



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES ESPERMÁTICOS
QUE SE UNEN A PROTEÍNAS RECOMBINANTES
DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
MYRNA GALICIA CHAVARRÍA**



MÉXICO, D.F.

2006



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.

Jurado asignado:

Presidente: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

Vocal: MA. ELENA IBARRA RUBIO

Secretario: MAYEL CHIRINOS ESPÍN

1er. Suplente: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

2º. Suplente: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

Sitio en donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN,
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".

ASESOR

Dra. MAYEL CHIRINOS ESPÍN

SUSTENTANTE

MYRNA GALICIA CHAVARRÍA



INCMNSZ

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la asesoría de la Dra. Mayel Chirinos Espín y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de proyecto 47011/A-1 y del Contraceptive Research and Development (CONRAD).

AGRADECIMIENTOS

A mis papás porque gracias a su cariño, apoyo y paciencia puedo concluir la meta más importante de mi vida.

A mis hermanos, sobrinos y familiares que siempre me han impulsado para seguir adelante sin detenerme.

A la Dra. Mayel Chirinos por el tiempo y la paciencia que tuvo durante mi formación científica y para la realización de este proyecto.

A Helen y todos los compañeros de laboratorio por su apoyo y entusiasmo para trabajar

Al Dr. Fernando Larrea por las facilidades otorgadas durante mi estancia en el laboratorio.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. FERTILIZACIÓN.....	9
1.1.1. Gameto femenino.....	9
1.1.1.1. <i>Ovogénesis y maduración del ovocito</i>	9
1.1.2. Gameto masculino.....	12
1.1.2.1. <i>Espermatogénesis y maduración del espermatozoide</i>	12
1.1.2.2. <i>Capacitación espermática</i>	14
1.1.2.3. <i>Reacción acrosomal</i>	15
1.2. INTERACCIÓN DE GAMETOS.....	17
1.3. ESTRUCTURA DE LA ZONA PELÚCIDA Y SU PAPEL DURANTE LA FERTILIZACIÓN.....	18
1.4. UNIÓN DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELÚCIDA: LIGANDOS Y RECEPTORES.....	19
2. OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. MATERIALES.....	23
3.2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA.....	24
3.2.1. Cultivo celular.....	24
3.2.2. Transfección celular.....	25
3.2.3. Expresión de las proteínas recombinantes.....	26
3.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	27
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	27
3.3.2. Western Blot.....	28
3.4. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	28

3.5. MUESTRAS DE SEMEN.....	29
3.5.1. Evaluación de la muestra.....	29
3.5.2. Capacitación espermática.....	30
3.5.2.1. <i>Inducción de la reacción acrosomal por ionóforo de calcio</i>	31
3.5.2.2. <i>Inhibición de la reacción acrosomal por toxina de Pertussis</i>	32
3.5.3. Ensayo de unión de espermatozoides capacitados a proteínas de la zona pelúcida humana.....	32
3.5.4. Detección de proteínas de la zona pelúcida humana unidas a espermatozoides mediante inmunofluorescencia.....	33
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA.....	35
4.2. EVALUACIÓN DEL SUERO ANTI-HSPZ.....	36
4.3. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	37
4.4. ANÁLISIS DE ESTADIOS DE LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	38
4.5. EVALUACIÓN DE REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDEOS PRE- TRATADOS CON TOXINA DE PERTUSSIS E IONÓFORO DE CALCIO.....	40
4.6. UNIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS PRE-TRATADOS CON TOXINA DE PERTUSSIS E IONÓFORO DE CALCIO A PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA Y EFECTOS SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	41
4.7. LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA UNIDAS A ESPERMATOZOIDEOS CAPACITADOS.....	43
5. DISCUSIÓN	46
6. CONCLUSIONES	51
7. REFERENCIAS	52
8. ANEXO	56

RESUMEN

En mamíferos, la fertilización es el proceso que involucra la unión de dos gametos, el ovocito y el espermatozoide, cuando éstos se encuentran dentro del oviducto femenino. Después de la eyaculación dentro del tracto reproductor femenino, los espermatozoides experimentan un proceso de maduración conocido como capacitación, el cual les permite llegar al ovocito ovulado. Para fecundarlo, los espermatozoides deben experimentar la reacción acrosomal que les permite atravesar la zona pelúcida, matriz extracelular del ovocito, y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. En vista de que la zona pelúcida constituye una barrera que limita el acceso del espermatozoide al ovocito, defectos en el mecanismo de reconocimiento y penetración de esta estructura podrían obstruir el proceso de fertilización. En los últimos años, los problemas para concebir hijos en parejas en edad reproductiva han aumentado considerablemente, razón por la que el estudio de la interacción espermatozoide-zona pelúcida ha tomado gran importancia. Sin embargo, existen muchas limitaciones para obtener zona pelúcida de mujeres para ser empleados en investigación. Con el propósito de comprender mejor esta etapa de la fertilización, el objetivo de este trabajo fue obtener proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 recombinantes, principales componentes de la zona pelúcida en humanos, para estudiar su capacidad de unión a espermatozoides vivos, y determinar la localización de los receptores espermáticos para las mismas. Para ello se utilizaron proteínas ZP expresadas en células de insecto, las cuales se incubaron con espermatozoides humanos capacitados, con o sin reacción acrosomal inducida, y se analizaron los patrones de unión mediante inmunofluorescencia. Las tres proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana obtenidas mostraron actividad biológica al unirse a espermatozoides humanos, preferentemente con morfología normal. Además, tanto ZP3 como ZP4 fueron capaces de inducir la reacción acrosomal de los espermatozoides por un mecanismo mediado por proteínas G_i . Los análisis de inmunofluorescencia indican que los receptores espermáticos para las rhZP's muestran un patrón de localización subcelular característico para cada proteína y diferente según el estatus del acrosoma, sugiriendo que el proceso dinámico de la reacción acrosomal involucra

la redistribución de los receptores para la zona pelúcida en la superficie del espermatozoide. Los resultados de este estudio ayudan a comprender los complejos mecanismos ocurridos durante la fertilización en humanos, abriendo la posibilidad de nuevos abordajes en el desarrollo de metodología anticonceptiva así como diagnóstica para ciertos tipos de infertilidad masculina.

ABREVIATURAS

Abreviatura

Significado

AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrin virus
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BSA	Albúmina sérica bovina
CaI	Ionóforo de calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementario
cél	Células
CO ₂	Dióxido de carbono
CHO	Chinese hamster ovary
COS	African green monkey kidney cells
Ctrol	Control
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FF	Fluido folicular
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada con isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
g α rIgG-Cy3	Gota anti rabbit IgG acoplado a Cy3
HEPES	Ácido N-[hidroxietil]piperazino-N-N'-[2-etanosulfónico]
HSA	Albúmina sérica humana
HTF	Human Tubal Fluid
KDa	Kilodaltones
M	Molar
mM	Milimolar
Morfo	Morfología
N	Tamaño de la muestra
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos.
OMS	Organización Mundial de la Salud
P1	Pasaje 1
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PKC	Proteína Cinasa C
PVDF	Polivinildifluorido
RA	Reacción acrosomal
rhZP's	Proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBST	Solución amortiguadora de tris salina con Tween 20
TEMED	N,N,N,N-tetrametilendiamina

Abreviatura**Significado**

Trat.	Tratamiento
TxP	Toxina de Pertussis
ZP	Zona pelúcida
α -hSpm	Suero anti-human sperm membrane
α -HSPZ	Suero anti-Heat Solubilized Pig Zona
μ M	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FERTILIZACIÓN

Los seres vivos se reproducen para dar lugar a nuevos descendientes y con ello perpetuar la especie en el tiempo. Cuando la reproducción es de tipo sexual, es necesaria la unión de dos células especializadas y distintas llamadas gameto masculino (espermatozoide) y gameto femenino (ovocito). La fertilización en humanos consiste en al menos tres etapas fundamentales que son el reconocimiento del ovocito por el espermatozoide, la penetración de la zona pelúcida y finalmente la fusión de los gametos que han completado su maduración [1].

1.1.1. Gameto femenino

Los ovarios son los órganos sexuales femeninos primarios, los cuales cumplen una doble función, la producción del ovocito y la secreción de hormonas tales como la progesterona y el estradiol. Los ovarios de humanos tienen la forma y el tamaño de una almendra, y su superficie exterior es lisa en la niña, presenta cicatrices en la mujer adulta (consecuencia de la ovulación) y es rugosa en la anciana [2].

1.1.1.1 Ovogénesis y maduración del ovocito

Los folículos primordiales aparecen en los ovarios al tercer mes de desarrollo fetal y con ellos se inicia el desarrollo folicular. El folículo primordial está rodeado por una única capa de células foliculares planas (*Fig. 1A*). Conforme el folículo primordial aumenta su tamaño, luego del nacimiento, las células foliculares planas que lo rodean proliferan y se tornan cúbicas dando origen al folículo primario (*Fig. 1B*). Cuando el folículo primario crece, entre éste y las células foliculares se deposita una capa de glicoproteínas que son secretadas por el ovocito y las células de la granulosa y que forman una matriz extracelular denominada zona pelúcida (*Fig. 1C*). Al llegar la pubertad, se produce una rápida proliferación mitótica de

células foliculares que dan origen a un epitelio estratificado, que rodea al ovocito. Las células foliculares se identifican entonces como células de la granulosa. A medida que las células de la granulosa proliferan, las células del estroma que rodean al folículo forman la teca folicular. Cuando la capa granulosa alcanza un espesor de 6-12 capas celulares, aparecen cavidades llenas de líquido folicular entre las células de la granulosa a medida que se acumula este líquido rico en ácido hialurónico, las cavidades empiezan a unirse hasta formar una cavidad semilunar denominada antro folicular; en esta etapa el folículo se denomina folículo secundario o antral (*Fig. 1D*).

A medida que aumenta el tamaño del folículo secundario, aumenta también el antro folicular que está revestido por varias capas de células de la granulosa. Las células de la granulosa forman el cúmulo oóforo que rodea al ovocito y permanece unido a este durante la ovulación formando la corona radiada. A medida que el folículo crece se observa que la capa de células de la granulosa se hace más delgada conforme aumenta el antro. Las células del cúmulo que rodean al ovocito forman entonces la única capa celular de la corona radiada. La teca folicular se divide en teca interna y teca externa. En este momento el folículo se denomina folículo maduro o de Graaf (*Fig. 1E*).

Paralelamente al desarrollo folicular, en el ovocito progresa la meiosis para dar origen al gameto femenino (célula haploide).

Los ovocitos primarios dentro de los folículos primordiales comienzan la primera división meiótica durante la etapa fetal, y el proceso se detiene en el estadio de diploteno de la profase meiótica en el folículo primario. La profase de la primera división meiótica se reinicia justo antes de la ovulación. Una vez finalizada la primera división meiótica en el folículo maduro, cada célula hija del ovocito primario recibe una fracción equivalente de la cromatina, pero una célula hija recibe la mayor parte del citoplasma y se transforma en el ovocito secundario mientras que la otra célula hija queda con una mínima cantidad de citoplasma y da origen al primer cuerpo polar que se ubica entre la zona pelúcida y la membrana del ovocito secundario. A medida que el ovocito secundario rodeado por las células de la corona radiada abandona el folículo durante la ovulación, progresa la segunda división meiótica deteniéndose en metafase, y la meiosis se completa sólo si el

ovocito secundario es penetrado por un espermatozoide, dando origen a un ovocito maduro con el pronúcleo y el segundo cuerpo polar. Si no ocurre la fertilización, el ovocito degenera en aproximadamente 24 horas después de la ovulación [3].

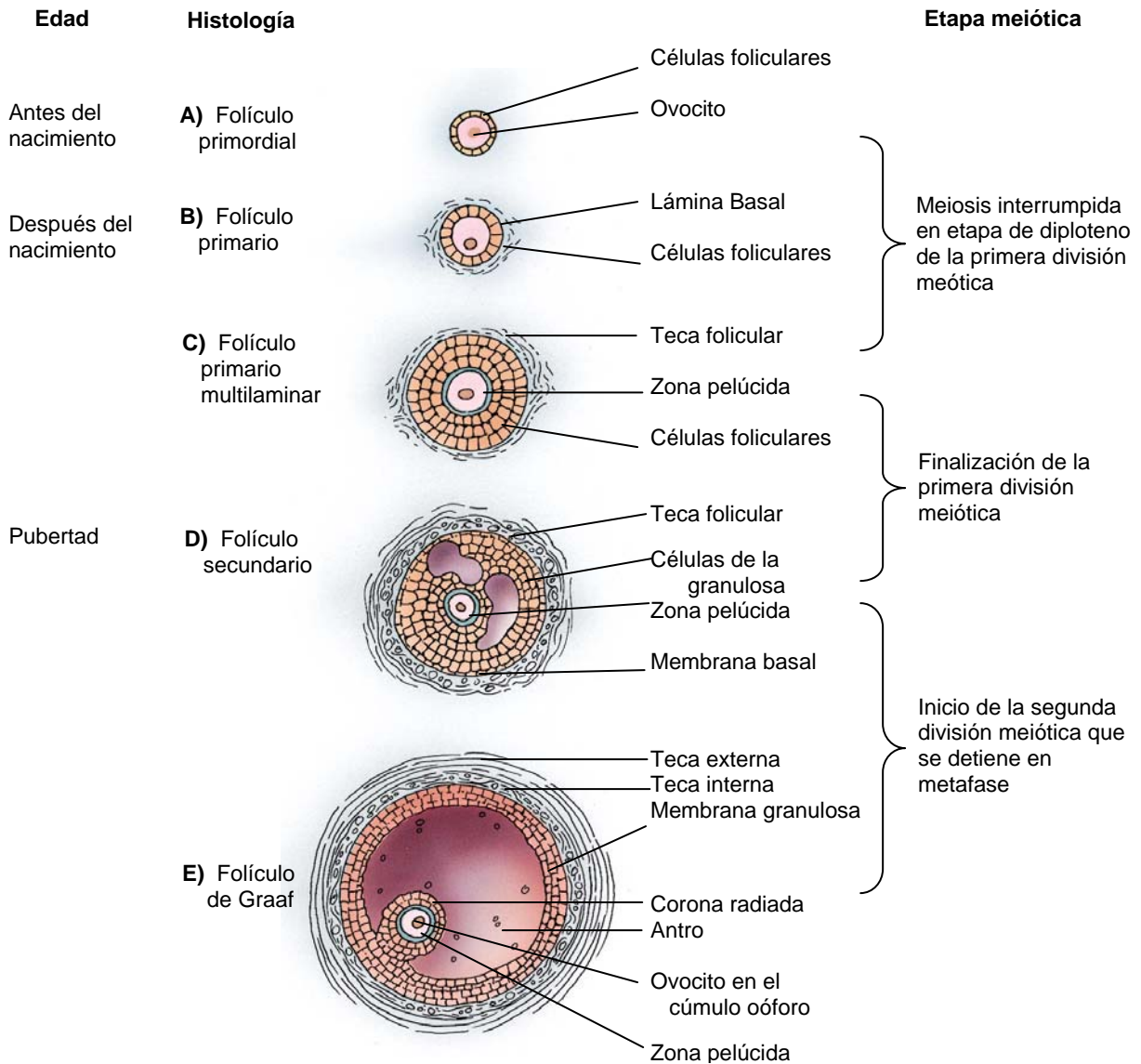


Figura 1. Esquema de la maduración del ovocito humano. Imagen extraída del libro Histología Texto y Atlas a color [3].

1.1.2. Gameto masculino

Por su parte, los testículos también realizan una doble función: la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas esteroideas como la testosterona. Un líquido de suspensión secretado por los testículos y otros segmentos de las vías espermáticas constituye el medio esencial para el transporte, el mantenimiento y la ulterior maduración de los espermatozoides [2].

1.1.2.1. Espermatogénesis y maduración del espermatozoide

La espermatogénesis comprende los fenómenos mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides, proceso que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos después de la pubertad y durante toda la vida del hombre.

La espermatogénesis puede dividirse en tres etapas: la producción de células germinales (gametos), la diferenciación funcional para la fertilización (meiosis) y la diferenciación estructural de los espermatozoides (espermiogénesis).

Durante la fase temprana de la espermatogénesis, en la etapa embrionaria del individuo, las células germinales primordiales presentes en los testículos migran a los túbulos seminíferos y dan origen a las espermatogonias (*Fig. 2A*). Luego, las espermatogonias migran hacia el centro de las células de Sertoli y quedan alojadas en las protuberancias citoplasmáticas envolventes de las mismas. En esta etapa las espermatogonias se dividen por mitosis (*Fig. 2B*) y permanecen inactivas hasta que inicia la vida sexual del hombre.

Cuando el hombre alcanza la madurez en la pubertad, cada espermatogonia que ha penetrado la capa de células de Sertoli se modifica aumentando de tamaño para formar un espermatocito primario (*Fig. 2C*), que a su vez se divide mediante meiosis (Meiosis I) para formar dos espermatocitos secundarios (*Fig. 2D*). A continuación, los espermatocitos secundarios inician una segunda división meiótica (Meiosis II) que da origen a 4 espermátides haploides (*Fig. 2E*). Una vez terminada la segunda división meiótica, cada espermátide entra en un proceso de espermiogénesis (*Fig. 2F*) para dar origen al espermatozoide (*Fig. 2G*). Los

cambios que experimentan las espermátides son: 1) formación del acrosoma que es una vesícula de exocitosis situada en la parte anterior de la cabeza; 2) reorganización de la cromatina del núcleo para formar una cabeza compacta; 3) formación del flagelo y 4) pérdida de la mayor parte de su citoplasma.

Durante este proceso, el aparato de Golgi se transforma en un cuerpo residual y una vesícula acrosómica que más tarde dará lugar al acrosoma. En el polo opuesto de la célula se sitúan los dos centriolos, uno de ellos participa en la formación del axonema flagelar, que formará el flagelo y alrededor del cual en su posición media, se colocan las mitocondrias constituyendo la zona media espiral, fuente de la energía que se requiere para la función flagelar el segundo centriolo se fija entre el núcleo y el axonema [4]. Conforme el exceso de citoplasma se libera, el sincicio que une a los espermatozoides se altera y los espermatozoides individuales se liberan de la masa celular grande. Los remanentes citoplasmáticos son fagocitados por células de Sertoli [5].

Una vez que la diferenciación es completada, el espermatozoide es liberado al lumen del túbulo seminífero, desde donde son empujados hacia el epidídimo. Allí, los espermatozoides desarrollan la capacidad de moverse, a nivel membrana plasmática, ésta sufre cambios en la distribución de proteínas y en los niveles de glicosilación de dichas proteínas los cuales van a estabilizar a las células espermáticas permitiendo formar un reservorio de las mismas hasta su liberación durante la eyaculación además se incorporan proteínas denominadas factores descapacitantes los cuales evitan que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal durante su estancia y paso por el tracto reproductor masculino. En el fluido seminal el espermatozoide es una célula móvil, capaz de transportar su complemento cromosómico haploide hasta el ovocito [6, 7]. Sin embargo, aún no está listo para fertilizar, y su maduración se completa gracias a modificaciones que sufre posteriormente durante su estancia a lo largo del tracto reproductor femenino.

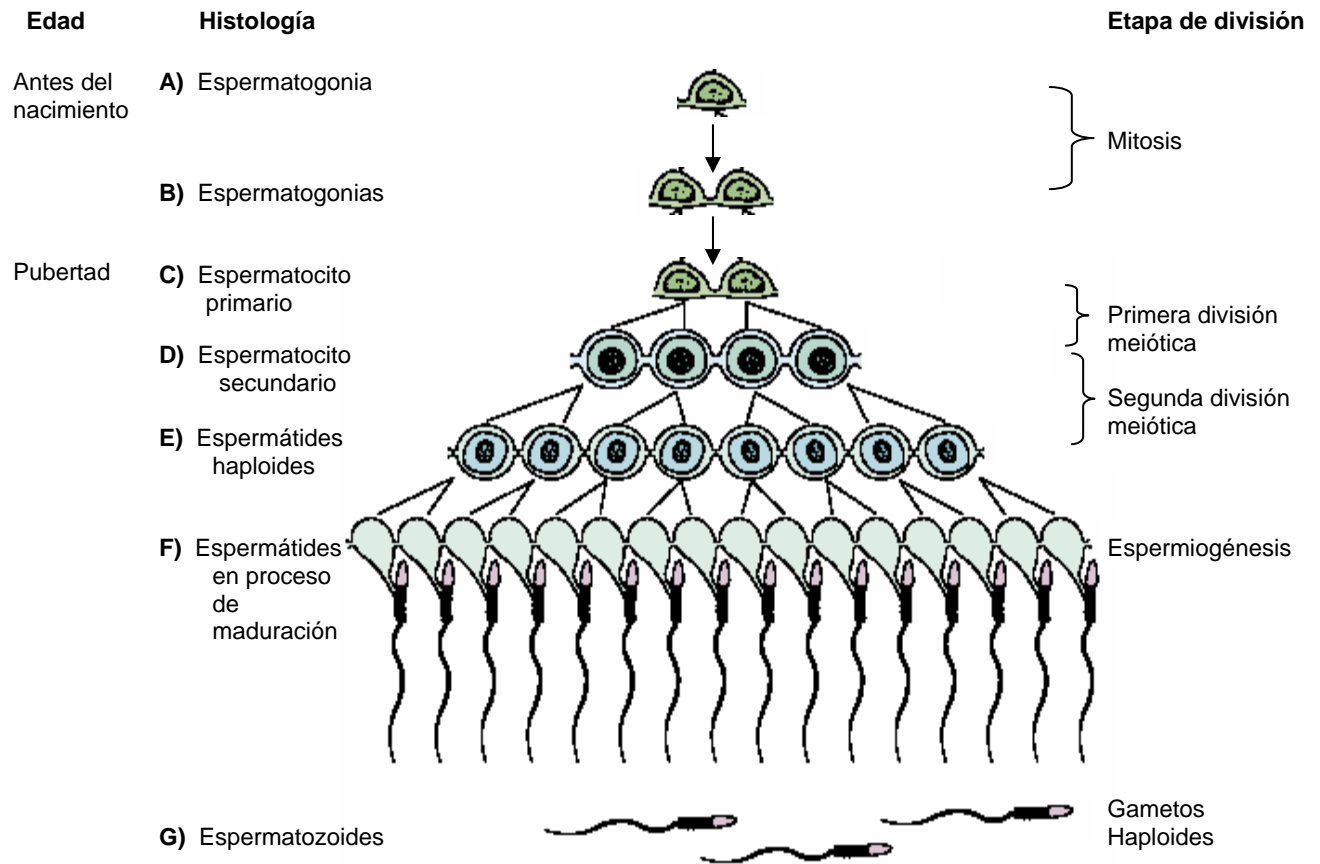


Figura 2. Esquema de maduración de espermatozoides humanos. Imagen extraída del libro Histología Texto y Atlas a color [7].

1.1.2.2. Capacitación espermática

La capacitación es definida como la serie de transformaciones que sufre el espermatozoide durante su migración a través del tracto genital femenino hasta alcanzar la zona pelúcida, atravesarla y fertilizar el ovocito [8]. Los cambios que desencadena el espermatozoide incluyen la remoción de proteínas de la superficie del espermatozoide adsorbidas del plasma seminal y la reorganización de las moléculas de la superficie del espermatozoide [9]. Estos cambios permiten al espermatozoide adquirir su capacidad fertilizante, manifestada por cambios en el patrón de movilidad, exposición de receptores en la superficie que participan en la

quimiotaxis y modificaciones en la membrana que los prepara para la reacción acrosomal.

En humanos, el eyaculado de espermatozoides (semen) se deposita en la vagina y los espermatozoides deben primero atravesar el moco cervical, en el cual pierden algunos elementos adsorbidos en su superficie. El moco cervical induce la capacitación espermática [10], pero no la reacción acrosomal (liberación del contenido acrosomal) [11, 12], por lo que preserva esta función espermática para una etapa posterior del proceso de fertilización. El fluido del oviducto puede servir como sitio de pre-acondicionamiento de los espermatozoides, permitiendo la consistencia de motilidad y progresión de la capacitación, pero retrasando la inducción de la reacción acrosomal hasta un tiempo apropiado [8].

Pequeñas moléculas, tales como la progesterona y lípidos, presentes en el fluido oviductal pueden afectar al espermatozoide. La progesterona puede estimular la capacitación espermática mediante la inducción de la entrada de calcio [13, 14], aunque es posible que el colesterol presente en el oviducto prevenga la capacitación prematura mediante la estabilización de la membrana espermática [8, 15].

Los patrones de movilidad espermática observados antes de la capacitación se ven modificados por la presencia de una movilidad diferente después de la capacitación llamada hiperactivación espermática que consiste en el incremento en la velocidad del movimiento, acompañado de decremento en la linealidad, aumento en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y movimientos del flagelo tipo latigazo [8]. La hiperactivación debe favorecer los eventos asociados a la fertilización y en todo caso, todos los cambios ocurridos durante la capacitación permiten al espermatozoide alcanzar el complejo cúmulo-ovocito y lo prepara para la fusión de gametos.

1.1.2.3. Reacción acrosomal

Una vez completada la capacitación, el espermatozoide está listo para experimentar la exocitosis acrosomal [16], la cual se inicia cuando el espermatozoide interactúa con la zona pelúcida (ZP). Este fenómeno, también

conocido como reacción acrosomal (RA). El acrosoma es un organelo secretor situado en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, entre el núcleo y la membrana plasmática. El contenido acrosomal consta principalmente de hialuronidasa y acrosina, enzimas que facilitan el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

Los espermatozoides en las últimas etapas de la capacitación han perdido todas las moléculas descapacitantes que tenían en la membrana plasmática y por lo tanto son susceptibles a desencadenar reacción acrosomal prematuramente y de forma espontánea, fenómeno que no se puede inhibir porque no está mediado por receptores [17]. La reacción acrosomal espontánea se produce naturalmente durante el proceso de capacitación en una porción de la población de espermatozoides del eyaculado.

En la figura 3 se muestra esquemáticamente el proceso de la reacción acrosomal. Cuando el espermatozoide tiene el acrosoma intacto (*Fig. 3A*), los receptores primarios del espermatozoide se localizan sobre la membrana plasmática, una vez que el espermatozoide se ha unido a la ZP, la integridad del acrosoma se altera por el aumento en la concentración de calcio intracelular, la bomba de sodio/potasio se inhibe y como consecuencia aumenta la concentración de iones sodio, hecho que causa la salida de iones H^+ , produciendo el aumento del pH intracelular [18, 16]. Lo cual provoca la fusión de las membranas plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa y como consecuencia la liberación del contenido acrosomal (*Fig. 3B*). Una vez que el contenido acrosomal se ha liberado completamente, queda expuesta la membrana acrosomal interna en la cual se ubican los receptores secundarios del espermatozoide (*Fig. 3C*).

Los espermatozoides que tienen la capacidad de desencadenar exocitosis acrosomal pueden ser inducidos a ello no sólo por la zona pelúcida, sino también por otros agentes tales como la progesterona, [19, 20, 21] o el fluido folicular (FF) [22] que son de origen natural, y por otro tipo de agentes de origen farmacológico tales como el ionóforo de calcio A-23187 [23], análogos de AMPc [24], o estimuladores de la PKC [25], si bien los mecanismos empleados para inducir la reacción acrosomal en cada caso son diferentes a los empleados por la ZP. Por otra parte, existe evidencia de que la progesterona podría preparar a los espermatozoides para la reacción

acrosomal, ya que cuando se incuban con progesterona seguido de ZP, los efectos sobre la RA son superiores a cuando sólo se incubaba con la ZP [26].

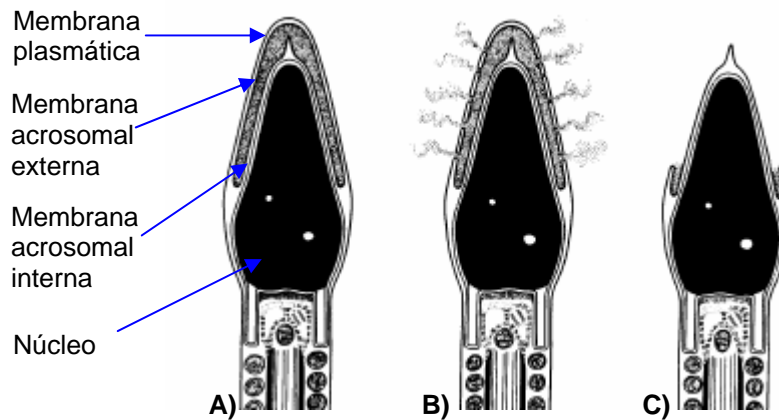


Fig. 3 Esquema de la reacción acrosomal. A) Espermatozoide intacto. B) Fusión de la membrana plasmática y la membrana externa acrosomal permitiendo la liberación del contenido acrosomal. C) Espermatozoide con acrosoma reaccionado. Figura extraída del libro *Histología Texto y Atlas a color* [7].

1.2. INTERACCIÓN DE GAMETOS

Cuando el espermatozoide y el ovocito se encuentran en el oviducto se desencadena una serie de eventos para lograr la fusión de gametos y dar origen a un nuevo individuo.

Para llegar hasta el ovocito, los espermatozoides capacitados deben penetrar el cúmulo oóforo y alcanzar la zona pelúcida. Como consecuencia de esta unión, el espermatozoide inicia la excitosis acrosomal que permite atravesar la zona pelúcida y alcanzar el espacio perivitelino situado entre la ZP y la membrana plasmática. Una vez que el espermatozoide llega a este sitio se une a la membrana plasmática del ovocito y se fusiona con ella dando lugar a una célula activada llamada cigoto [27].

Cuando el espermatozoide se fusiona con el ovocito, se activan dos mecanismos de bloqueo de la entrada de nuevos espermatozoides (polispermia). El primero ocurre cuando entra el espermatozoide, lo que induce una despolarización transitoria en la membrana del ovocito que impide la entrada de espermatozoides secundarios [9, 28,

29]. El segundo bloqueo es permanente y consiste en que los gránulos corticales ubicados por debajo de la membrana plasmática se fusionan con la misma liberando su contenido enzimático hacia el espacio perivitelino el cual modifica la estructura de la zona pelúcida para impedir la entrada de espermatozoides adicionales [30], proceso conocido como reacción de zona.

1.3. ESTRUCTURA DE LA ZONA PELÚCIDA Y SU PAPEL DURANTE LA FERTILIZACIÓN

La zona pelúcida (ZP) es la matriz extracelular que rodea el ovocito de mamíferos y está compuesta por glicoproteínas sulfatadas formadas durante la ovogénesis, las cuales son depositadas entre el ovocito y las células de la granulosa desde estadios tempranos del desarrollo folicular [31].

Las funciones de la zona pelúcida son proveer de sitios para el reconocimiento especie-específica del espermatozoide, inducir la reacción acrosomal, bloquear la polispermia mediante cambios estructurales y proteger al ovocito hasta la implantación.

El modelo más utilizado para estudios de estructura y función de la ZP es el de ratón [32]. Se ha determinado que la ZP de ratón está compuesta por tres glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, y ZP3, de acuerdo a sus pesos moleculares al ser separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) [33], donde ZP1 es la proteína más pesada y ZP3 la de menor peso. Estas proteínas también se conocen como ZPB, ZPA y ZPC respectivamente, en base al tamaño de la secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) que codifica para cada proteína [34], donde ZPA corresponde al cDNA más largo y ZPC al más corto. El uso de ambas nomenclaturas ha sido arbitrario y algunas veces ha causado confusión, lo que ha derivado en que ninguna se haya empleado de forma universal, si bien la más utilizada ha sido la de ZP1, ZP2 y ZP3. Por otra parte, se ha determinado que la ZP de ratón se forma por unidades repetidas de heterodímeros de ZP2-ZP3 arreglados en filamentos, que a su vez se unen por dímeros de ZP1 [35].

Gracias a la clonación de genes de la ZP en numerosas especies y al estudio de sus homologías, se ha observado que no en todas las especies la zona pelúcida está codificada por tres proteínas, ya que se ha observado la presencia de cuatro genes para ZP en humano [36], pollo [37] y rata [38]. A raíz de esto, el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) decidió nombrar las proteínas de la ZP humana como ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de acuerdo a sus homologías con ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón [39], donde la ZP1 humana se expresa en muy baja cantidad y la ZP4 no tiene equivalente en ratón [36], razón por la que un modelo alternativo debe postularse para la estructura de la ZP de humano, ya que la del ratón no parece ajustarse a las evidencias obtenidas. Los pesos moleculares que se han descrito para las proteínas nativas de la zona pelúcida son, según su movilidad en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), 70-100 kDa para ZP2, 53-65 kDa para ZP3 y 60-65 kDa para ZP4 [40, 41, 42], donde los rangos se deben a que las proteínas están altamente glicosiladas. Por su parte, la ZP1 humana aún no se caracteriza mediante esta técnica.

1.4. UNIÓN DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELÚCIDA: LIGANDOS Y RECEPTORES

En ratón se ha determinado que la proteína ZP3 del ovocito participa en la unión primaria del espermatozoide, ya que es capaz de unirse al espermatozoide con acrosoma intacto e inducir la reacción acrosomal [43, 44]. Por su parte, la proteína ZP2 actúa como receptor secundario y mantiene la unión del espermatozoide con acrosoma reaccionado a la zona pelúcida durante la penetración [45]. Por último, la proteína ZP1 posee funciones de conservación de la estructura de la matriz sirviendo como enlace entre los filamentos formados por ZP2 y ZP3 [46].

En cambio, en el modelo de porcino, la ZP4 juega un papel importante en la interacción de gametos, ya que heterocomplejos de ZP4-ZP3 se unen con alta afinidad espermatozoides capacitados, pero no se ha observado unión a subunidades de las glicoproteínas libres [47]. En el modelo de conejo, tanto ZP4

como ZP3 se unen a la proteína espermática recombinante Sp17 cuando es expresada en células COS [48].

Otros estudios realizados en primates, utilizando proteínas recombinantes de la zona pelúcida del mono bonete expresadas en *E. coli*, sugieren que ZP3 es el receptor primario, ya que sólo se une a la región anterior de la cabeza de espermatozoides con acrosoma intacto [49]. Por su parte ZP1 se une al segmento principal del acrosoma de espermatozoides capacitados y después de sufrir la exocitosis acrosomal la proteína se localiza en el segmento ecuatorial, la región post-acrosomal y la pieza media. Por último, ZP2 se une al segmento principal del acrosoma de espermatozoides capacitados, pero la unión cambia al segmento ecuatorial, la membrana interna acrosomal y pieza media después de la exocitosis acrosomal [50].

En humano, para poder evaluar la actividad como ligando de cada una de las glicoproteínas que constituyen la zona pelúcida se ha optado por utilizar proteínas recombinantes expresadas en diferentes sistemas de expresión, ya que existen grandes dificultades para obtener la ZP nativa para investigación. De este modo se ha observado que la proteína ZP3 expresada en células CHO (*chinese hamster ovary*) induce reacción acrosomal [51]. Sin embargo, la ZP3 recombinante expresada en *E. coli*, donde no sufre cambios pos-traduccionales, la proteína no es capaz de inducir reacción acrosomal [52], por lo que se puede concluir que para que se lleve a cabo la reacción acrosomal mediada por ZP3 es necesario que la proteína de la zona pelúcida esté glicosilada. Además, se ha observado que la reacción acrosomal inducida de ZP3 expresada en células CHO involucra la participación de proteínas Gi, que a su vez activan la cascada de segundos mensajeros que dan como resultado la liberación del contenido acrosomal [53].

Actualmente la producción y caracterización de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana y la capacitación de espermatozoides humanos fuera del tracto genital femenino están siendo de gran ayuda para conocer y entender el proceso de fertilización en humanos, además de contribuir en gran parte al éxito de las técnicas de fertilización asistida a la cual recurren parejas en edad reproductiva que presentan problemas para concebir hijos.

Con el objeto de entender mejor el proceso de fertilización en humanos, en este trabajo se produjeron las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 recombinantes de la zona pelúcida humana para usarlas como herramientas para la caracterización de los receptores espermáticos que se unen a la ZP y su distribución en el espermatozoide. Cabe mencionar que como la existencia de la proteína ZP1 en humanos se descubrió recientemente [36], aún no se expresa en el sistema del baculovirus ni en ningún otro sistema. El estudio de esta proteína y su probable participación durante la fertilización deberá ser valorada en un futuro, aunque su abundancia sea muy baja y por su alta homología con la ZP1 de ratón podría desempeñar sólo funciones estructurales.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la capacidad de unión de espermatozoides humanos capacitados a proteínas recombinantes de la zona pelúcida purificadas y caracterizar la distribución subcelular de los receptores correspondientes en espermatozoides con acrosoma intacto y reaccionado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtener las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 de la zona pelúcida humana.
- Purificar las proteínas recombinantes obtenidas mediante cromatografía de afinidad.
- Realizar ensayos de unión de espermatozoides humanos a las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana.
- Analizar los patrones de unión de cada una de las proteínas recombinantes a los espermatozoides mediante inmunofluorescencia indirecta y correlacionarlos con el estatus acrosomal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

El Dr. Jurrien Dean del National Institutes of Health de Estados Unidos de América, donó los cDNAs que codifican para las proteínas ZP2 y ZP3 de la zona pelúcida humana a la Dra. Cecilia Cariño quién obtuvo el cDNA que codifica para la proteína ZP4 de la zona pelúcida humana, el anticuerpo contra la zona pelúcida de cerdo (α -HSPZ) y el anticuerpo contra espermatozoides humanos (α -hSpm). La Dra. Mary Estes del departamento de Virología Molecular del Baylor College of Medicine (Houston, TX) donó la línea celular Sf9. El kit de transfección BaculoGold, el vector de transfección pAChLT, el medio TNM-FH, la agarosa Agarplaque Plus y la solución de imidazol 3M se adquirieron de PharMingen (San Diego, CA). La membrana de polivinildifluorido (PVDF) se adquirió de Poly Screen (Boston, MA). El marcador de peso molecular y la proteína A se adquirieron de Amersham Biosciences (Alemania). Las placas radiográficas X-OMAT se obtuvieron de Kodak AR Film (México). Los reactivos el rojo neutro, el azul de Coomassie, el Tween 20, la Poli-L-Lisina, el peróxido de hidrógeno al 30%, el azul de Tripán al 0.4%, la solución de Folin 2N, el ionóforo de calcio A-23187, el dimetil sulfóxido (DMSO), la albúmina sérica bovina (BSA), la albúmina sérica humana (HSA), el clorhidrato de guanidina, el dodecil sulfato de sodio (SDS), el 2-mercaptoetanol, el piruvato de sodio, la urea y la aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La azida de sodio se obtuvo de Fischer Scientific Company (New Jersey, NJ). El ácido clorhídrico, el cloruro de sodio, el citrato de sodio dihidratado, el carbonato de sodio anhidro, el fosfato de sodio monobásico, el fosfato de sodio dibásico, el bicarbonato de sodio, el alcohol etílico absoluto y el glicerol se adquirieron de J. T. Baker (México). El azul de bromofenol, el persulfato de amonio, la bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida se adquirieron de BioRad (Hercules, CA). La resina Entellan, el ácido cítrico monohidratado y el gluteraldehído 25%, se adquirieron de Merck (Alemania). El plumón mini-PAP Pen y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en cabra acoplado a Cy3 (α rIgG-Cy3) se adquirieron de Zymed (San Francisco, CA).

El metanol se adquirió de Fermont (México). La solución de N,N,N,N-tetrametilendiamina (TEMED) se adquirió de Gibco-BRL (New York, NY). La glicina y la acrilamida fueron adquiridos de ICN Biomedicals (Aurora, OH). La resina níquel agarosa (NiNTA) se adquirió de Invitrogen (Alemania). Los medios Human Tubal Fluid (HTF), Test Yolk Buffer, Sperm Washing Medium y el gradiente Isolate se adquirieron de Irvine Scientific (Santa Ana, CA). La leche descremada en polvo Svelty se adquirió de Nestlé (México). El ácido acético glacial se adquirió de Productos Monterrey (México). El tris base grado biología molecular se adquirió de Promega (Madison, WI). La resina VectaShield se adquirió de Vector Laboratories, INC (Burlingame, CA).

3.2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA

Los vectores de expresión para las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas formaron parte del trabajo experimental realizado por la Dra. Cecilia Cariño para obtener el título de doctorado en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los cDNAs que codifican para ZP2 (2266 pb), ZP3 (1299 pb) y ZP4 (1722 pb), introducidos en el vector de expresión pAChLT, se emplearon para la cotransfección con el virus linearizado tipo silvestre *Autographa californica* (AcNPV) en la línea celular Sf9.

3.2.1. Cultivo Celular

La línea celular Sf9 proviene de tejido ovárico en estado larvario de la mariposa *Spodoptera frugiperda*. El cultivo celular de las células Sf9 se llevó a cabo en medio TNM-FH con 10% de suero fetal a 27°C. Se utilizaron dos tipos de cultivo, en monocapa y en suspensión. El cultivo celular para la cotransfección, la infección viral y el aislamiento del virus recombinante se realizó de acuerdo a lo descrito por Summers y Smith [54] y Prasad y colaboradores [55].

El cultivo en monocapa se realizó para mantener las células vivas, resembrando células a partir de frascos de 75 cm² que tenían 90% de confluencia, procediendo de la siguiente manera: se descarta el medio viejo de un frasco y se adicionan 15 mL de medio fresco (a 27 °C) y con ayuda de una pipeta estéril y un pipetor se despegan las células del frasco por acción mecánica; de esta suspensión de células se depositan 2 mL en dos frascos nuevos estériles que contienen 13 mL de medio fresco cada uno. Los frascos se incuban a 27 °C hasta tener confluencia de 80-90% (aproximadamente 7 días) y se repite la siembra.

El cultivo en suspensión se usó para las infecciones virales y aislamiento del virus recombinante. Para ello se utilizaron biorreactores estériles de 250 mL, en los cuales 100 mL de medio fresco se inoculan con 1x10⁶ cel/mL. Se incubaron a 27 °C con una agitación de 60 rpm y cuando se alcanzaba una densidad de 2x10⁶ cel/mL se retiraba el 80% de la suspensión y se reemplazaban por medio fresco. De la suspensión extraída se recuperaban las células mediante centrifugación a 1500 rpm durante 15 min.

3.2.2. Transfección celular

Los vectores conteniendo los cDNAs para ZP2, ZP3 y ZP4 se usaron para cotransfectar células Sf9 de insecto con el virus *Autographa californica* (AcNPV), donde se produce una recombinación homóloga que da origen a virus recombinantes que pueden ser usados para infectar más células que producirán la proteína de interés. Para ello, se usó el kit de transfección BaculoGold el cual se basa en el método de precipitación de DNA con fosfato de calcio, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se prepararon placas de 6 pozos de 60 mm de diámetro con 2x10⁶ cel/pozo para proceder a la transfección, con sus respectivos controles, y se les agregó 1 mL de solución de transfección A (medio Grace). En tubos de microcentrífuga se mezclaron 0.5 µg de DNA viral (AcNPV) del kit BaculoGold con 2 µg de vector de transferencia que contiene el DNA de la proteína de interés. Se incubaron durante 5 min y se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de transfección B (HEPES 25 mM pH 7.1, cloruro de calcio 125 mM, cloruro de sodio 140 mM). A continuación, se adicionó la mezcla BaculoGold/vector

a las células gota a gota agitando suavemente, y se dejó incubar la placa durante 4 h a 27 °C. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se adicionaron 3 mL de medio TNM-FH. La placa se incubó durante 5 días a 27 °C, después de lo cual se recuperó el sobrenadante para realizar los ensayos de placa.

3.2.3. Expresión de las proteínas recombinantes

Para evaluar la expresión de las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 en las células Sf9, se utilizó el sobrenadante de la transfección de las células para hacer ensayos de placa. Se prepararon placas de cultivo de 6 pozos con medio TNM-FH con 1.5×10^6 cel/pozo, se adicionaron diluciones desde 10^{-3} hasta 10^{-14} del sobrenadante de la transfección y se incubaron durante 1 h a 27 °C. Después, las células se cubrieron con agarosa 1.5% (Agarplaque plus) y las placas se incubaron durante 6 días a 27 °C, después de los cuales se adicionó una solución al 2% de rojo neutro para poder identificar las colonias infectadas (placas de lisis). Las placas de lisis se picaron con ayuda de la punta de una micropipeta y se pusieron en tubos de microcentrífuga a los que les adicionó 1 mL de medio TNM-FH. Posteriormente se incubaron durante toda la noche para recuperar el virus por difusión del gel al medio y poder proceder a la amplificación del título del virus. Para ello, se incubaron 3×10^6 células con el medio que se obtuvo de la difusión en frascos de cultivo de 25 cm² durante 1 h a temperatura ambiente. Después se centrifugaron las células para retirar el virus, se resuspendieron con 5 mL de medio fresco y se cultivaron durante 4 días a 27 °C. Una vez transcurrido este tiempo se cosecharon las células infectadas. Los sedimentos de células se guardaron en congelación (-70 °C) para ser analizados mediante SDS-PAGE y Western Blot y los sobrenadantes de la infección con virus recombinantes se guardaron a 4 °C, etiquetados como pasaje 1 (P1) para utilizarlos en posteriores infecciones.

Las infecciones a gran escala se llevaron a cabo incubando 1×10^8 células con 20 mL del virus recombinante (P1) incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, la suspensión celular se transfirió a un biorreactor y se llevó a 100 mL con medio TNM-FH. El biorreactor se incubó durante 4-5 días a 27 °C con agitación de 60 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota

de la suspensión para analizarla mediante SDS-PAGE y el resto de la suspensión se centrifugó durante 15 min a 1500 rpm. El sobrenadante se guardó a 4 °C como pasaje 2 (P2) y el sedimento celular se lavó dos veces con PBS y se guardó a -70 °C para su uso en la obtención de las proteínas recombinantes expresadas.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para verificar la presencia de las proteínas recombinantes en las células Sf9 se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli, [56]. Los sedimentos celulares que se obtuvieron al cosechar las infecciones con virus recombinantes se resuspendieron en solución amortiguadora de muestra 1X [2% SDS, Tris 0.0625 M, 10% Glicerol, 1% β -mercaptoetanol, 0.001% azul de bromofenol, pH 6.8]. Las muestras se depositaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y se corrió a 100 V durante 2 h en solución amortiguadora de corrida [Tris base 0.025 M, glicina 0.192 M, 0.1% SDS, pH 8.3]. Paralelamente, se corrió un marcador de peso molecular con el objeto de conocer los pesos moleculares aparentes de las bandas de proteína observadas para cada muestra. Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de [0.2% Azul de Coomassie, 50% etanol, 5% ácido acético] durante 1 h y después se destiñó con una solución de [20% etanol, 5% ácido acético] hasta observar las bandas de proteína. Cuando las proteínas iban a ser analizadas por Western Blot, el gel se electrotransfirió a membrana de polivinildifluorido (PVDF), siguiendo el protocolo descrito por Towbin [57] y Dunbar [58], durante 1 h a 100 V con la solución amortiguadora de transferencia [Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol].

3.3.2. Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE pueden ser identificadas por su reactividad con anticuerpos específicos, luego de ser transferidas a una matriz sólida.

Para ello, la membrana de PVDF con las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se bloqueó incubando con solución TBST [Tris 0.01 M, 0.9% NaCl, 0.02% Tween 20, pH 7.2] más 5% de leche descremada durante 1 h. A continuación, se incubó durante 2 h con el suero anti-HSPZ ("Heat Solubilized Pig Zona") preparado en conejo el cual se ha probado que reconoce a las tres proteínas de la zona pelúcida humana recombinantes y nativas [59] diluido 1:1000 en TBST. Luego de lavar la membrana tres veces con TBST, la membrana se incubó con proteína A marcada con I^{125} durante una hora. Para detectar la unión proteína-anticuerpo se expuso la membrana a placas autorradiográficas.

3.4. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas recombinantes de la zona pelúcida se purificaron a partir de los sedimentos de células infectadas mediante cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalizantes. Para ello, se tomaron aproximadamente 80 mg del sedimento de células infectadas y se resuspendieron con 1 mL de solución amortiguadora de lisis [urea 2 M, tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 8.0]. La suspensión se incubó 45 min en hielo y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sedimento, se resuspendió y homogenizó con 1 mL de solución amortiguadora de solubilización [tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 8.0]. El tubo se agitó suavemente durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó durante 30 min a 12000 rpm. El solubilizado se mezcló con 1 mL de la resina NiNTA, previamente equilibrada con solución amortiguadora de solubilización, y se dejó en agitación suave durante toda la noche.

Al siguiente día, el tubo se centrifugó durante 3 min a 1500 rpm y se lavó la resina tres veces con solución amortiguadora de solubilización y dos veces con solución

amortiguadora de lavado [tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, urea 6 M, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 8.0]. A continuación, la resina se resuspendió con 1 mL de solución amortiguadora de lavado y se renaturalizó la proteína unida a ella adicionando volúmenes crecientes de solución amortiguadora de replegamiento [tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4], que diluyó progresivamente la urea de la solución amortiguadora de lavado en un gradiente decreciente de 6 a 0 M en fases de 0.5 M. Una vez terminado el gradiente, se centrifugó para eliminar la fase soluble. La resina se lavó tres veces con solución amortiguadora de replegamiento y dos veces más con solución amortiguadora de selección [tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 6.3]. Por último, se eluyó la proteína unida a la resina con 1 mL de solución amortiguadora de elución [tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 6.3]. Para verificar que la purificación se había llevado a cabo satisfactoriamente, las eluciones se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo que ya se describió anteriormente. Para su uso en los diferentes experimentos, las proteínas purificadas se dializaron contra buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 8.0, se concentraron y se cuantificaron las proteínas mediante Lowry [60].

3.5. MUESTRAS DE SEMEN

3.5.1. Evaluación de la muestra

Las muestras de semen empleadas fueron donadas por hombres sanos normozoospermicos de 21 a 35 años de edad que tuvieron un periodo de abstinencia de 3-5 días. La muestra se obtuvo por masturbación, colectándose en un envase estéril, y se dejó licuar durante 30 min-1 h a 37 °C.

Para la evaluación espermática se tomaron como referencia los criterios de evaluación de la Organización Mundial de la Salud [61] que se resumen en la siguiente tabla.

Evaluación macroscópica

CRITERIO	VALOR DE REFERENCIA
Licuefacción	La muestra debe licuar en máximo 1 h a 37 °C.
Apariencia	Homogénea de color gris opalescente.
Volumen	Mínimo 2 mL.
Viscosidad	Ausencia de hilos y moco.

Evaluación microscópica

CRITERIO	VALOR DE REFERENCIA
Movilidad	50% o más con progresión anterógrada (tipo 1 y 2) o 25% o más con progresión lineal rápida (tipo 1). Tipo 1: motilidad progresiva rápida. Tipo 2: motilidad progresiva lenta o errática. Tipo 3: motilidad no progresiva. Tipo 4: sin motilidad.
Morfología	15% de morfología normal.
Viabilidad	50% o más vivos.
Densidad	20X10 ⁶ espermatozoides por mililitro.
Cuenta espermática total	40X10 ⁶ espermatozoides o más.
pH	7.2 o más.

3.5.2. Capacitación espermática

La capacitación espermática se llevó a cabo después de haberse licuado la muestra evaluada y de determinarse que cumplía con los criterios de la OMS, para muestras normales.

La muestra se pasó a través de un gradiente de densidades de 50% y 90% de una suspensión coloidal de partículas de sílice (Isolate), diseñado para separar la fracción móvil de espermatozoides del fluido seminal. Para ello, se centrifugó la muestra a través del gradiente durante 30 min a 1800 rpm a temperatura ambiente y se recuperó el sedimento de espermatozoides. El sedimento se lavó

con "Sperm Washing Medium" y se resuspendió con 2 mL del mismo medio al que se le agregó 2 mL de "Test Yolk Buffer", incubando a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con medio "Human Tubal Fluid" suplementado con albúmina sérica humana [0.3%] y piruvato de sodio [0.33 mM] a 37 °C. A continuación se seleccionaron los espermatozoides capacitados mediante la técnica de "swim up", para lo cual sobre el sedimento de espermatozoides se depositaron 500 µL - 1 mL de medio HTF suplementado. El tubo se incubó inclinado a 45° durante 1 h a 37 °C, en incubador con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Una vez terminada la incubación, se recuperó la fase superior del gradiente en el cual se encontraban los espermatozoides móviles. Los espermatozoides obtenidos se re-evaluaron para determinar la concentración final de células y verificar la movilidad.

Para disminuir los estadios intermedios de la reacción acrosomal que interfieren en la localización de receptores espermáticos, espermatozoides capacitados se pre-trataron con ionóforo de calcio, que va a inducir la reacción acrosomal o con toxina de Pertussis que va a inhibir la reacción acrosomal mediada por proteínas G_i.

3.5.2.1. Inducción de la reacción acrosomal por ionóforo de calcio (CaI)

Los espermatozoides se incubaron con ionóforo de calcio A-23187 para inducir la reacción acrosomal, tal como se describió anteriormente [62]. Con este objeto, 1X10⁶ espermatozoides capacitados se incubaron durante 30 min a 37 °C en incubador con 5% de CO₂ y 85% de humedad con medio HTF suplementado que contenía ionóforo de calcio A-23187 a una concentración de 10 µM. Al finalizar el tiempo de incubación, los espermatozoides se lavaron y resuspendieron en medio HTF suplementado para su uso en los experimentos de unión con las proteínas recombinantes de la zona pelúcida (ver 3.5.3).

3.5.2.2. Inhibición de la reacción acrosomal por toxina de Pertussis (TxP)

La toxina de Pertussis se empleó como inhibidor de reacción acrosomal según las indicaciones descritas anteriormente [63]. Para ello, 1×10^6 espermatozoides capacitados se incubaron en medio HTF suplementado adicionado con toxina de Pertussis, a una concentración de 100 ng/mL. La incubación se llevó a cabo durante 3 h a 37 °C en incubador con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Al finalizar la incubación los espermatozoides se lavaron y se resuspendieron en medio HTF suplementado para continuar con el protocolo de unión de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida a espermatozoides (ver 3.5.3).

3.5.3. Ensayo de unión de espermatozoides capacitados a proteínas de la zona pelúcida humana

Los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal inducida, inhibida y sin tratamiento (control) fueron incubados con las diferentes proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana [62]. Para ello, 600,000 espermatozoides capacitados se incubaron con 2.4 µg de las proteínas recombinantes purificadas diluidas en medio HTF en un volumen final de 60 µL. La incubación se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C en incubador con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Posteriormente, se trataron 600,000 espermatozoides capacitados en iguales condiciones sin adicionar las ZP's para ser usados como controles en ensayos posteriores. Una vez terminada la incubación, los espermatozoides se lavaron con 60 µL de PBS [NaH₂PO₄ 13 mM, Na₂HPO₄ 88 mM, NaCl 150 mM] y se fijaron resuspendiendo en 60 µL de p-formaldehído al 4%. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con agitación ocasional, y una vez terminada la fijación las células se lavaron con PBS para ser usados en la preparación de frotis sobre portaobjetos pre-tratados con poli-L-Lisina. Una vez secos, los frotis se guardaron a 4 °C hasta su uso en análisis de inmunofluorescencia.

3.5.4. Detección de proteínas de la zona pelúcida humana unidas a espermatozoides mediante inmunofluorescencia

Las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana unidas a los espermatozoides durante los ensayos de unión se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta, seguida de tinción con la aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) para detectar el estatus acrosomal de los espermatozoides.

Los frotis se lavaron tres veces con PBS durante 5 min y se bloquearon incubando durante 30 min con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS. Después se sustituyó la solución de bloqueo por el suero anti-HSPZ (para los tratamientos y el control negativo) ó anti-hSpm (para el control positivo), diluidos 1:100 en solución de BSA al 1% en PBS e incubando toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS y los frotis se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a un compuesto fluorescente (α rIgG-Cy3), diluido 1:100, a 37 °C, durante 1 h en oscuridad.

A continuación, se lavaron tres veces con solución de PBS y los frotis se incubaron con FITC-PSA durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, las laminillas se montaron con resina para fluorescencia (VectaShield). Las laminillas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Polivar, Reichert Jung) con aumento de 400x y utilizando los filtros correspondientes a los valores de excitación y emisión para cada fluorocromo empleado (Cy3 550-570 nm y FITC 495-525 nm).

Para estudiar los patrones de tinción e intensidad de la señal debida a las proteínas recombinantes unidas a los espermatozoides, las muestras se evaluaron por dos observadores de manera independiente, asignando un valor de intensidad de señal según la siguiente escala: (-) sin tinción, (+) tinción débil, (++) tinción moderada y (+++) tinción intensa. Esta escala de valoración se utilizó para designar la tinción presente en las diferentes regiones del espermatozoide consideradas, que fueron la región acrosomal, la post-acrosomal, pieza media y flagelo.

Para la evaluación del estatus acrosomal, se usó el criterio descrito por Mortimer [64] que establece cuatro estadios de la reacción acrosomal (Fig. 4). De acuerdo a este criterio todos los espermatozoides que mostraron tinción bien definida en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide se consideraron con acrosoma intacto (patrón de tinción I), mientras que aquellos que no mostraron fluorescencia en el acrosoma o la mostraron en la región ecuatorial o en forma irregular se consideraron como acrosomas reaccionados (patrones de tinción IV, III y II, respectivamente). Se contaron 150 células por preparación, los resultados se expresaron como el delta de porcentaje de células con reacción acrosomal ($\Delta\%RA$), luego de normalizar los valores mediante la sustracción del porcentaje de células con reacción acrosomal espontánea en la muestra control.

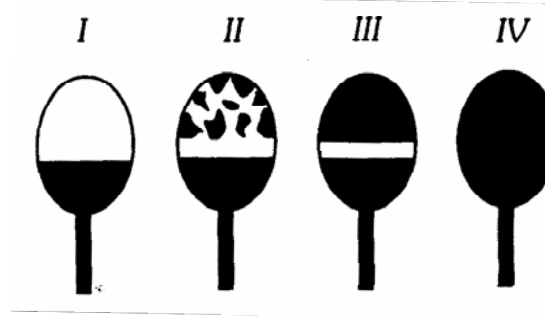


Fig. 4. Patrones de tinción del acrosoma con las lectinas PNA y PSA observados durante la reacción acrosomal. (I) Se observa tinción nítida en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, espermatozoide intacto. (II) Tinción desigual, dispareja: se observa una tinción de menor intensidad que la nítida en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide; (III) Tinción ecuatorial, se observa brillo sólo en la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide y (IV) Oscuro, no se observa tinción en la cabeza del espermatozoide. Figura extraída del libro Practical Laboratory Andrology [64].

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los casos apropiados, se realizó el análisis estadístico utilizando el programa Graph Pad Statistical Package. Los resultados se presentaron como las medias \pm E.E y fueron analizados por ANOVA y utilizando la prueba de Tukey HSD para los posteriores análisis de comparación. Los datos se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA

Las proteínas expresadas en las células Sf9 como proteínas de fusión mediante el sistema de expresión del baculovirus se purificaron mediante cromatografía de afinidad, y se analizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot para verificar la presencia y la pureza de las mismas. En la figura 5, se muestran las proteínas expresadas y purificadas teñidas con azul de Coomassie (panel A) y analizadas mediante Western Blot, incubando con el suero anti-HSPZ (panel B). Tanto en el gel como en el Western Blot, se observan las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4. Los pesos moleculares estimados para las bandas de proteína identificadas por el suero son de 80 KDa para ZP2, 65 KDa y 55 KDa para las dos isoformas de ZP3 y 66 KDa para ZP4, los cuales son similares a los que se han descrito para sus homólogas nativas [40, 41, 42]. Además, en el gel teñido se puede observar que hay proteínas de bajo peso molecular que pudieran ser proteínas que se pegan a la NiNTA de manera inespecífica pero las proteínas de interés carecen de contaminantes mayores provenientes de las células Sf9, por lo que pueden ser empleadas en ensayos de interacción con los espermatozoides.

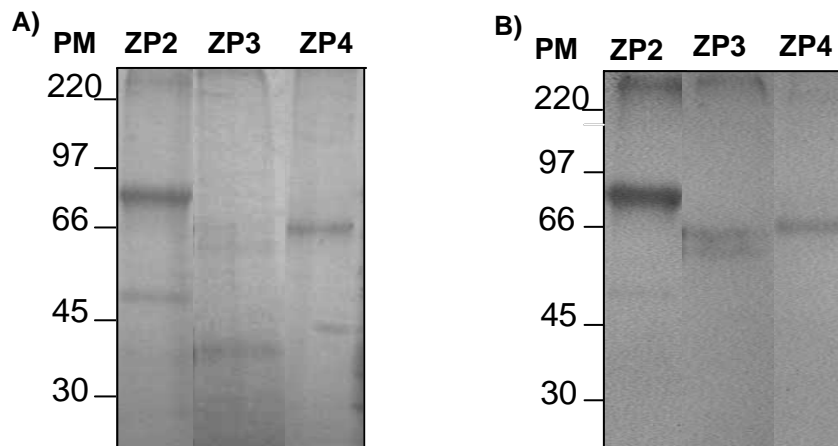


Fig. 5. Análisis de proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana. Las proteínas de la zona pelúcida fueron expresadas en la línea celular Sf9, purificadas mediante cromatografía de afinidad y separadas en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%. A) Tinción del gel con azul de Coomassie. B) Western Blot donde la membrana se incubó con suero anti-HSPZ (1:1000).

4.2. EVALUACIÓN DEL SUERO ANTI-HSPZ

Para la realización de los análisis de unión mediante inmunofluorescencia, era indispensable determinar si el suero anti-HSPZ, no desarrollaba reacción cruzada con proteínas del espermatozoide. En la figura 6 se muestra el resultado del análisis mediante Western Blot de un lisado de espermatozoides incubado con el suero anti-hSpm (control positivo) y con el suero anti-HSPZ en el que se observa que el suero anti-HSPZ no se une a ninguna de las proteínas del extracto de espermatozoides humanos.

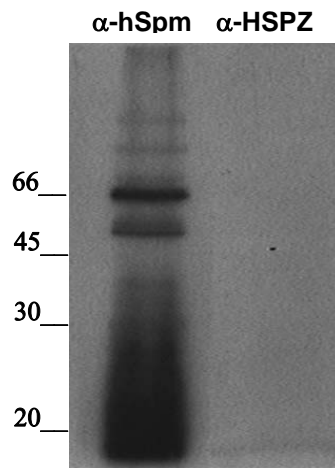


Fig. 6. Western Blot de extracto de proteínas de espermatozoides humanos. Sedimentos de espermatozoides humanos fueron solubilizados y analizados bajo condiciones desnaturizantes mediante SDS-PAGE. Las proteínas se electrotransferieron a membranas de PVDF y se incubaron con los diferentes antisueros. Carril 1: anti-hSpm, dilución 1:1000; Carril 2, anti-HSPZ dilución 1:1000.

Por otro lado, se verificó que el suero anti-HSPZ tampoco desarrollara reacción cruzada con los espermatozoides intactos. Para ello, frotis de espermatozoides se tiñeron por inmunofluorescencia indirecta con anti-HSPZ y con anti-hSpm (control positivo). En la figura 7, se muestran los espermatozoides analizados en campo claro y con fluorescencia y se observa que el suero anti-hSpm reconoce toda la célula tiñéndose de rojo (panel A), mientras que el suero anti-HSPZ no se une a ninguna proteína del espermatozoide (panel B).

Una vez evaluado el suero anti-HSPZ por Western Blot e inmunofluorescencia pudimos asegurar que este suero sólo reconoce las proteínas de la zona pelúcida, y

que por tanto podía ser usado para detectar las proteínas recombinantes de la zona pelúcida unidas a los espermatozoides.

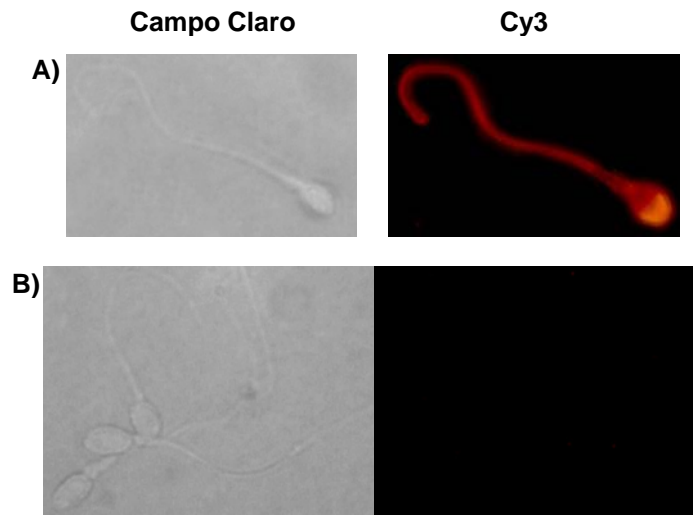


Fig. 7. Analisis de especificidad del suero α -HSPZ. A) Espermatozoides incubados con anti-hSpm (control +). B) Espermatozoides incubados con anti-HSPZ (control -). Del lado izquierdo se muestran los espermatozoides en campo claro y del lado derecho los mismos espermatozoides observados con fluorescencia a 550nm. Aumento de 400x.

4.3. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL

Como la zona pelúcida es el principal inductor de la reacción acrosomal en el espermatozoide, se evaluó la posible actividad biológica de las proteínas recombinantes obtenidas sobre este fenómeno. Para ello, espermatozoides capacitados se incubaron con ZP2, ZP3 y ZP4 durante 2h y se tiñeron con FITC-PSA para evaluar el estatus acrosomal.

En la figura 8, se muestran espermatozoides teñidos con FITC-PSA observados en campo claro (A) y con fluorescencia (B), donde se observa el patrón de tinción de espermatozoides con acrosoma intacto y con acrosoma reaccionado. A la derecha en la misma figura se muestran los valores de reacción acrosomal observados ($\Delta\%RA$), calculados a partir de los valores de reacción acrosomal obtenidos luego de incubar durante dos horas espermatozoides capacitados con las tres proteínas

recombinantes y normalizados por los valores de reacción acrosomal espontánea observados en el control, donde los espermatozoides se incubaron sólo con el medio pero en iguales condiciones. Los valores de $\Delta\%RA$ muestran que las proteínas ZP3 y ZP4 fueron capaces de inducir la reacción acrosomal en un 11.0% y 9.7% respectivamente, mientras que la proteína ZP2 no tuvo efecto. La diferencia de $\Delta\%RA$ entre ZP3 y ZP4 no es significativa, pero sí hay diferencia significativa entre estos valores y los valores de ZP2 y el control.

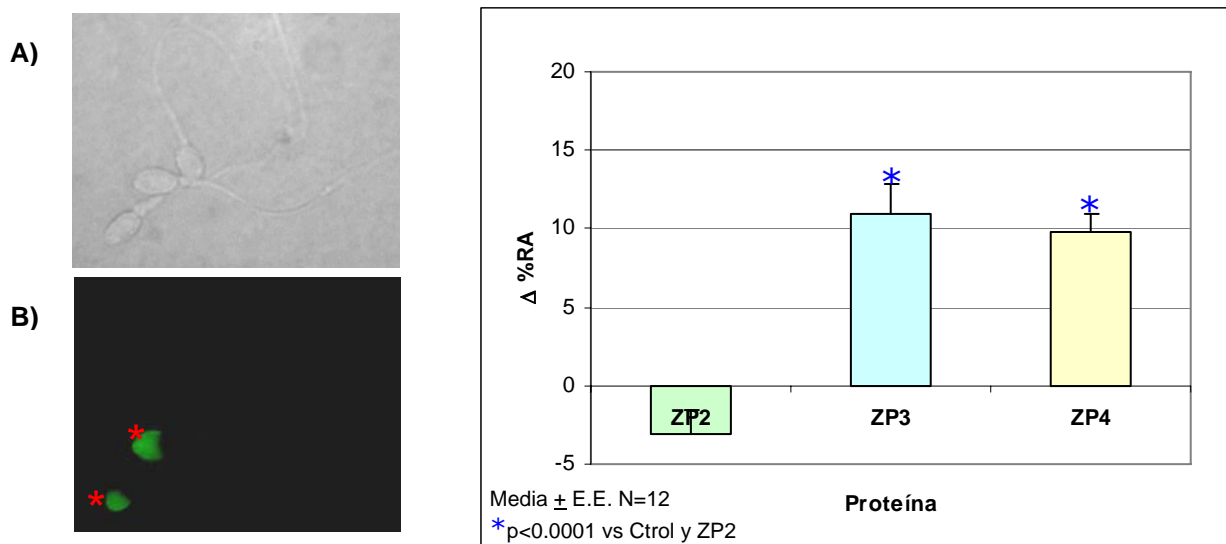


Figura 8. Efecto de las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 recombinantes sobre la reacción acrosomal. Espermatozoides capacitados se incubaron durante 2 horas con las proteínas recombinantes de la ZP y se tiñeron con FITC-PSA para evaluar el estatus acrosomal. A) Observación en campo claro, B) Observación de fluorescencia con filtro de longitud de onda 495 nm-525 nm, (*) indica la tinción de acrosoma intacto. La gráfica muestra la inducción de reacción acrosomal de cada una de las proteínas de la ZP expresados como el $\Delta\%RA$ (%RA tratamiento - %RA control), contando 150 células por preparación. Aumento 400x.

4.4. ANÁLISIS DE ESTADIOS DE LA REACCIÓN ACROSOMAL

Se observaron diferentes etapas de la reacción acrosomal al evaluar el estatus acrosomal de los espermatozoides que se tiñeron con FITC-PSA, tal como se mencionó en materiales y métodos (apartado 3.5.4.). Tomando en cuenta que la exocitosis acrosomal se considera un evento dinámico no reversible [65], el cual se

lleva a cabo en diferentes estadios que culminan con la pérdida total del acrosoma, los estadios II, III y IV descritos en la figura 4 de Materiales y Métodos se consideraron como espermatozoides con acrosoma reaccionado, si bien en los estadios II y III el acrosoma no se ha perdido totalmente. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de células con acrosoma intacto (I), en transición (II y III) y reaccionados (IV), luego de haber sido sometidos al protocolo del ensayo de unión de proteínas bajo las condiciones de control negativo (sin adición de proteínas recombinantes). Se puede observar que la mayor parte de los espermatozoides que se consideran reaccionados, realmente se encuentran en proceso de la pérdida del acrosoma (estadios II y III). Esto implica que en la cabeza de estos espermatozoides aún permanecen residuos de membrana plasmática y membrana acrosomal externa, y en estas condiciones sería muy difícil analizar la unión de proteínas de la ZP al espermatozoide, discerniendo si la unión es primaria (unión en la membrana plasmática del espermatozoide previo a la reacción acrosomal) o secundaria (unión en la membrana acrosomal interna) posterior a la reacción acrosomal. Además, como las proteínas ZP3 y ZP4 inducen la reacción acrosomal, estarían unidas a la membrana plasmática por un tiempo corto, el necesario para producir su efecto, pero una vez iniciado el proceso de exocitosis, ligandos y receptores serían dispersados en las vesículas.

Estadio	Patrón	%RA
Intactos	I	39.9 ± 4.5
Transición	II, III	34.9 ± 4.0
Reaccionados	IV	25.2 ± 4.6

Tabla 1. Espermatozoides capacitados y fijados se tiñeron con FITC-PSA para evaluar el estatus de reacción acrosomal. Se evaluaron 150 células por experimento utilizando microscopio de fluorescencia y se clasificaron según la figura 4 de Materiales y Métodos. Se muestra la media ± E.E. n=5

4.5. EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES PRE-TRATADOS CON TOXINA DE PERTUSSIS E IONÓFORO DE CALCIO

En vista de que el objetivo de este trabajo era la localización subcelular de los receptores para cada una de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana, la presencia de los estadios transitorios (patrones II y III) interfería con el análisis, por lo que se optó por tratar a los espermatozoides con agentes capaces de estimular o inhibir la reacción acrosomal y de esta forma minimizar la proporción de espermatozoides en transición antes de incubarlos con las proteínas recombinantes de la zona pelúcida. Los espermatozoides capacitados se incubaron con toxina de Pertussis para inhibir la reacción acrosomal vía proteínas G_i [66], ó con ionóforo de calcio A23187 para inducir la reacción acrosomal [67], y se evaluó el estatus acrosomal. En la tabla 2 se muestra que la toxina de Pertussis inhibe la reacción acrosomal de los espermatozoides capacitados, y la proporción de espermatozoides en transición es mínima. Esto indica que los espermatozoides con el acrosoma intacto no van a iniciar la reacción acrosomal y que por tanto van a permitir visualizar si las proteínas recombinantes que se unen a la membrana plasmática se pueden considerar como receptores primarios. Por otro lado, los espermatozoides capacitados incubados con el ionóforo de calcio mostraron inducción de reacción acrosomal de 20.7%, donde la mayoría de los acrosomas estaban reaccionados y de igual modo hay una baja incidencia de espermatozoides en transición. Esto permite observar la posible unión de las proteínas recombinantes a receptores ubicados en la membrana acrosomal interna (receptores secundarios). Estos resultados sugieren que al realizar los ensayos de unión se van a estudiar estadios estáticos de la reacción acrosomal, lo que va a permitir visualizar con mayor claridad los patrones de unión de cada una de las proteínas recombinantes a los espermatozoides.

Tratamiento	Δ %RA	%Intactos (I)	%Transición (II/III)	%Reaccionados (IV)
Medio HTF	0.6 ± 0.3	33 ± 1.8	6 ± 0.3	61 ± 1.5
Medio HTF	20.7 ± 7.1	13 ± 0.9	3 ± 0.3	84 ± 1.2

Tabla 2. Efecto de la toxina de Pertussis y del ionóforo de calcio A23187 sobre la exocitosis acrosomal. Espermatozoides capacitados fueron incubados con ionóforo de calcio A-23187 [$10\mu\text{M}$], toxina de Pertussis [100ng/mL] y se teñieron con FITC-PSA para determinar el estatus del acrosoma. Los datos se normalizados con un control de espermatozoides que no se sometieron a ningún tratamiento. Se evaluaron 150 células por experimento y los datos se presentan como la media \pm E.E. $n=3$.

4.6. UNIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS PRE-TRATADOS CON TOXINA DE PERTUSSIS E IONÓFORO DE CALCIO A PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA Y EFECTOS SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL

En la tabla 3 se resumen los datos obtenidos tras realizar los ensayos de unión de espermatozoides a las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 con y sin pre-tratamiento con toxina de Pertussis e ionóforo de calcio.

Al analizar la unión de las proteínas de la ZP a los espermatozoides se hizo notorio que no todas las células se teñían, es decir, no todas las células tenían receptores para la unión de ZP2, ZP3 y ZP4. Así se observó que en todos los casos el porcentaje de espermatozoides teñidos oscilaba entre 30.4 y 47.5%. Este fenómeno puede estar relacionado con la baja morfología normal de las muestras (20.9%), la cual sin embargo se encuentra dentro del rango considerado normal para el humano [61]. De hecho, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal esta incrementado en la población de espermatozoides teñidos (con receptores para las proteínas de la ZP), lo que nos indica que las proteínas se unen preferentemente a espermatozoides con morfología adecuada.

Además, se muestra el análisis de la reacción acrosomal obtenidas a partir de los ensayos de unión de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida a espermatozoides bajo diferentes condiciones. Los valores presentados se obtuvieron luego de sustraer el porcentaje de reacción acrosomal observado en el control negativo de cada tratamiento: sin inhibidores/inductores, toxina de

Pertussis e ionóforo de calcio. El análisis de la reacción acrosomal de espermatozoides incubados con las diferentes proteínas muestra que cuando los espermatozoides no son pre-tratados, las proteínas ZP3 y ZP4 son capaces de inducir reacción acrosomal mientras que ZP2 no induce, tal y como se mencionó en la figura 8. Sin embargo, al pre-tratar los espermatozoides con toxina de Pertussis las proteínas ZP3 y ZP4 no son capaces de inducir la reacción acrosomal, sugiriendo que la toxina de Pertussis bloquea los receptores específicos para estas dos proteínas y no permite que las mismas induzcan reacción acrosomal. Por otra parte, los espermatozoides que fueron pre-tratados con ionóforo de calcio e incubados con las proteínas recombinantes tampoco sufrieron cambios en los valores de reacción acrosomal, ya que la incubación con este agente provoca la exocitosis de todos los acrosomas susceptibles de llevar a cabo este fenómeno, y al incubarse con las proteínas ya no son capaces de inducir la reacción acrosomal.

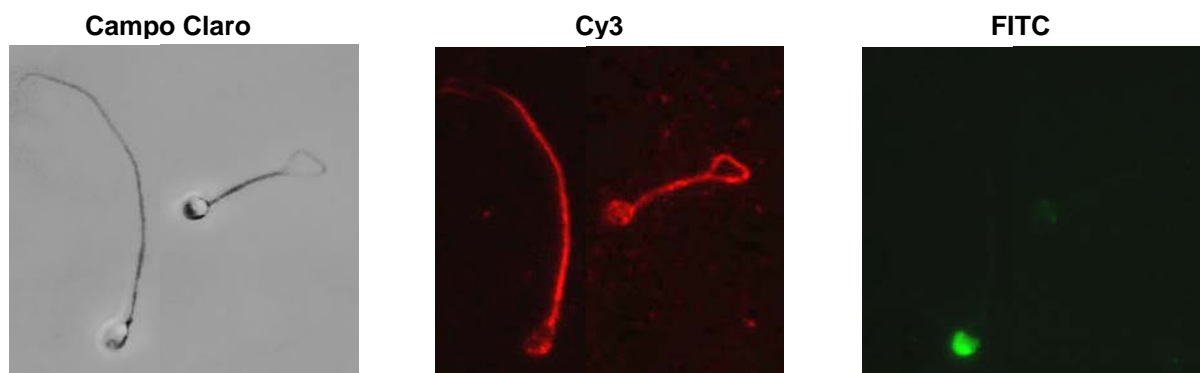
Tratamiento	Proteínas de la ZP	% Morfo. normal	% cel. teñidas	% Morfo. normal de cel. teñidas	Δ %RA
---	ZP2	20.9	47.5	37.1	-0.9
	ZP3	20.9	45.2	47.5	9.5
	ZP4	20.9	38.7	42.0	8.5
TxP	ZP2	20.9	46.2	37.0	0.6
	ZP3	20.9	30.4	30.4	1.2
	ZP4	20.9	45.9	45.9	0.5
Cal	ZP2	20.9	47.4	34.4	0.0
	ZP3	20.9	45.2	32.6	-1.2
	ZP4	20.9	37.1	39.9	-4.6

Tabla 3. Análisis de espermatozoides incubados con las distintas proteínas recombinantes de la zona pelúcida. Espermatozoides capacitados fueron pre-incubados sin tratamiento, con toxina de Pertussis ó ionóforo de calcio, seguidos de incubación con las proteínas recombinantes. Se contaron 150 células por laminilla y se muestran las medias. n=3.

4.7. LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA UNIDAS A ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS

Además de observar que los espermatozoides unían las ZP2, ZP3 y ZP4 recombinantes, se procedió a evaluar la localización de las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 en la superficie del espermatozoide, con acrosoma intacto y reaccionado, la cual se clasificó en base a la región del espermatozoide en que se observaba la señal, de acuerdo el siguiente criterio: región acrosomal, región post acrosomal, pieza media o flagelo.

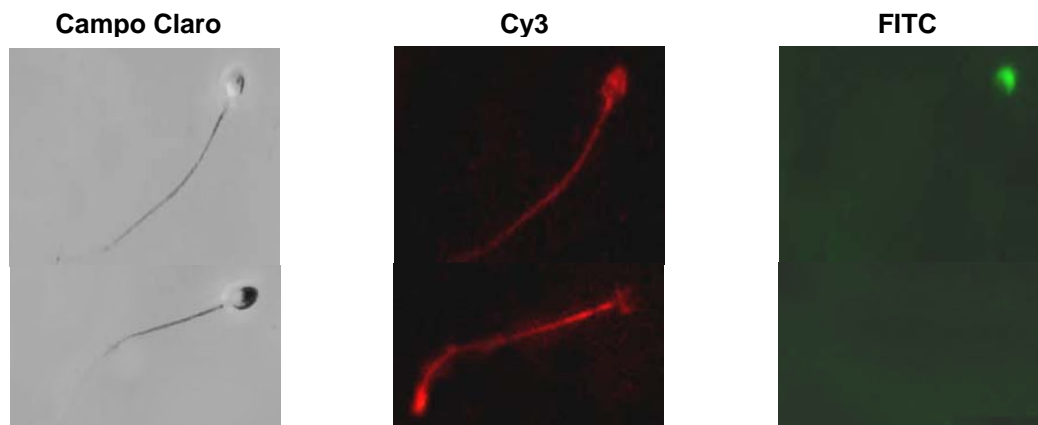
En la figura 9 se muestra la distribución característica de la proteína recombinante ZP2 unida a espermatozoides humanos capacitados, observados en campo claro y en fluorescencia con los filtros adecuados para detectar el fluorocromo Cy3 (para observar las proteínas de la ZP) y para el fluorocromo FITC (para observar la tinción del acrosoma). Se puede ver que ZP2 se localiza principalmente en el flagelo y con menor intensidad en la pieza media de espermatozoides con acrosoma intacto. Este patrón de tinción cambia cuando el espermatozoide ha perdido su acrosoma, ya que se tiñe en la región post acrosomal y con menor intensidad la pieza media y el flagelo.



Estatus acrosomal	Región acrosomal	Región Post-acrosomal	Pieza media	Flagelo
Intacto	-	-	+	+++
Reaccionado	-	++	+	+

Figura 9. Análisis de la unión de rhZP2 a espermatozoides. Se muestran patrones representativos de la unión. Los espermatozoides se muestran en campo claro, Cy3 y FITC con aumento de 400. Y la evaluación semi-cuantitativa de la distribución de ZP2 en espermatozoides intactos y reaccionados. n=6, evaluado por dos observadores independientes.

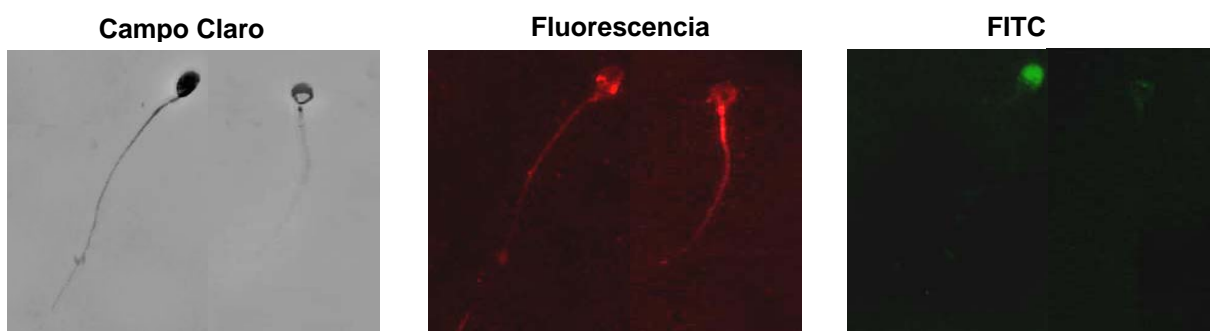
De manera similar, se procedió a analizar el patrón de unión de rhZP3 a espermatozoides, y los resultados se muestran en la figura 10. En espermatozoides con acrosoma intacto la tinción se localizó principalmente en la región acrosomal, y con menor intensidad en la región post acrosomal, pieza media y flagelo. Por su parte, en espermatozoides con acrosoma reaccionado la proteína ZP3 se localizó en la pieza media y con menor intensidad en la región post acrosomal y flagelo.



Estatus acrosomal	Región acrosomal	Región Post-acrosomal	Pieza media	Flagelo
Intacto	++	+	+	+
Reaccionado	-	++	+++	++

Figura 10. Análisis de la unión de rhZP3 a espermatozoides. Se muestran los patrones representativos de la unión. Los espermatozoides se muestran visualizados en campo claro, Cy3 y FITC, con aumento de 400. Y la evaluación semi-cuantitativa de la distribución de ZP3 en espermatozoides intactos y reaccionados. n=6, evaluado por dos observadores independientes.

Por último, los resultados del análisis de unión de rhZP4 a espermatozoides se presentan en la figura 11. Aquí se puede observar que cuando el espermatozoide tiene el acrosoma intacto la proteína se concentra fundamentalmente en la región post acrosomal y con menor intensidad en la región acrosomal, pieza media y flagelo. En cambio, en espermatozoides con el acrosoma reaccionado, la proteína se localiza mayormente en pieza media y con menor intensidad en la región post acrosomal y el flagelo.



Estatus acrosomal	Región acrosomal	Región Post-acrosomal	Pieza media	Flagelo
Intacto	+	+++	+	+
Reaccionado	-	+	+++	+

Figura 11. Análisis de la unión de rhZP4 a espermatozoides. Se muestran patrones representativos de la unión. Los espermatozoides se muestran visualizados en campo claro, Cy3 y FITC, con aumento de 400. Y la evaluación semi-cuantitativa de la distribución de ZP4 en espermatozoides intactos y reaccionados. n=6, evaluado por dos observadores independientes.

5. DISCUSIÓN

Históricamente, la limitada disponibilidad para obtener muestras de zona pelúcida humana ha sido el mayor obstáculo para el estudio de la interacción entre el ovocito y el espermatozoide en el humano. Afortunadamente, los avances de la biología molecular y el uso de sistemas de expresión han permitido sintetizar proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana en cantidades suficientes para estudiar el proceso de la fertilización en humanos, siempre que estas proteínas conserven la actividad biológica de sus homólogas nativas.

Las proteínas recombinantes de la zona pelúcida que se produjeron mediante el sistema de baculovirus en células Sf9 de insecto se expresaron como una sola banda de proteína con excepción de la proteína ZP3 que se expresa como dos. Los pesos moleculares de las tres proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana al ser analizadas mediante SDS-PAGE fueron de 80 kDa para ZP2, 65 kDa y 55 kDa para ZP3 y 66 kDa para ZP4, los cuales son similares a los publicados para las proteínas de la zona pelúcida nativa [40, 41, 42]. La diferencia entre los pesos moleculares de las proteínas nativas y las proteínas recombinantes puede ser debida a que los patrones y la abundancia de la glicosilación de proteínas entre el sistema de expresión y el nativo pueden no ser idénticos. Sin embargo, las proteínas son estructuralmente similares, ya que el suero anti-HSPZ es capaz de reconocer tanto a las proteínas recombinantes como a las proteínas nativas de la zona pelúcida presentes en cortes de ovario [59]. Además, las proteínas expresadas por el sistema del baculovirus inducen la reacción acrosomal, que es la variable de actividad biológica considerada en este trabajo. Este factor tiene relevancia, ya que otros sistemas de expresión eucariotas probados con anterioridad han producido proteínas recombinantes de la ZP sin actividad sobre la reacción acrosomal [68].

La purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad utilizando NiNTA-agarosa como matriz cromatográfica resultó ser un método eficiente, ya que las proteínas recombinantes poseen una cola de seis histidinas en el carbono terminal de la cadena polipeptídica, las cuales tienen alta afinidad por la matriz. Una vez unida la proteína, ésta se eluye aprovechando que la matriz tiene

mayor afinidad por el imidazol del buffer de elución que por la cadena de histidinas que tiene la proteína recombinante.

Aunque se ha reportado que la zona pelúcida humana está compuesta por cuatro proteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, aún no se ha expresado la proteína ZP1 en el sistema baculovirus, ya que su existencia se describió recientemente debido a que esta proteína se expresa en cantidades muy pequeñas en el ovocito. Su papel durante los eventos involucrados durante la fertilización deberá ser investigado, pero por la alta homología que tiene con la proteína ZP1 de ratón es probable que sólo desempeñe un papel de soporte estructural [36].

La reacción acrosomal es un fenómeno crucial para que se lleve a cabo la fertilización, y específicamente para que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida y alcance al ovocito. El inductor natural de este fenómeno es la zona pelúcida, por lo que una vez purificadas las proteínas recombinantes, se evaluó su actividad biológica sobre este fenómeno incubándolas con espermatozoides capacitados. En este estudio se observó que al incubar espermatozoides capacitados con las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana, la ZP3 y la ZP4 expresadas por el sistema de baculovirus fueron capaces de inducir la reacción acrosomal, mientras que la proteína ZP2 no tuvo efecto. El valor negativo del $\Delta\%RA$ de ZP2 puede deberse a que la lectina PSA reconoce a las tres proteínas recombinantes en baja proporción [52], por lo cual, cuando los espermatozoides capacitados se incuban con las proteínas recombinantes y luego se tiñen con FITC-PSA [69], la lectina se une a las tres proteínas además de los componentes acrosomales. Cuando el acrosoma está intacto no afecta la valoración del estatus acrosomal, pero en espermatozoides que han empezado a perder su contenido acrosomal (estadios de transición II y III), la tinción de las ZP's con FITC-PSA traerá como consecuencia que en algunos casos se observen acrosomas intactos que bajo condiciones normales serían evaluados como reaccionados (falsos negativos). Esto es cierto para las tres proteínas pero sólo es notorio en ZP2 porque no tiene efecto sobre la reacción acrosomal, y, por el contrario, los valores de reacción acrosomal inducida por ZP3 y ZP4 podrían ser en realidad ligeramente superiores a los aquí presentados. Por otra parte, el valor de $\Delta\%RA$ para ZP3 y ZP4 no se ve tan afectado ya que cuando estas proteínas se unen a los

espermatozoides intactos inducen reacción acrosomal, perdiéndose la membrana acrosomal y, por lo tanto, la PSA ya no puede unirse a las proteínas ZP's en la superficie del espermatozoide. La tinción del acrosoma con PSA pareciera por tanto no ser la más apropiada para este tipo de estudios. No obstante, los valores de reacción acrosomal obtenidos son lo suficientemente notorios como para superar este margen de error. Por otra parte, esta técnica ha sido ampliamente utilizada en análisis de unión similares a los aquí presentados y es la técnica más usada para el análisis del estatus acrosomal [61].

Al evaluar los estadios de la reacción acrosomal bajo las condiciones de este estudio se observó que los espermatozoides con el acrosoma intacto, los que se encuentran en estadios intermedios de la reacción acrosomal (patrones II y III) y aquellos con acrosoma completamente reaccionado se encontraban en proporciones similares lo cual dificultaba el estudio de la localización de los receptores para las proteínas recombinantes. Para minimizar los estadios intermedios de la reacción acrosomal se optó por pre-tratar los espermatozoides capacitados con toxina de Pertussis, que es capaz de inhibir la reacción acrosomal mediada por proteínas G_i , y con ionóforo de calcio, que promueve la entrada masiva de calcio provocando la fusión de membranas necesaria para la liberación del contenido acrosomal, antes de incubarlos con las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana. Las incubaciones con estos agentes disminuyeron la proporción de células en estadios intermedios de la reacción acrosomal, permitiendo el estudio de los patrones de unión en espermatozoides con acrosoma intacto o reaccionado. Al pre-tratar los espermatozoides con la toxina de Pertussis, se observó que los valores de reacción acrosomal observados en las muestras incubadas con ZP2, ZP3 y ZP4 eran iguales al control, lo que permitió analizar el sitio de unión de cada proteína. Esto tuvo especial relevancia para ZP3 y ZP4, ya que su unión a los espermatozoides no desencadenó la reacción acrosomal. De igual modo, se analizaron los espermatozoides incubados con el ionóforo de calcio, en los cuales también la disminución de los estadios intermedios permitió observar los patrones de unión de las ZP's cuando el espermatozoide tenía el acrosoma completamente reaccionado. Por otro lado, la incubación de espermatozoides capacitados con toxina de Pertussis inhibió la reacción acrosomal mediada por

proteínas G_i , pero no inhibió la reacción acrosomal espontánea, la cual se produce de manera natural bajo condiciones capacitantes [17]. Cabe mencionar que la capacidad de la toxina de Pertussis de inhibir la reacción acrosomal inducida por ZP3 recombinante ya ha sido descrita [63], pero en cuanto a su capacidad de inhibir la reacción acrosomal iniciada por ZP4, los resultados de este trabajo difieren de los observados con ZP4 expresada en la línea celular Sf21 [52]. La discrepancia observada puede deberse a que en el estudio de Chakravarty y colaboradores, la incubación de los espermatozoides con la toxina de Pertussis se hizo durante 30 min a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que en el presente trabajo se incubó durante 3 horas a una concentración de 100 ng/mL [63].

La morfología del espermatozoide es un factor importante que refleja el buen funcionamiento de la célula. Se ha observado que la morfología normal de los espermatozoides de una muestra de semen es una de las variables de la evaluación espermática con mejor valor predictivo en ensayos de fertilización in vitro (FIV) [70]. Además, la morfología espermática está positivamente correlacionada con la reacción acrosomal inducida por zona pelúcida [71], así como con la capacidad de los espermatozoides de unirse fuertemente a ella [72]. Si suponemos que las proteínas recombinantes se unen a receptores en la superficie del espermatozoide, cuando estos tienen defectos de morfología los receptores pueden no estar adecuadamente presentados o tal vez no estar en los sitios correctos de la superficie del espermatozoide. Así, en este trabajo se observó que los espermatozoides con receptores para las proteínas de la zona pelúcida tienen en su mayoría la morfología adecuada, apoyando la hipótesis de que la morfología espermática es una variable importante asociada a su capacidad fertilizante.

En estudios anteriores se ha observado que la proteína ZP2 expresada en *E. coli* no es capaz de inducir reacción acrosomal pero sí es capaz de unirse a espermatozoides con acrosoma reaccionado [73]. Nuestros resultados mostraron que cuando los espermatozoides tienen acrosoma intacto, el patrón de unión de ZP2 se localiza principalmente en el flagelo, y con menor intensidad en la pieza media. La tinción cambia a la región post acrosomal y con menor intensidad a pieza media y flagelo cuando los espermatozoides tienen el acrosoma reaccionado.

La proteína ZP3 se localizó en la región acrosomal y con menor intensidad en la región post acrosomal, pieza media y flagelo cuando el espermatozoide tiene el acrosoma intacto, pero la tinción cambia a la pieza media y con menor intensidad a la región post acrosomal y flagelo cuando el espermatozoide pierde el acrosoma. Este cambio en el patrón de unión de la proteína ZP3 puede ser debido a una redistribución de los receptores para ZP3 como consecuencia de la exocitosis acrosomal. Estudios hechos anteriormente señalan que la proteína ZP3 participa en la unión primaria entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito y subsecuentemente inicia la reacción acrosomal [43, 44].

Por su parte, la proteína ZP4 se localizó principalmente en la región post acrosomal y con menor intensidad en región acrosomal, pieza media y flagelo cuando el espermatozoide tiene el acrosoma intacto. La tinción cambia hacia la pieza media y con menor intensidad en la región post acrosomal y el flagelo cuando el espermatozoide pierde el acrosoma. El cambio observado en el patrón de unión de ZP4 puede ser debido a una redistribución de los receptores de ZP4 como consecuencia de la exocitosis acrosomal. Conviene destacar que hasta hace poco, se consideraba que ZP4 era la proteína equivalente de ZP1 de ratón, por lo que se pensaba que no tenía una actividad fisiológica sobre el espermatozoide y que sólo formaba parte de la estructura tridimensional de la matriz. Sin embargo, el presente trabajo, así como otros recientes [52] apoyan la hipótesis de una participación de la ZP4 durante la inducción de la reacción acrosomal (y en unión primaria), así como en una actividad dinámica de sus receptores asociados a este fenómeno.

Todos estos resultados contribuyen al mejor entendimiento de los mecanismos relacionados con el proceso de fertilización en humanos, y pueden ser de gran utilidad para mejorar las técnicas de fertilización asistida empleadas para apoyar a parejas con problemas para concebir, así como para abrir la puerta a novedosos enfoques en el campo de la anticoncepción.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron y purificaron las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 de la zona pelúcida humana mediante el sistema del baculovirus en células Sf9, las cuales mostraron actividad biológica al ser capaces de unirse a espermatozoides humanos capacitados. Además las proteínas recombinantes ZP3 y ZP4 son capaces de inducir reacción acrosomal.

- La evaluación de la reacción acrosomal de espermatozoides capacitados e incubados con toxina de Pertussis sugieren que las proteínas ZP3 y ZP4 podrían unirse a receptores acoplados a proteínas G_i . Este hecho apoya la idea de que ambas proteínas desempeñan un papel importante durante el reconocimiento de gametos.

- La morfología de los espermatozoides juega un papel fundamental para que se lleve a cabo la unión de estos con la zona pelúcida.

- Los receptores espermáticos para ZP2, ZP3 y ZP4 presentan un patrón de localización subcelular característico para cada proteína, el cual se modifica al producirse la reacción acrosomal.

- La obtención de proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana con actividad biológica representa un gran avance en el estudio y comprensión del proceso de fertilización en humanos. Asimismo, los avances en la investigación de cada uno de los factores involucrados en este proceso constituyen una valiosa aportación para las investigaciones en el área de medicina reproductiva.

7. REFERENCIAS

1. Wassarman P. M. *Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion*. Cell, 1999. **96**(2): p. 175-83.
2. Higashida B., *Sistema reproductor femenino y masculino*, in *Ciencias de la salud*. 1991, Mc Graw Hill: México. p. 193-206.
3. Ross M., Perth E., *Aparato Genital Femenino*, in *Histología Texto y Atlas a color*. 1997, Médica Panamericana: México. p. 674-699.
4. Geneser F., *Aparato genital*, in *Histología*, G. F, Editor. 1996, Editorial Médica Panamericana: México. p. 536-601.
5. Gartner L. H. J., *Sistema Reproductor Masculino*, in *Texto Atlas de Histología*. 2002, Mc Graw Hill Interamericana: México, D.F. p. 463-483.
6. Guyton Arthur C a. H. J. E., *Funciones Reproductoras y Hormonales del Varón*, in *Tratado de Fisiología Médica*, a.H.J.E. Guyton Arthur C, Editor. 1997, Mc Graw Hill Interamericana: México. p. 1099-1114.
7. Ross M., Perth E., *Aparato Genital Masculino*, in *Histología Texto y Atlas a color*. 1997, Médica Panamericana: México. p. 580-602.
8. de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. *Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(3): p. 175-94.
9. Yanagimachi R., *Mammalian Fertilization*, in *The physiology of reproduction*, E.a.N. Knobil, J. D., Editor. 1994, Raven Press: New York. p. 79-122.
10. Zinamen M., Drobnis, E.Z, Morales, P. et al. *The physiology of sperm recovered from the human uterine cervix: acrosomal status and response to inducers of the acrosome reaction*. Biology of Reproduction, 1989. **41**: p. 790-797.
11. Zhu J. J., Barratt C. L., Cooke I. D. *Effect of human cervical mucus on human sperm motion and hyperactivation in vitro*. Hum Reprod, 1992. **7**(10): p. 1402-6.
12. Bielfeld P., Jeyendran, R.S. and Zanaveld, L.J.D. *Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix*. Int. J. Fertil., 1991. **36**: p. 302-306.
13. Zhu J., Barratt C. L., Lippes J., Pacey A. A., Lenton E. A., Cooke I. D. *Human oviductal fluid prolongs sperm survival*. Fertil Steril, 1994. **61**(2): p. 360-6.
14. Revelli A., Modotti M., Piffaretti-Yanez A., Massobrio M., Balerna M. *Steroid receptors in human spermatozoa*. Hum Reprod, 1994. **9**(5): p. 760-6.
15. Grippo A. A., Anderson S. H., Chapman D. A., Henault M. A., Killian G. J. *Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct*. J Reprod Fertil, 1994. **102**(1): p. 87-93.
16. Yanagimachi R., *Mammalian Fertilization*, in *The Physiology of Reproduction*, E.a.N. Knobil, J. D., Editor. 1988, Raven Press: New York.
17. Stock C. E., Fraser L. R. *The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility*. Hum Reprod, 1987. **2**(2): p. 109-19.
18. Meizel S., Deamer D. W. *The pH of the hamster sperm acrosome*. J Histochem Cytochem, 1978. **26**(2): p. 98-105.
19. Baldi E., Casano R., Falsetti C., Krausz C., Maggi M., Forti G. *Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa*. J Androl, 1991. **12**(5): p. 323-30.
20. Tesarik J., Mendoza C., Moos J., Carreras A. *Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface*. Fertil Steril, 1992. **58**(4): p. 784-92.
21. Meizel S., *Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone.*, in *Human sperm acrosome reaction*, P.F.a.J. Parinaud., Editor. 1995, John Libbey Eurotext, Collioure. p. 151-64.

22. De Jonge C. J., Barratt C. L., Radwanska E., Cooke I. D. *The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid.* J Androl, 1993. **14**(5): p. 359-65.
23. Cummins J. M., Pember S. M., Jequier A. M., Yovich J. L., Hartmann P. E. *A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters.* J Androl, 1991. **12**(2): p. 98-103.
24. De Jonge C. J., Han H. L., Lawrie H., Mack S. R., Zaneveld L. J. *Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway.* J Exp Zool, 1991. **258**(1): p. 113-25.
25. Rotem R., Paz G. F., Homonnai Z. T., Kalina M., Lax J., Breitbart H., Naor Z. *Ca²⁺-independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm.* Endocrinology, 1992. **131**(5): p. 2235-43.
26. Roldan E. R., Murase T., Shi Q. X. *Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida.* Science, 1994. **266**(5190): p. 1578-81.
27. Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S. *A profile of fertilization in mammals.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. E59-64.
28. Alberts B., Bray, D.:. *The Molecular Biology of the Cell.* 1994, Garland: New York. p. 1011-1035.
29. Bazer F. W. G., R.D. and Zavy, M.T., *Fertilization, cleavage and implantation, in reproduction in farm animals*, E.S.E. Hafez, Editor. 1993, Lea and Febiger: Philadelphia. p. 188-212.
30. Wassarman P. M. a. A., D.F.:. *Mammalian Fertilization*, in *The physiology of reproduction*, E.a.N. Knobil, J. D., Editor. 1994, Raven Press: New York. p. 189-317.
31. Barros C., Crosby J. A., Moreno R. D. *Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization.* Cell Biol Int, 1996. **20**(1): p. 33-9.
32. Wassarman P. M., Litscher E. S. *Sperm--egg recognition mechanisms in mammals.* Curr Top Dev Biol, 1995. **30**: p. 1-19.
33. Bleil J. D., Wassarman P. M. *Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida.* Dev Biol, 1980. **76**(1): p. 185-202.
34. Harris J. D., Hibler D. W., Fontenot G. K., Hsu K. T., Yurewicz E. C., Sacco A. G. *Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families.* DNA Seq, 1994. **4**(6): p. 361-93.
35. Greve J. M., Wassarman P. M. *Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat.* J Mol Biol, 1985. **181**(2): p. 253-64.
36. Lefievre L., Conner S. J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I. A., Monk M., Hughes D. C., Barratt C. L. *Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human.* Hum Reprod, 2004. **19**(7): p. 1580-6.
37. Bausek N., Waclawek M., Schneider W. J., Wohlrab F. *The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver.* J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28866-72.
38. Hoodbhoy T., Joshi S., Boja E. S., Williams S. A., Stanley P., Dean J. *Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12721-31.
39. Conner S. J., Lefievre L., Hughes D. C., Barratt C. L. *Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida.* Hum Reprod, 2005. **20**(5): p. 1148-52.
40. Shabanowitz R. B., O'Rand M. G. *Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs.* J Reprod Fertil, 1988. **82**(1): p. 151-61.
41. Moos J., Faundes D., Kopf G. S., Schultz R. M. *Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization.* Hum Reprod, 1995. **10**(9): p. 2467-71.
42. Gupta S. K., Yurewicz E. C., Sacco A. G., Kaul R., Jethanandani P., Govind C. K. *Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3.* Mol Hum Reprod, 1998. **4**(11): p. 1058-64.

43. Bleil J. D., Wassarman P. M. *Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein*. Dev Biol, 1983. **95**(2): p. 317-24.
44. Beebe S. J., Leyton L., Burks D., Ishikawa M., Fuerst T., Dean J., Saling P. *Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction*. Dev Biol, 1992. **151**(1): p. 48-54.
45. Bleil J. D., Greve J. M., Wassarman P. M. *Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs*. Dev Biol, 1988. **128**(2): p. 376-85.
46. Wassarman P. M. *Zona pellucida glycoproteins*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 415-42.
47. Yurewicz E. C., Sacco A. G., Gupta S. K., Xu N., Gage D. A. *Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7488-94.
48. Yamasaki N., Richardson R. T., O'Rand M. G. *Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in COS cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida*. Mol Reprod Dev, 1995. **40**(1): p. 48-55.
49. Patra A. K., Gahlay G. K., Reddy B. V., Gupta S. K., Panda A. K. *Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-C expressed in Escherichia coli*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 7075-81.
50. Gahlay G. K., Srivastava N., Govind C. K., Gupta S. K. *Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in Escherichia coli bind to spermatozoa*. J Reprod Immunol, 2002. **53**(1-2): p. 67-77.
51. van Duin M., Polman J. E., De Breet I. T., van Ginneken K., Bunschoten H., Grootenhuis A., Brindle J., Aitken R. J. *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**(4): p. 607-17.
52. Chakravarty S., Suraj K., Gupta S. K. *Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(5): p. 365-72.
53. Kopf G. S. *Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa*. J Reprod Fertil Suppl, 1990. **42**: p. 33-49.
54. Summers MD S. G. *A Manual of Methods of Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1987. **No. 1555**.
55. Prasad S. *Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-Kilodalton zona pellucida protein expressed using baculovirus expression system*. Biology of Reproduction, 1995. **52**: p. 1167-1178.
56. Laemmli U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
57. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
58. Dunbar B. S. *Two-dimensional electrophoresis, and immunological techniques*. 1987, New York: Plenum Press. xvi, 372, [2] of plates.
59. Carino C., Prasad S., Skinner S., Dunbar B., Chirinos M., Schwoebel E., Larrea F. *Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries*. Reprod Biomed Online, 2002. **4**(2): p. 116-26.
60. Lowry U., Rosembrought N., Faer A., Randall R. *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**: p. 262-69.

61. WHO Special Programme of Research D., Research Training in Human R. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 1992, Cambridge: Cup 1992.
62. Govind C. K., Gahlay G. K., Choudhury S., Gupta S. K. *Purified and refolded recombinant bonnet monkey (Macaca radiata) zona pellucida glycoprotein-B expressed in Escherichia coli binds to spermatozoa*. Biol Reprod, 2001. **64**(4): p. 1147-52.
63. Bray C., Son J. H., Kumar P., Harris J. D., Meizel S. *A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3*. Biol Reprod, 2002. **66**(1): p. 91-7.
64. Mortimer D., *Sperm Fertilizing Ability Testing*, in *Practical Laboratory Andrology*. 1994, Oxford University Press Inc.: New York. p. 211.
65. Gerton G. L., *Function of the sperm acrosome*, in *Fertilization*. 2002, D.M. Hardy. p. 265-302.
66. Kopf GS G., G.L., *Mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction*, in *Elements of mammalian Fertilization*, P.M. Wassarman, Editor. 1991, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 153-203.
67. Aitken R. J., Ross A., Hargreave T., Richardson D., Best F. *Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187. Comparison of normospermic and oligozoospermic men*. J Androl, 1984. **5**(5): p. 321-9.
68. Martic M., Moses E. K., Adams T. E., Liu D. Y., Gook D. A., Garrett C., Dunlop M. E., Baker G. H. *Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line*. Asian J Androl, 2004. **6**(1): p. 3-13.
69. Cross N. L., Overstreet J. W. *Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro*. Gamete Res, 1987. **16**(1): p. 23-35.
70. El-Ghobashy A. A., West C. R. *The human sperm head: a key for successful fertilization*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 232-8.
71. Franken D. R., Bastiaan H. S., Kidson A., Wrantz P., Habenicht U. F. *Zona pellucida mediated acrosome reaction and sperm morphology*. Andrologia, 1997. **29**(6): p. 311-7.
72. Oehninger S., Mahony M., Ozgur K., Kolm P., Kruger T., Franken D. *Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding*. Fertil Steril, 1997. **67**(6): p. 1121-7.
73. Tsubamoto H., Hasegawa A., Nakata Y., Naito S., Yamasaki N., Koyama K. *Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa*. Biol Reprod, 1999. **61**(6): p. 1649-54.

8. ANEXO

Se anexa copia del artículo publicado.

Biological Effects of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins on Sperm Function¹

Pedro Caballero-Campo,^{3,4} Mayel Chirinos,^{3,5} Xue J. Fan,⁴ María E. González-González,⁵
Myrna Galicia-Chavarría,⁵ Fernando Larrea,⁵ and George L. Gerton^{2,4}

Center for Research on Reproduction and Women's Health,⁴ University of Pennsylvania School of Medicine,
Philadelphia, Pennsylvania 19104-6080

Departamento de Biología de la Reproducción,⁵ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,
Mexico City 14000, Mexico.

ABSTRACT

The initial interaction between gametes takes place at the level of the sperm surface and the zona pellucida (ZP), the extracellular matrix of the egg in mammals. Successful fertilization requires the proper molecular recognition of the ZP by the sperm. Recently, human ZP was demonstrated to be composed of four proteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. The goals of this study were to determine the effects of recombinant human ZP2, ZP3, and ZP4 on human sperm acrosomal exocytosis and sperm motility. Exposure of sperm to ZP proteins, alone or in combination, promoted acrosomal exocytosis in a time-dependent manner. This effect occurred in parallel with a considerable decrease in progressive motility, coincident with an increase in nonprogressive sperm motility. An analysis of kinetic parameters of ZP-treated sperm demonstrated that a characteristic motility pattern could be defined by values of curvilinear velocity > 63.9 $\mu\text{m/s}$ and linearity $\leq 15.5\%$. A strong correlation between curvilinear velocity and the amplitude of lateral head displacement was also observed. The incidence of sperm having these particular kinetic parameters increased after exposure to ZP proteins. These studies of two processes involved in sperm penetration through the ZP confirm that zona glycoproteins promote acrosomal exocytosis and now establish an additional role for these components as modifiers of sperm motility.

acrosome reaction, acrosomal exocytosis, fertilization, gamete biology, sperm capacitation, sperm motility and transport, zona pellucida

INTRODUCTION

During mammalian fertilization, but before reaching the egg plasma membrane, sperm bind to the zona pellucida (ZP), the extracellular matrix that surrounds the oocyte. The human ZP is composed of four proteins, ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4 (ZP4

previously known as ZBP, ZP1, and ZPB) [1–5]. The initial interaction with ZP macromolecules triggers several molecular processes that stimulate sperm acrosomal exocytosis (AE), which enables the sperm to penetrate the ZP in a process that also requires sperm motility. Subsequently, the sperm then interacts and fuses with the egg plasma membrane to form the zygote.

Acrosomal exocytosis is essential for successful fertilization, and the ZP has been classically considered as the primary initiator *in vivo*. Nevertheless, acrosomal exocytosis can also be stimulated by other factors, such as calcium ionophore or progesterone, although the mechanisms for induction differ from those used by the ZP [6–8]. Progesterone appears to exert a priming effect on AE. When sperm are exposed first to progesterone and then to the ZP, exocytosis is enhanced to a greater degree than that seen when these agonists are presented together or in the inverse order [9]. In addition, the ZP may stimulate the completion of an exocytotic process that had already been initiated during capacitation [10, 11]. Other studies indicate that acrosomeless, round-headed human sperm do not bind to and penetrate the ZP, nor do they fuse with the oolemma of ZP-free oocytes *in vitro* [12]. However, some studies have demonstrated that normal rabbit and guinea pig as well as human spermatozoa are capable of adhesion to the ZP in both acrosome-intact and acrosome-reacted states [13–15]. In human and mouse sperm, internal ZP binding proteins of the acrosomal matrix or inner acrosomal membrane may be exposed after acrosomal exocytosis that allow a continuous but dynamic attachment between sperm and ZP as the male gamete traverses this extracellular matrix [16, 17].

Sperm motility also plays an essential role in events leading up to fertilization. Furthermore, the patterns of motility change according to the maturation stage of the cell. During capacitation, some sperm undergo hyperactivation, which is characterized by the transition from a moderately active, progressive (relatively linear) swimming pattern to a highly vigorous, nonprogressive, random motion, with high-curvature flagellar movements [18, 19]. Although the characterization and identification of human sperm hyperactivation has been a subject of controversy, this distinctive motion seems to parallel the capacitation process [20]. Several studies have correlated hyperactivation with the occurrence of acrosomal exocytosis, ZP binding and penetration, and *in vitro* fertilization success, suggesting that it could be a good marker for capacitation and a valuable tool for clinical assessment of fertility [21–24].

There are many studies related to changes in sperm function after incubation with many different reproductive factors; however, studies on human ZP-sperm interaction are severely restricted because of difficulties in obtaining human oocytes as the source of native ZP. To circumvent this limitation, several research groups have recently cloned and expressed recombinant human ZP proteins with the goal of elucidating the ZP-

¹Supported by Contraceptive Research and Development (CONRAD) Twinning Program grants MFG-02-62 and MFG-02-63, NIH HD-41552 and The National Council of Science and Technology (CONACyT, Mexico). Also supported in part by the Bill and Melinda Gates Foundation (to X.J.F.). P.C.C. is a recipient of a training fellowship from Fundación Salud 2000 and Fundación Tambre, Madrid, Spain. M.E.G.G. and M.G.C. have been supported by CONACyT, Mexico.

²Correspondence: George L. Gerton, Center for Research on Reproduction and Women's Health, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania Medical Center, 421 Curie Blvd., 1311 BRB II/III, Philadelphia, PA 19104-6080. FAX: 215 573 7627; e-mail: gerton@mail.med.upenn.edu

³These authors contributed equally to this work.

Received: 16 September 2005.

First decision: 7 October 2005.

Accepted: 4 January 2006.

© 2006 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

sperm interaction mechanisms. In this regard, recombinant human ZP3 expressed in hamster CHO cells has been shown to induce AE and to promote sperm fusion with zona-free hamster oocytes [25–27]. Similar results have been obtained with ZP4 (called ZPB by these authors) and ZP3 expressed in insect Sf21 cells [28]. Nevertheless, the utility of each cell expression system needs to be investigated further, particularly because hZP3 expressed in human 293T cells does not have any effect on AE [29].

In this study, we have used recombinant proteins expressed in Sf9 insect cells to investigate the effects of ZP2, ZP3, and ZP4 on human sperm function. Because fertilization entails a complex series of events culminating in early embryo development, it is unlikely that the evaluation of a single sperm feature or function can be predictive of the fertilization potential of the male gamete. Therefore, we evaluated some of the most remarkable variables, such as stimulation of AE and changes in sperm motility following exposure to ZP proteins. Our results demonstrate that these ZP glycoproteins are physiologically active in promoting AE and in inducing changes in motility patterns, suggesting that these recombinant proteins could be useful to study the ability of sperm to bind and penetrate ZP.

MATERIALS AND METHODS

Expression of ZP2, ZP3 and ZP4 in Sf9 Cells and Purification

Human ZP2, ZP3, and ZP4 proteins were expressed in the *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect ovary cell line using the baculovirus expression system as previously described [30]. Briefly, the cDNAs coding for ZP2, ZP3, and ZP4 were cloned into the pAcHLT transfer vector (Pharmingen), and recombinant vectors were cotransfected with a linear AcNPV baculovirus into Sf9 cells using the Baculogold Transfection kit (Pharmingen) according to the manufacturer's guidelines. The resulting recombinant viruses were used for high-scale cell infection, culturing in TNM-FH medium (Invitrogen) for 3–4 days before harvesting. Although engineered to contain a signal sequence to enable the recombinant proteins to enter the secretory pathway for glycosylation, the ZP proteins, when expressed in this cell line, were not released into the culture medium, so cell pellets were analyzed by immunoblotting, as described below, to determine the presence of recombinant proteins.

The recombinant human ZP proteins were purified because of the presence of a 6-histidine tag encoded by the pAcHLT transfer vector. Purification started by solubilizing cell pellets under denaturing conditions in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, and 6M guanidine hydrochloride at room temperature and centrifuging at $10000 \times g$ for 30 min. The supernatant was added to pre-equilibrated Ni-NTA resin (Qiagen), which was incubated for 2 h and then washed with 5 volumes of the same buffer. The resin was suspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, and 6M urea, and the bound proteins were refolded using a decreasing gradient of urea. The proteins were eluted with 500 mM imidazole and dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.5 M NaCl, and the protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce).

Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis

The purities and molecular weights of the purified recombinant human ZP2, ZP3 and ZP4 proteins were determined by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) [31]. Briefly, 2 μ l of each ZP protein was applied to a WCX2 protein chip array, which was then incubated at room temperature for 1 h. Following washes with 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) and a final wash with water, the array was allowed to dry, and a saturated solution of sinapinic acid in 50% (v/v) acetonitrile and 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid was added to each spot and dried. The protein chip array was analyzed using a SELDI ProteinChip Biomarker System (PBS-II; Ciphergen Biosystems). Spectra were collected by the accumulation of 192 shots at a laser intensity of 220 in a positive mode. The protein masses were calibrated externally using protein molecular mass standards (Ciphergen Biosystems).

Immunoblot Analysis

To confirm the presence and integrity of recombinant human ZP proteins in Sf9 infected cells before and after purification, the proteins were analyzed by immunoblotting. The cellular pellets were used for protein separation by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel [32] and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore) [33]. After the membrane was blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 (TBST), the recombinant human ZP proteins were probed with a 1:1000 dilution in TBST of rabbit anti-heat-solubilized pig ZP serum that cross-reacts with human ZP, and antibody binding was detected using 125 I-Protein A [34].

Semen Samples and Sperm Preparation

This study and the informed consent forms signed by the semen donors were approved by the Institutional Review Board of the University of Pennsylvania. Following 2–4 days of abstinence, healthy donors (26–40 yrs) with proven fertility provided freshly ejaculated semen. The samples, collected in sterile polyethylene cups, were allowed to liquefy for at least 30 min and were assessed according to procedures and criteria established by the World Health Organization [35]. For capacitation, liquefied semen samples were centrifuged at $600 \times g$ for 30 min through a discontinuous Percoll density gradient (Isolate; Irvine Scientific). The sperm pellets were washed with 3 ml of Sperm Washing Medium (SWM; Irvine Scientific) and suspended in equal volumes of SWM and Test Yolk Buffer (Irvine Scientific) for overnight incubation at 4°C [36]. After washing with SWM, pellets were suspended with 0.1 ml of supplemented mHTF medium [modified Human Tubal Fluid (Irvine Scientific) + 0.3% human serum albumin + 1 mM sodium pyruvate], and gently overlaid with 0.9 ml of the same medium. Following a 1-h incubation at 37°C in 5% CO₂ to enable the sperm to swim up into the supernatant, the uppermost 0.9 ml with the motile sperm was carefully aspirated and reevaluated. The sperm concentration was then adjusted to 15 million per ml for subsequent experiments. In the recovered fractions, motility values were in all cases above 80%.

Sperm Function Analysis

Capacitated human sperm samples were incubated with the ZP proteins to assess effects on acrosomal exocytosis and sperm motility. After capacitation, 750 000 sperm were incubated with the different ZP proteins at a final concentration of 1 μ g/ml diluted in 50 μ l of supplemented mHTF medium at 37°C. At the end of the incubation time, half of each sample was washed and fixed with 95% ethanol for evaluation of acrosomal status, and the other half was used to determine whether the ZP protein(s) influenced sperm motility.

Evaluation of Acrosomal Status

Duplicate smears of fixed sperm aliquots were prepared on poly-L-lysine-treated slides and air-dried. Cells were stained with 20 μ g/ml of *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein (FITC-PSA; Sigma) diluted in PBS and incubated for 30 min at room temperature [37]. Slides were washed three times with PBS, mounted in glycerol-based solution (VectaShield; Vector Laboratories), and scored immediately by double-blinded evaluation. At least 200 cells were evaluated for each duplicate under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U; Nikon Inc.). All sperm showing acrosomal region fluorescence were considered as acrosome-intact, whereas those showing absence of fluorescence in the acrosome as well as staining at the equatorial region or patchy staining over the acrosome region were considered acrosome-reacted [38, 39]. Values of ZP-related acrosomal exocytosis were normalized by spontaneous acrosomal exocytosis observed in the negative control (sperm incubated in supplemented mHTF) under similar conditions. Sperm incubated with 10 μ M calcium ionophore A23187 (Sigma) were used as positive control.

Evaluation of Sperm Motility Changes after ZP Treatment

The motility patterns of capacitated sperm were examined after ZP treatments with a double approach: 1) manual assessment (World Health Organization progression evaluation system) and 2) computer-aided sperm analysis (CASA) using an IVOS system (version 12, Hamilton-Thorne Biosciences). For manual motility measurements, 200 sperm were evaluated at each incubation time by phase contrast microscopy (Nikon Optiphot) [40, 41]. The movement of every encountered sperm was graded as a, b, c, or d, as follows: a) rapid progressive motility, b) slow or sluggish progressive motility, c) nonprogressive motility, or d) immotility [35]. The percentage of progressive motility was defined as the sum of a + b divided by the sum of the total. As a positive control, sperm were incubated with 1 mg/ml pentoxifylline [42]. For

kinetic parameter evaluation, 5- μ l aliquots of treated or control sperm samples were placed on a 20- μ m-depth standard count analysis chamber (Leja Products), preheated at 37°C, and analyzed using the CASA system with settings according to the manufacturer's instructions. For every sample, approximately 10 randomly selected fields were evaluated, for a minimum total of 300 sperm. Average values were obtained for sperm motion parameters such as curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral displacement (ALH), linearity (LIN = VSL/VCL), and straightness (STR = VSL/VAP). Progressive motile sperm were defined by values of VAP > 20 μ m/sec and STR > 80%. Rapid or slow motile sperm cells were classified according to the CASA standard cutoff values for VAP or VSL. Slow cells were defined as cells with either of the following attributes: VAP < 20 μ m/sec or VSL < 30 μ m/sec. For analysis and characterization of ZP motility pattern, individual sperm track trajectories generated by CASA were identified by using a semiobjective approach [20]. Stored CASA files were played back, and sperm tracks showing a characteristic pattern of motility marked by side-to-side head movements and rapid spinning in place with frequent short translational movements (biphasic pattern) were considered for further analysis and classification modeling [43].

Statistical Analysis and Modeling

Statistical analyses were carried out using the Graph Pad Statistical Package. The results are presented as the mean \pm SE and were analyzed by ANOVA and Tukey HSD test for post hoc comparisons. When appropriate, *P* values < 0.05 were considered significant.

The motility patterns of sperm stimulated by ZP proteins were characterized by the Classification and Regression Trees software system (CART, version 4.0; Salford Systems) as previously described [43]. Technically, the CART algorithm constructs a binary decision tree wherein the relative importance of a variable/parameter is measured by the order in which it was selected in the decision tree and the number of correct predictions for which it is credited. The program constructed classification trees using the training set, and after V-fold cross-validation, the accuracy of each classification tree was then challenged with the test set. For our purpose, a multiparametric approach based on CASA analysis of two groups was considered: ZP-treated sperm tracks (40 sperm tracks from ZP incubations; CART group 1) vs. controls (43 sperm tracks from control mHTF medium incubations; CART group 0). CART estimated the threshold for each sperm kinetic parameters and the pattern combination among them that best defined the ZP-stimulated motility status. Multiple classification trees were generated using this process, and the best-performing tree was chosen for additional testing. Finally, we used the resulting variables thresholds to define the ZP proteins stimulated motility status, determining sensitivity and specificity.

RESULTS

Recombinant ZP Proteins Can Be Prepared in Sf9 Insect Cells

The full-length cDNA's encoding for human ZP2, ZP3, and ZP4 were cloned into pAcHLT vectors with the purpose of expressing these proteins as polyhistidine-tagged fusion proteins in Sf9 insect cells, as has been successfully done by others [44, 45]. The recombinant hZP proteins were purified from harvested cells by Ni-NTA affinity chromatography under denaturing conditions (Fig. 1). Purified hZPs were characterized by SELDI-TOF-MS. The purified preparations were

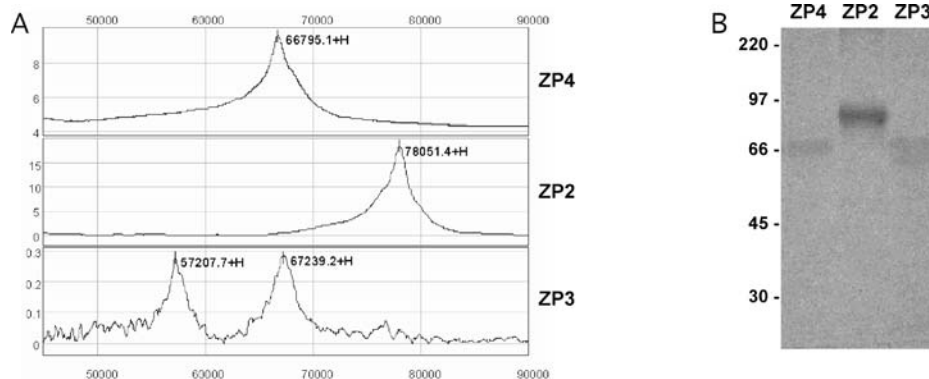
predominantly comprised of proteins with molecular masses of 78 051 for ZP2, 67 239 and 57 207 for ZP3, and 66 795 for ZP4, and major contaminants were absent (Fig. 1A). These values approximated the values expected for the polypeptides with some attached oligosaccharide moieties (the theoretical masses for the polypeptide moieties of these proteins are ZP2, 78 200; ZP3, 47 000; and ZP4, 59 400). The purified ZP proteins were also evaluated on immunoblots, probed with antibodies directed against native pig ZP (Fig. 1B); this antibody was previously shown to recognize native human ZP by immunohistochemistry [30]. The major constituents of the purified protein preparations were recognized by the antibody and possessed molecular weights similar to those observed by SELDI-TOF-MS. The expression of ZP3 as two molecular forms in this cell line has been previously described [30] and could be the result of differential glycosylation, as has been demonstrated for rabbit ZP1 expressed in Sf9 cells [44]. Although these results do not demonstrate that the recombinant proteins are identical to native human proteins (nor did we expect them to be, because the proteins were expressed in a heterologous system), the recombinant ZP proteins shared important properties in common with the native molecules (molecular mass and immunological reactivity).

Recombinant Human ZP Proteins Influence Acrosomal Exocytosis and Sperm Motility

To examine the biological activities of the ZP proteins, capacitated human sperm were incubated at different intervals with purified ZP2, ZP3, and ZP4 at a final concentration of 1 μ g/ml, and the effects on AE and motility were evaluated. The ZP effects on human sperm function in this study were determined primarily with a concentration of 1 μ g/ml. Experiments using 5 μ g/ml were also carried out, finding a similar effect with slightly higher values of AE. However, because the effects on AE were similar in both cases, the lower concentration (1 μ g/ml) was considered sufficient to fulfill the purpose of the analysis, which is at the lower range (1–100 μ g/ml) of baculovirus-expressed human ZPB and ZPC used to induce the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa [28].

Incubation of sperm in the presence of ZP3 and ZP4 resulted in significant increases in the numbers of sperm undergoing AE, whereas no significant changes were observed with ZP2 (Fig. 2A). AE induction was detectable as early as 10 min, and the velocity of AE stimulation was higher at shorter incubation times, although the stimulation of AE by either ZP3 or ZP4 was statistically significant only at 20 min of incubation. Combining ZP3 with ZP4 (0.5 μ g/ml each for a final concentration of 1 μ g/ml ZP protein) resulted in an effect on sperm AE similar to that observed with individual proteins. Comparable results

FIG. 1. SELDI-TOF-MS and immunoblot characterization of ZP proteins. **A**) SELDI-TOF-MS analysis of purified ZP4, ZP2, and ZP3 proteins. The purified proteins, analyzed on a WCX2 chip, have the following molecular masses: 66 795 for ZP4; 78 051; for ZP2, and 67 239 and 57 207 for ZP3. X-axis represents molecular mass (M/Z) and Y-axis signal intensity. **B**) Affinity-purified ZP proteins were separated on SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane for immunoblot analysis. Immunoblots were carried out using rabbit anti-pig ZP antibodies (anti-HSPZ).



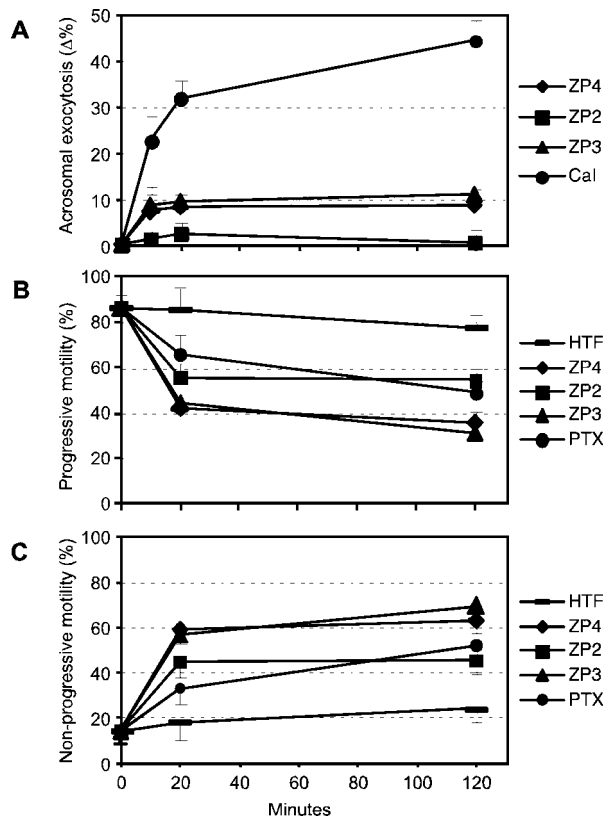


FIG. 2. Time course study of ZP2, ZP3, and ZP4 effects on sperm function. **A**) Percentage of acrosomal exocytosis (AE) of sperm treated with ZP2, ZP3, and ZP4. Acrosomal status was evaluated after staining with FITC-PSA and values were normalized against spontaneous AE. The percentage of AE over baseline ($\Delta\%$ AE) is plotted as a time function. AE after ZP4, ZP3, and calcium ionophore A23187 (Ca) treatment were higher than controls at 20 and 120 min time points ($P < 0.05$). **B** and **C**) Percentages of progressive (**B**) and nonprogressive (**C**) motility sperm after treatment with ZP2, ZP3 and ZP4. Results were normalized by total motile sperm. Progressive and nonprogressive motility were determined following World Health Organizations criteria (see *Materials and Methods* for details). Values in percentages are presented as the mean \pm SEM. Motility after ZP2, ZP3, ZP4, and pentoxifylline (PTX) treatments were different from controls at 20 min and 120 min time points ($P < 0.05$). $n = 8$ experiments, done with 3 different donors.

were obtained when sperm were incubated with ZP proteins in the presence of different protein concentrations (data not shown). In all cases, calcium ionophore was used as a positive control for the promotion of AE.

Besides the stimulation of AE by ZP3 and ZP4, changes in the patterns of sperm motility occurred in sperm treated with the three recombinant glycoproteins. Individually, ZP2, ZP3, and ZP4 were able to cause a significant decrease in the proportion of progressively motile sperm while increasing the relative number of nonprogressively motile sperm compared to the negative control (Fig. 2, B and C). The effect was more pronounced when the sperm were incubated with ZP3 or ZP4 compared to ZP2. The induced AE and motility changes showed no significant differences between 20 and 120 min, indicating that the effect of these proteins on these two sperm parameters was completed by 20 min. Sperm incubations with ZP2, ZP3, and ZP4 were also performed for longer incubation times (24 h) but showed no further increase in AE. Total motility decreased, but the percentages of sperm with progressive and nonprogressive motility remained constant beyond 120 min incubation (data not shown).

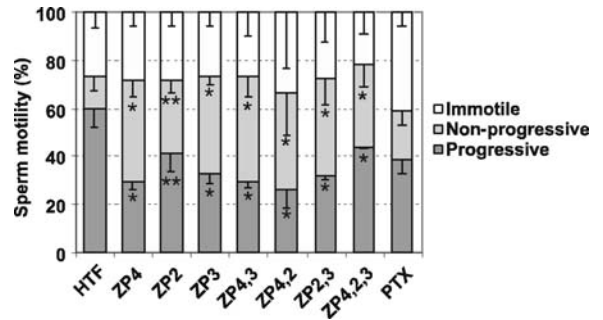


FIG. 3. Motility analysis of sperm after incubation with ZP2, ZP3, and ZP4. Motility percentage distribution of sperm according to progressive motility, nonprogressive motility, and immotility after incubation with ZP2, ZP3, and ZP4 and their different combinations at 20 minutes incubation time. Single or combined ZP incubations were done at a final protein concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bars represent mean motility \pm SEM from 8 (for mHTF, ZP4, ZP2, ZP3, and PTX) and 4 (for ZP combinations) sperm samples from 3 different donors. Progressive and nonprogressive motility values for ZP4; ZP3; ZP4 and ZP3; ZP4 and ZP2; ZP2 and ZP3; and ZP4, ZP2, and ZP3 are different from control ($*P < 0.01$). Progressive and nonprogressive motility values for ZP2 treatment are different from control ($**P < 0.05$).

Combinations of ZP Have an Additive Effect on Sperm Motility

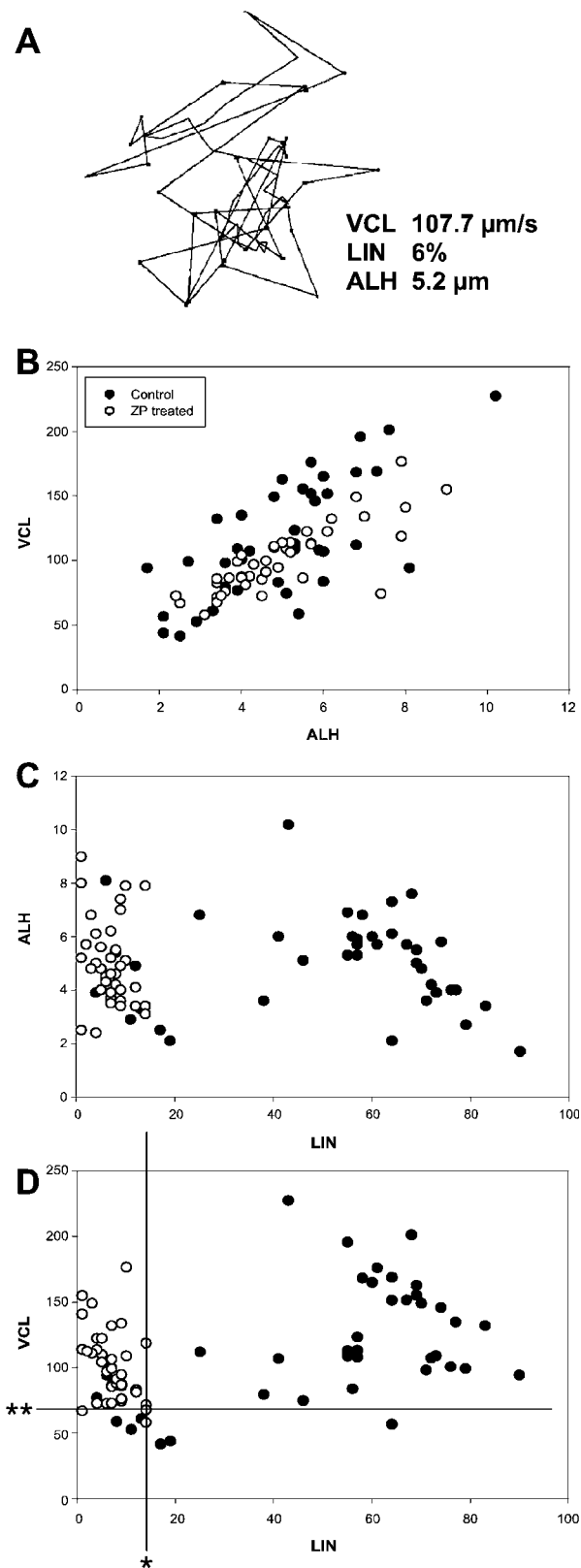
Because the ZP is composed of multiple proteins, we hypothesized that the treatment of sperm with combinations of recombinant ZP proteins may have additive or synergistic effects. When sperm motility analysis was assessed after 20 min incubation with ZP2, ZP3, or ZP4, alone or in combination, the sperm treated with a protein mix displayed a considerable attenuation in the number of sperm with progressive motility and an increase in the number of sperm with nonprogressive motility (Fig. 3), as previously seen with individual ZP proteins. However, the combination of ZP proteins did not elicit a synergistic effect on sperm motility when compared to the ZP individual treatments. After statistical analysis, the percentage of motile cells remained stable for all treatments including the negative control, suggesting that ZP proteins influence motility patterns without promoting immotility. Treatment of sperm with pentoxifylline (PTX) as a positive control for the stimulation of sperm motility augmented the percentage of immotile cells in the samples ($P < 0.05$).

Recombinant Human ZP Influences the Quality of Sperm Motility

From our manual assessment of motility, we observed that, besides the increase in nonprogressive motility after ZP treatment, there was a higher incidence of a distinct type of movement (Fig. 4A). To perform an objective evaluation, CASA was performed to delineate motility pattern changes after sperm incubation with the ZP proteins. A preliminary study was carried out considering the kinetic parameters to classify sperm movement into different types: progressive motility and rapid or slow motility, according to CASA settings. Data from the initial analysis confirmed the results obtained by our manual assessments of motility, in which ZP treatments promoted an increase in slow motility and decreases in progressive and rapid motility. Nevertheless, no significant differences were detected in the average kinetic parameters among sperm samples incubated under control conditions or with the various experimental treatments (data not shown).

To perform a more extensive analysis of sperm motility following ZP treatment, individual tracks of ZP-treated and

control sperm were selected and compared by CASA. After plotting the kinetic parameter values of individual sperm tracks in many ways, we found that the parameters of VCL, ALH, and LIN could differentiate the sperm tracks into two motility subpopulations (Fig. 4, B–D). When the previously established



thresholds for hyperactivation [20]— $LIN \leq 65$, $ALH \geq 7.5$, $VCL \geq 100$ —were applied to the subpopulation of the nonprogressive sperm treated with ZP, these cells did not fit a strict definition of hyperactivation, but did show a hyperactivated-like swimming pattern, which we term ZP-influenced motility. To perform an initial characterization of this pattern, sperm were classified into ZP-influenced or non-ZP-influenced motility groups by manual evaluation of sperm tracks registered by CASA. To refine the differentiation of ZP-influenced motility from the other patterns, we analyzed the CASA-derived values by a multiparametric classification and regression tree analysis with the CART computer program, which yielded cutoff values that were able to split the two groups. Figure 4D shows the combined CASA/CART analysis illustrating the two most suitable parameters to describe the ZP-influenced motility pattern, which was delineated by a sector bounded by VCL values greater than $63.9 \mu\text{m/s}$ and LIN scores less than 15.5%. Attempts to include ALH as a value to define ZP-influenced motility (as a motion pattern defined by three parameters) made the sort too restrictive, so that many sperm that visually could have been defined as ZP-influenced motility sperm would have been rejected. The sector in Figure 4D is reasonably pure; most of the sperm with ZP-influenced motility were correctly classified, and the sector contained few dots corresponding to control tracks (sensitivity of 97.5% and specificity of 92.5%). In addition, the two-dimensional scatterplot of Fig. 4B revealed that VCL and ALH were proportional and showed similar values for control and ZP-influenced sperm, so these two variables together are not useful to characterize the observed motility. ALH and LIN values could also be used to define sperm exhibiting the ZP-influenced motility pattern (Fig. 4C), but with a lower sensitivity and specificity than that observed with VCL and LIN values.

In a different set of experiments, the previously established multiparametric CASA/CART definition (Fig. 4D) was used to sort sperm samples from different donors treated with the ZP proteins for 20 min. Figure 5 shows the occurrence of sperm meeting this definition, as a subset of the slow motility sperm detected by CASA ($VSL < 30 \mu\text{m/sec}$ or $VAP < 20 \mu\text{m/sec}$). Sperm with ZP-influenced motility were considered slow sperm because they covered a very short distance (low VSL) as a consequence of the nonlinear swimming pattern (low LIN). Total sperm with slow motility and the subset sorted for ZP-influenced motility are presented as the percentage of total motile sperm meeting the appropriate criteria. In five experiments from three different donors, the relative frequency of motile cells identified as slow by CASA was similar to the frequency of nonprogressive sperm obtained by manual assessment (Fig. 3). However, the percentage of sperm with the ZP-influenced motility pattern increased for sperm treated

FIG. 4. CASA analysis of sperm motility and scatter plots of motion parameters for control and ZP-treated sperm. Sperm from a characterized donor with proven fertility were incubated for 20 min with medium (negative control) or medium plus ZP2, ZP3, or ZP4, individually or in all possible combinations, at a final protein concentration of $1 \mu\text{g/ml}$. Selected sperm tracks from control and ZP incubations were used to create a database for analysis of kinetic parameters changes. **A**) ZP motility characteristic pattern and kinetic parameters. **B**) 2D scatter plot of VCL vs. ALH. **C**) 2D scatter plot of ALH vs. LIN. **D**) 2D scatter plot of VCL vs. LIN with relevant kinetic parameters that separate control and ZP-treated sperm populations; the lines indicate the CART cutoff values obtained: * $LIN \leq 15.5\%$; ** $VCL > 63.9 \mu\text{m/s}$. The upper left quadrant of **D** defines the ZP-influenced motility sperm group. $n = 3$ sperm samples from one donor with proven fertility. LIN, Linearity; VCL, curvilinear velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement.

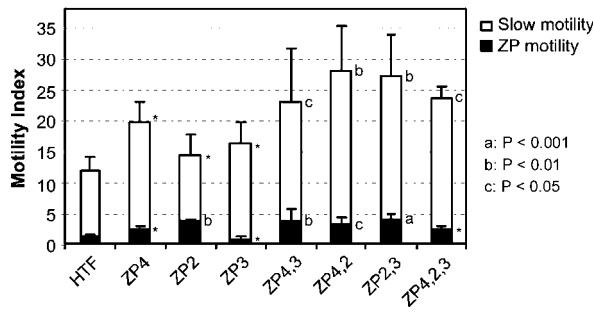


FIG. 5. Histogram of the relative frequency of cells with slow and ZP-influenced motility. Sperm were incubated for 20 min with HTF medium (negative control) or medium plus ZP2, ZP3, and ZP4, individually or in all their possible combinations, and analyzed by CASA. Slow motility values (VSL < 30 $\mu\text{m}/\text{sec}$ or VAP < 20 $\mu\text{m}/\text{s}$) were obtained and tracks were sorted for ZP-influenced motility using the cutoff values obtained by CART. The motility index corresponds to the percentage of sperm with a given motility pattern divided by the percentage of sperm that were motile multiplied by 100. Values are presented as mean \pm SEM. All ZP treatments were compared vs. the HTF medium control for each group (slow or ZP motility) and statistical significance is indicated by the letters a ($P < 0.001$), b ($P < 0.01$), and c ($P < 0.05$). An asterisk indicates that the value is not statistically different from the HTF medium control. $n = 5$ sperm samples from three different donors.

with ZP2, ZP4/ZP3 mixture, ZP4/ZP2 mixture, or ZP2/ZP3 mixture, but not for sperm exposed to ZP4 alone, ZP3 alone, or ZP4/ZP2/ZP3 mixture.

DISCUSSION

The composition of the human ZP and functions of its component proteins are not well known at present because of the limited availability of native human ZP. Recent advances in molecular biology provide new tools and approaches to address these issues. For example, the Human Genome Project has led to the finding that the human ZP is composed of four proteins instead of the three originally described [46–48]. For clarity and consistency in this report, we have adapted the ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4 nomenclature recently approved by the Human Genome Organization [1–5]. However, when this study was initiated, only three human zona proteins were known and cloned, so our work presented here has addressed only the functions of ZP2, ZP3, and ZP4 (previously called ZP1 or ZPB by other investigators) [46, 49]. The absence of ZP1 in this study is probably not a critical issue because it is not very abundant in mammalian ZP [48]. Besides, ZP1 in the mouse zona is thought to function as a scaffold for the assembly of ZP2 and ZP3 into a complex macromolecular extracellular matrix [50]. Our experiments reported here used soluble, recombinant proteins.

In this study, we have demonstrated that recombinant human ZP2, ZP3, and ZP4 expressed in Sf9 insect cells are biologically active toward capacitated human sperm. Native ZP proteins are highly glycosylated, and research in various species, including human, support the concept that specific interactions between sperm and ZP are carbohydrate-mediated events. However, the state of glycosylation of the recombinant proteins expressed in insect cells is under investigation. When zona proteins are expressed in heterologous systems, varying functional results have been found. Mouse but not human sperm bind to oocytes from transgenic mice that express human ZP2 and ZP3 in place of the native murine homologues [51, 52]. These findings suggest that the species-specific recognition of the ZP is mediated, in part, by the mouse-specific glycosylation patterns regardless of the amino acid sequence.

On the other hand, the polypeptide backbone could be sufficient for sperm recognition in some mammals, because nonhuman primate sperm are able to bind to homologous ZP proteins expressed in *Escherichia coli*, a species incapable of synthesizing glycoproteins [53]. In our studies, the ZP2, ZP3, and ZP4 expressed in Sf9 insect cells were recognizable by a heterologous antibody and were larger than the sizes predicted from the original cDNA sequences [30]. This suggests that these proteins undergo posttranslational modifications during expression, such as glycosylation. However, the molecular weights of the recombinant proteins are different from the native proteins, indicating that the type and/or extent of glycosylation produced in our expression system differ from those observed in vivo.

The recombinant proteins promoted AE and induced changes in sperm motility. In our study, only ZP3 and ZP4 could stimulate AE. These results are similar to those recently published with recombinant hZP proteins expressed in Sf21 insect cells [28]. The extent of AE induction by ZP3 and ZP4 is notable, considering that values obtained using solubilized native ZP are about 20% [38, 54]. The stimulation of AE by ZP3 expressed in mammalian cell systems has been well documented, and this ZP component has been proposed as the primary ligand involved in the recognition of ZP by sperm [25]. However, these findings should be reexamined, given the recent demonstrations by Chakravarty et al. [28] and our findings reported here that another ZP glycoprotein, ZP4, stimulates AE. Indeed, the ZPB proteins from rabbit, pig, and primates (bonnet monkey) bind to homologous sperm [55–57], and there is evidence suggesting that Sf21-expressed ZP4 (hZPB) acts on AE via a G_i -independent receptor of the sperm different from that employed by ZP3 [28]. Initial studies in the porcine system suggest that ZPB (ZP4) has sperm ligand activity [58]; however, later studies from the same group found that hetero-oligomers of ZPC-ZPB (i.e., ZP3-ZP4 in the current terminology) are responsible for binding to boar sperm-associated zona receptors [56]. Whether our finding of the ZP4 effect on AE results from specific posttranslational modifications produced in the Sf9 insect cell line, such as variations in glycosylation patterns, or is endogenous to the nature of hZP4 requires further investigation.

The nature of capacitation and its relationship to important events of fertilization are unclear. Spontaneous acrosomal exocytosis can be viewed as a true physiological event that occurs more readily during the course or as a consequence of capacitation. During fertilization, AE can then be seen as a process initiated but progressing at a very slow rate during capacitation. Upon interaction with the ZP, the rate of fusion between the sperm plasma membrane and the outer acrosomal membrane would be accelerated, leading to the completion of this exocytotic process [10]. The stimulation of AE by ZP could promote the appropriate timing of events during fertilization. Besides the action of ZP on AE, the expressed proteins were also able to induce motility changes in the sperm. The effects we have observed here are original in nature; as far as we know, there are no previous studies concerning the effects of recombinant or native human ZP proteins on sperm motility and kinematics. This could be an important finding because it may indicate something new about how sperm penetrate the zona. We also found that the CASA analyses of the percentage of progressive and slow sperm after treatment were similar to those obtained by manual assessment; these findings echoed previous studies, thereby validating our approach [40, 41].

Most sperm that have been recovered from the ampullae of naturally mated species are hyperactivated [59], suggesting that

hyperactivated motility enables or prepares sperm for penetration through the cumulus mass [23, 60] and/or the ZP [20, 61]. In the present study, we have demonstrated that ZP proteins promoted a hyperactivated-like motility state, with kinetic parameters different from those used to classify hyperactivation according to criteria defined by Burkman [20]. The hyperactivated-like movements defined by CART suggested that kinetic parameters might differentiate the tracks of a population of ZP-treated sperm from other types of motility. We have found that the combination of VCL, ALH, and LIN could identify a subpopulation of sperm with a characteristic ZP-influenced motility. By CASA/CART analysis, the VCL and LIN values together could define this population with high sensitivity and specificity. ALH and LIN values could be also used to distinguish this group, but sensitivity and specificity are lower. Although the kinetic parameters of these tracks do not qualify the sperm to be classified as hyperactivated, the LIN and VCL values obtained were similar to those suggested by Burkman [20] and Robertson et al. [62] to define the "star-spin" kind of hyperactivated sperm motion. After sorting ZP-treated sperm using the cutoff values obtained by CART, sperm treated with ZP2, ZP3 plus ZP4, ZP2 plus ZP4, or ZP2 plus ZP3 displayed a higher incidence of hyperactivated-like motility. However, further investigation is required to determine whether this type of motility is truly different from hyperactivation or whether the kinetic cutoff values for the hyperactivation classification should be reevaluated to incorporate the ZP-treated sperm with the hyperactivated-like motility into this class.

Although AE acceleration and motility changes induced by ZP proteins may occur in parallel, they are not necessarily mediated by the same mechanism. For instance, sperm incubation with pertussis toxin does not affect sperm motility or binding to ZP, but it inhibits the ZP-induced AE [54]. Because the ZP ligands are not the same for each case, the sperm receptor mediating these events could be different. However, in both cases, soluble recombinant ZP proteins induce their effects very quickly, usually in a few minutes. It is possible that these proteins act in a redundant way, in view of the high homology between ZP proteins of the same species and the differences in glycosylation patterns obtained in each expression system. This observation may explain why porcine ZP proteins expressed in Sf9 cells are able to bind bovine sperm but not to boar sperm [63].

In contrast to that of many animal species, human sperm morphology is quite heterogeneous; in fact, both fertile and infertile men produce a high number of morphologically abnormal sperm [64]. In addition, sperm cells at various sites in the female reproductive tract differ in terms of their states of capacitation and patterns of motility. This observation agrees with the acrosomal exocytosis model, suggesting that, in the process leading from acrosome-intact to acrosome-reacted sperm, the existence of continuously variable intermediates as part of the acrosomal exocytosis occurs normally during the course of capacitation [11]. This concept could be valid not only for AE but also for other functional alterations happening during capacitation, such as the changes in the patterns of sperm motility.

Infertility has an important public health impact because it affects about 15% of couples of reproductive age worldwide, and the male factor accounts for up to 50% of all cases [65, 66]. In conventional *in vitro* fertilization, most of the conception failures attributable to sperm are derived from alterations in ZP interaction and penetration [67, 68], including disorders in ZP-induced AE [69]. To develop assays to study sperm-ZP interactions, it is necessary to have recombinant ZP proteins

with biological activity. Our data demonstrated that the recombinant glycoproteins used in this investigation have physiological activity in terms of promoting AE and modifying sperm motility patterns, the two phenomena that allow sperm to penetrate the ZP and reach the oocyte. In the future, the use of recombinant human ZP1 for sperm function studies should also be considered because it may yield important information regarding ZP structure-function relationships and their roles in fertilization. The recombinant human ZP2, ZP3, and ZP4 expressed in insect Sf9 cells have biological activity, so they can be used to analyze the complex mechanism involving sperm-ZP relationships, including acrosomal exocytosis or ZP penetration under normal and abnormal conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge Dr. Bayard Storey for the critical revision of this manuscript and Dr. Mariano Buffone for statistical assistance. Also, we thank all sperm donors.

REFERENCES

1. Conner SJ, Lefevre L, Hughes DC, Barratt CL. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod* 2005; 20:1148–1152.
2. Symbol Report: ZP1. Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee April 25, 2005. World Wide Web (URL: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:13187). (September 6, 2005).
3. Symbol Report: ZP2. Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee. April 25, 2005. World Wide Web (URL: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:13188). (September 6, 2005).
4. Symbol Report: ZP3. Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee. April 25, 2005. World Wide Web (URL: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:13189). (September 6, 2005).
5. Symbol Report: ZP4. Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee. April 25, 2005. World Wide Web (http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:15770). (September 6, 2005).
6. 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.
7. 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.
8. Bray C, Son JH, Meizel S. A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. *Biol Reprod* 2002; 67:782–788.
9. Roldan E, Murase T, Shi Q. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 1994; 266:1578–1581.
10. Kim KS, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol* 2003; 264:141–152.
11. Gerton GL. Function of the sperm acrosome. In: Hardy DM, (ed.), *Fertilization*. San Diego: Academic Press; 2002:265–302.
12. Bourne H, Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. *Fertil Steril* 1995; 63:1329–1332.
13. Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *Dev Biol* 1987; 121:559–567.
14. Morales P, Cross NL, Overstreet JW, Hanson FW. Acrosome intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 1989; 133:385–392.
15. Valdivia M, Sillerico T, De Ioannes A, Barros C. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. *Zygote* 1999; 7:143–149.
16. Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K. Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 61:1649–1654.
17. Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. Identification of a secondary sperm

- receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 1988; 128:376–385.
18. Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970; 23:193–196.
 19. Morales P, Overstreet JW, Katz DF. Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *J Reprod Fertil* 1988; 83:119–128.
 20. Burkman LJ. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril* 1991; 55:363–371.
 21. Murad C, De Lamirande E, Gagnon C. Hyperactivated motility is coupled with interdependent modifications at axonemal and cytosolic levels in human spermatozoa. *J Androl* 1992; 13:323–331.
 22. Grunert JH, De Geyter C, Nieschlag E. Objective identification of hyperactivated human spermatozoa by computerized sperm motion analysis with the Hamilton-Thorn sperm motility analyser. *Hum Reprod* 1990; 5:593–599.
 23. Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 1990; 11:195–203.
 24. Oehninger S, Mahony M, Ozgur K, Kolm P, Kruger T, Franken D. Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril* 1997; 67:1121–1127.
 25. van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuys 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. 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.
 27. Bray C, Son JH, Kumar P, Harris JD, Meizel S. A role for the human sperm glycine receptor/Cl(–) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod* 2002; 66:91–97.
 28. Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod* 2005; 11:365–372.
 29. Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu de Y, Gook DA, Garrett C, Dunlop ME, Baker GH. Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl* 2004; 6:3–13.
 30. Cariño C, Prasad SV, Skinner S, Dunbar B, Chirinos M, Schwoebel E, Larrea F, Dunbar BS. Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod Biomed Online* 2002; 4:116–126.
 31. Weinberger SR, Dalmasso EA, Fung ET. Current achievements using ProteinChip Array technology. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6:86–91.
 32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
 33. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350–4354.
 34. Dunbar BS. Two-Dimensional Electrophoresis, and Immunological Techniques. New York: Plenum Press; 1987.
 35. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, U.K. Cambridge University Press; 1999.
 36. Gamzu R, Yavetz H, Lichtenberg D, Paz G, Homonnai Z, Yogev L. The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida. *Fertil Steril* 1994; 62:1221–1225.
 37. Cross NL, Overstreet JW. Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamet Res* 1987; 16:23–35.
 38. 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.
 39. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Rooyen LH. Clinical importance of a micro-assay for the evaluation of sperm acrosome reaction using homologous zona pellucida. *Andrologia* 2001; 33:87–93.
 40. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod* 1993; 8:1087–1092.
 41. Alvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 1982; 27:1102–1108.
 42. Nassar A, Morshedi M, Mahony M, Srisombut C, Lin MH, Oehninger S. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia* 1999; 31:9–15.
 43. Young RJ, Bodt BA. Development of computer-directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions. *J Androl* 1994; 15:362–377.
 44. Prasad SV, Mujtaba S, Lee VH, Dunbar BS. Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system. *Biol Reprod* 1995; 52:1167–1178.
 45. Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, Liu HF. Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif* 1999; 16: 298–307.
 46. Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* 1994; 4:361–393.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Prasad SV, Skinner SM, Cariño C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 2000; 166:148–164.
 50. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:415–442.
 51. Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 1998; 125:2415–2424.
 52. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 2003; 5:33–43.
 53. Gahlay GK, Srivastava N, Govind CK, Gupta SK. Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa. *J Reprod Immunol* 2002; 53:67–77.
 54. Lee MA, Check JH, Kopf GS. A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1992; 31:78–86.
 55. Prasad SV, Wilkins B, Skinner SM, Dunbar BS. Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 519–529.
 56. Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. Heterologous oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 1998; 273:7488–7494.
 57. Govind CK, Gahlay GK, Choudhury S, Gupta SK. Purified and refolded recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli* binds to spermatozoa. *Biol Reprod* 2001; 64:1147–1152.
 58. Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD. Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the alpha glycoprotein component of the Mr = 55 000 family. *Biol Reprod* 1989; 41:523–532.
 59. Suarez SS, Katz DF, Overstreet JW. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* 1983; 29:1277–1287.
 60. Mortimer ST, Swan MA. Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 Hz. *Hum Reprod* 1995; 10:873–879.
 61. Stauss CR, Voita TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; 53:1280–1285.
 62. Robertson L, Wolf DP, Tash JS. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 1988; 39:797–805.
 63. Yonezawa N, Kudo K, Terauchi H, Kanai S, Yoda N, Tanokura M, Ito K, Miura K, Katsumata T, Nakano M. Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J Biol Chem* 2005; 280:20189–20196.
 64. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46:1118–1123.
 65. Sherins RJ. Are semen quality and male fertility changing? *N Engl J Med* 1995; 332:327–328.
 66. 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.
67. Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15:702–708.
68. 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.
69. Liu DY, Baker HW. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9:1694–1700.