermatozoides en el tracto genital femenino se ha asociado a factores físicos y químicos. El fenómeno de reología positiva se ha demostrado en espermatozoides de bovinos y otras especies (Roberts, 1970) y ha sido la base para implementar diferentes técnicas para analizar la actividad atrayente del líquido folicular (Eisenbach et al, 1999a).

El desarrollo de ensayos específicos en los cuales se suprime total o parcialmente la movilidad del espermatozoide ha sido controversial. El ensayo de Cohen-Dayag y colaboradores (1995), por ejemplo, está basado en los que se utilizan en microbiología y que permiten evaluar tácitamente la capacidad quimioatrayente que pueda tener un tipo de soluto. Algunos más, permiten hacer la evaluación sin tomar en cuenta este aspecto (Villanueva-Díaz et al, 1995), pero siempre con la presencia de un control en donde los errores metodológicos son corregidos por lo que el efecto del factor puede apreciarse.

Como es de esperarse, una de las características que debe cuidarse en el desarrollo de cualquier ensayo, es la correspondencia entre un proceso fisiológico y las evidencias que arrojen los experimentos. En el caso de la quimioatracción, se ha demostrado que únicamente los espermatozoides capacitados son capaces de responder al estímulo, mientras que los recién eyaculados o que se incuban en condiciones que no permiten la capacitación, no lo pueden hacer (Cohen-Dayag, 1995).

Estos ensayos han mostrado que la actividad quimioatrayente puede asociarse a moléculas tan diferentes como la progesterona (Villanueva-Díaz et al, 1995; Navarro et al, 1998), o la sustancia P (Sliwa, 2001). Varios autores han demostrado la actividad quimioatrayente del líquido folicular (Fabbri et al, 1988; Nichol et al, 1997; Oliveira et al, 1999; Yao et al, 2000; Tacconis et al, 2001), el ácido hialurónico (Sliwa, 1999) o una

proteína de bajo peso molecular termoestable y aún no caracterizada (Ralt et al, 1999; Eisenbach, 1999b).

En un intento por caracterizar la porción proteica del líquido folicular responsable de la actividad quimioatrayente, nuestro grupo purificó mediante cromatografía de exclusión seguida de electroforesis preparativa una proteína de 8.6 kilodaltones del líquido contenido en folículos maduros de ovarios de cerdo. Al transferir la proteína aislada a membranas de nylon para secuenciarla utilizando la reacción de degradación del amino terminal, los resultados mostraron que el extremo amino terminal es similar al de la apolipoproteína b2 (Serrano et al, 2001a).

Este resultado es importante por dos aspectos. Primeramente, en el líquido folicular se han aislado preferentemente lipoproteínas de alta densidad, como las FF-BSP (Therien et al, 2001), no así lipoproteínas de baja densidad. En segundo lugar, todas las apolipoproteínas descritas y cuya secuencia se encuentra en las bases de datos de acceso libre como la Swissprot, tienen un papel preferentemente de transporte de lípidos.

Con base en estos resultados, una explicación posible es que la actividad quimioatrayente se deba a la proteína por sí misma o bien, que este efecto se presente cuando la proteína se encuentre asociada a algún lípido, lo que explicaría el efecto quimioatrayente de la progesterona.

Reacción acrosomal.

La reacción acrosomal es un evento altamente especializado que llevan a cabo los espermatozoides capacitados. Aunque ha sido estudiada con gran detalle y que existen varias técnicas para su evaluación en diferentes especies (Aitken y Brindle, 1993; Serrano et al, 2001b; Tesarik et al, 1993; Ward y Storey, 1984), los eventos moleculares que la inician no están muy bien definidos.

Está ampliamente documentado que la interacción entre gametos es la señal para este evento y que el inductor natural es la zona pelúcida, la cubierta celular que rodea a los ovocitos.

Los estudios *in vitro* indican que algunos factores del líquido folicular, de los cuales destaca la progesterona (P₄), son capaces de inducir la reacción acrosomal. Sin embargo, también se ha demostrado que la acción de ésta no se debe a receptores citoplásmicos, sino que utilizando compuestos fluorescentes asociados a moléculas acarreadoras, se ha demostrado en diferentes especies la existencia de receptores membranales que actúan a través de la inducción de una cascada de fosforilación característica de la transducción de señales.

En la reacción acrosomal inducida por P₄, cuando el espermatozoide llega al istmo, la interacción de proteínas como las HDL-FF induce algunos cambios en la fluidez de la membrana y de componentes proteicos que permite que algunas estructuras, como el receptor membranal a P₄, pueda estar expuesto. El receptor membranal a P₄ no es del tipo de los receptores asociados a proteínas G.

Por otro lado, la interacción del receptor a P₄ y su ligando aumentan las concentraciones citoplásmicas de Ca²⁺, así como el incremento de vida media larga de Na⁺ producto de la actividad de canales membranales sensibles a flunarizina (Patrat et al, 2000).

La estimulación inducida por la progesterona en espermatozoides de ratón se ha evaluado mediante la elevación de la concentración citoplásmica de Ca²⁺. El tipo de canal por el cual el Ca²⁺ es transportado está en controversia. Algunos autores sugieren que el fenómeno se debe a la acción de un tipo de canal activado por cGMP y no por canales de Ca²⁺ del tipo "T" (Kobori et al, 2000), mientras que otros autores indican que son precisamente estos canales los que se activan cuando se utiliza la zona pelúcida como inductor de la reacción acrosomal (Florman et al, 1998; Patrat et al, 2000).

Cualquiera que sea el tipo de canales que se activan, el receptor a P_4 actúa primeramente utilizando una proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y posteriormente por una proteína que la ancla (AKAP).

Este sistema media el transporte citoplásmico del fragmento activo de la PKA y en células somáticas, interactúa con otros compartimentos citoplásmicos o aún con proteínas específicas como la CaCM, la calreticulina o calbindina, encargadas de la regulación de Ca^{2+} (Jordan et al, 2000).

Si este modelo puede aplicarse a los espermatozoides, parece razonable postular que después de que la progesterona interactúa con su receptor membranal, y con la activación de la adenilato ciclasa se incrementan las concentraciones de cAMP. Este segundo mensajero permite la activación del sistema PKA-AKAP de tal forma que el fragmento regulador de la PKA pueda interactuar tanto con la calmodulina y con algún tipo de canal específico para Ca^{2+} , lo que incrementa las concentraciones citoplásmicas de este ion.

Este incremento, a su vez, promueve cambios en las proteínas del citoesqueleto de tal forma que al menos en la región que comprende la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que cubre al acrosoma, se fusionen en varios puntos con lo que se libera el contenido.

La fusión de las membranas es un proceso que depende del tiempo que al menos en sus etapas iniciales implica regiones muy pequeñas y a medida que transcurre el tiempo, se extiende a regiones mayores con lo que se expone la membrana acrosomal interna y, en las zonas donde termina esta intersección se mantiene la membrana plasmática en la denominada región ecuatorial.

Este proceso de fenestración y fusión en zonas múltiples, permite la liberación del contenido del acrosoma por lo que se conoce como reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994).

La reacción acrosomal bajo condiciones fisiológicas es inducida por la interacción entre la cubierta de los ovocitos, principalmente la zona pelúcida y los receptores a ella en la superficie del espermatozoide. Utilizando péptidos de la zona pelúcida de ratón después de haberla sometida a proteólisis parcial, Leyton y Saling (1989) demostraron que los péptidos menores a 6 000 daltones podían interactuar con la superficie de los espermatozoides es decir, se unen a sus receptores.

Estos péptidos son incapaces de inducir la reacción acrosomal por sí solos. Solamente cuando se forman agregados por la presencia de anticuerpos bivalentes (Fab'_2 o anticuerpos íntegros), son capaces de inducir la

reacción acrosomal lo que estas autoras interpretan como la necesidad de agregación del receptor a la zona pelúcida.

En nuestro trabajo acerca de la importancia de la estructura tridimensional de la zona pelúcida en la eficiencia de la inducción de la reacción acrosomal (Serrano et al, 2001b), demostramos que el tratamiento con agentes desnaturalizantes del tipo del Ditiotreitól y el 2-mercaptoetanol, altera la capacidad de inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo y humanos.

Hasta este momento, solamente la familia 90K de la ZP porcina es la que se ha demostrado que tiene una estructuración con base a puentes disulfuro (Hedrick y Wardrip, 1986).

Tomando en cuenta estos estudios, es posible que la interacción entre el receptor a ZP en la membrana del espermatozoide y ZP requiera no solo una estructura tridimensional adecuada que exhiba los residuos de carbohidrato, sino que estos se encuentren en relación más o menos estrecha de tal suerte que permitan que los receptores en el espermatozoide puedan ser agregados y así dar inicio a la reacción acrosomal.

Carrera y colaboradores (1996) demostraron que durante la reacción acrosomal de espermatozoides humanos se lleva a cabo una transfosforilación de receptores membranales del tipo de las tirosina quinasas (TK).

De acuerdo a la propuesta de Visconti y colaboradores (1995a,b), este proceso de activación permite que otras proteínas interactúan con el receptor, de tal manera que son fosforiladas y activadas adquieren la capacidad de interactuar con otras proteínas del tipo de las quinasas, lo que podría explicar el aumento en la cantidad de proteínas fosforiladas que se detectan en este proceso.

El papel decisivo que tiene el Ca^{2+} en el proceso de reacción acrosomal ha sido demostrado utilizando varias metodologías que van desde el uso de ionóforos específicos hasta el uso de compuestos cuya fluorescencia depende de la concentración de Ca^{2+} . Algunos autores han demostrado que la fuente principal de Ca^{2+} es el medio en el cual están los espermatozoides.

Cuando se incuban en medios con Ca^{2+} , son capaces de llevar a cabo la reacción acrosomal pero son incapaces de responder al estímulo cuando se utilizan medios libres de Ca^{2+} . Bajo estas condiciones, es necesaria la presencia de poliaminas, en particular la espermidina para que se lleve a cabo una adecuada reacción acrosomal de espermatozoides humanos (Meizel y Turner, 1993).

Por otro lado, si la fuente principal de Ca^{2+} es interna, podría ser de las mitocondrias del cuello del espermatozoide o alguna porción especializada del retículo análoga al calcisoma de células no musculares.

La calmodulina (CaCM) es la proteína reguladora de Ca^{2+} que se ha demostrado su papel en la capacitación y la reacción acrosomal. En espermatozoides, no se han localizado otras proteínas que intervengan en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} . Estas evidencias indirectas, según varios autores (Visconti et al, 1995a,b; Morales et al, 2000; Si y Olds-Clarke, 2000), indican que la fuente principal de Ca^{2+} es el medio extracelular.

En espermatozoides humanos, la reacción acrosomal inducida por precursores de NO requiere de la presencia de Ca^{2+} pues su presencia en la actividad de CaCM permite que la óxido nítrico sintasa (NOS) lleve a cabo su función y active una guanilato ciclasa soluble. El aumento de este nucleótido cíclico a su vez activa a una proteína cinasa dependiente de él (PKG) (Revelli et al, 2001).

Interacciones entre el ovocito y el espermatozoide, penetración de la zona pelúcida y fusión de membranas.

Utilizando lectinas o anticuerpos específicos se han caracterizado varias moléculas implicadas en la interacción de gametos que llevará finalmente a su fusión. Florman y Wassarman (1975) demostraron que los carbohidratos unidos a los residuos de serina o treonina de la proteína ZP₃ de los ovocitos de ratón eran los responsables de la interacción entre los ovocitos y los espermatozoides.

La proteína ZP₃ y sus análogos funcionales o estructurales han sido los prototipos del receptor primario a los espermatozoides que aún no llevan a cabo la reacción acrosomal y es en los cuales reside la especificidad de la unión (Snell y White, 1996). Sin embargo, también se ha propuesto que la proteína ZP₂ sirva como proteína de unión de espermatozoides que están realizando o han finalizado la reacción acrosomal por lo que se le denomina receptor secundario (Wassarman y Albertini, 1994).

Aunque se han hecho varios intentos para determinar la estructura e identidad del residuo de carbohidrato terminal responsable de la interacción (Mori et al, 1991; Yurewicz et al, 1991) no se ha logrado. Sin embargo, este tipo de estudios ha permitido encontrar las características específicas de otros modelos. Así por ejemplo, en el cerdo, son los carbohidratos tri- y tetra-antennarios unidos a asparagina y no los que se encuentran unidos a serina o treonina los responsables de la unión inicial de los espermatozoides (Nakano et al, 1996).

En este mismo animal, los residuos terminales de lactosa presentes en las tres familias glicoproteicas de la ZP porcina presentan un arreglo laminar heterogéneo y son, aparentemente, los responsables de la unión inicial entre los gametos (Dunbar et al, 2001).

Otros oligosacáridos no reductores con uniones alfa (Litscher et al, 1995), β-N-Acetil glucosamina y manosa (Cormwall et al, 1991), fucosa (Huang y Yanagimachi, 1984), son solo algunos de los carbohidratos que se han implicado, principalmente por su capacidad de inhibir la unión de espermatozoides a la ZP de ovocitos en experimentos in vitro.

Dentro de los factores externos que afectan la unión de espermatozoides a ovocitos, se encuentra la hormona liberadora de hormonas gonadotróficas (GnRH). Se ha visto que esta hormona aumenta el número de espermatozoides unidos a la ZP homóloga. Este aumento depende del Ca²⁺

extracelular transportado a través de canales para Ca^{2+} (Morales et al, 2000).

Varias moléculas localizadas en la superficie de la membrana del espermatozoide han sido implicadas en el proceso de unión de gametos. La galactosil transferasa (Miller et al, 1992), una proteína de 60 kilodaltones con actividad enzimática que utiliza UDP galactosa (Hamilton, 1980) y la fucosil transferasa (Apter et al, 1988) a través del uso de fucosa, son dos enzimas que pueden unirse a los residuos de carbohidrato de ZP₃. Algunos sulfogalactosilglicerolípidos (White et al, 2000) y otras proteínas aisladas de espermatozoides y aún no totalmente caracterizadas (Moos et al, 1990; Zayas et al, 1995) también han sido implicadas, aunque se desconoce el mecanismo por el cual actúan.

Otro candidato potencial para mediar la interacción inicial entre la ZP y la membrana del espermatozoide es la zonadhesina (Hardy y Garbers, 1995), una proteína de 16.4 kilodaltones sintetizada exclusivamente en el testículo, que se localiza en la región apical de la cabeza espermática y que presenta una homología restringida cuando se analiza el RNA entre el ratón, cerdo y humanos. En el cerdo, la zonadhesina interactúa con la ZP homóloga a través de dos residuos de cisteína localizados en sus dominios D0-D1 y D2-D4.

Tanto la galactosil transferasa como la zonadhesina están implicadas en la interacción de espermatozoides con el acrosoma intacto y las proteínas de la ZP que forman el receptor primario. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, la presencia de un receptor secundario para espermatozoides que han o están perdiendo la membrana plasmática ha permitido plantear la posibilidad de que otras moléculas puedan mediar la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida.

De acuerdo al modelo propuesto por Hedrick y colaboradores (1989) y apoyado por los resultados experimentales de Liu y Baker (1993) y Crosby y Barros (1999), la acrosina que se encuentra incluida en la membrana acrosomal interna interactúa con los carbohidratos de ZP₂ a través de un dominio de lectina expuesto por este tipo de acrosina, mientras otra porción de ella digiere activamente la matriz formada por la proteína ZP₁.

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la ZP utilizando una combinación de actividades mecánicas y proteolíticas, el espermatozoide que ha llevado a cabo la reacción acrosomal entra al espacio perivitelino. La interacción entre el segmento ecuatorial de la cabeza espermática y la membrana plasmática del ovocito fuerza la orientación tangencial de la cabeza espermática, por lo que interactúa únicamente con la porción de membrana plasmática presente en la región ecuatorial (Yanagimachi, 1994).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La fusión de la membrana de los gametos se ha asociado a la interacción de varias proteínas. Actualmente, el modelo con mayor cantidad de evidencias experimentales que lo apoyan, es el que comprende la interacción por la membrana del espermatozoide del heterodímero formado por la fertilina y en la membrana del ovocito el heterodímero de integrina.

El estudio de la proteína espermática del hámster detectada por el anticuerpo monoclonal anti-PH 30 permitió no sólo determinar que al bloquearla con el anticuerpo se disminuía la cantidad de espermatozoides que se fusionaban a la membrana de ovocitos libres de ZP (Blobel et al, 1990), sino además, iniciar los estudios que llevaron a la caracterización de un miembro de la familia de proteínas conocida como desintegrinas y metaloproteasas (ADAM por la siglas de A Disintegrin And Metalloprotease, su denominación en inglés) que explica perfectamente la razón de la disminución en la penetrabilidad de ovocitos libres de ZP al utilizar inhibidores de proteasas en la solución en el cual se lleva la evaluación (Yanagimachi, 1994).

Estudios posteriores del mismo grupo de investigadores demostraron que cuando se utiliza esta proteína a la cual se le denomina ADAM 2 o fertilina β (Primakoff et al, 1987) o fragmentos de péptidos en los cuales se incluye el dominio de desintegrina (Almeida et al, 1995; Evans et al, 1995), el porcentaje de ovocitos libres de ZP que son penetrados se ve drásticamente disminuido.

Cuando en el gene de la proteína ADAM 2 de roedores se inserta una mutación que evita que se sintetice un mRNA adecuado para producir una proteína funcional, su fertilidad está fuertemente comprometida, aunque no es nula (Cho et al, 1998) lo que indica que si bien es la principal responsable de la fusión de membranas, no es la única.

Se han detectado varios tipos de integrinas en ovocitos de diferentes especies como el cobayo (Blobel et al, 1992), el ratón (Almeida et al, 1995), el cerdo (Linfor y Berger, 2000), bovinos (Campbell et al, 2000), e incluso humanos (Fusi et al, 1992) por lo que al menos en estas especies la forma en la cual se lleva a cabo la fusión de membranas, podría ser similar.

Cuando se incuban ovocitos de ratón en presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales en contra de la integrina $\alpha 6 \beta 1$, se reduce el número de espermatozoides fusionados entre 30 – 60% respecto del control con anticuerpo no específico (Almeida et al, 1995). En bovinos, la presencia de péptidos que contienen la porción de unión de las integrinas o inmunoperlas cubiertas con el tripéptido RGD (Arginil-glicil-aspartico) no solamente tiene un menor porcentaje de penetración, sino que incrementan las concentraciones citoplásmicas de calcio en una forma similar a lo que

lo harían los espermatozoides e inician la activación partenogénica del ovocito (Campbell et al, 2000).

De acuerdo a las evidencias mostradas por Bigler et al, (1997) así como por Schlondorff y Blobel (1999), la interacción entre la integrina y la fertilina promueve la fusión de gametos. El dominio de desintegrina (o de unión) de ADAM2 en la membrana plasmática de la región ecuatorial de los espermatozoides se une a la integrina de la membrana plasmática de los ovocitos.

Esta interacción induce un cambio en la estructura tridimensional en el dominio de fusión localizado en la otra subunidad de ADAM2, lo que permite su interacción con la matriz hidrofóbica de la membrana plasmática del ovocito. Cuando se agregan varias regiones en donde ADAM2 y la integrina interactúan, se forma un intermediario de semi-fusión el cual al ampliarse forma un poro por donde se permite el ingreso del núcleo espermático.

Este mecanismo es muy explicativo y aparentemente bastante generalizado. Sin embargo, no está libre de argumentos que lo cuestionan. El gene de la fertilina α , fundamental para la interacción, no es funcional en los espermatozoides humanos (Jury et al, 1997).

Como mencionamos anteriormente, en roedores cuyos espermatozoides eran incapaces de sintetizar la fertilina β , su fertilidad se reduce considerablemente, sin ser nula. Estas evidencias han llevado a postular un modelo en el cual se requieren algunos otros factores que auxilien la interacción fertilina-integrina.

Cohen y colaboradores (2000) demostraron que al menos en lo referente al ratón, una proteína de origen epididimario puede ser el factor proteico que auxilia en la fusión mediada por fertilinas-integrinas, ya que cuando está presente en el medio en el cual se colocan ambos gametos, interfiere efectivamente con el proceso normal en una forma que parece competir con el espermatozoide por los sitios que reconocen a esta proteína en el ovocito por lo que se disminuye la fusión de gametos, a pesar de que se utilizan espermatozoides con el binomio fertilina-integrina sin alterar.

En el mismo orden de ideas, se ha demostrado que la expresión de la proteína CD9 en las células de la unión útero-tubal del tracto reproductor de ratones hembra, aumenta el porcentaje de espermatozoides unidos facilitando aparentemente la interacción de alta afinidad entre la fertilina y la integrina (Chen et al, 1999).

Consideraciones finales

En esta breve revisión hemos tratado de incorporar algunas de las evidencias experimentales que han aparecido en la literatura reciente y que explican las modificaciones más importantes que podrían llevarse a cabo tanto en la fisiología como en la composición de la cubierta de los espermatozoides para que puedan alcanzar en estado óptimo la superficie del ovocito y poder llevar a cabo el proceso de la fertilización.

Quedan aún muchas dudas relativas a fenómenos particulares de las diferentes etapas del proceso. En algunos casos, las evidencias específicas en gametos de una especie particular se desconocen por lo que es necesaria la comprobación experimental. En otros casos, la falta de evidencias experimentales hace urgente la implementación de estudios que permitan establecer las características funcionales del proceso.

Creemos que con base en las evidencias que se tienen, es posible detectar varios puntos en los cuales se pueden hacer estudios que permitan ampliar nuestros conocimientos acerca del proceso de fertilización con un enfoque integral y siempre con una perspectiva que permita la diferencia entre los fenómenos netamente *in vitro* y aquellos que puedan llevarse a cabo *in vivo* en condiciones fisiológicas.

Referencias.

1. Aitken, R.J., Brindle, J.P. 1993. Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 8: 1663-1669.
2. Almeida, E.A.C., Houvila, A.P.J., Sutherland, A.E., Stephens, L.E., Calarco, P.G., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., Sonnenberg, A., Primakoff, P.A., Myles, D.G., White, J.M. 1995. Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 81: 1095-1104.
3. Apter, F.M., Baltz, J.M., Millette C.F. 1988. A possible role for cell surface fucosyl transferase (FT) activity during sperm zona- pellucida binding in the mouse. *J. Cell. Biol.* 107: 175 a
4. Bigler, D., Chen, M., Waters, S., & J.M. White. 1997. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trend Cell Biol.* 7: 220-225. 1997.
5. Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M. 1990. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with the acquisition of fertilization competence. *J. Cell Biol.* 111: 69-78.
6. Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356: 248-252.
7. Cameo, M.S., Blaquier, J.A. 1976. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocrinol.* 69: 47-55.
8. Campbell, K.D., Reed, W.A., White, K.L. 2000. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 62: 1702-1709.
9. Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Teesarik, J., Kopf, G.S., Moss, S.B. 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a Calcium/Calmodulin-dependent mechanism: identification of a kinase anchor protein as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev. Biol.* 180: 284296.
10. Chang, M.C. 1984. The meaning of sperm capacitation. *J. Androl.* 5: 45-50.
11. Chen, M.S., Tung, K.S.K., Coonrod, S.A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P.W., Herr, J.C., White, J.M. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96: 11830-1835.
12. Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J.E., Goulding, E. H., Eddy, E.M., Primakoff, P., Myles, D.G. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 281: 1857-1859.

13. Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., Eisenbach, M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 11039-11043.
14. Cohen, D.J., Ellerma, D.A., Cuasnicú, P.S. 2000. Mammalian sperm-egg fusion: Evidence that epididymal protein DE plays a role in gamete fusion. *Biol. Reprod.* 63: 462-468.
15. Cornwall, G.A., Tulsiani, D.R.P., Orgebin-Crist, MC. 1991. Inhibition of the mouse sperm surface α -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol. Reprod.* 44: 913-921.
16. Crosby, J.A., Barros, C. 1999. Effect of recombinant boar β -acrosin on sperm binding to intact zona pellucida during in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 61: 1535-1540.
17. Dunbar, B.S., Timmons, T. M., Skinner, S.M., Prasad, S.V. 2001. Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoproteins. *Biol. Reprod.* 65: 951-960.
18. Eisenbach, M. 1999a. Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* 4: 56-66.
19. Eisenbach, M. 1999b. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev. Genet.* 25: 87-94.
20. Fabbri R., Porcu, E., Lenzi, A., Gandini, L. Marsella, T., Flamini, C. 1988. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 69: 112-117.
21. Fierro, R., Foliguet, B., Grignon, g., Daniel, M., Benc, M.C., Faure, G.C., et al. 1996. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction : modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch. Androl.* 36: 187-196.
22. Florman, A.M., Wassarman, P.A. 1975. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 accounts for its sperm receptor activity. *Cell* 41: 313-324.
23. Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, c., O'Toole, C.M.B. 1998. A perspective of the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm. A tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59: 12-16.
24. Fusi, F.M., Bronson, R.A. 1992. Sperm surface fibronectin. Expression following capacitation. *J. Andrology* 13: 28-35.
25. Fusi, FM., Vignali, M., Busacca, M., Bronson, R.A. 1992. Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 31: 215-222.
26. Go, K.J., Wolf, D. P. 1985. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32: 145-153.
27. Hamilton, D.W. 1980. UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 23: 377-385.
28. Hardy, D.M., Garbers, D.L. 1995. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 270: 26025-26028.

29. Hedrick, J.L., Wardrip, N.J. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families. *Anal. Biochem.* 157: 63-70.
30. Hedrick, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M. 1989. Structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In: *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* (J.R. Witaker, P.E. Sonnett, eds). American Chemical Society (Washington, DC): 212-229.
31. Herrero, M.B., de Lamaride, E., Gagnon, C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol. Reprod.* 61: 575-581.
32. Hong, C.Y., Chao, H.T., Lee, S.L., Wei, Y.H. 1993. Modification of human sperm function by human follicular fluid. A review. *Int. J. Androl.* 16: 93-96.
33. Huang, T.T.F., Yanagimachi, R. 1984. Fucoidin inhibits attachment of guinea pig spermatozoa to the zona pellucida through binding to the inner acrosomal membrane and equatorial domains. *Exp. Cell Res.* 153: 363-373.
34. Jordan, J.D., Landau, E.M., Iyengar, R. 2000. Signal networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 103: 193-200.
35. Jury, J.A., Frayne, J., Hall, L. 1997. The human fertilin α gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem. J.* 321: 577-581.
36. Kobori, H., Miyazaki, S., Kuwabara, Y. 2000. Characterization of intracellular Ca^{2+} increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 63: 113-120.
37. Kouba, A.J., Abeydeera, L.R., Alvarez, I.A., Day, B.N., Buhí, W.C. 2001. Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol. Reprod.* 63: 242-250.
38. Leyton, L., Saling, P.A. 1989. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 108: 2163-2168.
39. Linfor, J., Berger, T. 2000. Potential role of αv and $\beta 1$ integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 120: 65-72.
40. Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Pentilá, L., Niemalá, R., Renkonen, O., Wassarman, P.M., 1995. Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* 34:4662-4669.
41. Liu, D.Y., Baker, H.W.G. 1993. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48: 340-348.
42. Meizel, S., Turner, K.O. 1993. Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on the progesterone-initiated increase in intracellular free Ca^{2+} and acrosome reaction in human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 457-465.
43. Miller, D.I., Macek, M.B., Shur, B.D. 1992. Complementarity between sperm surface β 1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding in vitro. *Nature* 357: 589-593.
44. Moos, J., Pekniková, J., Surneva-Nakova, T.N., Pavlík, M. 1990. *FEBS Lett.* 280: 183-186.
45. Morales, P., Pizarro, E., Kong, M., Kerr, B., Ceric, F., Vigil, P. 2000. Gonadotropin-releasing hormone-stimulated sperm binding to the human zona pellucida is mediated by a calcium influx. *Biol. Reprod.* 63: 635-642.

46. Mori, E., Takasaki, Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Mori, t., Kobata, A. 1991. Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins. *Biochemistry* 30:2078-2087.
47. Nakano, M., Yonezawa, N., Hatanaka, Y., Noguchi, S. 1996. Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil.* 50: 25-34.
48. Navarro, M.C., Valencia, J., Vázquez, C., Cózar, E., Villanueva, C. 1998. Crude mare follicular fluid exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 321-324.
49. Nichol, R., Hunter, R.H., de Lamaride, E., Gagnon, C., Cooke, G.M. 1997. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J. Reprod. Fertil.* 110. 79-86.
50. Oliveira, R.G., Tomasi, L., Rovasio, R.A., Giojalas, L.C. 1999. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J. Reprod. Fertil.* 115: 23-27.
51. Patrat, C., Serres, C., and Juannet, P. 2000. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 62: 1380-1386.
52. Revah, I., Gadella, B.M., Flesch, F.M., Colenbrander, B., Suarez, S.S. 2000. Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol. Reprod.* 62: 1010-1015.
53. Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Occhetti, S., Bosia, A. et al. 2001. Signalling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 64: 1708-1712.
54. Roberts, A.M. 1970. Motility of spermatozoa in fluid streams. *Nature* 228: 375-376.
55. Rommerts, F.F.G. 1992. Cell surface actions of steroids: A complementary mechanism for regulation of spermatogenesis?. In: *Spermatogenesis, fertilization, contraception.* (E. Nieschlag, U.F., Habenicht, eds). Springer-Verlag (Heidelberg): 1-19.
56. Rosado, A. 2001. La barrera final. Un estudio de la interacción entre las membranas plasmáticas del óvulo y del espermatozoide. En: *Biología de la Reproducción II* (J. Velázquez- Moctezuma, ed). Universidad Autónoma Metropolitana (México): 201-228.
57. Schlondorff, J., Blobel, C.P. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112. 3603-3617.
58. Serrano, H. Canchola, E., García-Suárez, M.D. 2001a. Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6-kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 782-784.
59. Serrano, H., Diaz-Esparza, L., Garcia-Suarez, M.D. 2001b. Pig sperm membrane integrity evaluated by lectin labeling. *Arch. Androl.* 47: 59-65.
60. Shur, B.D. Neely, C.A. 1988. Plasma membrane association, purification, and partial characterization of mouse sperm beta 1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 263: 17706-17714.
61. Si, Y., and Olds-Clarke, P. 2000. Evidence for the involvement of Calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 62: 1231-1239.
62. Sliwa, L. 1999. Hyaluronic acid and chemoattractant substances from follicular fluid: In vitro effect of human sperm migration . *Arch. Androl.* 43: 73-76.

63. Stliwa, L. 2001. Substance P and beta-endorphin act as possible chemoattractants of mouse sperm. *Arch. Androl.* 46: 135-140.
64. Snell, W.J., White, J.M. 1996. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85: 629-637.
65. Suarez, S., Redfern, K., Raynor, P., Martin, F., Phillips, D.M. 1991. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role formation of a sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 44: 998-1004
66. Tacconis, P. Revelli, A., Massobrio, M, Batista La Sala, G., Tesarik, J. 2001. Chemotactic responsiveness of human spermatozoa to follicular fluid is enhanced by capacitation but is impaired in dyspermic semen. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18. 36-44.
67. Tesarik, J., Mendoza, C., Carreras, A. 1993. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 59: 424-430.
68. Therien, I., Bousquet, D., Manjunath, P. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 65: 41-51.
69. Villanueva-Díaz, C., Arias-Martínez, J., Bermejo-Martínez, L., Vadillo-Ortega, F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.* 64: 1113-1188.
70. Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S. 1995a. Capacitation in mouse spermatozoa I. Correlation between capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137.
71. Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139-1150.
72. Visconti, P.E., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G.S., Tezon, J.G. 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of human sperm. *Biol. Reprod.* 61: 76-84.
73. Ward, C.R., Storey, B.T. 1984. Determination of the time course of of capacitation in mouse using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 171: 554-563.
74. Wassarman, P.M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96. 175-183.
75. Wassarman, P.M., Albertini, D.F. 1994. The mammalian ovum. In: *The Physiology of reproduction* (E. Knobil, J.D. Neill, eds) 2nd. Edit. Raven Press (New York): 79-122.
76. White, D., Weerachatanukul, W., Gadella, B., Kamolvarin, N., Attar, M. 2000. Role of sulfogalactosylglycerolipid in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* 63: 147-155.
77. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J.D. Neil, eds) 2nd. Edit. Raven Press (New York): 189-317.
78. Yao, Y., Ho., P., Yeung, W.S. 2000. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 73: 680-686.

79. Yurewicz, E.C., Pack, B.A., Sacco, A.G. 1991. Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Mol. Reprod. Develop.* 30: 126-134.
80. Zayas, H., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Casas, E., Córdova, A., Betancourt, M. 1995. Affinity of pig oocyte zona pellucida peptides for sperm proteins. *Med. Sci. Res.* 23: 831-832.

CAPITULO 2

APORTACIONES AL CAMPO DE LA INTERACCION DE GAMETOS.

ACTIVIDAD DE ATRACCION DE ESPERMATOZOIDES EN EL LIQUIDO FOLICULAR ASOCIADA A UNA PROTEINA DE 8.6 kDa.

La interacción de gametos en organismos de fertilización interna podría no ser tan dependiente de la actividad atrayente de los líquidos que rodean a los gametos femeninos, como lo requieren los ovocitos de los equinodermos, para citar algún grupo en donde si se requiera de esta actividad en los cuales la fertilización de los huevos depositados por la hembra se lleva a cabo en el medio.

A pesar de esto, desde hace varios años se ha demostrado la capacidad que tienen algunos compuestos para no solo aglutinar espermatozoides, sino de ejercer una quimioatracción específica de espermatozoides.

Para este fin, se han diseñado cámaras y arreglos especiales en los que se trata de mantener controlados el flujo del líquido en los cuales se depositan tanto las posibles fuentes de sustancias atrayentes así como los espermatozoides.

También se han desarrollado fórmulas matemáticas, equivalentes a las que se usan en el análisis computarizado de semen, en las cuales se toma en cuenta el posible movimiento aleatorio de espermatozoides para distinguirlo del evocado por la presencia de un quimioatrayente.

La fuente principal de factores de atracción al espermatozoide es el líquido folicular. A partir de esta fuente, en diversas especies se ha analizado la capacidad de atracción que pueden tener sus componentes. Entre los más estudiados se encuentran el ácido hialurónico, la progesterona y diversas proteínas no caracterizadas.

En este artículo, reportamos el aislamiento de una proteína de 8.6 kilodaltones (kDa) de peso molecular relativo e iniciamos su caracterización. El análisis del extremo amino terminal indica que se trata de la Apolipoproteína B2.

Esta es la primera vez que se reporta el aislamiento de una lipoproteína de baja densidad en el líquido folicular. Hasta el momento, las lipoproteínas que se han aislado de diferentes fuentes se encargan del transporte de lípidos. Esta proteína de 8.6 kDa podría explicar la acción atrayente que se ha asociado con la progesterona, aunque no descartamos la posibilidad e que sea una actividad propia de la proteína o se encuentre asociada a otro lípido diferente a la progesterona.

Sperm-Attracting Activity in Follicular Fluid Associated to an 8.6-kDa Protein

Hector Serrano,*¹ Enrique Canchola,† and María Dolores García-Suárez‡

*Department of Health Sciences, †Department of Biology of Reproduction, and ‡Department of Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, 09340, DF, México

Received April 10, 2001

Follicular fluid is made of both follicular cell-secreted molecules as well as blood infiltration into the follicle. Sperm-attracting activity has been associated to column-filtered proteins as well as to progesterone. Here we report the initial characterization of a protein with this activity. Follicular fluid was collected from preovulatory follicles in freshly obtained ovaries from a local slaughterhouse. Fluid was cleared from cells and fractionated by size exclusion chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. For gamete interaction, sperm were allowed to swim in an agarose-covered slide designed to separate two wells by a rod in a fixed pattern. At each well, a semisolid agarose solution containing either the attractant with oocytes or control solution in one end, whereas capacitated boar sperm was at the opposite well. Sperm bound to oocytes were evaluated under phase contrast microscopy. Results show that fluid from preovulatory follicles have a sperm attracting activity and that this activity can be associated with an 8600 Dalton protein that at the N-terminal end exhibit close relation to Apolipoprotein B2. © 2001 Academic Press

Key Words: sperm; follicular fluid; apolipoprotein-like; gamete interaction.

Sperm-egg interaction is a process that marks the initiation of the complex and highly regulated phenomenon of fertilization (1). In externally fertilized eggs like sea urchin and other aquatic animals, sperm-egg interaction is secured by the high sperm amount deposited directly on the egg mass by the male. This functionally important reservoirs are also present in internally fertilized eggs (2), and even when the male is capable to ejaculate several million spermatozoa, only a small number reaches the site where fertilization actually takes place due to the sperm selection by the cervical mucus (3).

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: (5) 304 4727. E-mail: hser@xanum.uam.mx.

In this case, the site of deposition and fertilization are separated by a proportionally high distance since first sperm cells have to free themselves from the molecules associated to the reservoir that can be either fucose- or mannose-containing molecules that acts as receptors (4).

During their way up to the site of fertilization, the spermatozoa suffer several changes in a not yet fully understood process called capacitation. Nevertheless, spermatozoa swim up through the upper parts of the female reproductive tract as if they were some sort of signal that attract them precisely to the place where the oocyte is by the activity of a sperm attracting factor (5).

One source for this activity is the follicular fluid. Rait and coworkers (6) have shown that one of the low molecular weight protein components is responsible for the chemoattracting activity present in mouse follicular fluid.

There is also evidence that sperm attracting activity can be associated with hyaluronic acid (7), and progesterone present in human follicular fluid (8). In this case, the authors do not distinguishes between free or protein associated progesterone is the responsible of the detected activity. Here we report the initial characterization of an 8.6-kilodaltons (kDa) protein whose N-terminal sequence is similar to that of Apolipoprotein B2.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) unless otherwise noted. Ovaries from a local slaughterhouse were obtained and transported to the laboratory in an antibiotic-containing balanced salt solution. Follicular fluid from mature (>10 mm diameter) follicles was aspirated under a dissection microscope. Cells were removed by mild centrifugation. 0.10 M TFMIS was added as a protease inhibitor, aliquoted, and frozen until use within the next 3 days (9).

An aliquot was fractionated in a Sephadex G-10 column (Pharmacia, Bromo, Sweden) using 10 mM PBS solution at 1 ml/min flow. One-milliliter fractions were collected and assayed for sperm attracting activity. Positive fractions were pooled and then subjected to preparative electrophoresis on a 10–20% polyacrylamide gel gradient.



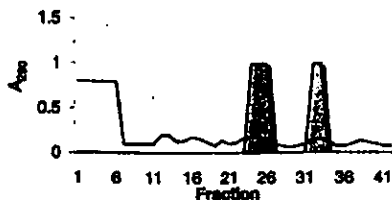


FIG. 1. Size exclusion chromatography. Follicular fluid from preovulatory follicles was centrifuged. One milliliter of cell free supernatant was chromatographed in a Sephadex G-10 column and separated with 10 mM PBS. Fractions were collected and assayed for sperm attracting activity. Positive (shaded) fractions were pooled and electrophoresed.

Oocytes were obtained according to the methods described by Dunbar *et al.* (10). Protein content was determined by the bicinchoninic acid method (11).

Pig ejaculate was obtained by the gloved hand method from healthy trained sires. Seminal plasma was removed by centrifugation at 100g and the pellet was resuspended in TALP medium. Motile spermatozoa were selected by swim up in an albumin-based medium. Motile spermatozoa were capacitated in a 39°C 5% CO₂ in air incubator (12).

After capacitation, sperm cells were tested for chemoattractant. A regular pattern was obtained by pouring an 0.9% agarose coat on a microscope slide containing a plastic template that forms two extremely located wells separated by a thin 2 cm long 2 mm width channel that was filled with medium. At one extreme a 0.9% agarose plug containing full strength follicular fluid, individual or pooled fractions or albumin at equivalent concentrations was deposited. At the other well, 100 capacitated spermatozoa suspended in capacitation medium were poured. The slides were incubated as above and analyzed at 30 min to 1 h intervals. Sperm traveled two-thirds of the length to the plug was recorded and the number of spermatozoa in the albumin-containing plug was taken as random migration and then subtracted to the experimental well. Alternatively, pig oocytes

in soft (0.4%) agarose were used instead the agarose plug. In this case, sperm bound to the oocytes were recorded under phase contrast microscopy. Statistical significance was evaluated after the arcsine transformation by Student's *t* test.

Positive fractions showing the highest attracting effect was pooled and electrophoresed in a 10–20% gradient polyacrylamide gel under nonreducing conditions (13). Individual bands were electroeluted and tested for attracting activity. Positive bands were subjected to peptide sequencing.

N-terminal analysis was performed on purified protein electroblotted on PVDF membrane with a model LF3000 Protein Sequencer (Beckman) by using chemicals and software supplied by the manufacturer.

RESULTS

Sperm attracting activity from follicular pig oocytes was detected after chromatography fractionation (Fig. 1). Positive fractions were pooled and subjected to preparative SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2). Again, sperm-attracting activity was determined for the top three main components and the single isolated band. Agarose plugs containing the lowest molecular weight component can attract spermatozoa in a similar way as total follicular fluid can do so only this fraction was used.

When similar protein amounts of BSA (negative control), freshly isolated follicular fluid (positive control), and the SDS–PAGE isolated fraction was used in the sperm attracting assay, the isolated factor could attract more than 15 times the sperm attracted by the freshly isolated follicular fluid (Fig. 3).

In an attempt to know the responsible component of the activity, an SDS–PAGE factor was transferred onto a nylon membrane and subjected to amino acid sequencing and compared to the available databases.

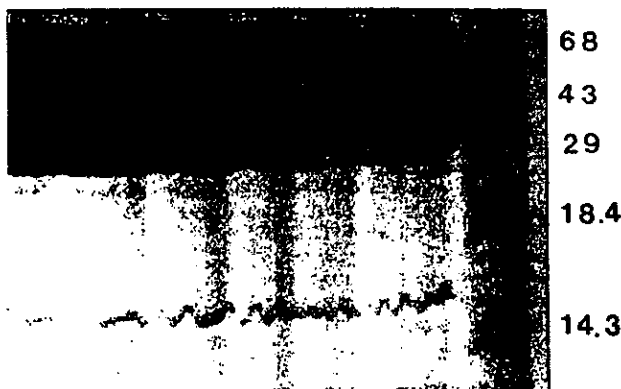


FIG. 2. Preparative electrophoresis of pooled chromatographic fractions. Sperm attracting fractions from Sephadex G-10 fractionated preovulatory pig follicular fluid were electrophoresed by 10–20% gradient SDS–PAGE. Proteins were Coomassie stained. Numbers at right indicate molecular weight standards.

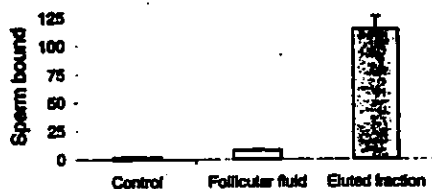


FIG. 3. Sperm attracting activity from preovulatory pig follicles. Column chromatography and SDS-PAGE fractionated proteins (eluted proteins) were compared to BSA-containing TALP medium (control), and freshly isolated follicular fluid in the sperm attracting assay. Data are media from five independent experiments.

The sequence obtained was Aspartic acid-aspartic acid-proline-glutamine-serine, similar to the Apolipoprotein B2 N-end.

DISCUSSION

After deposition, spermatozoa have to travel up into the female genital tract in order to reach and fertilize the ovum. The results from Cohen-Dayag and coworkers (14) indicate that in the follicular fluid a low molecular weight protein acts as sperm attractant guiding the spermatozoa to the fertilization region, the isthmus in the upper oviduct where the ovum is (15). Some other experiments indicate that the sperm-attracting factor is progesterone. By using preovulatory follicles, we have characterized an 8.6-Kda protein that significantly increases the number of sperm attracted to the region where it is deposited. Moreover, this protein can be isolated simply by using size exclusion chromatography and SDS-PAGE techniques.

By N-terminal sequencing, we found that the 8.6-Kda protein has similarity to Apolipoprotein B2. Since the main function of all Apolipoproteins isolated so far is lipid transportation, we can not discard the possibility that the sperm attracting function could be due to a shared action of both progesterone and its carrier protein. Further studies are needed to explore this possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank to the technicians at the Pig Farm from the National University (UNAM) for providing and analyzing the semen

samples. A grant from CONACYT awarded to H.S. funded a small part of this work.

REFERENCES

- Wassarman, P. M. (1999) Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96, 175-183.
- Topfer-Petersen, E. (1999) Carbohydrate-based interactions on the roasts of a spermatozoon to fertilization. *Human Reprod. Update* 5(4), 314-329.
- Senger, P. L. (1993) Site of semen deposition and its effect on fertility and sperm retention: A review. *Reprod. Fert. Dev.* 6, 659-663.
- Revah, I., Gadella, B. M., Flesch, P. M., Colenbrander, B., and Suarez, S. (2000) Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1010-1015.
- Schwartz, R., Brooks, W., and Zinsser, H. H. (1973) Evidence for chemotaxis as a factor in sperm motility. *Fertil. Steril.* 9, 300-308.
- Ralt, D., Goldenberg, M., Thompson, D., Dor, J., Mashiach, S., Garber, D. L., and Eisenbach, M. (1991) Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 2340-2344.
- Silva, L. (1999) Hyaluronic acid and chemoattractant substance from follicular fluid: In vitro effect of human sperm migration. *Arch. Androl.* 43, 73-76.
- Villanueva-Diaz, C., Arins-Martinez, J., Bermejo-Martinez, L., and Vadillo-Ortega, F. (1995) Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.* 64, 1113-1118.
- Benyon, R. J. (1988) Prevention of unwanted proteolysis. In *Methods in Molecular Biology: New Protein Techniques* (Walker, J. M., Ed.), Vol. 3, pp. 1-23. Humana Press, Clifton, NJ.
- Dunbar, B. S., Wardrip, N. J., and Hedrick, J. L. (1980) Isolation, physicochemical properties and macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry* 19, 356-365.
- Smith, P. K., Krohn, R. L., Hellmanson, G. T., Mayhew, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Gueke, N. M., Olson, B. J., and Jenck, O. C. (1985) Protein determination with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Serrano H., and Garcia-Suarez, M. D. (2001) Sperm aggregation by water extracts from two *Bursera* species. *Arch. Androl.* 46, 15-20.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Cohen Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., and Eisenbach, M. (1995) Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 11039-11043.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. (Knobil, E., and Neil, J. D., Eds.), pp. 189-317. Raven Press, New York.

EVALUACION DE LA INTEGRIDAD MEMBRANAL POR MARCADO CON LECTINAS.

La inducción de la reacción acrosomal por los componentes de la zona pelúcida es uno de los fenómenos que pueden ser evaluados en condiciones *in vitro*. Esta evaluación requiere de una metodología rápida que pueda distinguir entre el daño que pueden sufrir los espermatozoides por la simple manipulación y los cambios en la disposición de sus superficie en respuesta al estímulo.

Durante la reacción acrosomal, la membrana plasmática que cubre la porción terminal del espermatozoide se pierde al fusionarse con la membrana externa del acrosoma liberándose el contenido de esta vesícula especializada.

Para poder visualizar estos cambios se han utilizado reactivos que reconozcan moléculas en la superficie celular o en la membrana interna del acrosoma. Con esta base, se utilizó la lectina del cacahuete que reconoce residuos de lactosa, N-acetil-lactosamina, galactosa y N-acetil-galactosamina. En espermatozoides humanos, esta lectina reconoce la membrana acrosomal interna.

Sin embargo, en nuestro artículo reportamos que los residuos reconocidos por esta lectina se encuentran en la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo por lo que la intensidad relativa de la fluorescencia disminuye al exponerse la membrana acrosomal interna.

Una aportación adicional de nuestro trabajo es el análisis que hicimos utilizando la zona pelúcida sometida a dos agentes reductores. Encontramos que la eficiencia en la inducción de la reacción acrosomal de la zona pelúcida porcina utilizando espermatozoides autólogos se ve disminuida al utilizar concentraciones de β -mercaptoetanol o ditioneitol que no inducen proteólisis en las glicoproteínas.



PIG SPERM MEMBRANE INTEGRITY EVALUATED BY LECTIN LABELING

H. SERRANO
L. DIAZ-ESPARZA

Department of Health Sciences, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, D.F., Mexico

D. GARCÍA-SUÁREZ

Department of Biology, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, D.F., Mexico

Sperm integrity is one of the most carefully examined characteristics for artificial insemination in humans and mammals. Techniques have been developed to assess the sperm plasma membrane integrity. Some of them need a well-trained evaluation for correctness, as is the case of the triple stain technique; others are time-consuming and need special equipment, varying from specially adapted microscopes to computer-based analyzers. The authors report the use of fluorescein-labeled peanut agglutinin plus a fluorescein extender that permits an easy evaluation for pig spermatozoa membrane integrity. Sperm integrity in pigs was evaluated before and after zona pellucida-induced acrosome reaction in capacitated sperm. The sperm acrosome reaction was affected when the zona pellucida was reduced.

Keywords acrosome, fertility evaluation, lectin labeling, membrane integrity, peanut agglutinin, sperm

Sperm used for artificial insemination (AI) depends mainly in the conservation of their fertilizing ability. Several methods have been used to evaluate this ability based on several distinctive features, ranging from simple morphology (as the well-formed, tailless or cytoplasm containing sperm ratio) to highly computerized sperm motion analysis or the evaluation of intracellular calcium concentrations [1]. Most of these methods are based on the sperm membrane characteristics in an ill-defined process: the capacitation process [18]. Since the predictive capacity of their methods is low, several additional essays have been developed for analyzing some specific characteristic. For example, one of the methods evaluate specifically the activity of the trypsin-like acrosin release after its liberation from the acrosome is a clear

The authors appreciate the expert technical help of the workers and administrators of the Pig Farm, from the National Autonomous University of Mexico. Part of this work was funded by a grant to IIS from CONACyT.

Address correspondence to Hector Serrano, Dept. Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Ave. Michoacán & Purisima, Apartado Postal 55-635, México City, (0330), D.F. Mexico. E-mail: hectorserrano@xoomm.uam.mx

indicator of the loss of plasma membrane integrity [1]. Other assays mainly evaluate the kinematics characteristics of the sperm sample: head lateral displacement, straight motility, sperm flagella beating, and wave amplitude [13]. All these parameters evaluate the sperm capacity to penetrate through the egg vestments.

Even when most kinetic parameters may be useful in the evaluation of sperm in some assisted reproduction technologies like laparoscopy-guided artificial insemination or in vitro fertilization, most of these data are not determined, so it is necessary to have other evaluation parameters to analyze some other sperm characteristics. Other techniques evaluate the peroxidative capacity of the sperm membrane lipids as a membrane fluidity evaluation parameter or membrane damage. Others focused on the zona pellucida receptor aggregation capacity, a prerequisite to acrosomal reaction [9], or the well-established transduction signaling aspects due to the correct establishment of the tyrosine kinase activity in the sperm receptor [19].

Another target to evaluate is the total membrane function, as in the case of the chlortetracycline triple stain [15]. These methodologies have been looking for specific molecules using monoclonal or highly specific polyclonal antibodies or by looking at carbohydrate-containing proteins using sugar-specific lectins. Sperm membrane mapping has been done with several lectins in several species. We used the peanut agglutinin, which recognizes terminal *N*-acetylgalactose or -lactose residues.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were from Sigma Chemical (St. Louis, MO) unless otherwise noted. Pig ejaculate was obtained by the handed glove method from Durock or Hampshire trained adult boars. The sperm-rich fraction was collected and filtered through a 4-mesh cloth to eliminate as many mucins as possible. Sperm motility and morphology were evaluated. Semen samples were washed by centrifugation. Sperm cells were suspended in a Tyrode-based medium with bovine serum albumin (fraction V), sodium lactate syrup, and sodium pyruvate (TALP).

Capacitation was conducted according to [4] in a 5% CO₂ in air, 39°C incubator for 4 h. Pig zona pellucida was obtained from freshly obtained ovaries from a local slaughterhouse. Follicular oocytes and solubilized zona pellucida were processed according to the methods described in [5]. Protein content was determined by the bicinchoninic acid method [14].

To obtain the time course of the acrosome reaction of pig sperm after capacitation, sperm cells were incubated under the same conditions as above but with added solubilized zona proteins for 30 min in a 96-well plate. Controls used were TALP medium (negative control) or a positive acrosome-induced control made by an equivalent native zona pellucida amount. Aliquots from each well were obtained at 5- to 10-min intervals, lectin-labeled by the method described below, and the acrosomal status of at least 100 sperm per slide was measured. Lectin labeling was performed on sperm cells adsorbed to glass slides. Capacitated sperm cells were smeared over a clean glass slide. Fluorescein-conjugated peanut agglutinin (200 µg/ml) was added to the slide and incubated 20 min in the dark at 37°C [2]. Excess lectin was washed out and then a 50% glycerol-phenylenediamine solution was added to enhance fluorescence [7]. Fluorescence pattern was examined under a Zeiss epifluorescence microscope to investigate the effect of zona pellucida reduction on its acrosome reaction induction activity. Solubilized zona pellucida obtained as above was treated either with 2-mercaptoethanol or Dithiothreitol (DTT, Calbiochem, San Diego) to reduce intra- and interchain disulfide bridges present in the proteins. After treatment, reduced zona proteins were equilibrated by extensive dialysis against

0.9% NaCl solution and then incubated for 15 min with capacitated pig sperm. Samples were obtained at 5-min intervals and then stained with the peanut agglutinin to assess the acrosomal status of at least 100 sperm cells. The Duncan multiple *t* test was used to analyze the data obtained in all experimental procedures.

RESULTS

Several techniques have been used to determine the sperm acrosomal membrane status. One of the most commonly used is the triple stain with chlortetracycline, which gives 3 differential patterns associated with both the sperm membrane integrity and physiological status of the sperm [15]. However, even when theoretically simple, in fact, the evaluation needs a good trained observer to distinguish between each differential pattern. Almost since the time lectins were discovered, they have been used to study cell membranes and study has not been restricted to isolated blood cells; lectins have been used on different normal and transformed cell surfaces.

There were differential patterns in peanut agglutinin binding on pig sperm plasma membrane (Figure 1). Peanut agglutinin was distributed homogeneously on the sperm surface when the sperm plasma membrane was not altered (Figure 1A). When the acrosome reaction was induced by the addition of pig zona proteins, this lectin bound to sugar moieties located only on the surface and was not associated to the inner acrosomal membrane (Figure 1B), and remained only on the sperm plasmalemma located in the postacrosomal region after the acrosome reaction has been completed (Figure 1C).

When exposed to solubilized zona pellucida, sperm initiated the acrosome reaction, a well-defined exocytic process that was time dependent. Acrosome-reacted sperm was noted even at

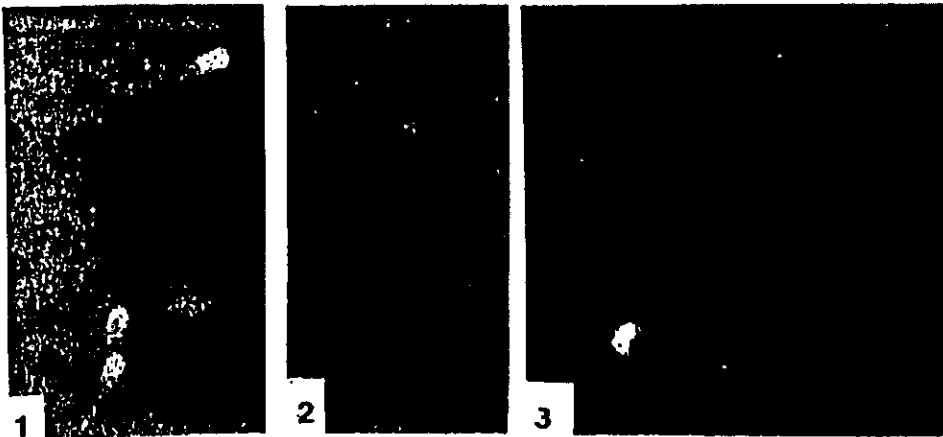


Figure 1. Different labeling patterns of capacitated pig spermatozoa. Acrosome-intact spermatozoa (1) a uniform lectin distribution. If the plasma membrane damaged, parts of this are clearly seen as flat panels out of the plane. Acrosome-reacted spermatozoa show a light fluorescence below the acrosome region (3) marking the equatorial segment. Sperm cells that are actually going through the acrosome reaction (2) show pickled acrosome labeling sometimes lacking parts of the sperm head.

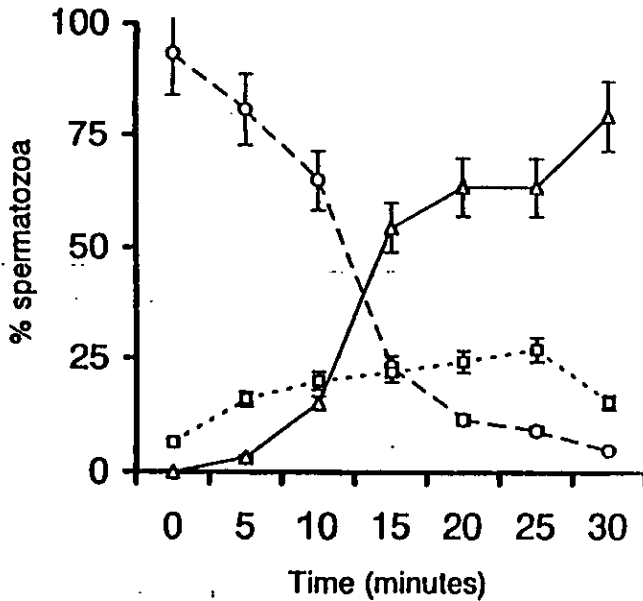


Figure 2. Time course of the acrosome reaction of capacitated pig spermatozoa. Washed and capacitated pig spermatozoa were incubated in TALP medium containing solubilized pig zona pellucida. Acrosomal status was evaluated by the peanut agglutinin binding pattern and classified as acrosome intact (open circles), intermediate (squares), or acrosome reacted (triangles). Data from at least three independent experiments.

the beginning of the incubation period (Figure 2). This can be due to the presence of damaged sperm cells during processing and centrifugation or to the presence of "false" acrosome reacted sperm found in freshly ejaculated sperm. Zona pellucida-induced acrosome reaction showed a constant increase during the incubation period, whereas in control sperm this process was not similar.

When zona pellucida was reduced by two different compounds, its acrosome-inducing capacity was affected. The cells incubated for 30 min in either DTT or 2ME-reduced zona pellucida were in the intermediate state even when positive (solubilized pig zona proteins) controls showed higher amount of acrosome-reacted cells (Figure 3). It would appear that disulfide bridges are important for the zona to be able to interact with the zona receptor on the sperm plasma membrane.

DISCUSSION

Methodologies to determine the acrosomal status or membrane integrity of sperm cells are important, since most of the problems in artificial insemination or *in vitro* fertilization are due to the lack of membrane integrity or to a high number of acrosome-reacted sperm. One simple assay, besides morphology, is to evaluate the carbohydrate-modified molecules located on the

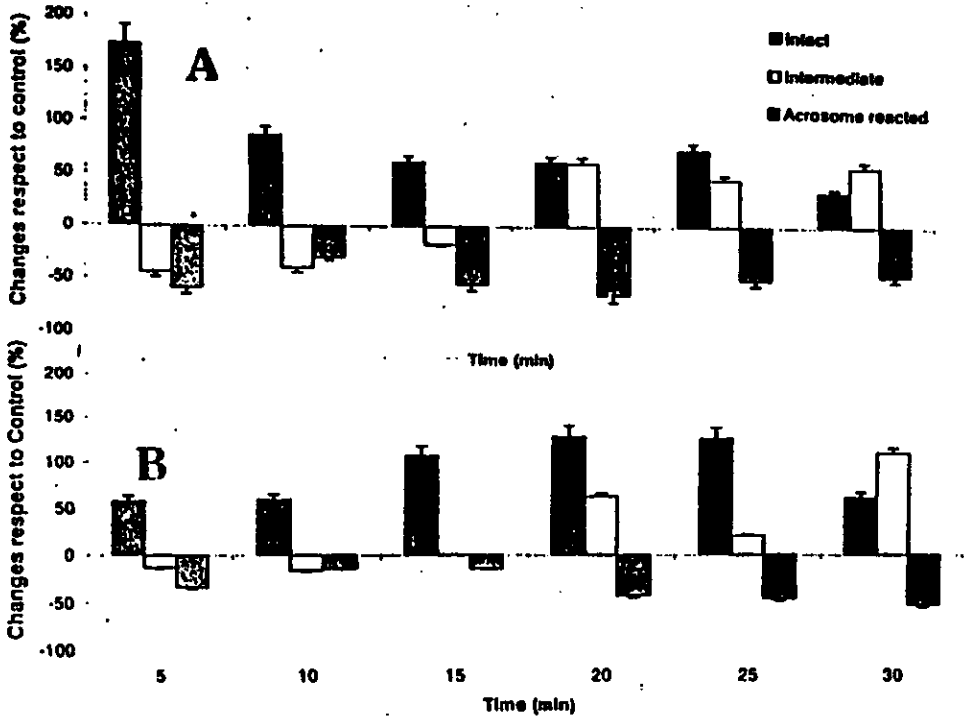


Figure 3. Changes in the acrosomal status of capacitated pig spermatozoa exposed to reduced zona pellucida with (A) dithiothreitol (DTT) or (B) β -mercaptoethanol (2-ME). Capacitated pig spermatozoa were incubated either with nonreduced zona pellucida (positive control) or reduced zona pellucida for 15 min. Samples were taken at the designated times after this initial incubation and sperm cells labeled with fluorescein-conjugated peanut agglutinin. At least 100 spermatozoa were recorded in each slide. Data are from at least three independent experiments and were taken out from those obtained from the positive control.

sperm surface. Lectins labeled with either colloidal gold or, as in this report, a fluorochrome could be adapted rapidly to any low-budget laboratory. Several lectins have been used to evaluate the membrane characteristics of sperm from different species as in the case of the human sperm with the *Pisum sativum* (pea) agglutinin [10] or that of *Ricinus communis* agglutinin-60 that labels the plasma membrane of several species [1]. Mortimer et al. [12], demonstrated that peanut agglutinin labels the inner acrosomal membrane of intact human sperm.

We have been interested in the importance of the three-dimensional structure of the pig zona pellucida and the roles it plays in the fertilization process. By using the peanut agglutinin assay, we found that the presence of intact disulfide bridges is important for the zona pellucida to induce the acrosome reaction. These results are in agreement with those of Leyton/Saling [9], who found that zona receptors on the sperm surface have to be aggregated to induce the

acrosome reaction in mouse. Visconti et al. [17] shows that the putative zona receptor has an intrinsic tyrosine kinase property, which during the acrosome reaction has to be aggregated.

The most currently accepted model for acrosome reaction to take place involves several steps. First, zona receptors have to interact properly with a structured zona pellucida protein (ZP₃) that has to have an adequate spatial distribution and need to be aggregated [9]. Second, this interaction then permits the tyrosine kinase to transphosphorylate each other [16]. Third, the involvement of a G-protein signal transduction pathway giving rise to the second messengers IP₃ and diacylglycerol (DAG) that, with the phosphorylation signal, triggers the phosphorylation cascade increases the intracellular calcium [3], activates the cGMPase and cAMPases, increasing the levels of cyclic nucleotides, and then activates cGMP- and cAMP dependent protein kinases [8]. There is a rise in intracellular Ca²⁺ due to the activation of membrane Ca²⁺ channels and also the rise in NO, which are characteristic molecular events during the acrosome reaction [6].

Finally, one of the postulated molecules for sperm-egg interaction is a galactosyltransferase located on the sperm surface that is able to recognize the terminal lactose residue on the ZP₃ peptide [11]. The use of this simple technique to assess the membrane integrity status could help in the understanding of the most dramatic exocytic event representing the acrosome reaction.

REFERENCES

1. Cardullo RA, Florman HM (1993): Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. In: *Methods in enzymology*, vol. 255: Guide to techniques in mouse development. Wassarman PM, DePamphilis ML (Eds). San Diego, CA: Academic, pp 136-153.
2. Fichurova R, Anderson DJ (1991): Use of sperm viability and acrosomal status assays in combination with immunofluorescence technique to ascertain surface expression of sperm antigens. *J Reprod Immunol* 20:1-13.
3. Florman HM (1994): Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 165:152-164.
4. Hartman JF, Hutchinson CI (1974): Nature of the pre-penetration contact interactions between hamster gametes in vitro. *J Reprod Fertil* 36:49-57.
5. Hedrick JL, Wardrip NJ (1986): Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families. *Anal Biochem* 157:63-70.
6. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C (1999): Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* 61:575-581.
7. Johnson G, Nogueira-Araujo G (1981): A simple method of reducing fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods* 43:349-350.
8. Leclerc P, Kopf GS (1995): Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol Reprod* 52:1227-1233.
9. Leyton L, Saling P (1989): Evidence that aggregation of the mouse sperm receptor triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 108:2163-2168.
10. 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. *J Reprod Fertil* 95:755-763.
11. Miller DJ, Macek MB, Shur BD (1992): Complementarity between sperm surface β 1,1 galactosyltransferase and egg-coat ZP₃ mediates sperm-egg binding. *Nature* 357:589-593.
12. Mortimer D, Curtis EI, Miller RG (1987): Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* 81:127-135.

13. Neill J, Olds-Clarke P (1987): A computer assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res* 8:121-140.
14. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
15. Talbot P, Chacon RS (1980): A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res* 3:211-216.
16. Visconti PE, Kopf GS (1998): Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 55:684-692.
17. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. II: protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121:1139-1150.
18. Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezcan JG (1999): Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61:76-84.
19. Ward CR, Kopf GS (1993): Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol* 158:9-34.
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, ed 3. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
21. Wolf DP (1989): Acrosome status quantitation in human sperm. *Ann J Reprod Immunol* 20:106-113.

AGREGACION DE ESPERMATOZOIDES POR EXTRACTOS ACUOSOS DE DOS ESPECIES DE *Bursera*.

El desarrollo de métodos de control de la natalidad es una de las prioridades que la Organización Mundial de la Salud ha sugerido en países subdesarrollados. A pesar de que algunas compañías farmacéuticas han declarado que se tiene ya disponible un anticonceptivo que induce estados temporales de infertilidad en el hombre, la realidad es que aún no se pone a disposición de la población ya no digamos de países subdesarrollados, sino incluso de aquellos países en donde se encuentran los laboratorios de investigación de las compañías que dicen haberlo desarrollado.

En el otro extremo se encuentran los métodos desarrollados por la herbolaria y que han demostrado su eficiencia. Quizás el caso más conocido sea el del polialcohol extraído de las semillas del algodón: el gosispol.

Este polialcohol es tomado como parte de la dieta de la población china. Tanto en condiciones naturales como experimentales, se ha encontrado que este componente es capaz de inducir etapas de oligospermia en humanos. A diferencia de otros compuestos, este estado se revierte cuando se excluye de la dieta la fuente del compuesto.

En nuestro trabajo tratando de encontrar lectinas que pudiesen ser utilizadas en el estudio de las interacciones entre gametos, encontramos que utilizando el extracto acuoso de los tallos y hojas de *Bursera fagaroides* y de *Bursera schlechtendalii* es posible inducir la agregación de espermatozoides de cerdo.

Debido a que este es un fenómeno que se presenta de manera espontánea en espermatozoides capacitados, utilizamos igualmente espermatozoides humanos. En ambos casos, la respuesta fue de agregación superior a la que podría inducir la albúmina.

Encontramos también que esta respuesta dependía de la presencia de carbohidratos unidos al extracto proteico. Estudios que están en progreso en nuestro laboratorio indican que el monómero de la lectina es una proteína de 35 kilodaltones (kDa) y reconoce residuos de lactosa. Estos últimos hallazgos fueron presentados durante el congreso sobre Tecnología y Salud Reproductiva en Andrología y Fisiología de Gametos llevada a cabo en Charleston, Carolina del sur, Estados Unidos.



SPERM AGGREGATION BY WATER EXTRACTS FROM TWO *BURSERA* SPECIES

K. SERRANO

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Dept. Ciencias de la Salud, Mexico City, DF, Mexico

M. D. GARCIA-SUAREZ

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Dept. Biología, Mexico City, DF, Mexico

Some plants have more than the common utility value, as is the case of some members of the *Bursera* species such as the Mexican copal, a plant used for worship. Water extracts of several plants have vaginal contraceptive properties. The authors evaluated the sperm agglutinating activity of two *Bursera* species on human and boar sperm. Extracts from stems and leaves were obtained. Capacitated sperm samples were used in all cases. There were different agglutinating capacities, which were not observed in the vehicle-only samples. The most frequent sperm agglutination response was that involving the heads. Agglutinating activity was higher from stem- than leaf-derived extracts. The results indicate that proteins present in the extracts are responsible for the aggregation of sperm heads.

Keywords: contraceptives, lectin, sperm, sperm aggregation

Steroid contraceptives are used worldwide and are the primary choice in family planning programs. However, and despite its efficacy, an increasing number of papers are reporting the relationship between their use and some physiological alterations, ranging from gain of body weight to some types of cancer, mainly cervical and breast cancer [14]. For several years, efforts have been conducted to develop alternative, safe contraceptives. Researchers have developed both synthetic and hormone-derived abortive strategies, such as in the case of the β -chain human gonadotrophin hormone-based effort of Indian investigators [13] and the French RU-486 abortive pill that acts probably regulating the MUC1 expression in the uterus [11]. Gamete-specific targets have also been investigated, such as the LDH-X, hyaluronidase, acrosin, sorbitol dehydrogenase from the sperm [12], the oocyte zona pellucida components [1, 6, 7], or

The authors acknowledge the expert technical assistance of Francisco Zárate. A grant awarded to HS from CONACYT funded part of this research.

Address correspondence to Hector Serrano, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Dept. Ciencias de la Salud, Apartado Postal 55-535, Mexico City, DF, 09340, Mexico. E-mail: hectorserrano@hotmail.com

even the embryo-specific fertilization antigen FA-1 [5]. In developing countries, WHO has shown a preferential use of traditional, almost home-made preparations for fertility control and some success have been achieved, as is the case of Gossypol derived from the *Gossypium* seeds, which is capable of inducing a reversible oligospermic state. Some other plant groups have also been studied. In México, Santana et al. [9] reported that a water extract from *Kalanchoe* sp. and an alcoholic extract from *Sedum oxipetalum* [8] immobilize sperm. We report the sperm-agglutinating activity from two *Bursera* species that are commonly used in religious services due to their sweet smell after burning the whole plant, known as "copal" in many Central America countries.

MATERIAL AND METHODS

Bursera schlechtendalii (Engl.) and *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl. (Burseraceae) individuals were collected during the rainy seasons of 1992 and 1993 from the Barranca de Meztlán, Hidalgo, México. Parts of the individual plants were cut out for processing. Samples were deposited and identified by J. Rzedowski numbers 25165, 05733 and C. Toledo numbers 11316, 11317 at the herbarium UAMIZ. Twelve grams of excised leaves and 21 g stems were thoroughly washed with deionized water and extracted by boiling them separately in distilled water for 15 min. Infusions were filtered through 5 wet mesh-cloth sheets. Filtered material was centrifuged 10 min at 1200 g. Supernatants were dialyzed against 0.9% NaCl solution with 2 h solution, aliquoted as 5 mL samples, and stored at -40°C until use.

Protein content was determined by the BCA method [10] using BSA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) as standard. To study the importance of the carbohydrate moiety of the extracted protein, protein deglycosilation was done by using TFMS (Sigma Chemical), according to the method of Karp et al. [4]. Deglycosilated samples were again equilibrated against 0.9% NaCl, aliquoted, and stored as above. Spectrophotometrical evaluations were done in a Perkin-Elmer Lambda2 spectrometer in both scan/man and wav/pgm programs.

Boar ejaculated sperm were obtained by the handed glove method and capacitation was achieved [2]. In brief, ejaculated sperm were washed off from seminal plasma and capacitated for 1 h at 37°C in Tyrode media supplemented with BSA, sodium lactate syrup (Sigma Chemical), and sodium pyruvate.

After capacitation, sperm were incubated with the equilibrated extract in a microwell plate. Sperm aggregation was followed by microscopical examination and ranked according to the criteria in Table 1. Human ejaculated sperm from 5 healthy adults were obtained by masturba-

Table 1. Arbitrary scale used to evaluate sperm agglutinating activity of *Bursera* extracts

Aggregation grade	Characteristics
0	No agglutination; all spermatozoa swimming actively.
1	Small (1-2) sperm aggregates; predominantly free-swimming spermatozoa
2	Aggregated sperm in small groups (8-10 spermatozoa); most swimming freely
3	Countless sperm aggregates; number of swimming spermatozoa drops drastically
4	Increased number of sperm aggregates; few free swimming spermatozoa
5	All spermatozoa in aggregates; no free swimming sperm

Note. The categories were clearly differentiated by at least two different observers.

tion and evaluated by the WHO guidelines. Normal samples were treated essentially as described for boar except for an initial 90-min maximum period to liquefy the sample at room temperature.

RESULTS

Protein content from leaves and stems were very different, as shown in Table 2. While both stem and leaf extracts from *B. schlechtendalii* had small protein amounts, less than 2 mg protein per gram fresh tissue, *B. fagaroides* is almost 3 times higher in stem and 10 times higher in leaf tissue. After chemical deglycosylation of exactly the same protein amount, all 4 tissues showed a high carbohydrate content. All extracts, except those from stems of *B. schlechtendalii* have more than 90% carbohydrates linked to proteins.

Even when *B. fagaroides* had a higher protein amount, recovery of protein moieties from leaves after deglycosylation are a third from that present in the leaves of *B. schlechtendalii*. This difference is less evident when stem-derived deglycosylated peptides are analyzed. From *B. schlechtendalii* we can obtain twice the amount of carbohydrate-free proteins as from *B. fagaroides*. Absorbance scanning from all samples shows a maximum in the 200- to 400-nm range (Figure 1), and in *B. fagaroides* it extends until 420 nm.

Neither human nor boar sperm aggregate in basic or albumin-supplemented medium. They aggregate only when plant extract was added (Table 3). It is very common that extracts obtained from different plant parts have different effects, but in both *B. fagaroides* and *B. schlechtendalii*, they behave the same: stem-derived extracts aggregate sperm at a higher degree than leaf-derived extracts whether or not they are glycosylated. Even when sperm could interact in very different ways, in our case, the most frequent aggregation pattern was head to head and the rarest interaction was head to tail.

Table 2. Characteristics of the water extracts from *Bursera*

Items	<i>B. schlechtendalii</i>	<i>B. fagaroides</i>
Stems		
Protein content (mg/g fresh weight)	0.38	15.4
Carbohydrate-free protein (μ g/mg)	71.0	32
% Carbohydrate	81.3	99.8
Leaves		
Protein content (mg/g fresh weight)	1.62	5.05
Carbohydrate-free protein (μ g/mg)	127	46.0
% Carbohydrate	92.2	99.9

Note. Clean biological material was boiled, filtered, and centrifuged. Samples were treated as described under Materials and Methods. Proteins were either deglycosylated or used directly in the sperm aggregation assay. Carbohydrate content was estimated in the same sample after TPMS treatment.

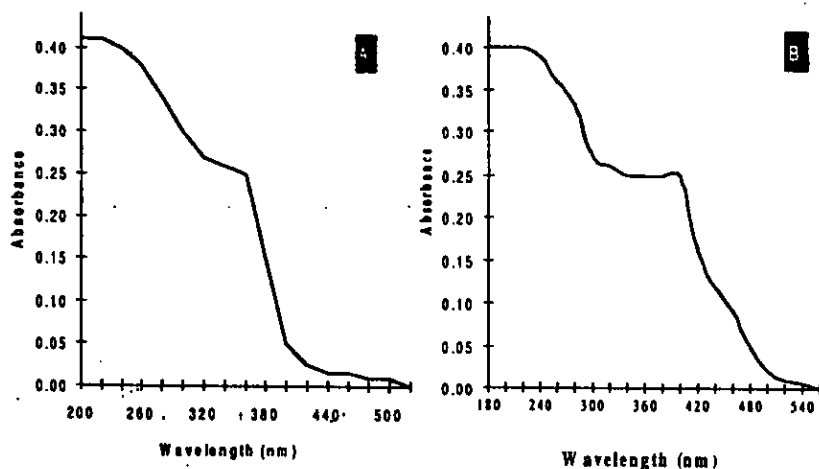


Figure 1. Spectrophotometric scan from leaves (A) and stems (B) from *Bursera* plants used in the water extract preparation. Clarified extract was equilibrated with 0.9% NaCl and then scanned in a Perkin-Elmer spectrophotometer.

DISCUSSION

Initial studies from Ramirez et al. [8] and Santana et al. [9] indicated that low molecular weight peptides are responsible for altering the fertilizing ability of mouse and human sperm in extracts from *Kalanchoe gastonis bonnieri* and *Sedum oxipetalum*. We found the correlation of protein content, peptide moiety, and agglutinating effect of water extracts from *Bursera*. A big difference between our work and that of Ramirez et al. is that we used water extract, whereas they used an ethanolic one. We cannot compare our extracts from those of Santana et

Table 3. Results from the sperm agglutination assay, according to the arbitrary scale

	<i>B. fagaroides</i>				<i>B. schlechtendalii</i>			
	Leaves		Stems		Leaves		Stems	
	Glycosil	Deglyco	Glycosil	Deglyco	Glycosil	Deglyco	Glycosil	Deglyco
Pig sperm	2	2	4	4	2	2	4	4
Human sperm	3	2	4	4	2	2	4	4

Note. Glycosil means the equilibrated extract, while deglycosil is the carbohydrate-removed form of the extract as described under Materials and Methods. Values are the modes of at least 5 different assays. As negative control, we used a 4 mg/mL BSA in 0.9% NaCl solution.

al. since *Kalanchoe* is a succulent species that contains high water amounts and, in this case, smashing clean stems is enough to obtain an extract.

Another main difference is that their alcoholic extract not only impairs sperm motility but also diminishes the sperm viability. In our case, the effect is only head to head sperm aggregation with no effect on sperm viability nor motility. Protein yield was different just after boiling. To avoid any undesirable effect due to different protein content, we used similar protein amounts thereafter. Deglycosylation experiments showed that carbohydrate content is lower in the stem than in leaves. This relationship also correlates with the aggregating effect from both plant species.

In vivo fertilization, sperm must be transported through the female genital tract, first by peristaltic movements from the lower tract and later by their own flagella until they reach the oocyte at the fertilization site. Then, spermatozoa show an active, small displacement but wide flagella beating called hyperactivation that helps the spermatozoa to penetrate the egg vestments [15].

After binding to the egg zona pellucida, receptor molecules on the sperm top-most part, known as acrosome region, aggregate and induce the exocytic process called acrosome reaction, which helps the sperm to penetrate this acellular coat and fertilize the egg. In this view, the agglutinating effects of the extracts are very encouraging since by binding two sperm by their heads, there is no net displacement and it is possible that "ligand" aggregation could induce an acrosome reaction-like effect. In our case, the higher aggregation grade achieved was 4, indicating that there were some nonaggregated spermatozoa.

Sperm aggregates showed a circular rolling movement of heavily beating flagella. This indicates that equilibrated plant extracts do not affect cell viability because if pH, temperature, and culture conditions are maintained, it is possible to see some swimming spermatozoa by time periods higher than 2 h. This same effect has been obtained with monoclonal antibodies, recognizing specific antigenic determinants from the head surface. Also, this head to head sperm contact was observed in infertile couples due to the presence of immobilizing antibodies in seminal fluid or female blood serum [3].

Recently, genetic engineering techniques have made it possible to clone some important genes from proteins that potentially could be used as an extra weapon for fertility regulation [1, 7]. However, plant extracts have to be considered in this regard. Proteins from water extracts from *Bursera* are potential aggregation-based contraceptives, but first they have to be further analyzed. Current efforts in our laboratory are seeking this goal.

REFERENCES

1. Dean J (1992): Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 89:1055-1059.
2. Hartman, JF, Hutchinson CF (1974): Nature of the pre-penetration contact interactions between hamster gametes in vitro. *J Reprod Fertil* 36:49-57.
3. Kamada K, Tsuji Y, Koyama K, Isojima S (1992): Comparative studies of the antigens recognized by sperm-immobilizing monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 46:349-357.
4. Karp DR, Atkinson J., Schreffler DC (1982): Genetic variation in glycosylation of the fourth component of murine complement: association with hemolytic activity. *J Biol Chem* 257:7330-7335.
5. Naz, RK, Mehta KP (1989): Cell-mediated immune responses to sperm antigens: effects on mouse sperm and embryos. *Biol Reprod* 41:533-542.

6. Paterson M, Thillai-Koothan P, Morris KD, O'Byrne KT, Braude P, Williams A, Aitken RJ (1992): Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 46:523-534.
7. Prasad SV, Mujtaba S, Lee VH, Dunbar BS (1995): Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system. *Biol Reprod* 52:1167-1178.
8. Ramirez MP, Zuñiga G, Carranco LA, Huacuja L, Perez-Amador MC (1991): Ethanol extracts from *Sedum oxipetalum* and its effects on progressive motility, viability and ultrastructure of human and mouse spermatozoa. (In Spanish) XXXIV National Congress on Physiological Sciences, México, Abstract C95.
9. Santana M, Huacuja L, Zuñiga G, Carranco L, Perez-Amador MC, Guzman A, Merchant H (1991): Effects of crude extract from *Kalanchoe gastonis bonieri* on motility, viability and ultrastructure of human and mice spermatozoa (in Spanish). XXXIV National Congress on Physiological Sciences, México, Abstract C96.
10. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Mallia AK, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
11. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L (1995): Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 136:3639-3647.
12. Talwar GP (1980): Immuno-contraception. *Curr Top Immunol* 13:1-146.
13. Talwar GP, Singh O, Jayashankara R, Shaha C, Suri A, Rao LV, Gaur A, Alam A, Upadhyaya SN, Pal S, Choudhuri M (1989): Vaccine for control of fertility. *Immunology (Suppl)* 2:93-97.
14. WHO Collaborative Study of neoplasia and steroid contraceptives. (1990): Breast cancer and combined oral contraceptives: results from a multinational study. *Brit J Cancer* 61:110-119.
15. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, JD Neil (Eds). New York: Raven, pp 189-317.