



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**INTERACCIÓN ENTRE EL ESPERMATOZOIDE Y LA ZONA  
PELÚCIDA DEL OVOCITO: ETAPA CRUCIAL DURANTE  
LA FERTILIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

**RODRIGO REVELES ZÁRATE**

**MÉXICO D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
Vocal	Dr. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ
Secretario	Dra. MAYEL CHIRINOS ESPÍN
1° Suplente	Dr. GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA
2° Suplente	Dra. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

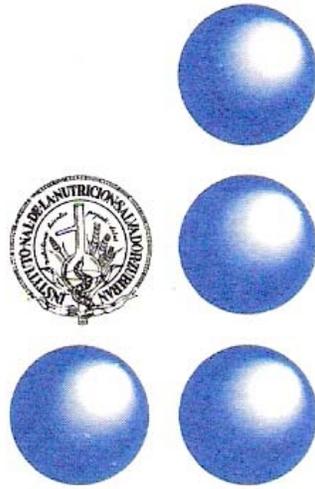
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
“SALVADOR ZUBIRÁN”

Asesor: MAYEL CHIRINOS ESPÍN



Sustentante: RODRIGO REVELES ZARATE





Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección de la Dra. Mayel Chirinos, y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de proyecto 47011, y gracias a una beca de Ayudante de Investigador otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores, a través del Dr. Fernando Larrea.

## AGRADECIMIENTOS

---

*A mi Mamá, mi Hermano y mi Sobrino:*

Porque con el cariño, la paciencia y el apoyo que me han dado, me ha permitido tener fuerzas para salir adelante.

*A mi Hermana:*

Porque culminando este momento es la mejor manera de agradecer tantos esfuerzos, cuidados que me has dado.

*A Liz:*

Por el todo el apoyo y principalmente por el cariño que me brindas día a día.

*A Mayel:*

Por todo este tiempo dedicado y la paciencia para enseñarme.

*A mis Compañeros del laboratorio:*

Por todo su apoyo y los momentos gratos que pasamos juntos.

*A Gaby e Ixchel:*

Porque a pesar de estar lejos nuestra amistad y el cariño continua.

*A mis Compañeros del trabajo:*

Por la oportunidad de crecer juntos y confiar en mí.

*Muchos son los caminos que la vida nos ofrece, así como muchos son los resultados que puedes obtener del camino que hayas elegido.*

*Por este momento, **gracias.***

# ÍNDICE

---

Resumen.....	4
Abreviaturas Utilizadas.....	5
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>Capítulo 2. Origen y características del gameto femenino.....</b>	<b>10</b>
2.1. Ovogénesis.....	10
2.2. Maduración del ovocito.....	12
2.3. Zona Pelúcida.....	13
<b>Capítulo 3. Origen y características del gameto masculino.....</b>	<b>16</b>
3.1. Espermatogénesis .....	16
3.2. Capacitación.....	18
3.3. Reacción acrosomal.....	19
<b>Capítulo 4. Interacción y fusión de gametos.....</b>	<b>23</b>
4.1. Interacción de gametos.....	23
4.2. Fusión de células haploides.....	24
4.3. Bloqueo de la polispermia.....	26
<b>Capítulo 5. Moléculas que participan en la unión entre la ZP y el espermatozoide</b>	<b>27</b>
5.1. Receptores espermáticos.....	27
5.2. Ligandos en la ZP.....	29
<b>Capítulo 6. Ensayos utilizados para estudiar la unión de espermatozoides a la ZP: posibilidades y limitaciones.....</b>	<b>30</b>
6.1. Ensayos de inducción de la reacción acrosomal.....	31
6.1.1. Estimulación por ionóforo de calcio.....	31
6.1.2. Inducción de la RA con ZP solubilizada (ZIAR).....	32
6.1.3. Uso de proteínas recombinantes de la ZP.....	32
6.2. Ensayos de unión a la zona pelúcida.....	33
6.2.1 Radio de unión espermatozoide-zona pelúcida.....	33
6.2.2. Unión espermatozoide-zona pelúcida como prueba de rutina.....	34
6.2.3. Ensayo de hemizona.....	34
6.3. Ensayos de penetración de la zona pelúcida.....	35
<b>Discusión.....</b>	<b>37</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

---

La fertilización es el proceso por el que dos células haploides se unen para formar un cigoto (diploide), capaz de dividirse y diferenciarse para dar origen a un nuevo individuo. Sin embargo, algunas veces surgen alteraciones capaces de impedir el éxito de este evento. Durante las dos últimas décadas, se ha observado un aumento en la incidencia de problemas de infertilidad en parejas en edad reproductiva. A pesar del éxito alcanzado por novedosas técnicas en reproducción asistida, en casos de infertilidad masculina poco se puede hacer por ayudar al paciente, ya que existen pocas pruebas destinadas al diagnóstico de padecimientos en el hombre. Es por ello que en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de técnicas que podrían ser utilizadas en el diagnóstico de la infertilidad masculina. El adecuado reconocimiento entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito es un evento crítico durante la fusión de gametos, y sin embargo una de las etapas más desconocidas de la fertilización en humanos. Es por lo anterior que el presente trabajo evalúa las técnicas existentes destinadas al diagnóstico de la infertilidad masculina originada por disfunciones en la interacción espermatozoide-zona pelúcida. Estas técnicas están enfocadas a detectar problemas asociados a la reacción acrosomal del espermatozoide, la unión a la zona pelúcida o la penetración de la misma. Los ensayos destinados a evaluar la capacidad de penetración de la zona pelúcida permiten obtener información concerniente a la capacidad fertilizante de una muestra de semen y por tanto tienen mayor valor predictivo. Sin embargo, las dificultades existentes para obtener zonas pelúcidas humanas impiden el uso extensivo de estas técnicas, lo que ha impulsado el uso de la biología molecular para el desarrollo de técnicas alternas, cuyas posibilidades y limitaciones también son revisadas en el presente trabajo.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

---

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
AC	Adenilato ciclasa
BSA	Albúmina del suero bovino
AMPc	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHO	Ovario de hámster chino
CG	Células de la granulosa
DAG	Diacilglicerol
FA-1	Antígeno de fertilización 1
FHS	Hormona folículo estimulante
Hex	N-acetilglucosanimidasa
HZA	Ensayo de hemizona
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
IP <sub>3</sub>	1, 3, 5-trifosfato de inositol
IVF	Fertilización <i>in vitro</i>
LH	Hormona luteinizante
NGPS	Neoglicoproteínas
O. M. S.	Organización Mundial de la Salud
PIP <sub>2</sub>	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol-
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RA	Reacción acrosomal
rhZP	Zona pelúcida humana recombinante
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SLIP1	Proteína inmovilizadora de sulfolípidos 1
TK	Tirosina cinasa
ZIAR	Inducción de la reacción acrosomal por zona
ZP	Zona pelúcida
ZPIAR	Inducción de la reacción acrosomal por zona pelúcida

# CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

---

El éxito de la reproducción sexual depende de que se produzca la fertilización, donde la fusión de dos gametos (óvulo y espermatozoide) genera un cigoto que puede crecer y diferenciarse hasta dar origen a un nuevo organismo. Sin embargo esto no siempre ocurre con éxito, pues durante los complejos eventos que conducen a la fertilización pueden surgir alteraciones que evitan su culminación. Actualmente, muchas parejas en edad reproductiva padecen de problemas de infertilidad, la cual es definida como la incapacidad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales frecuentes<sup>[1]</sup>.

Collins<sup>[2]</sup> menciona que los principales problemas de infertilidad radican en:

1. Alteraciones en la producción de un ovocito competente;
2. Alteraciones en el transporte de espermatozoides, ovocitos o el embrión en el tracto reproductor;
3. Alteraciones en el proceso de implantación, incluidos defectos tempranos del desarrollo embrionario y de la interacción embrión-endometrio;
4. Alteraciones en la producción de espermatozoides, y
5. Otras condiciones, como trastornos inmunológicos que pueden afectar diversos componentes del proceso.

Según datos del Departamento de Esterilidad e Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología (México), se estima que el 15% de las parejas mexicanas presentan infertilidad y en más del 40% de los casos la causa es atribuible al hombre<sup>[3]</sup>.

En el caso de la infertilidad femenina, existen distintas formas de diagnosticar los problemas que la causan, así como la variedad de tratamientos. Un ejemplo de ello, son los casos de alteración en la producción de ovocitos, donde se realizan estudios hormonales para medir la concentración de progesterona en sangre o mediante la biopsia del endometrio; de esta forma son reveladas las alteraciones secretoras y se estima la insuficiencia de la secreción lútea de progesterona, así como la respuesta endometrial a la misma.

A continuación la tabla I muestra las principales afecciones que causan infertilidad en la mujer, así como algunos estudios que permiten su diagnóstico:

<b>Tabla I. Infertilidad en la mujer y causas para el diagnóstico de las mismas<sup>[1]</sup>.</b>		
<b>Afección</b>	<b>Causas</b>	<b>Método diagnóstico</b>
Alteración en la producción de ovocitos <sup>[4]</sup>	<p>Disfunción hipotalámica (alteraciones del peso y composición corporal, estrés y ejercicio intenso)</p> <p>Enfermedad hipofisiaria (prolactinoma, síndrome de la silla vacía, síndrome de Sheehan y enfermedad de Cushing)</p> <p>Disfunción ovárica (síndrome del ovario poliquístico e insuficiencia ovárica)</p>	Mediante la determinación del peso y talla, niveles en el suero de hormona foliculo estimulante (FSH), prolactina, hormona estimulante de la tiroides, y en algunos casos de andrógenos.
Factores anatómicos <sup>[5]</sup>	<p>Enfermedad inflamatoria pelviana</p> <p>Infección pelviana</p> <p>Endometriosis</p>	<p>Laparoscopia</p> <p>Histerosalpingografía</p>

Actualmente muchas de las causas que conducen a la infertilidad femenina son tratables, pues existen herramientas que permiten el diagnóstico de las mismas. No obstante, aproximadamente del 10 a 17% de las parejas infértiles no presentan una causa

identificable de infertilidad después de una evaluación médica detallada<sup>[3]</sup>. En este tipo de infertilidad, denominada infertilidad idiopática, es el hombre el que principalmente se ve afectado, como consecuencia de que ha sido sujeto a pocos estudios que permitan determinar las causas o factores involucrados en la infertilidad masculina.

En el varón, el causante de infertilidad más común está asociado a alteraciones de la calidad del semen. Se sabe que varias afecciones provocan alteraciones en la muestra de espermatozoides, tales como varicocele, disfunciones genéticas, exposición a sustancias tóxicas, etc.

Durante mucho tiempo y hasta la fecha, la espermatobioscopia de rutina ha sido el análisis empleado para evaluar, entre otros parámetros, la motilidad, la viabilidad y la concentración espermática en el semen. Desafortunadamente su valor diagnóstico es limitado. El mayor obstáculo que presenta es la acentuada variabilidad del eyaculado de un mismo donante; además, muchos de los parámetros considerados se evalúan de una manera subjetiva, mostrando diferencias importantes entre los distintos laboratorios e inclusive entre los técnicos de un mismo laboratorio, lo que conlleva a una alta incongruencia inter e intralaboratorio. Sin embargo, a pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido valores de referencia de uso internacional<sup>[6]</sup> éstos no necesariamente están asociados a la fertilidad.

Si bien la espermatobioscopia es el primer estudio que se debe realizar a una muestra de semen, existen otros aspectos que comúnmente no son tomados en cuenta para determinar la capacidad fertilizante de una muestra de espermatozoides, como es llevar a cabo la reacción acrosomal (RA) y la de unirse y/o penetrar la zona pelúcida (ZP).

La ZP es la matriz extracelular que rodea al óvulo, la cual media la interacción del espermatozoide con el ovocito. Además, induce la reacción acrosomal del espermatozoide

para permitir su penetración a través de la ZP<sup>[7]</sup>. En vista de que la ZP juega un papel fundamental durante la fertilización, es probable que también se encuentre involucrada en algunos problemas de reconocimiento por parte de los espermatozoides.

Ante la inexistencia de pruebas clínicas que permitan estudiar las interacciones moleculares de gametos para diagnosticar algunos tipos de infertilidad masculina, se ha incrementado el uso de técnicas como la fertilización *in vitro* (IVF), así como la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, por sus siglas en inglés), como alternativas para lograr un embarazo. Sin embargo, en la última década se han reportado algunos métodos de investigación básica que podrían ser utilizados como alternativa en el diagnóstico de problemas que afectan la fertilidad masculina, y que por lo tanto podrían ayudar a determinar cuál es el método de fertilización asistida más adecuado para cada caso.

Es por lo anterior, que el objetivo de esta tesis es hacer una evaluación de los distintos métodos existentes en la actualidad para estudiar la infertilidad masculina causada por problemas al nivel de la interacción del gameto masculino con la ZP y su valor predictivo.

## CAPÍTULO 2. OVOCITOS

---

Solo un ovocito se encuentra listo para ser fertilizado después de haber llevado a cabo múltiples procesos, que van desde la ovogénesis hasta el primer contacto que tiene con el espermatozoide. Dentro de los principales procesos que tiene el ovocito a lo largo de su desarrollo se encuentra el cambio morfológico desde las células germinales hasta llegar a ser un ovocito secundario, la adquisición y conservación de la ZP, así como de las células de la granulosa, etc.; mismas que hacen a esta célula capaz de generar en conjunto con el espermatozoide una célula diploide con posibilidades de crecer y formar un nuevo individuo.

### **2.1. Origen y características del gameto femenino**

Los ovocitos comienzan a formarse desde el producto embrionario (*figura 1*). La ovogénesis se inicia cuando las células germinativas primordiales migran hacia el interior de la gónada embrionaria y se convierten en ovogonias, alrededor de la quinta semana de vida intrauterina<sup>[8]</sup>. El número total de ovogonias se acerca a 10,000 alrededor de las semanas 6 a 7 de la gestación. Hacia las 8 semanas, las continuas divisiones mitóticas aumentan el número total de ovogonias hasta 600,000<sup>[9]</sup>. Desde este momento, la población de ovogonias está sujeta a tres procesos simultáneos: mitosis, meiosis y atresia.

Entre las semanas 8 y 13 de la vida fetal, algunas de las ovogonias parten del ciclo mitótico para entrar en la profase de la primera división meiótica. Es este cambio el que marca la

conversión de ovogonias a ovocitos primarios. La meiosis permite que las células germinales formen las células de la granulosa y luego los folículos primordiales.

Después del nacimiento comienza el desarrollo folicular con la aparición del folículo primordial. El folículo primordial consiste en una compleja unidad compuesta por un ovocito detenido en la profase de la primera división meiótica y las células precursoras de la granulosa rodeadas por una membrana basal. El ovocito primario persiste en la profase de la primera división meiótica, hasta el momento de la ovulación.

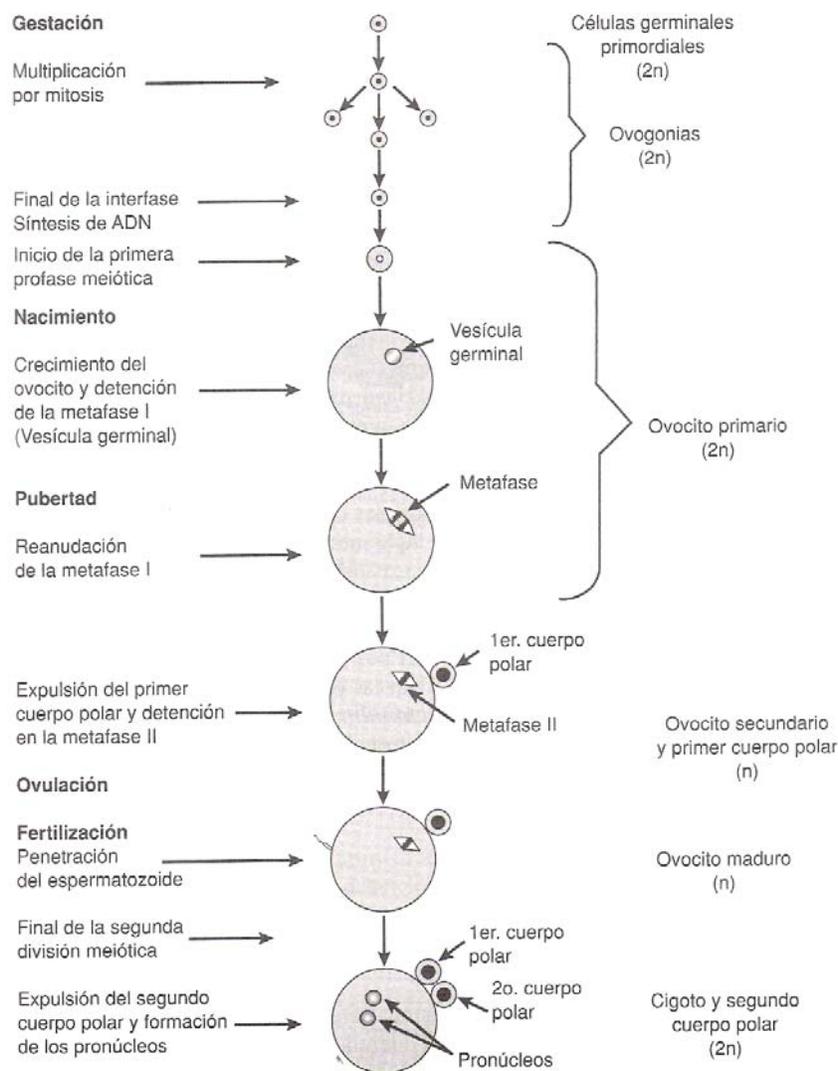


Figura 1. Eventos que ocurren durante la ovogénesis y la fertilización de los mamíferos<sup>[10]</sup>.

## 2.2. Maduración del ovocito

En la pubertad, la FSH induce la maduración de algunos de los folículos que contienen a los ovocitos primarios. El desarrollo de los folículos primordiales consiste en el crecimiento del ovocito, acompañado de proliferación de las células de la granulosa y se convierten por tanto en folículos secundarios maduros. Simultáneamente, aparece un halo translúcido que rodea al ovocito, conocido como ZP (*figura 2*).

El origen celular de las glicoproteínas de la ZP ha estado sujeto a controversia. Se ha señalado al ovocito, a las células de la granulosa o a ambos tejidos como responsables de la síntesis de las proteínas que conforman la ZP<sup>[11]</sup>; sin embargo, se ha observado que el sitio de su síntesis varía según la especie estudiada. En el ser humano, el ovocito como las células de la granulosa expresan proteínas de la ZP en forma dependiente del estado de desarrollo del folículo<sup>[12-14]</sup>.

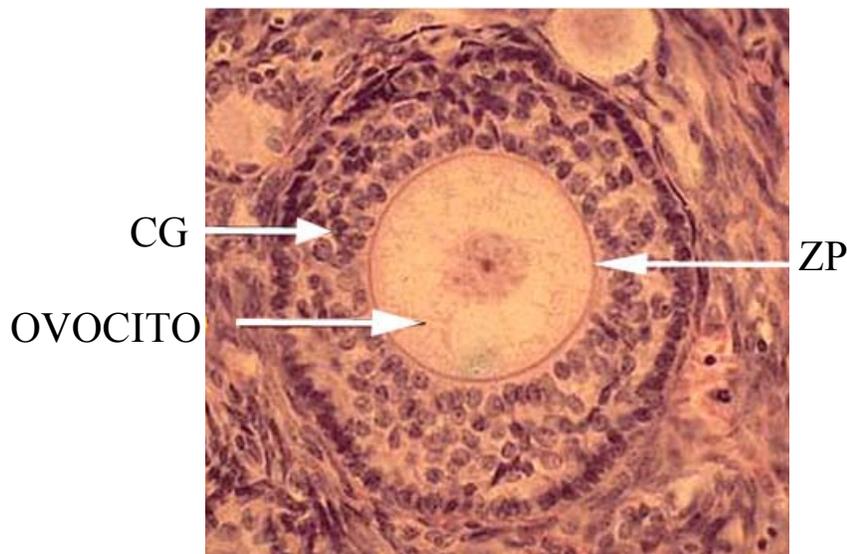


Figura 2. Fotomicrografía de una sección de un folículo preantral humano. En este ovocito se muestra que las células de la granulosa (CG) ya han formado la zona pelúcida (ZP)<sup>[15]</sup>.

Al término del crecimiento folicular, la ovulación se produce por la acción de la hormona luteinizante (LH) sobre las células foliculares, que liberan al ovocito de la detención de la profase I.

Después de completar la metafase de la primera división celular se generan dos células, el primer cuerpo polar y el ovocito secundario; este último recibe la mayoría del citoplasma. El primer cuerpo polar puede o no puede dividirse para producir dos pequeñas células haploides.

Al ocurrir la ovulación, las células del cúmulo son expulsadas con el ovocito secundario (el cual se encuentra en metafase II), mientras que las CG restantes quedan incorporadas al cuerpo lúteo. Dado que rodean al ovocito, las células del cúmulo ofrecen un blanco más evidente para los espermatozoides, prolongan la vida fértil del ovocito y sirven de filtro para admitir a los mejores espermatozoides<sup>[7]</sup>.

Tal como se muestra en la figura 1, el ovocito maduro se produce a partir del ovocito secundario en la segunda división meiótica, la cual ocurre en presencia del espermatozoide. En esta división, el citoplasma del ovocito secundario se reparte de nuevo, desigualmente, dando lugar a un cigoto y al segundo cuerpo polar<sup>[16]</sup>.

### **2.3. Zona Pelúcida**

La ZP está formada básicamente por 3 familias de proteínas, si bien en algunas especies pueden haber cuatro proteínas (incluyendo el ser humano), las cuales se han denominado ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (en el caso de que la estructura tenga cuatro proteínas)<sup>[17, 18]</sup>. Estas proteínas se caracterizan por estar altamente glicosiladas y presentar un elevado grado de homología entre proteínas de la ZP en diferentes especies<sup>[19]</sup>.

El modelo murino ha sido el más utilizado para el estudio de la ZP. Por lo tanto, la estructura de la ZP de ratón (*figura 3*) se ha utilizado como modelo en mamíferos, la cual está constituida por repetidas unidades heterodiméricas de ZP2-ZP3 organizadas en filamentos entrecruzados por dímeros de ZP1<sup>[20]</sup>.

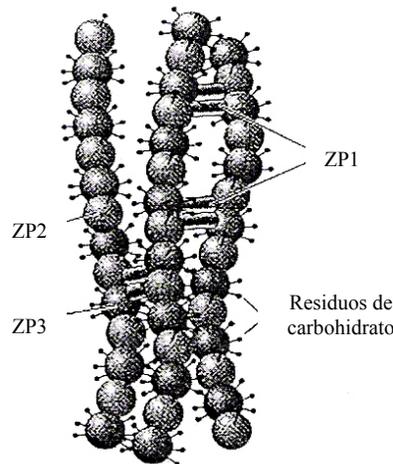


Figura 3. Estructura de la zona pelúcida de ratón, tomado de Wassarman<sup>[21]</sup>.

En este mismo modelo, se ha identificado a la proteína ZP3 como el ligando que une la ZP a la membrana plasmática del espermatozoide, y que induce la reacción acrosomal<sup>[22]</sup>. La ZP2 ha sido propuesta como el ligando de unión secundaria al espermatozoide, luego de que ocurre la RA<sup>[23]</sup>, mientras que la ZP1 parece estar involucrada en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la zona pelúcida<sup>[21]</sup>. Sin embargo, cada una de las proteínas de la ZP se ha visto implicada en el reconocimiento primario del espermatozoide en al menos una especie de vertebrados, lo que ha impedido postular un receptor primario universal<sup>[24]</sup>. Cabe mencionar que de las tres proteínas que constituyen la zona pelúcida, la ZP3 ha mostrado funciones de receptor espermático e inductor de la reacción acrosomal en ratón, hámster y en el ser humano<sup>[21, 25-29]</sup>.

En el ser humano, luego de analizar la ZP mediante espectrometría de masas, se han encontrado cuatro proteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) y se demostró que la ZP1 se encuentra en mucho menor cantidad en comparación con ZP2, ZP3 y ZP4<sup>[18, 30, 31]</sup>. Por todo lo anterior, el modelo estructural de la ZP en ratón tendría que ser reevaluado, en su calidad de modelo general, extrapolable a todos los mamíferos.

## **CAPÍTULO 3. ESPERMATOZOIDES**

---

A pesar de la gran cantidad de espermatozoides que regularmente son producidos y que se encuentran presentes en el semen, solo un espermatozoide es el que sobrevive después de pasar a través del útero, atravesar las células de la granulosa, sufrir RA en presencia de la ZP, atravesar la misma y fertilizar al ovocito. En el presente capítulo se tratarán los cambios bioquímicos y morfológicos que lleva a cabo el espermatozoide antes de poder fertilizar al ovocito.

### **3.1. Origen y características del gameto masculino**

En el embrión, las células germinales migran hacia los testículos y permanecen en un estado de hibernación hasta la pubertad, es en esta etapa de la vida del varón donde bajo los efectos de la testosterona las espermatogonias comienzan su diferenciación para dar origen a espermatozoides maduros.

Las espermatogonias, localizadas en el epitelio de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis y generan dos conjuntos de células. Las células de uno de estos conjuntos, siguen dividiéndose por mitosis y actúan como espermatogonias madres, las cuales migran hacia las células de Sertoli que se localizan en el interior de los túbulos seminíferos. Tal como se muestra en la figura 4, el segundo conjunto de espermatogonias ingresa en la meiosis para convertirse en espermatoцитos primarios ( $4n$ ). A su vez, los espermatoцитos primarios sufren la primera división meiótica para generar espermatoцитos secundarios ( $2n$ ).

Seguido de este evento, ocurre la segunda división meiótica, dando origen a 4 espermátides haploides ( $1n$ ) que se diferencian hasta espermatozoides. Los cambios que experimenta la espermátide para desarrollarse hasta espermatozoide son: formación del acrosoma, condensación del núcleo, diferenciación del cuello, pieza media y flagelo, y eliminación de la mayor parte del citoplasma<sup>[32]</sup>. Las células espermáticas en desarrollo (espermátides) experimentan una división celular, pero no completan la división citoplasmática. En consecuencia, las células germinativas en desarrollo están conectadas por puentes citoplasmáticos en forma de sincicio. Estos puentes citoplasmáticos permiten que las espermátides reciban proteínas desde el aparato celular parental sin necesidad de contar con un sistema de síntesis propio<sup>[33]</sup>.

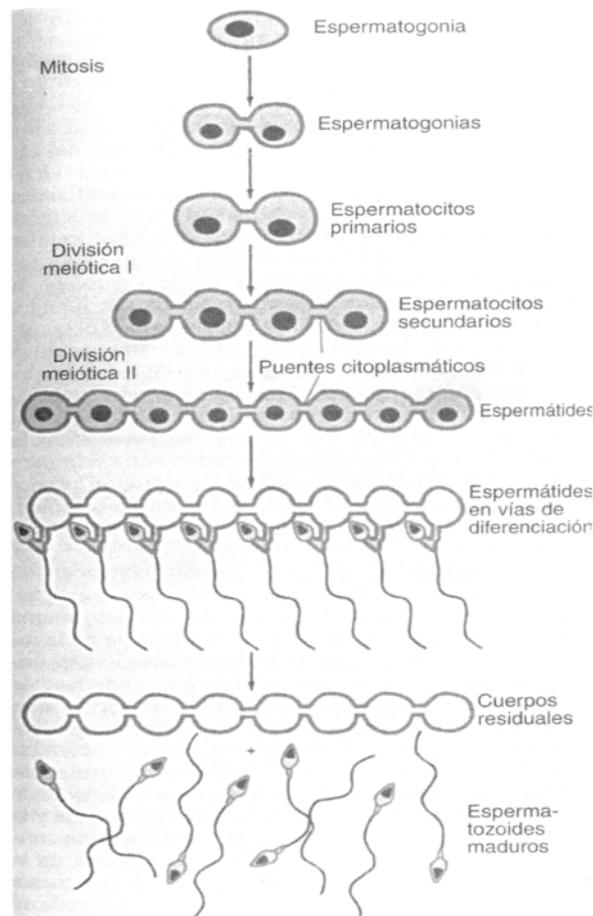


Figura 4. Progenie de una espermatogonia en vías de maduración<sup>[33]</sup>.

Los espermatozoides recién liberados dentro del lumen del túbulo seminífero aún no pueden fertilizar y el proceso de maduración continúa en el epidídimo, donde se producen modificaciones de la membrana plasmática del espermatozoide. Estos cambios consisten en el aumento de la cantidad de colesterol sulfatado y fosfolípidos, los cuales se encuentran contenidos en la región del acrosoma, ocupando un 20% de la superficie de la cabeza<sup>[7]</sup>.

Una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas denominadas factores estabilizantes del acrosoma o factores descapacitantes. Estos factores evitan que los espermatozoides inicien la reacción acrosomal durante su estancia y paso por el tracto reproductor masculino, desde su formación en el testículo hasta la eyaculación<sup>[34]</sup>. Los espermatozoides durante su estancia en el epidídimo permanecen inmóviles, tienen bajas concentraciones de 3',5',-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) y calcio, así como inhabilitada la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Sin embargo, la maduración de los espermatozoides no concluye aquí, ya que cuando el espermatozoide ingresa en el tracto reproductor femenino presenta una serie de cambios conocidos como capacitación, los cuales le permiten adquirir la capacidad de fertilizar.

### **3.2. Capacitación**

El conjunto de cambios morfológicos y bioquímicos que hacen a los espermatozoides capaces de desarrollar la reacción acrosomal y fertilizar, son llamados colectivamente capacitación<sup>[10]</sup>. Este proceso involucra un rearrreglo gradual de las glicoproteínas periféricas y una redistribución de glicoproteínas integrales de la membrana. También, se produce una reducción del colesterol de la membrana y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos<sup>[35]</sup>.

Una vez que el semen se deposita en la vagina, los factores inhibidores de la capacitación son removidos a medida que los espermatozoides viajan a través del moco, permitiendo que los espermatozoides puedan llevar a cabo la capacitación y posteriormente la RA<sup>[34]</sup>.

Durante las etapas iniciales de la capacitación aumentan las concentraciones de calcio intracelular y AMPc; además se comienzan a generar las ROS y en consecuencia el espermatozoide desarrolla un patrón de movilidad que se conoce como “hiperactivación”<sup>[7, 36]</sup>. La hiperactivación se caracteriza por pronunciados movimientos flagelares, vigorosos movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide y una trayectoria no lineal. Una manifestación adicional de la capacitación es la habilidad de llevar a cabo la reacción acrosomal en respuesta de estímulos fisiológicos, tales como la ZP y la progesterona<sup>[7]</sup>.

### **3.3. Reacción acrosomal**

La reacción acrosomal del espermatozoide es un evento exocitótico esencial para el éxito de la fertilización, ya que está involucrada tanto en la penetración de la ZP como en la fusión con la membrana plasmática del ovocito<sup>[7]</sup>.

El acrosoma es un organelo de tipo lisosómico (derivado del aparato de Golgi) que rodea al núcleo en la región apical de la cabeza del espermatozoide<sup>[37]</sup>. Aunque el acrosoma está formado por una membrana continua, funcionalmente se pueden distinguir una membrana interna y una membrana externa<sup>[38]</sup>, donde la membrana acrosomal externa se encuentra por debajo de la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna que se encuentra por encima del núcleo (*figura 5*).

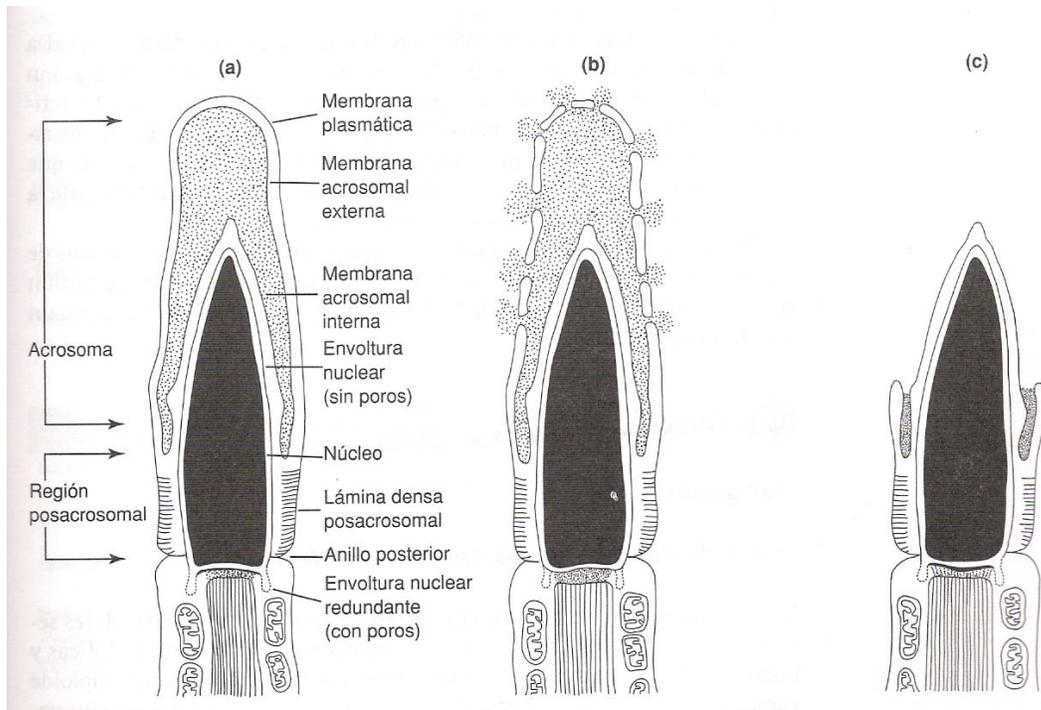


Figura 5. Diagrama que ilustra la progresión de la reacción acrosomal. a) Acrosoma intacto, antes de la reacción acrosomal. b) Inicio de la reacción. Se observan múltiples sitios de fusión entre las membranas plasmática y del acrosoma, que permiten la liberación de diversas enzimas. c) Reacción acrosomal terminada. La cara interna del acrosoma queda expuesta<sup>[7]</sup>.

Existen dos clases de inductores de la RA, los fisiológicos como la progesterona<sup>[39]</sup>, el fluido folicular<sup>[40]</sup> y la zona pelúcida<sup>[40-42]</sup>, y los no fisiológicos tales como el ionóforo de calcio (A23187)<sup>[40]</sup> y glicoproteínas sintéticas (neoglicoproteínas)<sup>[43]</sup>.

Así como son muchos los agonistas capaces de inducir la reacción acrosomal, también son diversas las vías que pueden utilizar estas moléculas. El mecanismo de acción más conocido de la RA es el iniciado por la ZP, donde la reacción acrosomal inicia cuando el espermatozoide entra en contacto con la ZP, y en particular con la ZP3 en el ser humano, el hámster y el ratón.<sup>[21, 28, 44]</sup>

Primero, la ZP3 entra en contacto con el receptor de zona (conocido como ZRK, por sus siglas en inglés), esta interacción activa a las proteínas G (G), y genera una hiperpolarización de la membrana que activa al intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <sup>[45]</sup> y al canal de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[46]</sup> (figura 6).

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es debido a la liberación de los sitios de almacenaje por parte de el  $\text{IP}_3$ , y va acompañado de un incremento en la salida de iones  $\text{H}^+$ , lo cual culmina con un aumento en el pH intracelular (0.3 unidades)<sup>[38]</sup>. Este aumento de pH inicia un proceso de fusión de membranas similar a la exocitosis que se observa en otros sistemas.

Por otra parte, las proteínas G transducen la señal interactuando con enzimas unidas a la membrana, tales como la fosfolipasa C (PLC) y la adenilato ciclasa (AC). La activación de la AC genera un segundo mensajero que es el AMPc, el cual desplaza a los dímeros represores (R) de la proteína cinasa A (PKA), que a su vez activa la fosforilación proteínica<sup>[47]</sup>.

Por otra parte, la PLC activada, hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ )-en 1,3,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $\text{IP}_3$  se une a un receptor específico en el reservorio de calcio, generando una liberación de este ión. El DAG en conjunto con el  $\text{Ca}^{2+}$  activan a la PKC. Dicha activación genera la fosforilación proteínica y por ende la reacción acrosomal<sup>[48]</sup>.

Durante la reacción acrosomal, la membrana externa del acrosoma se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide generando numerosas vesículas que liberan el contenido acrosomal y deja expuesta la membrana interna del acrosoma<sup>[7]</sup>. Dichas vesículas liberan enzimas tales como la acrosina, las cuales son necesarias para la penetración de la ZP<sup>[37]</sup>. A su vez quedan expuestas otras moléculas en la membrana interna del acrosoma, las cuales se encuentran involucradas en la fertilización.

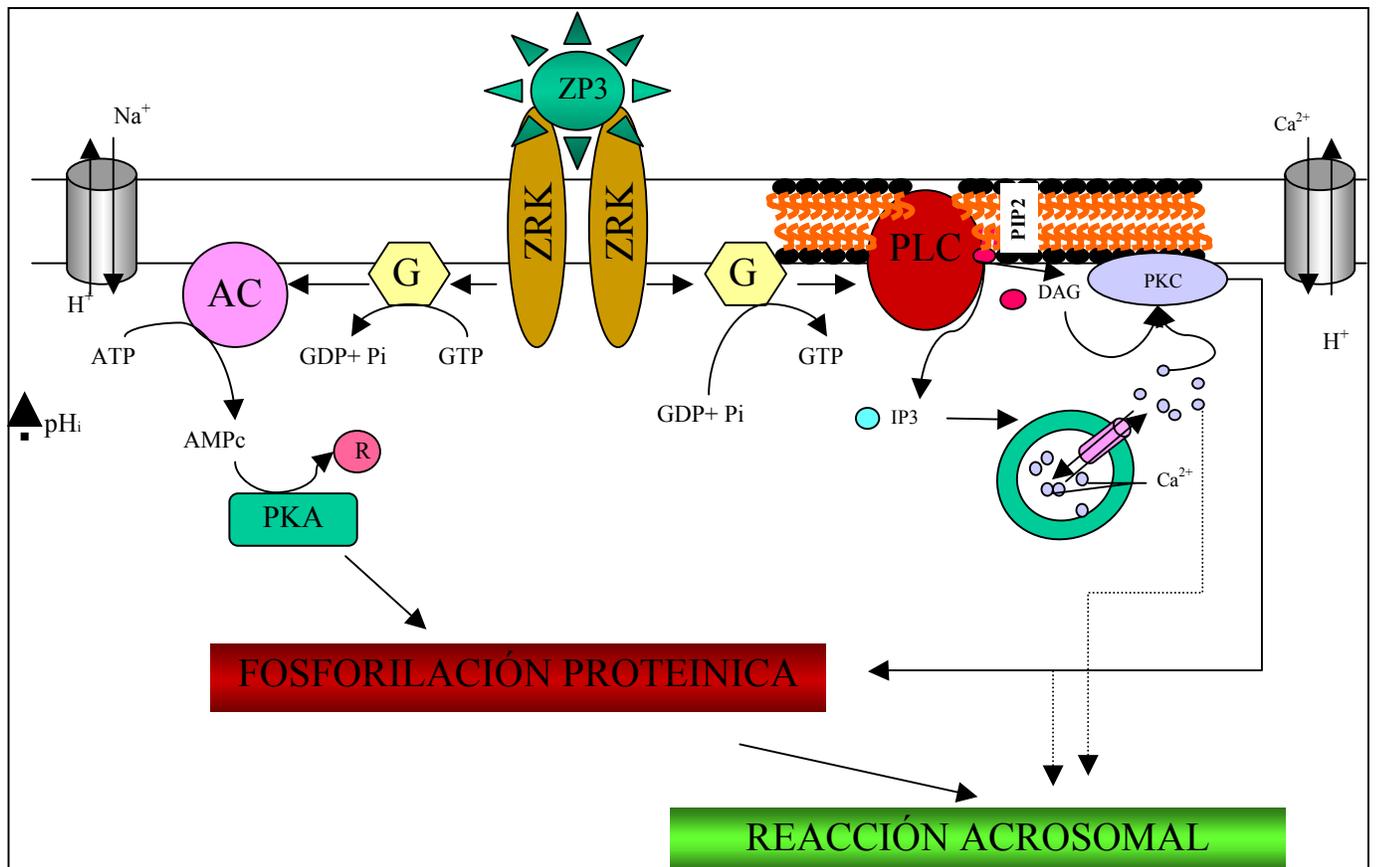


Figura 6. Diagrama que ilustra las principales vías de transducción de señales durante el proceso de la reacción acrosomal en respuesta a la ZP3<sup>[48]</sup>. Cuando la ZP3 entra en contacto con el receptor de zona (ZRK) genera la hiperpolarización de la membrana acrosomal externa, el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{pH}$  intracelular. La agregación del ZRK-ZP3 activa las proteínas G (G), que mediante enzimas como la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) se genera la fosforilación proteínica y por ende la reacción acrosomal<sup>[48]</sup>.

## **CAPÍTULO 4. INTERACCIÓN Y FUSIÓN DE GAMETOS**

---

Cuando los espermatozoides se encuentran dentro del útero, tienen que empezar su recorrido hasta llegar al oviducto, después de adquirir la capacitación, deben de encontrarse con el ovocito para llevar a cabo la RA y empezar el reconocimiento tanto del espermatozoide hacia el ovocito y viceversa. El primer espermatozoide que atraviesa la ZP y puede fusionarse con el ovocito, genera la última división celular por parte del ovocito, para posteriormente generar un cigoto. Dado que sólo un espermatozoide es el que se fusiona con el ovocito, se genera un bloqueo para impedir la penetración de más espermatozoides.

### **4.1. Interacción de gametos**

Los espermatozoides presentes en el oviducto, se dirigen hacia el cúmulo oóforo mediante un proceso de quimioatracción. Para atravesar las células del cúmulo, los espermatozoides hacen uso de la motilidad adquirida durante la capacitación (hiperactivación) y de una proteína anclada a través de glicosilfosfatidilinositol, con actividad de hialuronidasa, denominada PH-20<sup>[49]</sup>.

La movilidad y la hialuronidasa son necesarias, y quizá suficientes, para digerir y pasar a través de la matriz de ácido hialurónico que rodea las células del cúmulo<sup>[50]</sup>. Después, el espermatozoide con el acrosoma intacto debe unirse a la ZP3, que induce la RA.

La reacción acrosomal libera proteasas y hialuronidasas que son esenciales para la penetración de la ZP, y quedan expuestas otras proteínas de la superficie interna del acrosoma que se unen a la ZP2 durante su paso a través de la ZP<sup>[10]</sup>.

Se ha propuesto que la penetración de la ZP puede producirse mediante 2 mecanismos, uno mecánico y otro enzimático. La hipótesis mecánica propone que la fuerza generada por el espermatozoide puede ser de hasta 3000  $\mu$ dinas, suficientes para atravesar la ZP. En cambio, la hipótesis enzimática postula que los espermatozoides que no llevan a cabo reacción acrosomal no pueden penetrar la ZP. La acrosina es capaz de hidrolizar todas las glicoproteínas de la ZP, pero a diferencia de la tripsina lo hace de manera específica, ya que sólo digiere las proteínas necesarias para su paso, sin destruir totalmente la ZP<sup>[10]</sup>.

Estas dos hipótesis no necesariamente son excluyentes, dado que la acrosina pudiera ser necesaria para ir digiriendo las moléculas, dándole el espacio suficiente al espermatozoide para poder desplazarse y atravesar completamente la ZP, gracias a su motilidad.

Después de atravesar la ZP, el espermatozoide cruza el espacio perivitelino y su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito. El primer contacto se da cuando el espermatozoide se posa sobre los microfilamentos de la superficie de los ovocitos, lo que provoca que los microfilamentos adyacentes se alarguen rápidamente para rodear al espermatozoide y así asegurar que se una firmemente y pueda fusionarse con el ovocito<sup>[7]</sup>.

#### **4.2. Fusión de células haploides**

Al fusionarse los espermatozoides con el ovocito se producen en este último una serie de sucesos que promueven la activación del cigoto. Estos se inician con la activación de la ruta del IP3 que provoca el aumento de  $Ca^{2+}$  en el citosol del huevo, el cual inicia en la región

donde se produjo la penetración del espermatozoide y se extiende hacia el resto del ovocito. La liberación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  produce por un lado la exocitosis de los gránulos corticales, y por otro lado provoca pulsos de hiperpolarización periódicos en la membrana plasmática. Los cambios en la membrana plasmática se realizan en forma simultánea y son debidos a la activación de las proteínas G<sup>[7, 33]</sup>.

La PKC, activada por el DAG, provoca un rompimiento en el equilibrio entre la fosforilación y defosforilación de algunas proteínas, lo cual conduce a la modulación de los canales iónicos de calcio en la membrana, a la inactivación del factor promotor de la maduración y a la del factor citostático.

Estos cambios y el aumento del pH conducen al reinicio de la meiosis, y la segunda profase del ovocito prosigue para expulsar el segundo cuerpo polar<sup>[10]</sup>.

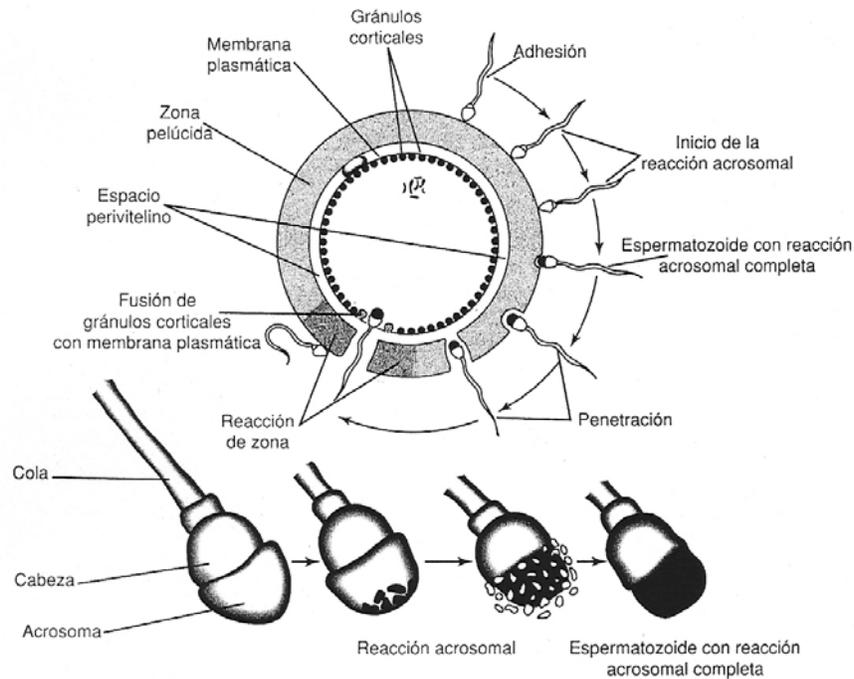


Figura 7. Etapas de interacción de gametos de mamífero que ocurren durante la fertilización<sup>[10]</sup>.

### 4.3. Bloqueo de la polispermia

Al producirse la fertilización y la activación del ovocito, los gránulos corticales que se encuentran por debajo de la membrana plasmática del ovocito se fusionan con la misma liberando su contenido enzimático hacia el espacio perivitelino. Éste a su vez, altera las propiedades de la ZP impidiendo la entrada de más espermatozoides, lo que se conoce como bloqueo de la polispermia<sup>[51]</sup> (*figura 7*).

En los mamíferos, el primer bloqueo ocurre en la membrana plasmática, ya que la entrada del primer espermatozoide produce una despolarización transitoria de ésta, impidiendo la entrada de espermatozoides secundarios. La membrana plasmática reduce drásticamente su potencialidad de fusionarse con espermatozoides después de que se lleva a cabo la fertilización. El mecanismo de este primer bloqueo no se conoce en su totalidad, pero se sabe que es independiente de la exocitosis de los gránulos corticales<sup>[7, 33]</sup>.

Luego de que el potencial de la membrana regresa a la normalidad, poco después de la fertilización, se produce un segundo bloqueo de la polispermia que está mediado por la liberación de los gránulos corticales hacia el espacio perivitelino. Durante esta liberación enzimática, la ZP3 y la ZP2 se alteran para inactivar los ligandos de los espermatozoides. Las enzimas de los gránulos corticales cortan los residuos terminales de los oligosacáridos de la glicoproteína ZP3 involucrada en la unión del espermatozoide, impidiendo la entrada de más espermatozoides. También la ZP2 es modificada por proteasas, perdiendo su capacidad de unión<sup>[33]</sup>.

## CAPÍTULO 5.

# MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA UNIÓN ENTRE LA ZP Y EL ESPERMATOZOIDE

---

Como se mencionó anteriormente, la ZP tiene distintas funciones que desempeña dentro de la fertilización; una de ellas es la RA, pues permite el primer contacto y reconocimiento por parte del espermatozoide. Dicho reconocimiento se piensa que puede ser mediante moléculas que identifican a moléculas de origen proteínico o por medio de carbohidratos presentes en las ZP's. Respecto al tema existe controversia pues no se ha podido identificar que o cuales moléculas son los responsables de dicho reconocimiento.

### 5.1. Receptores espermáticos

Diversos estudios indican que el espermatozoide humano expresa receptores de superficie capaces de unirse a una variedad de simples y complejas porciones de carbohidratos y proteínas. Si bien la mayoría de las moléculas inicialmente han sido identificadas en modelos no humanos, esto ha permitido detectar la presencia de algunas moléculas en el ser humano. A continuación se presentan los principales receptores del espermatozoide que se han descrito por su capacidad de unión a la zona pelúcida del ovocito (Tablas II y III).

<b>Tabla II. Moléculas de la superficie del espermatozoide con afinidad por carbohidratos presentes en la matriz extracelular del ovocito en el ser humano<sup>[52]</sup>.</b>	
Receptor espermático	Características
Receptor de manosa (tipo lectina)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Durante la capacitación del espermatozoide, aparecen receptores de manosa en la cabeza del espermatozoide<sup>[53]</sup>.</li><li>• La manosa necesita no ser un residuo terminal de los glicoconjugados de la ZP3 para regular los pasos iniciales en la unión especie específica de los gametos humanos<sup>[54]</sup>.</li><li>• El receptor de manosa forma un complejo con los receptores no nucleares de progesterona sobre la superficie el espermatozoide humano capacitado,</li></ul>

	sugiriendo que la progesterona y los ligandos de unión de la ZP actúan en conjunto para producir la RA fisiológica <sup>[55]</sup> .
N-acetilglucosanimidasa (Hex)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es responsable de hidrolizar los residuos terminales de N-acetilglucosamina de las uniones <math>\beta</math>-glicosídicas en distintos glicoconjugados.</li> <li>• Es capaz de hidrolizar tanto N-acetil glucosamina como N-acetil galactosamina.</li> <li>• Estudios <i>in vitro</i> de unión espermatozoide-ZP, donde fue agregada la Hex, reducen significativamente la unión del mismo ensayo<sup>[56]</sup>.</li> <li>• Se sugiere la participación de Hex en la interacción espermatozoide-ZP, aunque no se sabe a que nivel (primario, secundario o penetración de la ZP).</li> <li>• Es una enzima acrosomal<sup>[57]</sup>.</li> </ul>
Receptor de galactosa (tipo lectina)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína de 50 kDa, presente tanto en el espermatozoide como en los testículos de humano, y está relacionada por antígenos a una galactosillectina encontrada en rata y en espermatozoide de conejo<sup>[58]</sup>.</li> <li>• Este receptor se encuentra localizado en la punta de la membrana plasmática que rodea al acrosoma. Su papel en la unión del espermatozoide con la ZP, o en la inducción de la reacción acrosomal aun no ha sido evaluado directamente.</li> </ul>

**Tabla III. Moléculas de la superficie del espermatozoide con afinidad por proteínas de la zona pelúcida del ser humano.**

Receptor espermático	Características
hu9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificado como hu9<sup>[59]</sup>, es un antígeno de 95 kDa localizado en la región ecuatorial del espermatozoide con acrosoma intacto<sup>[60]</sup>, también se conoce como antígeno de 94 kDa<sup>[61]</sup> o antígeno de fertilización -2 (FA-2)<sup>[62]</sup>,</li> <li>• Se une a la ZP3 recombinante<sup>[63]</sup>.</li> <li>• Como esta proteína contiene una actividad intrínseca de tirosina cinasa y se autofosforila<sup>[64]</sup>, ha sido renombrado ZRK (zona receptor kinase). ZRK podría regular la actividad de la fosfolipasa C<sup>[65]</sup>.</li> </ul>
L-Selectina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudios con anticuerpos anti L-selectina (selectina de leucocito) han identificado a una proteína de espermatozoide humano de 90 kDa que se localiza en la cabeza del espermatozoide<sup>[66]</sup>. Un tratamiento previo de espermatozoides con estos anticuerpos bloquea su unión a la ZP en ensayos de hemizona. Sin embargo el papel de la L-selectina aun no ha sido directamente estudiado en el proceso de fertilización.</li> </ul>
FA-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El antígeno de fertilización 1 (FA-1) está implicado en la generación de inmuno-infertilidad<sup>[67]</sup>.</li> <li>• Utilizando anticuerpos monoclonales, se ha localizado a FA-1 sobre la superficie del espermatozoide humano<sup>[68]</sup>.</li> <li>• FA-1 se une específicamente a la ZP3 de humano<sup>[69]</sup>.</li> <li>• Es una glicoproteína que al ser deglicosilada se une a la ZP3 de ratón<sup>[70]</sup>.</li> </ul>
P34H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína del espermatozoide humano de 34 kDa de origen epididimal. Se encuentra localizada en la punta del acrosoma del espermatozoide humano y parece estar involucrada en la interacción con la zona pelúcida<sup>[71]</sup>.</li> <li>• Anticuerpos policlonales contra P34H interfieren con la capacidad del espermatozoide de unirse a la ZP humana sin afectarse la motilidad, la reacción acrosomal o la fusión con la membrana plasmática del ovocito<sup>[71]</sup>.</li> </ul>

SLIP1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La proteína inmovilizadora de sulfolípidos 1 (SLIP1) es una proteína de membrana plasmática de 68 kDa, presente selectivamente en células germinales<sup>[72]</sup>.</li> <li>• Se comprobó que la SLIP1 tiene una función en la unión a la ZP mediante un ensayo de unión espermatozoide-ZP, donde espermatozoides de humano que fueron pretratados con anticuerpo anti-SLIP1 disminuyeron consistentemente el número de espermatozoides unidos a la ZP.</li> </ul>
PH-20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esta proteína tiene actividad hialuronidasa, que permite al espermatozoide con acrosoma intacto penetrar las células del cúmulo<sup>[49]</sup>, y parece ser requerida para que el espermatozoide se una a la ZP<sup>[73]</sup>.</li> </ul>

## 5.2. Ligandos en la ZP

Si bien el modelo murino de la ZP es el mejor conocido, existen diferencias entre especies que indican que aun a pesar de que las proteínas de ZP provienen de un mismo ancestro común, no pueden ser consideradas homólogas y por lo tanto requieren de un análisis individual<sup>[14]</sup>.

En el ser humano, el receptor primario e inductor de la reacción acrosomal es la ZP3<sup>[29]</sup>. Existen evidencias de que la cadena polipeptídica de la ZP3 humana recombinante es capaz de inducir la RA *in vitro*<sup>[74]</sup>. Sin embargo, los carbohidratos unidos a las ZP's también juegan un papel muy importante en las funciones de cada una de las proteínas, ya sea como sitio de reconocimiento entre gametos, o en la activación de la RA del espermatozoide.

Para conocer los principales carbohidratos de la ZP que se encuentran involucrados en la RA, se ha utilizado sobre todo el ratón como modelo de estudio. Algunos ensayos utilizan neoglicoproteínas (NGPS), que se constituyen de una proteína tal como la albúmina del suero bovino (BSA) a la cual se le acoplan diferentes carbohidratos. Con el uso de estas NGPS se ha encontrado que la manosa<sup>[75]</sup>, la N-acetilglucosamina<sup>[76]</sup> y la fucosa<sup>[77]</sup> participan en la RA. Sin embargo hasta el momento no se han descrito los carbohidratos que se encuentran presentes en la ZP3.

## **CAPÍTULO 6.**

# **ENSAYOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LA UNIÓN DE ESPERMATOZOIDES A LA ZP: POSIBILIDADES Y LIMITACIONES**

---

Como se describió en los capítulos anteriores, para que exista la fertilización deben ocurrir una gran cantidad de eventos tanto en el hombre como en la mujer. Por distintas circunstancias muchas veces no se llevan a cabo satisfactoriamente.

Actualmente se cuentan con distintas pruebas clínicas que permiten el diagnóstico de la infertilidad femenina. Sin embargo, no se ha descrito ninguna prueba que permita el diagnóstico de la infertilidad de origen desconocido, donde pueden estar participando problemas en el reconocimiento de la ZP hacia el espermatozoide.

Por lo que respecta a la infertilidad del varón, sólo se utiliza la espermatozoscopia como prueba de rutina, si bien sólo permite conocer parámetros generales del semen tales como la concentración, movilidad, y la viabilidad, entre otros. Por otra parte la certeza del resultado de esta prueba es relativa, pues una muestra que tenga una alta concentración de espermatozoides no necesariamente conduce a una fertilización exitosa. Actualmente se han reportado distintas pruebas que permiten evaluar eventos específicos de una muestra de semen, tales como la RA, la unión a la ZP y la penetración de la misma. No obstante estas pruebas son de investigación básica, pero pueden tener una gran utilidad clínica, y por ende ser un apoyo para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina.

Los métodos que han sido desarrollados para detectar problemas asociados a la interacción entre espermatozoide-ZP se pueden clasificar según la actividad que evalúan, que son:

1. Inducción de la reacción acrosomal

2. Unión a la zona pelúcida
3. Penetración de la zona pelúcida.

### **6.1. Ensayos de inducción de la reacción acrosomal**

Distintos estudios con base en la RA se han desarrollado con el fin de brindar resultados confiables en la evaluación de un evento fisiológico tan importante. Las pruebas que a continuación se mencionan, tienen por generalidad la incubación de espermatozoides, previamente capacitados, con una molécula que induce la reacción acrosomal. Luego de la incubación, se procede a evaluar la muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides que han llevado a cabo la RA.

#### **6.1.1. Estimulación por ionóforo de calcio**

La O.M.S. menciona que se puede utilizar al ionóforo de calcio (A23187) como inductor de la RA<sup>[6]</sup>. Este compuesto se puede usar como una prueba optativa para el diagnóstico de infertilidad masculina, cuya principal utilidad radica en la identificación de la insuficiencia de la RA<sup>[78]</sup>.

La insuficiencia en la RA describe casos en donde la diferencia entre la frecuencia de espermatozoides con reacción acrosomal tratados con ionóforo de calcio y el control es menor al 15%.

El ionóforo de calcio induce la RA de manera significativa respecto a la RA espontánea en hombres sanos. Sin embargo, este inductor no es fisiológico por lo que no puede compararse con la RA *in vivo*, y sólo sirve como aproximación para determinar la susceptibilidad de que una muestra lleve a cabo la RA.

### **6.1.2. Inducción de la RA con ZP solubilizada (ZIAR)**

Esta prueba está basada en la incubación de espermatozoides capacitados con la ZP solubilizada, con el objetivo de obtener mayor aprovechamiento y de poder evaluar el estado acrosomal de la muestra. Dentro de las principales ventajas de esta prueba destacan que es repetible y se emplean volúmenes mínimos de zona pelúcida por ensayo<sup>[79]</sup>.

Sin embargo, sí existe una diferencia significativa al compararla con la RA espontánea y contra la RA por ZP nativa intacta (ZPIAR)<sup>[79]</sup>. Es posible que la estructura tridimensional de la ZP sea importante para la inducción de la RA<sup>[80]</sup>.

### **6.1.3. Uso de proteínas recombinantes de la ZP.**

Otra alternativa para el estudio de la RA es el uso de proteínas recombinantes de la ZP expresadas en diferentes líneas celulares. Distintos estudios han utilizado la expresión de ZP3 humana en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), encontrando que es capaz de inducir la RA en espermatozoides capacitados, de manera equivalente ZIAR<sup>[81]</sup>.

La principal ventaja dentro de la producción de las ZP's recombinantes es la posibilidad de obtener grandes cantidades de proteína. Para el caso de ZP3, se obtienen miligramos de proteína equivalente a la extracción de 200,000 ovocitos. Si bien el peso molecular de la rhZP3 expresada en células CHO es menor al observado en la proteína nativa debido al patrón de glicosilación, se ha demostrado que esas discrepancias no influyen en la capacidad del reconocimiento de esta molécula por parte de la superficie del espermatozoide<sup>[25]</sup>.

## **6.2. Ensayos de unión a la zona pelúcida**

Desde el momento en que ha ocurrido la reacción acrosomal, la unión a la ZP es el evento donde se involucran los receptores secundarios que permiten que el espermatozoide siga unido y pueda atravesar la ZP para concluir con la fertilización del ovocito.

En las pruebas que se mencionan a continuación, se utiliza la ZP (íntegra) de los ovocitos para determinar la unión por parte de los espermatozoides con la finalidad de evaluar este evento. Los resultados obtenidos de dichos ensayos son muy valiosos, pero tienen el inconveniente de las dificultades para obtener la ZP nativa.

### **6.2.1. Radio de unión espermatozoide-zona pelúcida**

Se basa en la unión competitiva de un mismo grupo de ovocitos simultáneamente con dos poblaciones de espermatozoides marcados con distintos fluorocromos<sup>[82]</sup>. Los espermatozoides de un paciente se marcan con isotiocianato de fluoresceína (fluorescencia verde) y los espermatozoides control de donadores fértiles se marcan con isotiocianato de tetrametilrodamina (fluorescencia roja). Los espermatozoides fuertemente unidos a la ZP se cuentan con ayuda de un microscopio de fluorescencia para calcular el radio de unión de los espermatozoides prueba respecto a los espermatozoides control. Se ha observado que espermatozoides que han fallado en uno o en varios eventos de fertilización *in vitro*, usualmente muestran muy bajo radio de unión respecto a los espermatozoides normales en este ensayo<sup>[82]</sup>.

Esta prueba puede predecir la capacidad de que una muestra de espermatozoides pueda fertilizar ovocitos humanos *in vitro* y puede ser utilizado en estudios de interacción de gametos humanos.

Este procedimiento es largo, laborioso y sobre todo costoso por el marcaje con fluorescencia, sin embargo, el uso de espermatozoides control permite comparar resultados de pacientes que presentan problemas de infertilidad.

### **6.2.2. Unión espermatozoide-zona pelúcida como prueba de rutina**

Este ensayo es similar al de radio de unión, pero omite el marcaje fluorescente y los espermatozoides control. El método consiste en incubar 20 millones de espermatozoides capacitados con cuatro ovocitos por un periodo de 2 horas. Posteriormente los espermatozoides fuertemente unidos son contados con un microscopio de contraste de fases<sup>[80]</sup>.

Con estas condiciones, los hombres fértiles muestran más de 100 espermatozoides unidos por cada ZP. Si se observa la unión de 40 ó menos espermatozoides por cada ZP, se considera como unión anormal. Sin embargo, a causa de la variabilidad de los ovocitos se recomienda que los pacientes con un resultado bajo de unión entre espermatozoides-ZP, sean sometidos a una segunda prueba para corroborar dicho resultado. Si bien no es necesario realizar un marcaje a los espermatozoides, se deben tener previamente resultados de espermatozoides control para poder interpolar los resultados de las muestras.

### **6.2.3. Ensayo de hemizona**

Entre las pruebas de unión a la zona pelúcida humana se encuentra el ensayo de hemizona (HZA), el cual se basa en la unión de espermatozoides prueba y control a dos mitades de una misma ZP. Dichas mitades son obtenidas por disección de un ovocito en dos partes iguales, de forma que la incubación de una mitad con la muestra de fertilidad probada sirve como control de la variabilidad del ovocito<sup>[83]</sup>.

Oehninger y colaboradores reportaron que pacientes con una baja fertilización en IVF presentaron una unión significativamente baja respecto al control en este ensayo. Basado en estándares comunes, el HZA fue capaz de predecir la fertilización en 26 de 28 casos<sup>[84]</sup>.

Esta prueba elimina la variabilidad de la ZP debida a los ovocitos y permite comparar los resultados de una muestra con un control. Sin embargo, se requiere de personal capacitado tanto en la micromanipulación de la muestra, así como en la evaluación de la misma.

### **6.3. Ensayos de penetración de la zona pelúcida**

Determinar el número de espermatozoides que penetran la ZP ha sido difícil, debido a la transparencia de esta estructura. Es decir, es difícil determinar si la cabeza del espermatozoide se ha unido o si está dentro de la ZP, por lo que la evaluación de la penetración de la ZP mediante observación directa del ovocito es inapropiada.

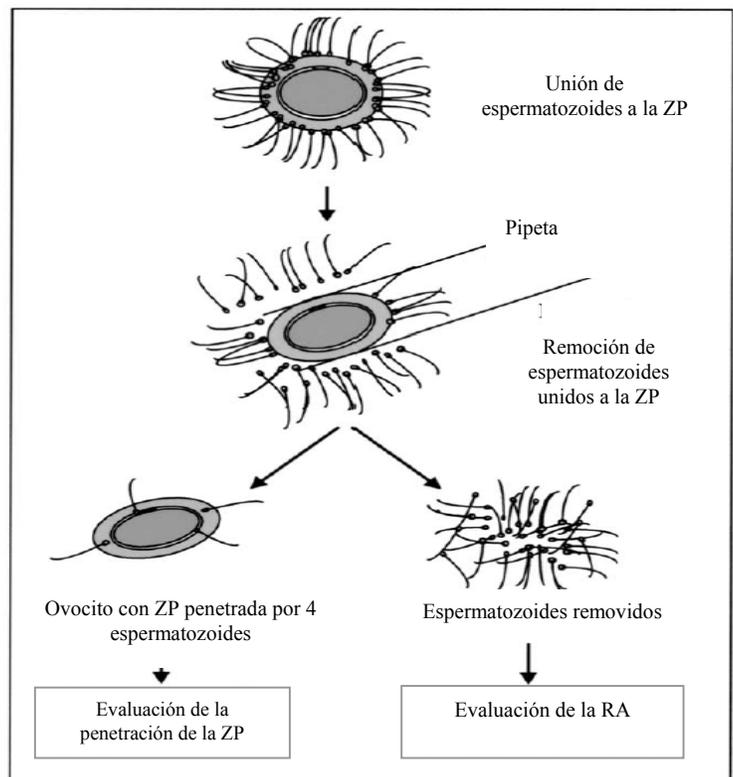
Debido a esto, una nueva técnica ha sido desarrollada para remover todos los espermatozoides unidos a la superficie de la ZP, permitiendo el conteo de aquellos que sus cabezas se encuentran embebidas en la ZP o en el espacio perivitelino<sup>[85]</sup>. Después de la incubación con espermatozoides, los ovocitos son aspirados repetidamente con una pipeta ligeramente más pequeña que el diámetro del ovocito, eliminando así los espermatozoides fuertemente unidos y dejando los espermatozoides que hayan penetrado la ZP. Estos espermatozoides no pueden ser removidos con posteriores pipeteos y pueden ser contados con mayor facilidad (*figura 8*).

Esta prueba sirve además para evaluar la RA por ZP (ZPIAR), así como para predecir la penetración defectuosa espermatozoide-ZP en hombres con análisis de semen normal y unión normal de espermatozoide-ZP. Liu y colaboradores reportan que hay una gran correlación entre resultados de la prueba ZIAR y la prueba de penetración espermatozoide-

ZP, donde hombres con resultados de ZIAR mayor al 20% generalmente tienen buenos resultados de penetración de ZP<sup>[86]</sup>.

Los resultados con este ensayo pueden tener un alto valor para el diagnóstico de la infertilidad. Desafortunadamente esta prueba no resulta viable pues implica un largo tiempo en el procesamiento de muestras, además de requerir ovocitos frescos no viables.

Figura 8. Diagrama esquemático de la técnica para la evaluación de la inducción de la RA por la ZP y de la penetración de la ZP<sup>[87]</sup>.



## DISCUSIÓN

---

En los últimos 15 años se ha difundido la creencia de que el diagnóstico de problemas asociados al espermatozoide era de poca relevancia, debido a los avances logrados en las técnicas de reproducción asistida y especialmente al éxito del ICSI. Sin embargo, esta última es una técnica que no contempla la selección natural de los gametos que van a participar en el proceso de fertilización, ni ningún procedimiento equivalente, y es el laboratorista el que decide con base en la madurez del ovocito y a las características aparentes de los espermatozoides cuáles células van a ser utilizadas, con los riesgos que esto puede conllevar.

Es por ello que recientemente ha habido un aumento considerable en el desarrollo de pruebas de laboratorio destinadas a evaluar las diferentes funciones espermáticas en el ser humano con fines diagnósticos, sobre todo destinadas a dar respuestas a aquellos casos de infertilidad que son calificados como idiopáticos y evitar el uso indiscriminado y sin criterio de las técnicas de reproducción asistida.

Una de las etapas de la fertilización más desconocida es la que involucra la interacción de gametos al nivel de la zona pelúcida, debido fundamentalmente a que es un evento que ocurre en el interior del aparato reproductor femenino. Para poder llevar a cabo estudios *in vitro*, los científicos han encontrado grandes dificultades para obtener ZP humana, razón por la cual no se han podido implementar de forma generalizada las técnicas que implican el uso de ZP nativa. Sin embargo, como alternativa se está dando un impulso al uso de proteínas recombinantes de la ZP para este fin.

Durante la interacción entre el espermatozoide y la ZP ocurren eventos secuenciales que son indispensables para que el ovocito pueda ser finalmente fertilizado, que son la RA del espermatozoide, su unión a la ZP y la penetración de esta última. Por tanto, investigadores en el área de la medicina reproductiva se han abocado al desarrollo y/o perfeccionamiento de técnicas que permitan evaluar la capacidad de una muestra de semen de cumplir con estos tres eventos y así correlacionarlos con el éxito de la fertilización, siendo esta natural o asistida.

A medida que el espermatozoide pasa por el proceso de capacitación, adquiere la habilidad de sufrir la RA y, en última instancia, de fertilizar. Se ha determinado que la evaluación de la RA inducida por el ionóforo de calcio tiene un valor diagnóstico limitado, ya que sólo permite diagnosticar problemas asociados con la susceptibilidad de sufrir la RA. Sin embargo, el ionóforo de calcio no es un inductor fisiológico que se pueda encontrar en el ambiente del espermatozoide *in vivo*, y por tanto persiste la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico en el laboratorio que contemplen el uso de la ZP, que es el agonista natural de este evento fisiológico.

Varios son los métodos que se han desarrollado para este fin, los cuáles, con el paso del tiempo, se han ido perfeccionando con el objeto de optimizar y estandarizar el método, así como para ponderar su valor predictivo. Aunque no con la misma intensidad, todos los ensayos de inducción de RA por la ZP revisados aquí cumplieron con el objetivo, si bien en el caso del uso de ZP intacta los resultados obtenidos son mayores, probablemente debido a que la interacción entre ambos gametos es más parecida a la fisiológica. A pesar de esto, la escasez de ZP para realizar este tipo de estudios motivó el desarrollo del método de la ZP solubilizada, el cual aumenta el aprovechamiento de la ZP y por tanto permite realizar un mayor número de ensayos con el mismo material de partida<sup>[80]</sup>. Sin embargo, este método

aun requiere la obtención de ZP nativa, además de que la implementación de esta técnica requiere de personal técnico entrenado para ello, ya que la micromanipulación de las ZP para su solubilización es compleja y laboriosa.

La expresión de las proteínas recombinantes de la ZP del ser humano en diferentes líneas celulares permite su producción en altas cantidades y en poco tiempo. La rhZP3 expresada en células CHO es capaz de inducir la RA en espermatozoides capacitados, de manera equivalente a la zona pelúcida humana solubilizada, por lo que puede ser una herramienta importante en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina. Sin embargo, los resultados obtenidos podrían diferir de lo que ocurre *in vivo* dependiendo del sistema de expresión empleado, pues los carbohidratos asociados a la rhZP3 pueden estar involucrados en este proceso y entre los diferentes sistemas de expresión existen variaciones en el patrón de glicosilación.

Por otra parte, para determinar la unión de los espermatozoides con la ZP actualmente existen dos pruebas: el radio de unión espermatozoides-ZP y el ensayo hemizona. Ambas pruebas eliminan las posibles discrepancias debidas a la variabilidad de los ovocitos. Sin embargo, la competencia que se presenta en el ensayo de radio de unión pudiera interferir con el proceso de unión, y lo que se pretende es evaluar la cantidad de espermatozoides que se unen a los ovocitos en un periodo determinado y no la competencia. Es lógico pensar que si una muestra problema es poco hábil para unirse a la ZP, y que si coexiste con otra con mayor afinidad por la ZP, sus posibilidades de unión son menores. Por tanto, el mismo investigador que diseñó este método realizó modificaciones al mismo para mejorarlo. Esta variante del método del radio de unión omite el marcaje con fluorescencia y la incubación con espermatozoides control, y los resultados obtenidos se interpolan con resultados previamente obtenidos de hombres fértiles<sup>[88]</sup>. El inconveniente de este método es que no

contempla la variabilidad en la calidad de los ovocitos empleados ni de las condiciones empleadas durante el ensayo, por lo que sólo tiene validez cuando la diferencia entre los valores de unión entre la muestra problema y los valores de referencia para hombres fértiles son muy marcadas.

Por su parte, el ensayo de hemizona solamente utiliza un ovocito para cada prueba y no requiere de tiempo extra en el marcaje de espermatozoides. No obstante, requiere de un micromanipulador y una persona entrenada para dividir la ZP en dos mitades, y distinguir los espermatozoides unidos a la superficie interna y externa de la ZP.

Finalmente, existe una prueba que de forma indirecta evalúa todas las etapas de la penetración espermática de la ZP, que es la prueba de penetración de la ZP. Dicha prueba tiene el inconveniente de ser costosa y laboriosa debido a la interpretación de los resultados obtenidos. No obstante, esta prueba ha permitido distinguir entre muestras que pueden utilizarse para IVF o que deben recurrir al ICSI<sup>[89, 90]</sup>.

Para que alguna de las técnicas anteriormente descritas se implemente de forma generalizada en las clínicas de reproducción asistida debe cumplir con varias condiciones: ser confiable, reproducible y económica. La escasez de material biológico y la dificultad de su obtención han sido otras de las razones por las que estas pruebas no son introducidas en la rutina clínica. Sin embargo, el uso de la biología molecular ha permitido la obtención de proteínas recombinantes similares a las que conforman la ZP humana nativa que pueden ser utilizadas en estudios de la reacción acrosomal y/o la unión a ZP. Dichas proteínas recombinantes deben estar previamente caracterizadas y demostrar su actividad biológica sobre el espermatozoide, pero una vez cubiertos esos requerimientos sus posibilidades en estudios clínicos y de investigación en reproducción humana son muy prometedoras.

De cualquier modo, la Andrología en humanos es un campo fértil para la investigación, si consideramos que prácticamente el único estudio diagnóstico de rutina que se realiza en la actualidad a hombres con problemas de infertilidad es la espermatobioscopía. Cualquier esfuerzo orientado a conocer mejor la fisiología espermática y los complejos cambios que sufre esta célula para poder finalmente fertilizar un ovocito, serán de gran valor para la medicina reproductiva y la ciencia en general.

## CONCLUSIONES

---

Aunque existe una amplia variedad de pruebas enfocadas a determinar el estatus de la fertilidad masculina, hasta el momento no existe una prueba a nivel clínico que permita obtener un diagnóstico certero. Sin embargo, cada una de las pruebas existentes en la actualidad permiten conocer ciertos aspectos que pueden ser utilizados para encaminar a los pacientes hacia una técnica de fertilización en particular y/o dar un pronóstico de sus posibilidades de éxito.

La prueba de penetración de la ZP es la prueba más completa que puede utilizarse para diagnosticar problemas de infertilidad debidos a la incapacidad del espermatozoide de atravesar la ZP para alcanzar al ovocito. Sin embargo, las dificultades en la obtención de ZP nativa, su alto costo y grado de dificultad han impedido su uso extendido.

El uso de proteínas recombinantes como alternativa al empleo de material biológico nativo puede ser una herramienta útil en el diagnóstico de infertilidad masculina asociada a problemas en la reacción acrosomal o la unión a la ZP.

En la actualidad, debido al aumento en la incidencia de problemas de infertilidad de pareja, es necesario el desarrollo de nuevos métodos diagnóstico, sencillos y con un valor predictivo confiable, que puedan implementarse de manera rutinaria en las clínicas de reproducción asistida y que permitan así tratar el factor masculino de infertilidad, área de la investigación biomédica que ha estado relativamente desatendida en los últimos años.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL. Endocrinología de la reproducción. México. Médica Panamericana. 2001. 697.
2. Collins J. **Unexplained infertility**. In: Infertility: Evaluation and treatment. Keye W, Chang R, Rebar R, Soules M (eds.). Philadelphia. WB Saunders; 1995. Ed. vol249-262.
3. Ramirez JF, Ayala AR. El factor masculino como causa de esterilidad. In: Endocrinología y Nutrición, vol. 5. México, D.F.; 1997: 6-11.
4. Laufer MR, Floor AE, Parsons KE, Kuntz KM, Barbieri RL. **Hormone testing in women with adult-onset amenorrhea**. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40: 200-203.
5. Westrom L. **Incidence, prevalence, and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrialized countries**. Am J Obstet Gynecol. 1980; 138: 880-892.
6. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, UK. Cambridge University Press. 1999.
7. Yanagimachi R. **Mammalian Fertilization**. In: The physiology of reproduction. Knobil E, Neill JD (eds.). New York. Raven Press; 1994. 2 Ed. vol 1: 189-317.
8. Baker TG, Franchi LL. **The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries**. J Cell Sci. 1967; 2: 213-224.
9. Ohno S, Klinger H, Atkin N. **Human oogenesis**. Cytogenetics. 1962; 1: 42.
10. Jimenez LF, Merchant H. Biología Celular y Molecular. México. Pearson Educación. 2003. 679-711.
11. Dunbar B, Prasad S, Timmons T. A comparative overview of mammalian fertilization. New York. Plenum Press. 1991. 97-116.
12. Grootenhuis AJ, Philipsen HL, de Breet-Grijnsbach JT, van Duin M. **Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3**. J Reprod Fertil Suppl. 1996; 50: 43-54.
13. Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. **Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries**. Cell Tissue Res. 2001; 303: 277-287.
14. Carino C, Diaz L, Mendez I. **Zona pellucida antigens in the human ovum: its importance in contraceptive strategies**. Rev Invest Clin. 2001; 53: 174-180.
15. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. **The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships**. Endocr Rev. 1985; 6: 371-399.
16. Klug WS, Cummings MR. Conceptos de genética. Madrid. Prentice Hall Iberia. 1999.
17. Spargo SC, Hope RM. **Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family**. Biol Reprod. 2003; 68: 358-362.
18. Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC, Barratt CLR. **Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida**. Hum Reprod. 2005; 20: 1148-1152.
19. Epifano O, Liang LF, Dean J. **Mouse Zp1 encodes a zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish**. J Biol Chem. 1995; 270: 27254-27258.
20. Greve JM, Wassarman PM. **Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat**. J Mol Biol. 1985; 181: 253-264.
21. Wassarman PM. **Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion**. Cell. 1999; 96: 175-183.
22. Bleil JD, Wassarman PM. **Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein**. Dev Biol. 1983; 95: 317-324.
23. Wassarman PM. **Zona pellucida glycoproteins**. Annu Rev Biochem. 1988; 57: 415-442.
24. Rankin T, Soyal S, Dean J. **The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development**. Mol Cell Endocrinol. 2000; 163: 21-25.
25. van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ. **Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion**. Biol Reprod. 1994; 51: 607-617.

26. Dong KW, Chi TF, Juan YW, Chen CW, Lin Z, Xiang XQ, Mahony M, Gibbons WE, Oehninger S. **Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells.** *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184: 835-844.
27. Eisenbach M. **Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation.** *Dev Genet.* 1999; 25: 87-94.
28. Eisenbach M, Tur-Kaspa I. **Do human eggs attract spermatozoa?** *Bioessays.* 1999; 21: 203-210.
29. Kinloch RA, Ruiz-Seiler B, Wassarman PM. **Genomic organization and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor.** *Dev Biol.* 1990; 142: 414-421.
30. Hughes DC, Barratt CL. **Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida?** *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1447: 303-306.
31. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. **Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human.** *Hum Reprod.* 2004; 19: 1580-1586.
32. Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology.* Philadelphia, Pa. Lippincott Williams & Wilkins. 2004. 534.
33. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *The Molecular Biology of the Cell.* New York. Garland Pub. 1994. 1011-1035.
34. Bonilla E, Velasco R, Casa E, Ducolomb Y, Betancourt M. **Inhibition of the pig sperm acrosome reaction by decapacitation factor from pig seminal plasma.** *Med Sci Res.* 1996; 24: 75-77.
35. Fraser FR, McDermott CA. **Ca(2+) related changes in the mouse sperm capacitation state a possible role for Ca(2+) ATPase.** *J Reprod Fertil.* 1992; 96: 363-377.
36. Lamirande E, Leclerc P, C. G. **Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization.** *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 173-194.
37. Abou-Haila A, Tulsiani DR. **Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function.** *Arch Biochem Biophys.* 2000; 379: 173-182.
38. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. **A profile of fertilization in mammals.** *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 59-64.
39. Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N. **Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm.** *J Biol Chem.* 1990; 265: 1376-1380.
40. Schuffner AA, Bastiaan H, Duran HE, Lin Y, Morshedi M, Franken D, Oehninger S. **Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive Gi protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid.** *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 722-728.
41. Kopf GS, Gerton GL. **The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction.** In: *Elements of Mammalian Fertilization.* Wassarman PM (ed.) Boston. CRC Press; 1991. Ed. vol153-203.
42. Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, Gonzalez-Gonzalez ME, Galicia-Chavarria M, Larrea F, Gerton GL. **Biological Effects of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins on Sperm Function.** *Biol Reprod.* 2006.
43. Loeser CR, Tulsiani DR. **The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa.** *Biol Reprod.* 1999; 60: 94-101.
44. Kinloch RA, Mortillo S, Wassarman PM. **Transgenic mouse eggs with functional hamster sperm receptors in their zona pellucida.** *Development.* 1992; 115: 937-946.
45. Darszon A, Wood CD, Beltran C, Sanchez D, Rodriguez E, Gorelik J, Korchev YE, Nishigaki T. **Measuring ion fluxes in sperm.** *Methods Cell Biol.* 2004; 74: 545-576.
46. Schulz JR, De la Vega-Beltran JL, Beltran C, Vacquier VD, Darszon A. **Ion channel activity of membrane vesicles released from sea urchin sperm during the acrosome reaction.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321: 88-93.
47. Naz RK, Rajesh PB. **Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction.** *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 75.
48. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. **Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction.** *Front Biosci.* 2000; 5: 110-123.

49. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. **A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg.** *J Cell Biol.* 1994; 125: 1157-1163.
50. Primakoff P, Myles DG. **Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction.** *Science.* 2002; 296: 2183-2185.
51. Wassarman PM, Albertini R. **The mammalian ovum.** In: *The Physiology of reproduction.* Knobil E, Neill JD (eds.). New York. Raven Press; 1994. 2 Ed. vol 1: 189-317.
52. Benoff S. **Carbohydrates and fertilization: an overview.** *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 599-637.
53. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL. **Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content.** *Hum Reprod.* 1993c; 8: 2155-2166.
54. Childs RA, Feizi T, Yuen CT, Drickamer K, Quesenberry MS. **Differential recognition of core and terminal portions of oligosaccharide ligands by carbohydrate-recognition domains of two mannose-binding proteins.** *J Biol Chem.* 1990; 265: 20770-20777.
55. Benoff S, Rushbrook JI, Hurley IR, Mandel FS, Barcia M, Cooper GW, Hershlag A. **Co-expression of mannose-ligand and non-nuclear progesterone receptors on motile human sperm identifies an acrosome-reaction inducible subpopulation.** *Am J Reprod Immunol.* 1995b; 34: 100-115.
56. Miranda PV, Gonzalez-Echeverria F, Blaquier JA, Mahuran DJ, Tezon JG. **Evidence for the participation of beta-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction in vitro.** *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 699-706.
57. Tulsiani DR, Skudlarek MD, Orgebin-Crist MC. **Human sperm plasma membranes possess alpha-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity.** *Biol Reprod.* 1990; 42: 843-858.
58. Goluboff ET, Mertz JR, Tres LL, Kierszenbaum AL. **Galactosyl receptor in human testis and sperm is antigenically related to the minor C-type (Ca(2+)-dependent) lectin variant of human and rat liver.** *Mol Reprod Dev.* 1995; 40: 460-466.
59. Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM. **Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization.** *Science.* 1995; 269: 83-86.
60. Moore HD, Hartman TD, Bye AP, Lutjen P, De Witt M, Trounson AO. **Monoclonal antibody against a sperm antigen Mr 95,000 inhibits attachment of human spermatozoa to the zona pellucida.** *J Reprod Immunol.* 1987; 11: 157-166.
61. Naz RK, Ahmad K, Kumar R. **Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function.** *J Cell Sci.* 1991; 99 ( Pt 1): 157-165.
62. Naz RK, Morte C, Garcia-Framis V, Kaplan P, Martinez P. **Characterization of a sperm-specific monoclonal antibody and isolation of 95-kilodalton fertilization antigen-2 from human sperm.** *Biol Reprod.* 1993; 49: 1236-1244.
63. Moore HDM, Clayton R, Barratt CLR, Hornby DP. **Induction of acrosome human reaction in human spermatozoa with recombinant human ZP3 is associated with 95 kDa epitope and is inhibited with a specific monoclonal antibody.** *J. Reprod. Fertil.* 1995; 15: 7-18.
64. Leyton L, LeGuen P, Bunch D, Saling PM. **Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 11692-11695.
65. Tomes CN, McMaster CR, Saling PM. **Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation.** *Mol Reprod Dev.* 1996; 43: 196-204.
66. Lucas H, Le Pendu J, Harb J, Moreau A, Bercegeay S, Barriere P. **Identification of spermatozoa L-selectin and two potential pellucida ligands.** *C R Acad Sci III.* 1995; 318: 795-801.
67. Naz RK. **Involvement of fertilization antigen (FA-1) in involuntary immunofertility in humans.** *J Clin Invest.* 1987; 80: 1375-1383.
68. Naz RK, Brazil C, Overstreet JW. **Effects of antibodies to sperm surface fertilization antigen-1 on human sperm-zona pellucida interaction.** *Fertil Steril.* 1992; 57: 1304-1310.
69. Naz RK, Ahmad K. **Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity, and involvement of FA-1.** *Mol Reprod Dev.* 1994; 39: 397-408.
70. Zara J, Naz RK. **The role of carbohydrates in mammalian sperm-egg interactions: how important are carbohydrate epitopes?** *Front Biosci.* 1998; 3: 1028-1038.
71. Boue F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R. **Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein.** *Biol Reprod.* 1994; 51: 577-587.

72. Rattanachaiyanont M, Weerachayanukul W, Leveille MC, Taylor T, D'Amours D, Rivers D, Leader A, Tanphaichitr N. **Anti-SLIP1-reactive proteins exist on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding.** *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 633-640.
73. Hunnicutt GR, Mahan K, Lathrop WF, Ramarao CS, Myles DG, Primakoff P. **Structural relationship of sperm soluble hyaluronidase to the sperm membrane protein PH-20.** *Biol Reprod.* 1996; 54: 1343-1349.
74. Chapman N, Kessopoulou E, Andrews P, Hornby D, Barratt CR. **The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro.** *Biochem J.* 1998; 330 ( Pt 2): 839-845.
75. Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, Aono T. **Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization.** *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 207-211.
76. Brandelli A, Miranda PV, Tezon JG. **Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase.** *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1220: 299-304.
77. Lucas H, Bercegeay S, Le Pendu J, Jean M, Mirallie S, Barriere P. **A fucose-containing epitope potentially involved in gamete interaction on the human zona pellucida.** *Hum Reprod.* 1994; 9: 1532-1538.
78. Tesarik J, Mendoza C. **Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency.** *Fertil Steril.* 1993; 60: 141-148.
79. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. **Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida.** *J Assist Reprod Genet.* 2000; 17: 156-161.
80. Liu DY, Baker HW. **A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction.** *Hum Reprod.* 1996; 11: 551-557.
81. Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. **Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa.** *Mol Hum Reprod.* 1996; 2: 583-589.
82. Liu DY, Lopata A, Johnston WI, Baker HW. **A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro.** *Fertil Steril.* 1988; 50: 782-788.
83. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Krugen TF, Rosenwaks Z, Hogen GD. **The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential.** *Fertil Steril.* 1988; 49: 688-697.
84. Oehninger S, Coddington CC, Scott R, Franken DA, Burkman LJ, Acosta AA, Hodgen GD. **Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome.** *Fertil Steril.* 1989; 51: 665-670.
85. Liu DY, Baker HW. **A new test for the assessment of sperm-zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization in vitro.** *Hum Reprod.* 1994; 9: 489-496.
86. Liu DY, Baker HW. **Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding.** *Fertil Steril.* 1996; 66: 312-315.
87. Liu de Y, Garrett C, Baker HW. **Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs.** *Fertil Steril.* 2004; 82: 1251-1263.
88. Liu DY, Clarke GN, Martic M, Garrett C, Baker HW. **Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding.** *Hum Reprod.* 2001; 16: 1185-1190.
89. Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. **Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization.** *Fertil Steril.* 2003; 79: 49-55.
90. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, van Rooyen LH. **Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF.** *Hum Reprod.* 2001; 16: 138-144.