



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

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

**PRESENTA:
SUÁREZ OSNAYA CELIA JAZMÍN**

MÉXICO, D.F.

2010





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: DR. Francisco J Plasencia de la Parra.

Vocal: Dra. Martha Alicia Menjivar Iraheta

Secretario: Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín

1er Suplente: Prof. Perla D Maldonado Jiménez

2do Suplente Prof. Rosalba Esquivel Cote

Sitio donde s desarrollo en proyecto de investigación:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran"
Departamento de Biología de la Reproducción

Mayel del Valle Chirinos E.
Asesor del Tema

Celia Jazmín Suárez O.
Sustentante

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubiran”, bajo la Tutoría de la Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín. Este trabajo fue apoyado por las becas de CONACyT a nombre del Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción el Dr. Fernando Larrea Gallo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en el camino de la vida por no abandonarme en los momentos críticos y por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida con salud y satisfacción junto a mis seres queridos.

A mis padres por sus consejos, paciencia, comprensión, amor y por brindarme su apoyo para cumplir mis metas. GRACIAS

A mis hermanos, Rosy, Hector, Claudia, Julio, Rosario, Edgar, por apoyarme en cada momento de mi vida.

A Rodolfo por compartir esta etapa de mi vida por sus valiosos consejos y por su amor.

Al departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubiran” por brindarme las herramientas necesarias para la realización de mi trabajo de tesis.

Al jefe de Departamento el Dr. Fernando Larrea Gallo por permitirme desarrollar mi trabajo y adquirir nuevos conocimientos.

A la Dra. Mayel por transmitirme sus conocimientos, guiarme durante este trabajo y sobre todo por su calidad humana.

A Helen y Analilia por ayudarme en todo momento a realizar mi trabajo en el laboratorio por sus consejos y enseñanzas en todos los aspectos.

A Nancy, Gaby, Paola, Memo por su amistad y por los buenos momentos que pasamos por escucharme y apoyarme.

A David Barrera por darme la confianza y buenos consejos por ser un ejemplo de superación.

A los profesores Martha Menjivar y Javier Plasencia por su buena disposición y consejos para superarme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. de proyecto 47011)

ÍNDICE

Abreviaturas	9
RESUMEN	10
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Fecundación.....	11
1.2 Gameto femenino	11
1.3 Gameto masculino	14
1.3.1 Maduración del espermatozoide en el epidídimo y formación del semen	21
1.4 Capacitación	24
1.5 Reacción acrosomal.....	25
1.6 Interacción entre gametos.....	28
1.6.1 Interacción del espermatozoide con la ZP	28
1.6.1.1 Modelos de unión espermatozoide–zona pelúcida.....	30
1.6.1.2 Receptores del espermatozoide que participan en la interacción entre gametos	31
1.6.2 Fusión de gametos	35
2 JUSTIFICACIÓN.....	36
3 OBJETIVOS.....	37
4 METODOLOGÍA.....	38
4.1 Obtención y purificación de las proteínas recombinantes de la ZP.....	38
4.2 Caracterización de las proteínas obtenidas	39
4.2.1 SDS-PAGE	39
4.2.2 Western Blot.....	39
4.3 Muestras de semen humano.....	40
4.4 Obtención de los espermatozoides móviles y capacitados	40
4.5 Inducción de la reacción acrosomal	41
4.6 Extracción de las proteínas de espermatozoide	42
4.7 Espermoblot.....	42

4.8 Ensayo de captura de ligandos: <i>Ligand Pull Down</i>	43
4.8.1 Biotinilación de proteínas de espermatozoide	44
4.8.2 Uso de entrecruzadores.....	44
4.9 Secuenciación de las proteínas	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes de la ZP	46
5.2 Evaluación de la actividad biológica de las proteínas recombinantes de la ZP mediante inducción de la reacción acrosomal.....	47
5.3 Preparación del extracto de proteínas de espermatozoide	48
5.4 Espermoblot.....	48
5.5 Captura de receptores espermáticos	49
5.6 Secuencia de péptidos de las proteínas aisladas para su caracterización	55
6 DISCUSIÓN.....	57
7. CONCLUSIONES.....	62
ANEXO 1	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Aparato reproductor femenino	12
Fig. 2 Estructura del ovario y desarrollo del folículo.....	14
Fig. 3 Epitelio seminífero.....	15
Fig. 4 Espermatogénesis.....	18
Fig. 5 Espermioyogénesis y de un espermatozoide maduro	20
Fig. 6 Curso de la reacción acrosomal	26
Fig. 7 Mecanismos implicados en la reacción acrosomal	28
Fig. 8 Modelo de la estructura de la ZP de ratón	29
Fig. 9 Caracterización de las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4	46
Fig.10 Gráfica de la reacción acrosomal inducida por las proteínas recombinantes	47
Fig.11 Análisis del extracto de proteínas de espermatozoide obtenidas en condiciones no desnaturalizantes.....	48
Fig. 12 Análisis del espermoblot mediante western blot.....	48
Fig. 13 Análisis de receptores espermáticos	49
Fig. 14 Análisis de las proteínas de espermatozoide biotiniladas	51
Fig. 15 Análisis electroforético SDS-PAGE en gel al 12% para observar las proteínas de espermatozoide que se unen a ZP3 utilizando diferentes compuestos entrecruzadores	52
Fig. 16 Análisis electroforético SDS-PAGE en un gel de acrilamida del 10-15% de las proteínas de espermatozoide que se unen específicamente a las proteínas recombinantes de la ZP.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas adquiridas por el espermatozoide durante su tránsito por el epididimo	22
Tabla 2. Principales proteínas de espermatozoide que están involucradas en la interacción de gametos	34
Tabla 3. Valores de referencia establecidos por la OMS para muestras de semen humano	40
Tabla 4. Pesos moleculares estimados de las proteínas de espermatozoide aisladas.....	55
Tabla 5. Secuencias de las proteínas de espermatozoide obtenidas mediante ensayos de unión spm-ZP	55

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ZP	Zona pelúcida
spm	Espermatozoides
R.A.	Reacción acrosomal
Gal T	Galactosiltransferasa
HSA	Albúmina sérica humana
BSA	Albúmina sérica bovina
IP ₃	Inositoltrifosfato.
DAB	Diaminobencidina
PBS	Tampón salino de fosfatos modificado
PIP ₂	Fosfoinositol bifosfato.
PLA, PLC, PLD	Fosfolipasas A, C, y D.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
AMPc	Adenil monofosfato cíclico
Cal	Ionóforo de Calcio A23187
HTFs	Medio HTF suplementado
HTFss	Medio HTF sin suplementar
OMS	Organización Mundial de la Salud
rhZP	Proteínas recombinantes de la zona pelúcida
rpm	Revoluciones por minuto
Ctrol	Control
RER	Retículo endoplásmico rugoso

RESUMEN

La zona pelúcida (ZP) es la matriz extracelular del ovocito en los mamíferos, que en humanos está compuesta principalmente por tres glicoproteínas denominadas ZP2, ZP3 y ZP4. Para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito es necesario que atraviese la ZP, proceso que está mediado por receptores y ligandos específicos que inician la reacción acrosomal en el espermatozoide y permiten la penetración de la ZP para finalmente alcanzar el espacio perivitelino y la membrana plasmática del ovocito. Estudios realizados *in vitro* sugieren que algunos problemas de infertilidad masculina se derivan de deficiencias en el reconocimiento espermatozoide-ZP. Sin embargo, en humanos aún no se han identificado las moléculas que participan en los eventos tempranos de la fertilización, debido a la dificultad de obtener ZP donada por mujeres para su estudio. En consecuencia, las moléculas receptoras en la superficie del espermatozoide humano que participan en esta etapa de fertilización aún no han sido identificadas.

El propósito de este trabajo fue utilizar proteínas recombinantes de la ZP humana para aislar e identificar algunos de los receptores espermáticos que participan en la fecundación. Para ello, se prepararon las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 recombinantes, expresadas en la línea celular Sf9 empleando un sistema de baculovirus. Luego de purificar las proteínas de interés, éstas se emplearon para capturar, en ensayos de unión en fase sólida moléculas provenientes de espermatozoides humanos que se unen específicamente a las proteínas de la ZP. De este modo se aislaron algunos receptores espermáticos, los cuales fueron secuenciados para su identificación. Las moléculas aisladas fueron identificadas como serinas proteasas (que se unen a ZP2 y ZP3), la proteína de unión a S100P (que se une a ZP2) y la ubiquitina peptidasa 3 (que se une a ZP4). El papel de estas proteínas durante la fertilización está aún por determinarse, pero su caracterización permitirá entender mejor los complejos fenómenos asociados con la fertilización en humanos y realizar nuevas aproximaciones para el estudio y tratamiento de la infertilidad masculina.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 FECUNDACIÓN

La fecundación se define como la fusión de gametos que da lugar a la célula cigoto, la cual contiene la información genética necesaria para que desarrolle un nuevo individuo con características similares a los padres. Este fenómeno biológico constituye el eje fundamental de la reproducción sexual[1]. La fecundación es el resultado de varios acontecimientos moleculares coordinados en los que participa el gameto masculino y el femenino. El gameto femenino (ovocito) y masculino (espermatozoide) deben haber completado normalmente todas las etapas de maduración antes de ponerse en contacto para que la fecundación se lleve a cabo con éxito[2].

Los mayores avances en el conocimiento de la fecundación se han producido en el modelo de ratón. Sin embargo, los mecanismos y las bases moleculares implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito en otros mamíferos permanecen sin ser conocidos por completo, incluyendo el humano [3].

1.2 GAMETO FEMENINO

Los principales órganos del aparato reproductor femenino humano son los ovarios, las trompas de Falopio, el útero y la vagina (ver fig.1). El desarrollo de los ovocitos en los ovarios se lleva a cabo mediante un proceso denominado ovogénesis donde se forma el gameto femenino pasando de ovogonia a ovocito primario, ovocito secundario y finalmente a óvulo.

En humanos cada ovocito está rodeado de una única capa de células de la granulosa, lo que se denomina folículo primordial como se muestra en la fig. 2.

En el quinto mes de desarrollo, embrionario entre ovogonias y ovocitos primarios hay 7 millones de células de las cuales muchas degeneran y mueren. Al nacer, solo quedan aproximadamente 700,000 y se encuentran cerca de la corteza del ovario. Luego siguen degenerando, y al llegar a la pubertad quedan

aproximadamente 400,000 de los cuales un poco menos de 500 llegarán a ser ovulados.

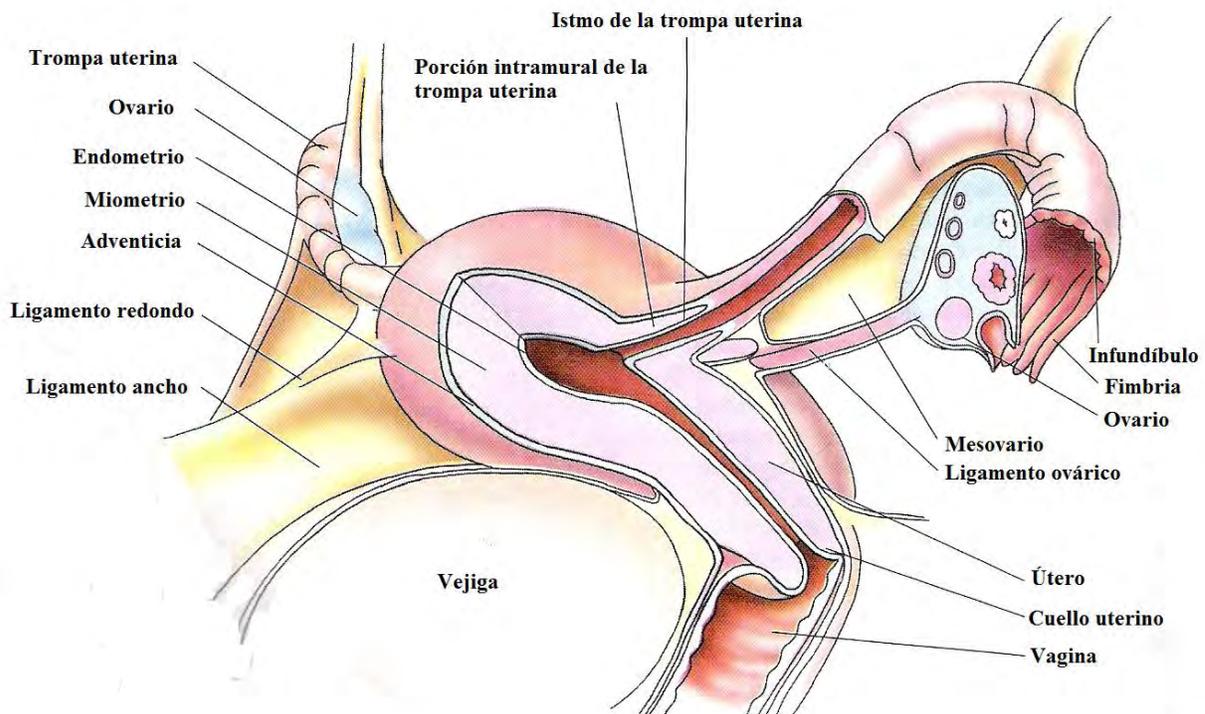


Fig.1 Esquema del la composición del aparato reproductor femenino[4]

Se cree que durante la niñez las células de la granulosa nutren al ovocito y secretan factores inhibidores de la maduración (OMI) que lo mantiene en su estado primordial, detenido en profase I de la división meiótica [4, 5].

En el periodo de edad comprendido entre los 10 y los 15 años, comienzan a madurar los folículos primordiales para convertirse en folículos maduros, pasando por varias etapas: (ver fig.2)

1. Transformación en folículo primario: Las células epiteliales planas pasan a ser cúbicas y las células foliculares del ovocito secretan una capa de mucopolisacáridos denominada zona pelúcida, la cual separa las capas de células foliculares (células de la granulosa) del ovocito. Por su parte, el tejido conjuntivo del ovario que rodea al folículo forma una membrana basal alrededor de la granulosa que se llama membrana folicular. Con esto termina la primera división meiótica del ovocito.

2. Transformación del folículo primario en secundario: De la primera división meiótica resulta un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar, que se sitúa entre la zona pelúcida y la membrana del ovocito. Esto ocurre alrededor del día 14 del ciclo menstrual. Posteriormente comienza la segunda división meiótica, la cual se detiene en metafase II. Se forma una cavidad folicular llena de líquido llamada antro, que tiene forma semilunar. La membrana folicular se divide en dos: teca interna o celular, que sintetiza hormonas esteroideas, y teca externa o fibrosa.

3. Transformación en folículo terciario: El antro aumenta de volumen mientras que las células de la granulosa que rodean el ovocito permanecen intactas y forman el cúmulo oóforo. Alcanzada la madurez, el folículo puede tener un diámetro de hasta 20 milímetros y se denomina folículo terciario, vesicular o de De Graaf.

En cada ciclo solamente llega a madurar completamente un folículo, mientras que los otros se vuelven atrésicos. Todos estos procesos están controlados por hormonas de la hipófisis. Cuando se produce la ovulación hay un pico de hormona luteinizante (LH), que provoca una rotura del folículo expulsándose el ovocito rodeado de la zona pelúcida y el cúmulo oóforo. El ovocito está detenido en la segunda división mitótica y para que complete la meiosis es necesaria la fecundación [5].

El cúmulo oóforo es una estructura que rodea a los ovocitos de mamíferos y está formado por las células de cúmulo y una matriz extracelular que une las células entre sí. La matriz es rica en ácido hialurónico y varias proteínas han sido identificadas como componentes de la misma, incluyendo el inter- α inhibidor de tripsina, un proteinglicano sulfatado y la proteína PTX3[6]. Para alcanzar el ovocito durante la penetración del cúmulo oóforo el espermatozoide interactúa con las células que lo forman, las cuales son capaces de sintetizar progesterona[7].

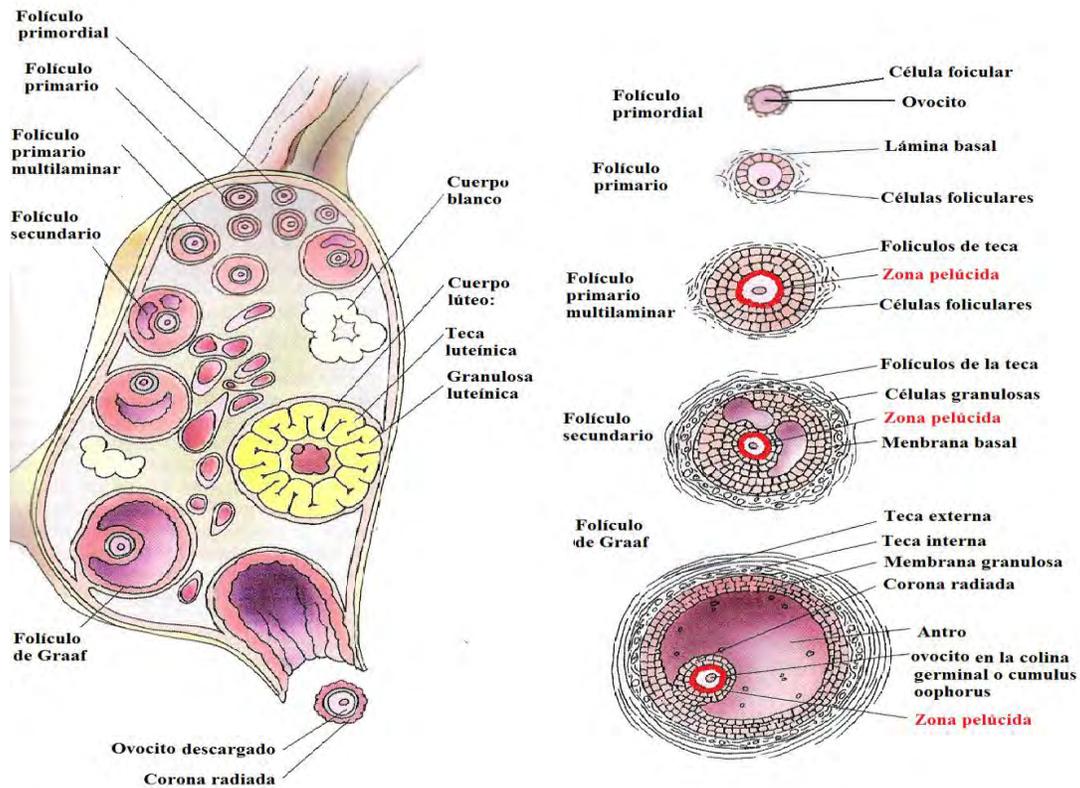


Fig. 2 Esquema de la estructura del ovario y desarrollo del folículo[4]

1.3 GAMETO MASCULINO

La reproducción en el hombre es una función integrada dependiente de la interacción de señales hormonales y nerviosas entre el sistema nervioso central, hipotálamo, hipófisis y testículo.

Los testículos, al igual que los ovarios, producen y liberan células germinales que se denominan espermatozoides por medio de un proceso conocido como espermatogénesis. Además, sintetizan hormonas esteroideas y peptídicas. Estas dos actividades se realizan en dos compartimentos diferentes, la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y la esteroidogénesis en las células de Leydig [8].

La espermatogénesis es la suma de transformaciones mediante las cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides. La espermatogénesis en el hombre se inicia en la pubertad y se mantiene durante toda la vida.

La mayor parte de las células que forman el grueso epitelio seminífero son células espermatogénicas en varias etapas de maduración (ver fig. 3). Las espermatogonias se encuentran en el compartimento basal, en tanto que el resto de las células en desarrollo (espermaticitos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides) se ubican en el compartimento luminal. Las espermatogonias son células diploides que entran en mitosis para formar más espermatogonias así como espermaticitos primarios, mismos que emigran desde la región basal hacia el compartimento luminal. Los espermaticitos primarios entran en la primera división meiótica para formar espermaticitos secundarios, que a su vez entran a la segunda división meiótica para formar células haploides conocidas como espermátidas o espermátidas. Estas células haploides se transforman en espermatozoides (células maduras), luego de eliminar parte de su citoplasma, rearreglar sus organelos y formar un flagelo (ver fig. 4).

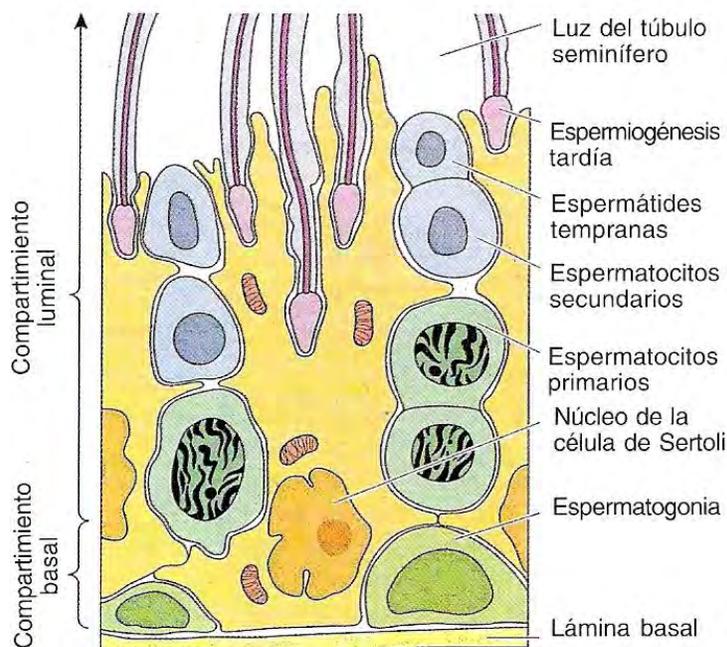


Fig. 3 Esquema del epitelio seminífero[4].

La espermatogénesis se divide en tres fases.

1. Espermatocinesis: Diferenciación de las espermatogonias en espermatocitos primarios.

Las espermatogonias son pequeñas células germinales ubicadas sobre la lámina basal del túbulo seminífero. En la pubertad, por influencia de la testosterona, las espermatogonias entran en el ciclo celular. Hay tres categorías de espermatogonias: oscuras de tipo A, pálidas de tipo A y pálidas de tipo B.

Las espermatogonias oscuras de tipo A son pequeñas con forma redondeada y tienen un núcleo oval con abundante heterocromatina que otorga un aspecto más denso al núcleo. Las espermatogonias oscuras de tipo A son células de reserva que no han entrado al ciclo celular pero que podrían hacerlo. Cuando entran a mitosis, forman más células oscuras de tipo A y células pálidas de tipo A y de tipo B.

Las espermatogonias pálidas de tipo A son idénticas a las oscuras, con excepción de que su núcleo es oval y claro, ya que contienen gran cantidad de eucromatina; tienen pocos organelos, entre ellos mitocondrias, un aparato de Golgi limitado, un poco de RER y numerosos ribosomas libres. La testosterona induce a estas células a proliferar y dar origen por mitosis a espermatogonias pálidas del tipo A y a espermatogonias del tipo B.

Las espermatogonias del tipo B son muy parecidas a las claras del tipo A, pero generalmente su núcleo es redondo más que aplanado [4].

2. Meiosis: División con reducción por la cual un espermatocito primario diploide reduce la cantidad de su material genético a la mitad formando espermátides haploides.

Tan pronto como se forman los espermatocitos primarios emigran desde el compartimento basal hacia el luminal. En su migración entre las células de Sertoli ayudan también a la formación de la zona ocluyente de las células de Sertoli y

conserva de este modo la integridad de la barrera hematotesticular. Los espermatoцитos primarios son las células más grandes del túbulo seminífero. Tienen un gran núcleo vesiculoso en los que se observan los cromosomas en diversas etapas de condensación. Los espermatoцитos primarios tienen un número diploide de cromosomas [9]. (Ver fig.4).

La profase I de la primera división meiótica tarda 22 días y pasa por cuatro estados: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diacinesis. Los cromosomas del espermatoцитo primario inician su condensación, forman grandes hebras durante el estado de leptoteno y se unen con sus homólogos en el estado de cigoteno. La condensación ulterior tiene como resultado la producción de cromosomas pequeños y anchos que se agrupan en tétradas, durante el estado de paquiteno. Durante la diacinesis, ocurre intercambio de segmentos (entrecruzamiento) entre los cromosomas homólogos; esta combinación genética al azar tiene como resultado un genoma único para cada gameto que contribuye a la variabilidad del material genético.

Durante la metafase I el par de cromosomas se alinea en el plano ecuatorial. Los integrantes de cada par emigran hacia los polos opuestos de la célula en la anafase I, y las células hijas se separan (aunque persiste un puente citoplasmático que da origen a un sincicio), lo que produce dos espermatoцитos secundarios durante la telofase I.

En la telofase I se completa la primera división meiótica, la cual es seguida de un breve periodo intercinético y se inicia la meiosis II sin que ocurra nueva síntesis de DNA. Durante la metafase II, los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y en la anafase II ocurre la división longitudinal del centrómero. La migración hacia los polos se completa en la telofase II. Por consiguiente, cada una de las dos células obtenidas en meiosis I originará a su vez otras dos, o sea cuatro en total. Cada uno de estos gametos tendrá un número haploide de 23 cromosomas [9].

Como los cromosomas homólogos se segregan en la anafase II, el cromosoma X y el Y se distribuyen al azar en espermaticitos secundarios diferentes y como resultado se producen espermatozoides que llevan el cromosoma X y otros Y. Por este motivo, los espermatozoides son los que determinan el sexo del futuro embrión.

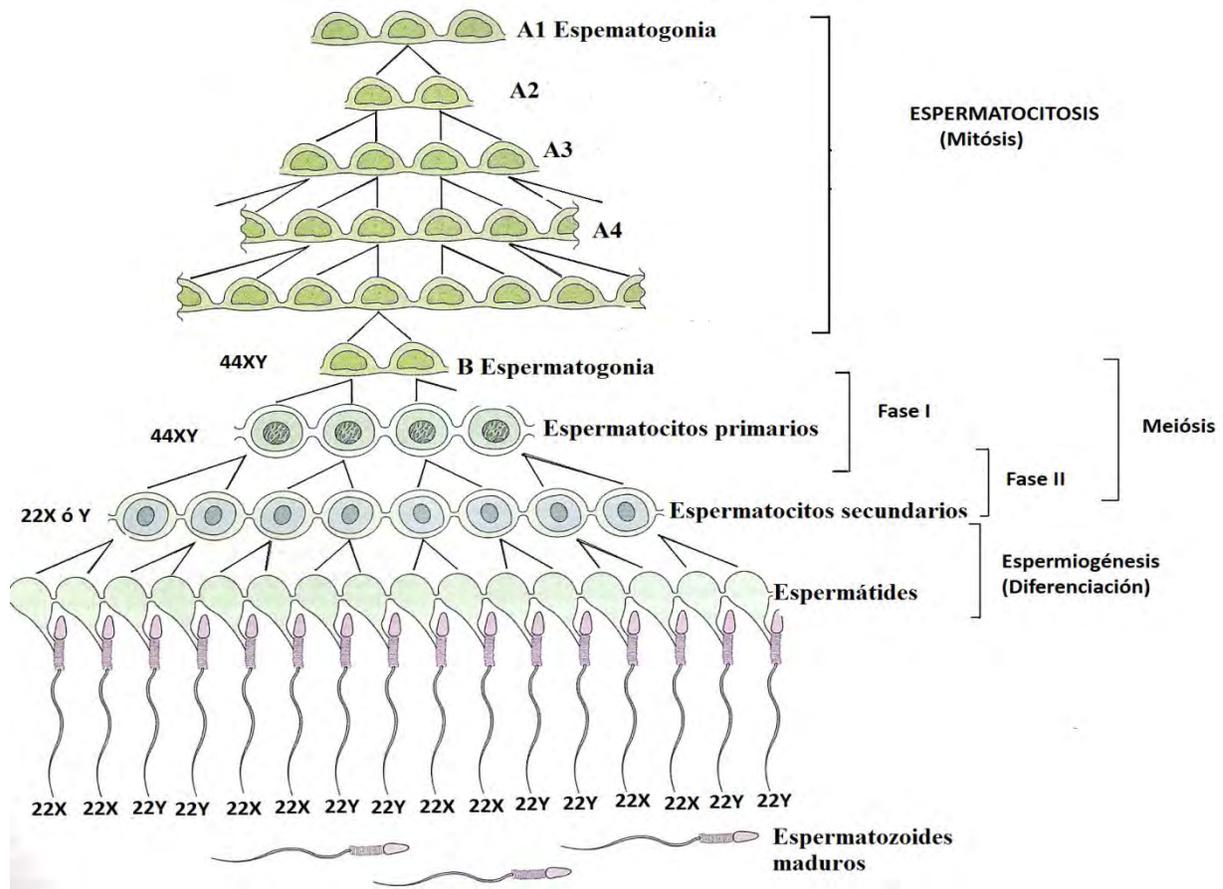


Fig 4. Esquema de la espermatogénesis [4].

3. Espermiogénesis: Transformaciones de las espermátides para formar espermatozoides.

Las espermátides son pequeñas y haploides (8µm diámetro). Todas las espermátides derivadas de una espermatogonia están unidas por un puente citoplasmático. Forman pequeños conglomerados y ocupan un lugar cercano a la vez del túbulo seminífero. Estas células tienen abundante RER, mitocondrias y

complejo de Golgi. Durante su transformación en espermatozoides, acumulan enzimas hidrolíticas, rearreglan sus organelos y los reducen en número, forman un flagelo y eliminan el citoplasma. Este proceso de espermiogénesis está subdividido en cuatro etapas (ver fig. 5).

Etapa de Golgi: En esta etapa, las enzimas hidrolíticas se forman en el RER, se modifican en el aparato de Golgi empacándose en la cara trans del Golgi como pequeños gránulos preacrosomales unidos a la membrana celular. Estos pequeños gránulos se fusionan entre sí y forman una vesícula acrosomal. La vesícula acrosomal entra en contacto con la membrana nuclear y se une a ella.

En tanto, los centriolos se alejan del núcleo y uno de ellos participa en la formación del flagelo. Una vez iniciada la generación de microtúbulos, los centriolos se regresan al núcleo y ayudan a la formación de la pieza intermedia, estructura que rodeara a los centriolos.

Etapa acrosomal: Esta se caracteriza por la presencia de varias alteraciones en la morfología de la espermátide. El núcleo se condensa, la célula se alarga y la mitocondrias cambia su ubicación. Los cromosomas se condensan más y quedan muy comprimidos. Conforme disminuye el tamaño de los cromosomas ocurre lo mismo con el tamaño del núcleo la condensación se acompaña de la sustitución de histonas por protaminas. Durante esta etapa la vesícula acrosomal aumenta su tamaño y su membrana rodea parcialmente al núcleo. Cuando esta vesícula alcanza su tamaño final se identifica como acrosoma [4].

Etapa de maduración temprana e intermedia. Los microtúbulos se ensamblan para constituir una estructura cilíndrica, la cual ayuda al alargamiento de la espermátide. En su lugar queda una pieza llamada anillo, estructura electrodensa que delimitará la unión de la pieza intermedia del flagelo con la pieza principal. Conforme se alarga la espermátide, sus mitocondrias se reúnen en una región detrás del núcleo. Aquí se forma una cubierta cilíndrica de mitocondrias que rodea a la región del axonema ubicada en la cercanía del núcleo y forma de este modo la pieza intermedia. A continuación, se forman nueve columnas alrededor del

axonema [4, 5]. Estas fibras densas se adhieren al flagelo formado durante la fase de Golgi. Después de su establecimiento, las fibras densas forman estructuras parecidas a anillos que se conocen como hoja o cubierta fibrosa.

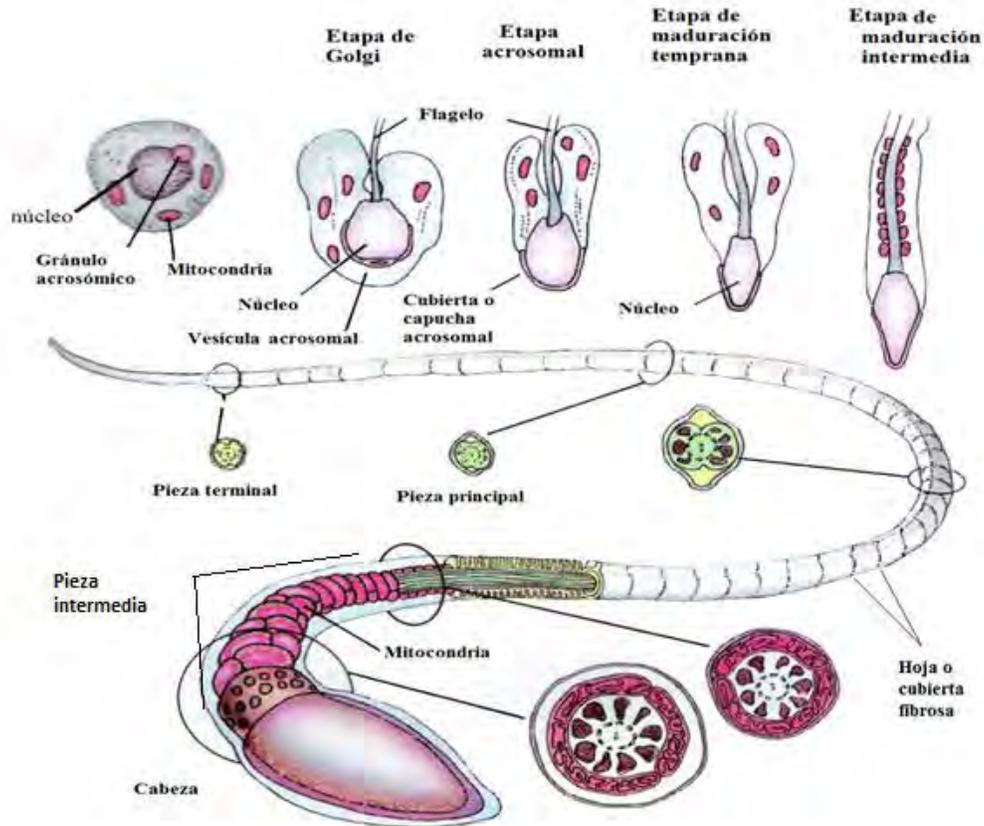


Fig. 5 Esquema de la espermiogénesis y de un espermatozoide maduro[4].

Etapa de maduración morfológica. La fase de maduración se caracteriza por pérdida del citoplasma por parte de la espermátide. Conforme se libera el exceso de citoplasma, el sincicio se rompe y se libera el espermatozoide. Las células de Sertoli fagocitan los residuos citoplasmáticos y los espermatozoides libres pasan

a la luz del túbulo seminífero. Una vez ahí son empujados hacia el epidídimo por cilios del epitelio, en donde sufren un proceso denominado maduración epididimal [4, 5].

1.3.1 MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL EPIDIDIMO Y FORMACIÓN DEL SEMEN.

Tras su formación en los túbulos seminíferos, los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo. Los espermatozoides extraídos de los túbulos seminíferos y de las primeras porciones del epidídimo son inmóviles e incapaces de fecundar al ovocito. Sin embargo, una vez que han permanecido en el epidídimo entre 3 y 4 días, adquieren la capacidad de moverse. Durante ese tiempo tiene lugar el proceso de especialización y maduración bioquímica la cual consiste en cambios en el tamaño y forma de la estructura del acrosoma y la distribución de las proteínas de superficie del espermatozoide, la cual se modifica internamente debido a la unión de moléculas de origen epididimario[10].

Además se incorporan proteínas denominadas factores descapacitantes como glicerilfosforilcolina y carnitina, con el objetivo de evitar que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal durante su estancia y trayecto por el tracto reproductor masculino[10].

Algunas de las proteínas de origen epididimario que han sido caracterizadas por participar en la interacción de gametos se muestran en la tabla 1.

Proteína	Ubicación	Función	Referencia
CRISP 1 y 4	Se detecta en la región acrosomal del espermatozoide humano	Participan en la interacción y fusión de gametos	Busso et al 2007[11] Cohen et al 2007[12]
β-defensinas	Se expresa en los testículos y epidídimo	Además de su actividad antimicrobial.	Zhou 2004[13]
SPAG1	Está presente en el acrosoma de los espermatozoides de ratón	Induce movilidad progresiva por un aumento de la concentración de calcio	Zhou 2004[13]
DEFB126	Está presente en el acrosoma de espermatozoides de macaco.	Está implicada en el paso del espermatozoide a través del moco cervical e interacción spm -ZP	Tollner et al 2004[14]
Carbonil reductasa PH34	Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo PH34 se acumula en la región acrosomal.	Es un miembro de la familia deshidrogenasa reductasa. Se ha sugerido que participa en la interacción spm-ZP	Sullivan 2004[15]

Tabla 1 Proteínas adquiridas por el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo.

Los espermatozoides que son eyaculados se acompañan de un líquido denominado fluido seminal, el cual les brinda protección y provee de nutrientes necesarios para que sigan su recorrido en el tracto femenino. El fluido seminal se compone de fluidos liberados a los conductos deferentes por las vesículas seminales, glándula prostática y pequeñas cantidades procedentes de las glándulas mucosas, especialmente las glándulas bulbo uretrales.

La glándula prostática secreta un líquido poco denso, lechoso que contiene citratos, calcio, fosfatos, una enzima de coagulación y profibrolisina. Durante el paso de los espermatozoides la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con la contracción del conducto deferente, de forma que el líquido poco denso de la glándula prostática contribuye con el volumen del fluido

seminal. El carácter ligeramente alcalino del líquido prostático puede ser muy importante para que se lleve a cabo con éxito la fecundación.

Las glándulas bulbo uretrales, también conocidas como glándulas de Cowper, son pequeñas y están ubicadas en la raíz del pene, exactamente donde empieza la uretra membranosa. El moco producido por estas glándulas es espeso y tiene como probable función lubricar la luz uretral. Estas son las primeras glándulas que excretan su material después de la erección del pene. Justo antes de la eyaculación se secreta el material prostático hacia la uretra, así como el fluido seminal con los espermatozoides que están en el ámpula del conducto deferente. La secreción prostática otorga al parecer la movilidad a los espermatozoides. La última secreción sale de las vesículas seminales, que son las encargadas del aumento del volumen del semen, y este líquido rico en fructuosa se utiliza para dar energía a los espermatozoides [4].

Durante este recorrido las vesículas seminales secretan un material mucoso rico en fructuosa, ácido cítrico y otras sustancias nutritivas, así como grandes cantidades de prostaglandinas y fibrinógeno. Se cree que las prostaglandinas ayudan de dos maneras a la fecundación, 1) reaccionando con el moco cervical para hacerlo más receptivo al movimiento de los espermatozoides y 2) desencadenando contracciones peristálticas del útero y de las trompas de Falopio para mover los espermatozoides hacia el ovocito [16, 17]. Finalmente el semen pasa por el pene, a través de la uretra penénea que contienen el tejido eréctil. El mismo consiste en espacios interconectados que permanecen vacíos en el pene flácido, pero que se llenan de sangre ante los impulsos sensoriales y psíquicos provocando así la erección y la expulsión del semen [5].

1.4 CAPACITACIÓN

El semen eyaculado se deposita en la vagina de la mujer y los espermatozoides deben atravesar el cuello del útero hacia las trompas. En el ámpula de la trompa se produce la fecundación, pero si el ovocito no ha sido liberado los espermatozoides pueden formar un reservorio en el istmo del oviducto el cual posee cilios luminales epiteliales y plegamientos de la mucosa que forman criptas. Los espermatozoides son retenidos en las criptas oviductales y allí pierden los factores decapacitantes como mucopolisacáridos y proteínas aportadas por las glándulas anexas[17].

Para que el espermatozoide llegue al ámpula del oviducto y pueda fecundar es necesario que pase por un proceso conocido como capacitación.

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide a su paso por el oviducto [18]. Dicho proceso produce cambios en la membrana plasmática que dan lugar a una remodelación de las moléculas de la superficie celular, la desestabilización de la membrana plasmática y la hiperactivación espermática, preparando al espermatozoide para que sufra la reacción acrosomal [18]. Algunos de los cambios bioquímicos que se producen son:

- Disminución del número de moléculas de colesterol presentes en la membrana plasmática.
- Aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y AMPc.
- Aumento del pH intracelular, variaciones en la concentración de especies reactivas de oxígeno.
- Modificación de los patrones de fosforilación de proteínas [19, 20].

El fluido oviductal es rico en albúmina y HDL, capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide lo que la hace más fluida y permite que las proteínas integrales puedan interactuar con las proteínas ancladas a la membrana.

La pérdida de colesterol favorece además la translocación de algunas proteínas a la zona ecuatorial, donde son necesarias para que el espermatozoide posteriormente pueda fusionarse con el ovocito.

La salida de colesterol durante la capacitación también induce la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y de los canales de HCO_3^- que se encuentran en la membrana plasmática del espermatozoide. El ingreso de HCO_3^- al citosol activa la adenilciclase dependiente de HCO_3^- que aumenta las concentraciones de AMPc, activando, a su vez, la proteína quinasa (PKA1) dependiente de AMPc; esta última fosforila algunas proteínas en los residuos de serina, desencadenando la fosforilación de las tirosinas de otras proteínas [17].

La fosforilación de residuos de tirosina en proteínas flagelares está acompañado de cambios en el patrón de movilidad, observándose la hiperactivación espermática que se caracteriza por un movimiento no progresivo, asimétrico, amplio y acelerado del flagelo. La hiperactivación espermática es necesaria para que los espermatozoides se liberen de las criptas oviductales, avancen a través del lumen hasta alcanzar el ámpula y atraviesen el cúmulo oóforo para entrar en contacto con la ZP [17].

In vitro, la capacitación puede ser simulada incubando espermatozoides epididimarios o eyaculados en un medio definido, cuya composición exacta varía según la especie. De forma general, estos medios están compuestos de una solución salina tamponada que contiene concentraciones adecuadas de electrolitos, sustancias que aportan energía, Ca^{2+} , bicarbonato y una fuente de proteína que generalmente es albúmina sérica bovina (BSA), aunque la función de los componentes mencionados durante la capacitación no es totalmente conocida [21].

1.5 REACCIÓN ACROSOMAL

Una vez que los espermatozoides interactúan con la ZP del ovocito se inicia un proceso excitotico conocido como reacción acrosomal (RA). Los espermatozoides de mamíferos tienen una vesícula secretora denominada acrosoma, la cual se encuentra en la cabeza de los espermatozoides y está conformada por

membranas que contienen numerosas enzimas hidrolíticas entre ellas proteasas acrosina, fosfatasa ácida, neuraminidasas y hialuronidasas [22, 23] (ver fig. 6).

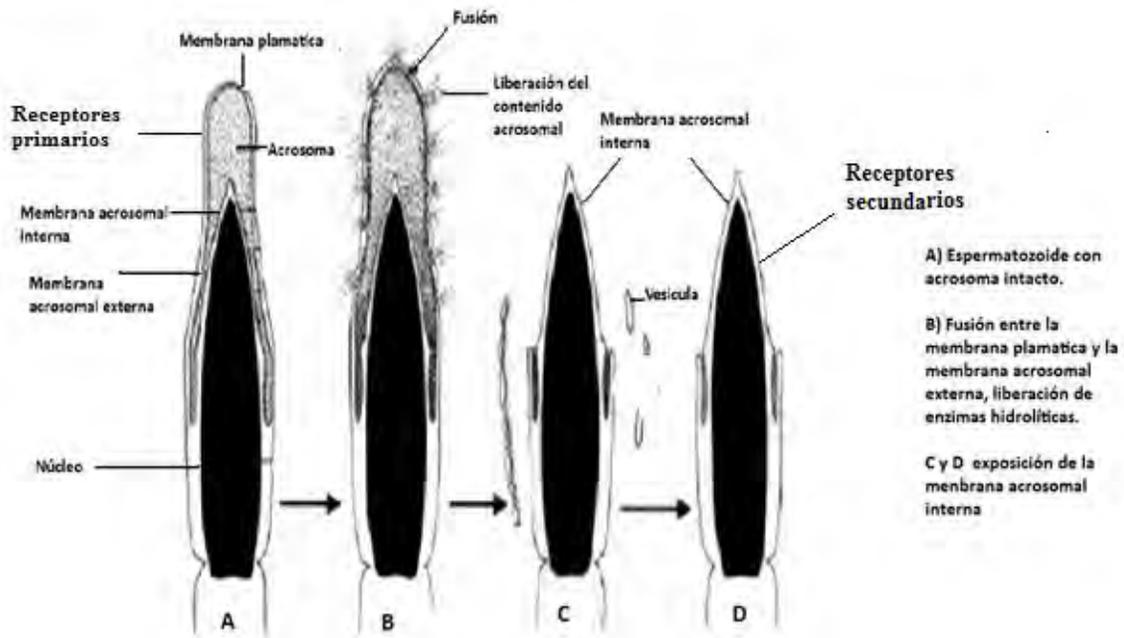


Fig. 6 Esquema del curso de la reacción acrosomal[7].

La RA consiste en la fusión de la membrana citoplasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza, originando vesículas de membrana que permiten la liberación de las enzimas almacenadas en el acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna (ver fig. 6). Las enzimas hidrolíticas liberadas son requeridas para que el espermatozoide pueda penetrar la ZP. Este proceso se desencadena cuando el espermatozoide reconoce ligandos específicos presentes en la ZP, la cual es el agonista de este fenómeno si bien la progesterona también puede desencadenar la RA [24].

La RA está mediada por una compleja cadena de señales celulares, las cuales incluyen la activación de proteínas cinasas y su consecuente fosforilación, activación de canales iónicos y otros procesos aún por definir, aunque algunos de estos se describen como característicos del proceso de capacitación [20, 25].

Al igual que en otros sistemas de exocitosis, un aumento citosólico de las concentraciones de calcio es suficiente y necesario para que se produzca la liberación del contenido acrosomal.

Un modelo para explicar los mecanismos implicados en el aumento de calcio intracelular y exocitosis en el espermatozoide como consecuencia de su unión a la ZP propone que el espermatozoide se une a la glicoproteína ZP3 (ver fig.7). El receptor (R) del espermatozoide está acoplado a una proteína G, que activa la fosfolipasa C β 1 (PLC β 1) y podría regular la actividad de la adenilato ciclasa (AC) para producir AMPc y activar la proteína cinasa A (PKA). Esta PKA activaría un canal dependiente de calcio situado a nivel de la membrana acrosomal externa, que liberaría Ca^{2+} desde el interior del acrosoma hacia el citosol. Este es el primer aumento de Ca^{2+} intracelular, relativamente pequeño, el cual permite la activación de la fosfolipasa C (PLC) [20].

La activación de las fosfolipasas PLC β 1 (mediante la proteína G acoplada al receptor R) y la PLC γ (mediante el ligero aumento de calcio por movilización desde el acrosoma), generaría la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) para formar inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La PKA y el IP3 activan los canales de Ca^{2+} en la membrana acrosomal externa provocando aumento de calcio intracelular mediante movilización desde el acrosoma.

Por otro lado, el DAG (producto de la hidrólisis del PIP2) activa la PKC, la cual provoca la apertura de los canales de calcio en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular al citosol. Como consecuencia se produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la concentración acrosomal disminuye dando lugar a la apertura de los canales de Ca^{2+} de los almacenes, llamados SOC (store opens channels), lo que provoca un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Este fenómeno llamado entrada de calcio capacitativo se produce en un gran número de células y consiste en la liberación de calcio de los depósitos de la célula, lo que a su vez también promueve la entrada de calcio extracelular a través de la membrana plasmática[20].

Por otra parte en la RA es necesario que se produzca la despolimerización de la F-actina, por ser un requisito necesario para que la membrana acrosomal externa y la parte interna de la membrana plasmática puedan ponerse en contacto íntimamente y fusionarse. Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular (sobre 500 mM) que se producen como consecuencia de la inducción de la RA, provocan la activación de proteínas cortadoras de actina, que inducen la ruptura de los filamentos de actina y el desmantelamiento de la estructura de sostén entre ambas membranas, permite que se fusionen y libere el contenido del acrosoma [26].

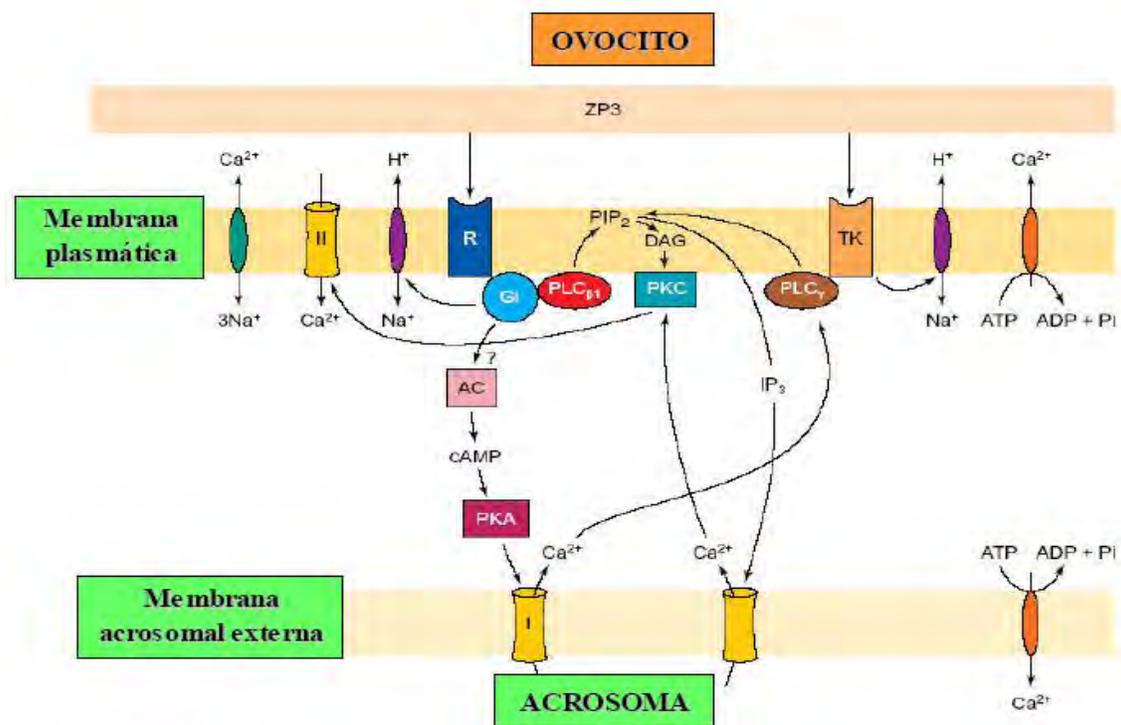


Fig. 7 Representación esquemática de los mecanismos implicados en la reacción acrosomal[27]

1.6 INTERACCIÓN ENTRE GAMETOS

La interacción del espermatozoide con el ovocito se produce en dos etapas primero con la ZP y posteriormente con el oolema.

1.6.1 INTERACCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON LA ZP

Alrededor del ovocito de los mamíferos se encuentra una matriz extracelular que está presente desde el folículo primario hasta la implantación en el útero, denominada zona pelúcida (ZP). Esta cumple importantes funciones durante la

fecundación, ya que media la interacción espermatozoide-ovocito de manera especie específica [28], previene la polispermia y brinda protección al embrión hasta su implantación [3, 29].

La ZP es una estructura compuesta por glicoproteínas sulfatadas de número variable según la especie. En humanos está compuesta por cuatro glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, los cuales actúan como ligandos para la unión de los espermatozoides. La glicoproteína ZP1 se encuentra presente en baja abundancia en la ZP de humanos por ello es difícil su obtención y su identificación solo se logró en años recientes [29].

A pesar de su sencilla composición, los mecanismos de interacción entre el espermatozoide y la ZP siguen sin ser comprendidos por completo, por lo que numerosos estudios se han realizado en diferentes especies para conocer la ultraestructura de la ZP al igual que su composición bioquímica y molecular [28, 29]. Los mayores avances se han producido en el conocimiento de la fecundación en ratón, donde se ha determinado que la ZP está formada por un entramado de fibras compuestas de dímeros repetitivos de ZP2:ZP3 unidos entre sí por moléculas de ZP1 [29] (ver Fig.8).

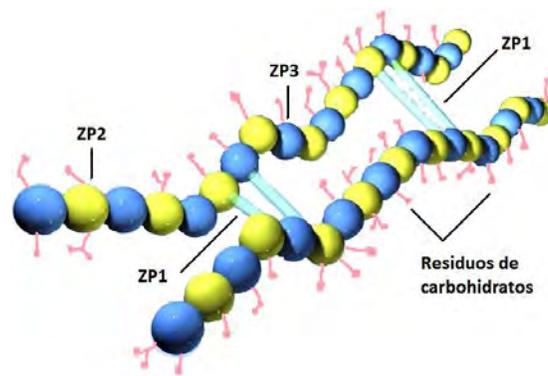


Fig.8 Modelo de la estructura de la zona pelúcida de ratón

En vista de que la composición de la ZP de ratón es diferente a la de humanos los conocimientos obtenidos en ratón no son fáciles de extrapolar. Sin embargo pocos estudios se han llevado a cabo empleando ZP humana nativa por lo que algunos investigadores han utilizado la tecnología del DNA recombinante para clonar las

glicoproteínas de la ZP humana con el objeto de estudiar su bioactividad sobre el espermatozoide. De este modo se ha visto que el espermatozoide intacto se une a ZP3 y ZP4 humanas y desencadena la exocitosis acrosomal, mientras que el espermatozoide reaccionado se une a ZP2 a través de receptores secundarios [28, 30].

1.6.1.1 MODELOS DE UNIÓN ESPERMATOZOIDE–ZONA PELÚCIDA

A pesar de las numerosas investigaciones llevadas a cabo para conocer las bases moleculares de la unión de espermatozoides a la ZP, no existe un modelo único aceptado para mamíferos [31]. Por años, se ha especulado sobre la participación del esqueleto polipeptídico, los carbohidratos, la estructura tridimensional o una mezcla de todo, sin que se hayan tenido resultados concluyentes.

Mientras que en el ratón se acepta que los oligosacáridos de la ZP3 son los responsables de la unión del espermatozoide, en otros animales la situación es menos clara. En ratón se ha observado que los espermatozoides se unen a glúcidos del tipo O-unidos de la ZP3 y que estos son eliminados después de la fecundación [1]. Sin embargo, otros estudios evidencian la participación de las cadenas de oligosacáridos N-unidas en la unión del espermatozoide en bovino y porcino [32, 33]. Actualmente se cuestionan los modelos que proponen a los oligosacáridos como responsables de la unión del espermatozoides a la ZP, en vista de los resultados contradictorios que han sido obtenidos en la última década al respecto. Alternativamente se plantea que la función de los oligosacáridos en el proceso de unión espermatozoide-ZP quedaría restringida al establecimiento de la especificidad de especie [34].

Existe un modelo en donde se propone que la estructura supramolecular de las proteínas es determinante para la unión del espermatozoide a la ZP. Este modelo se propuso en base a experimentos realizados con ratones transgénicos en los que se han introducido los genes que codifican para ZP2 y ZP3 humana. Los resultados demuestran que aunque se expresa ZP2 y ZP3 humana en los ovocitos de ratón no hay unión de espermatozoides humanos, mientras que los

espermatozoides de ratón se unen, incluso después de haberse producido la reacción cortical [31]. Según este modelo, la ZP formada por ZP2 y ZP3 con una disposición tridimensional específica, sería responsable de la capacidad de unión del espermatozoide, de modo que según han descrito diferentes autores, tras la unión de un espermatozoide y extrusión de los gránulos corticales, se produciría un corte proteolítico de la ZP2 que provocaría una modificación de la estructura supramolecular, que impediría que se puedan unir más espermatozoides. En este modelo, aunque no se descarta la participación de los carbohidratos, no sería necesaria su modificación tras la fecundación. Este modelo supramolecular explicaría los resultados obtenidos con ratones en los que no hay ZP1 y que forman una ZP compuesta de ZP2 y ZP3 la cual, aunque estructuralmente es defectuosa, continúa teniendo la capacidad de unir espermatozoides y son fértiles [35].

Recientemente se ha observado en experimentos en donde se clonaron las proteínas de la ZP en bacteria las cuales no son incapaces de glicosilar a las proteínas estas son capaces de unir a los espermatozoides sin embargo no desencadenan reacción acrosomal por la que con este trabajo se demostró que el esqueleto polipeptídico es importante para la interacción entre gametos[36]

En conclusión se puede decir que la estructura tridimensional de la ZP juega un papel crucial en la formación del sitio de unión para que el receptor espermático reconozca al ligando[37].

1.6.1.2 RECEPTORES DEL ESPERMATOZOIDE QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCIÓN CON LA ZP

Un gran número de receptores espermáticos para proteínas de la ZP han sido descritos pero su función en forma individual o colectiva es poco clara.

Se ha demostrado que la identificación de receptores espermáticos es más difícil que la identificación de ligandos de la ZP debido a la gran complejidad de la superficie espermática en comparación con la ZP, ya que pueden haber varios receptores para un solo ligando de la ZP.

Los receptores espermáticos que se encuentran a nivel de la membrana plasmática se denominan receptores primarios, mientras que los receptores secundarios se encuentran en la membrana acrosomal interna [29]. Varios receptores han sido aislados basándose en su afinidad por la ZP. En humanos se han llevado a cabo varios estudios enfocados en aislar y caracterizar proteínas localizadas en la superficie de la cabeza de los espermatozoides, pero una de las principales barreras para la identificación de dichas moléculas es la falta de un ensayo estandarizado *in vitro* de unión espermatozoide-ovocito que simule las condiciones fisiológicas [38].

En el ratón se ha demostrado la existencia de una molécula denominada “sp56” con afinidad por la ZP [29, 39]. Se ha observado que se une a ZP3 [40]. Dicha molécula está localizada en el acrosoma del espermatozoide y se transloca a la superficie durante el proceso de capacitación. En la especie porcina se ha descrito la existencia de zonadesina, proacrosina, sp38, P47 y un grupo de proteínas llamadas espermadesinas basándose en su afinidad por la ZP, aunque los ligandos de zona específicos para este grupo de moléculas no se conocen [41].

A nivel del espermatozoide una de las moléculas más estudiadas como receptor de la zona ha sido la β -1,4 Galactosiltransferasa (GalT-I). Entre sus funciones se encuentra la que le da nombre, por su capacidad de añadir galactosa a las glicoproteínas y glicolípidos con residuos terminales N-acetilglucosamina. Pero además, GalT-I puede actuar como receptor específico de glicoproteína, incluyendo la ZP3 de ratón, al estar ubicada en la membrana plasmática [42, 43].

Sin embargo estudios de ratones knock-out para el gen que codifica para GalT-I demostraron que el número de espermatozoides que se une a la zona pelúcida del ovocito disminuye pero no son infértiles [42], demostrando que GalT-I no es prescindible para la fertilización.

Una molécula presente en espermatozoide humano que ha sido objeto de estudio es la proteína PH-20, la cual se encuentra en la superficie de espermatozoides con acrosoma intacto [44].

Se ha descrito que esta proteína tiene una doble función, se sabe que tiene actividad de hialuronidasa que permite al espermatozoide atravesar la capa de

células del cúmulo oóforo que rodea al ovocito y en segundo lugar se ha observado su participación como receptor secundario de la ZP. Los anticuerpos generados contra la proteína PH-20 y que posteriormente son utilizados en ensayos *in vitro* de unión espermatozoide- ZP reducen significativamente la unión del espermatozoide a la ZP [44, 45]. Por lo que se deduce que está involucrada en la interacción primaria espermatozoide –ZP sin embargo no inhibe por completo la unión.

Existen algunas moléculas caracterizadas en la actualidad que pueden ser posibles receptores que participen en la interacción entre gametos, los cuales se presentan en la tabla 2. Sin embargo hasta la fecha no se ha encontrado alguna proteína que inhiba por completo el proceso de fecundación en mamíferos.

Debido a la complejidad de la superficie de espermatozoides se ha visto que la fecundación no está condicionada a la interacción receptor ligando por lo se ha propuesto la existencia de diferentes receptores espermáticos que unan a las proteínas de la ZP con mayor o menor afinidad y que permiten la fecundación[44].

Especie	Proteína candidata	Tipo de interacción propuesta	Referencia
Ratón	95KDa receptor tirosina cinasa	Receptor vía tirosina cinasa interacción proteína-proteína con ZP3	Brewis et al 1999[46]
	GALT-I	Proteína que disminuye la unión de espermatozoide a la ZP.	Rodeheffer 2004[42]
	Sp56	Proteína que disminuye la unión de espermatozoides en ZP	Buffone MG et al 2008[47]
	SED1	Se une específicamente a ZP en ovocitos no fertilizados	Ensslin et al 2003[48]
Humano	ZRK	Interacción proteína – proteína con ZP3.	Brewis et al 1999[46]
	PH-20	Se encuentra presente en el acrosoma intacto del espermatozoide presenta actividad de Hialuronidasa.	Sury A. 2004
	SAMP14	Asociadas a la membrana acrosomal inhibe la unión y fusión de gametos.	Shetty J et al 2003[49]
	ADAM(metaloproteasa, desintegrina rica en cisteínas)	Proteínas transmembranales asociada a la unión entre gametos.	Kim E et al 2009[50]
	Fertilina α y β	Interviene entre la fusión de gametos interactúa con la membrana del ovocito.	Naz K 2009[51]
Cerdo	Espemadesina	Espemadesinas interactúan con los carbohidratos de la zona pelúcida.	Haase B 2005[52]
	Zonadesinas	Unión específica a la ZP acelera la R.A	Bi M 2003[53]

Tabla 2. Principales proteínas de espermatozoide que están involucradas en la interacción de gametos.

1.6.2 FUSIÓN DE GAMETOS

Interacción con la membrana plasmática (oolema)

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP interacciona con el ovocito, a través de las membranas plasmáticas. A continuación se produce la unión y fusión entre la membrana plasmática del ovocito y la del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial. [54].

El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres eventos claves. El primero consiste en el reconocimiento que consiste en el contacto inicial entre las dos membranas mediado por uniones proteína-proteína o por uniones proteína-carbohidrato. El segundo, consiste en la aposición de las membranas: la actividad fusogénica de las proteínas conlleva que las dos membranas tengan un contacto íntimo y se produzca la adhesión uniéndose físicamente las dos membranas, a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína. El tercer evento corresponde a la mezcla de lípidos; una vez que las membranas están en contacto, se produce la mezcla de lípidos dando como resultado una bicapa mixta que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células[55].

En espermatozoides humanos, hay evidencias de que la RA es importante para la adhesión a la membrana del ovocito. Las uniones iniciales del espermatozoide a la membrana son reversibles y parecen requerir de la movilidad espermática para que se produzcan, aunque espermatozoides con pobre movilidad pueden fusionarse con ovocitos [21]. Al mismo tiempo que se produce la fusión de los gametos, se completa la segunda división meiótica en el ovocito y se expulsa el segundo corpúsculo polar. Con la unión de las dos células sexuales se completa el número de cromosomas necesarios para crear el genoma del embrión.

2 JUSTIFICACIÓN

El reconocimiento entre gametos es el primer paso para que se lleve a cabo la fecundación. El espermatozoide debe primero interactuar con la ZP que rodea al ovocito y para ello se requiere del reconocimiento mediado por moléculas específicas que se encuentran tanto en el espermatozoide como en la ZP.

En la actualidad se conocen las glicoproteínas que conforman la ZP y se han descrito algunas moléculas del espermatozoide que son receptores específicos para la ZP. Sin embargo, la mayoría de los trabajos encaminados a estudiar los mecanismos moleculares implicados en la interacción del espermatozoide-ZP se han realizado en modelos animales, por lo que la información obtenida nos ayuda a entender los mecanismos pero no son extrapolables al humano. Algunos investigadores han realizado estudios con gametos humanos, pero existe la dificultad de obtener ovocitos de mujeres donados para la investigación, por lo que poco se ha progresado al respecto.

Por lo anteriormente expuesto este estudio está encaminado a evaluar los mecanismos de interacción entre gametos utilizando proteínas recombinantes de la ZP, los cuales son una herramienta que nos puede ayudar a identificar moléculas espermáticas que se unan a la ZP humana. Los resultados obtenidos podrían contribuir a elucidar los mecanismos de unión entre gametos y por ende abrir las puertas para nuevas aproximaciones diagnósticas para algunos casos de infertilidad masculina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es aislar y caracterizar proteínas presentes en espermatozoides de donadores normozoospermicos que participan en la interacción con la ZP humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Obtener las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas recombinantes y extractos solubles de proteínas de espermatozoides.

- Estandarizar un método para capturar proteínas de espermatozoide mediante ensayos de unión en fase sólida con las proteínas recombinantes de la ZP.

- Caracterizar las proteínas de espermatozoide aisladas.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención y purificación de proteínas recombinantes de la ZP.

La expresión de las proteínas de la ZP humana se realizó mediante la infección de células Sf9 con virus recombinantes para ZP2, ZP3 y ZP4, según Cariño y colaboradores [55]. Los vectores de expresión empleados contienen una secuencia de 6 histidinas (6His) que se utiliza para la purificación de las proteínas recombinantes. Las células infectadas con los virus recombinantes se cosecharon y se comprobó la expresión de las proteínas de interés mediante SDS-PAGE y Western Blot (ver apartado 4.2.1 y 4.2.2). La purificación de las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 se realizó mediante cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturizantes, a partir de los pellets de células. Para ello se adicionó solución amortiguadora de lisis (ver anexo I) con la cual se incubó durante 1hr. Después se centrifugó a 12000 rpm y se adicionó solución amortiguadora de solubilización (ver anexo I) a temperatura ambiente, se homogeneizó y se incubó durante 3 hrs en agitación.

Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm y el sobrenadante obtenido se adicionó a una resina de agarosa acoplada Ni-NTA (Qiagen, EE.UU), previamente equilibrada con solución amortiguadora de solubilización y se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente, la mezcla se centrifugó a 1200 rpm y la resina se lavó tres veces con solución amortiguadora de solubilización y dos veces más con solución amortiguadora de lavado (ver anexo I). Por último la resina se sometió a un gradiente decreciente de urea con solución amortiguadora de plegamiento (ver anexo I) para renaturalizar las proteínas unidas a ella.

Las proteínas renaturalizadas se eluyeron con solución amortiguadora de elución (ver anexo I) y se concentraron por medio de ultrafiltración en columnas de Amicon (Millipore, EE.UU) y después se dializaron contra solución amortiguadora

de diálisis (ver anexo I). La concentración de las proteínas recombinantes de la ZP se determinó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA; Pierce, EE.UU).

4.2. Caracterización de las proteínas

4.2.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Esta técnica se empleó para visualizar la presencia de las proteínas obtenidas siguiendo la técnica de Laemmli [56]. Las muestras de cada experimento se resuspendieron en solución amortiguadora de carga, se hirvieron y se depositaron en geles de poliacrilamida de diferentes porcentajes, bajo condiciones desnaturizantes.

La corrida electroforética se llevó a cabo a voltaje constante de 100V. Al finalizar, las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción de plata o con azul de Coomassie. En algunos casos las proteínas se transfirieron a membranas de polivinildifluorido (PVDF; Millipore, EE.UU) y se emplearon para Western Blot (ver apartado 4.2.2).

4.2.2. Western Blot

Para llevar a cabo la inmunodetección de proteínas específicas, las proteínas separadas en el gel se electrotransfirieron a membranas de polivinildifluorido (PVDF; Millipore, EE.UU) a 100V durante 1:20hr.

Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1hr en solución amortiguadora de TBST (ver anexo I) con 5% de leche descremada. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido con TBST durante 1hr con agitación y se lavaron tres veces con TBST. A continuación las membranas se incubaron con proteína A marcada con I^{125} durante 1hr. Por último las membranas se lavaron tres veces con TBST y se sometieron a autoradiografía a -70°C durante toda la noche.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-zona pelúcida de cerdo preparado en conejo (anti-HSPZ), diluido 1:1000, y anti-membrana de espermatozoide humano preparado en conejo (anti-Spm), diluido 1:200. Alternativamente, la

detección del primer anticuerpo se realizó mediante la incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo preparado en cabra (Zymed, EE.UU) conjugado a peroxidasa de rábano HRP y se reveló mediante la adición de diaminobencidina como sustrato (Sigma, EE.UU); en otros casos se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL (Amersham, EE.UU).

4.3. Muestras de semen humano

Las muestras de semen fueron obtenidas mediante masturbación de donadores sanos normozoospermicos, después de un período de abstinencia de 3 a 5 días. El eyaculado se incubó durante 1hr a 37°C para permitir su licuefacción. Luego se evaluó la muestra siguiendo los valores de referencia del Manual de la Organización Mundial de Salud (ver tabla 3).

Parámetro	Valor de referencia
Volumen	≥ 2 ml
pH	7.2
Densidad	≥ 20X10 ⁶ spm/mL
Número total de espermatozoides	≥ 40X10 ⁶
Movilidad	≥ 50% o más móviles (A +B)
Tipo de movilidad	A) Progresiva lineal B) Progresiva errática C) No progresiva D) Inmóviles
Morfología	≥ 15%
Viabilidad	≥50% de vivos

Tabla 3. Valores de referencia establecidos por la OMS para las muestras de semen humano[57]

4.4. Obtención de espermatozoides móviles capacitados

La separación de los espermatozoides móviles del semen humano se realizó mediante la técnica de *swim up* [58]. Para ello al semen se le añadió medio *Human Tubal Fluid* (HTF; Irvine Scientific, EE.UU), suplementado con HSA

(albumina sérica humana) al 3% y piruvato de sodio (1mM). Este medio se adicionó lentamente por las paredes del tubo para formar una fase superior a la cual los espermatozoides móviles pueden migrar. Se incubó durante 1hr a 37°C con 5% de CO₂ en un tubo inclinado a 45°. Luego se recuperó la fase superior y los espermatozoides se lavaron tres veces con PBS y se guardaron a -20°C para su posterior uso.

Para la obtención de espermatozoides móviles capacitados se empleó un sistema de gradiente de Percoll utilizando el sistema Isolate (Irvine Scientific, EE.UU). Sobre el gradiente se depositó un volumen igual de eyaculado y se centrifugó a 1800 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó con *Sperm Washing Medium* (Irvine Scientific, EE.UU), se resuspendió con un volumen de *Sperm Washing Medium* más un volumen de *Test Yolk Buffer* (Irvine Scientific, EE.UU) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la técnica *swim-up* como se describió anteriormente en este apartado.

4.5. Inducción de la reacción acrosomal

Para determinar si las proteínas recombinantes de la ZP son biológicamente activas se evaluó su capacidad para inducir la reacción acrosomal en espermatozoides móviles capacitados. Para ello se incubaron 150000 espermatozoides con 1µg/ mL de ZP2, ZP3 y ZP4 en medio HTF suplementado durante 30 min a 37°C.

Transcurrido este tiempo, los espermatozoides se lavaron con PBS y se fijaron con etanol al 70%. Posteriormente se realizaron frotis por duplicado de los espermatozoides, los cuales se incubaron con 20µg/mL de lectina de *Pisum sativum* conjugada con fluoresceína (FITC-PSA; Sigma, EE.UU) diluida en PBS, durante 30min a temperatura ambiente. A continuación, los frotis se lavaron tres veces con PBS y se agregó una solución de glicerol para el montaje. Los frotis se observaron bajo el microscopio de fluorescencia y se realizó la evaluación de doble ciego en al menos 200 células. Todos los espermatozoides que mostraron fluorescencia en la región del acrosoma se consideraron como no reaccionados,

mientras que los que presentaron ausencia de fluorescencia en el acrosoma o bien tinción en la región ecuatorial se consideraron como reaccionados.

Los valores de reacción acrosomal producidos por las proteínas de la ZP fueron normalizados por la reacción acrosomal espontánea observada en el control negativo (espermatozoides incubados con medio HTF suplementado bajo las mismas condiciones) [63]. Como control positivo, se incubaron en paralelo espermatozoides con ionóforo de calcio A23187 10mM (Sigma, EE.UU.).

4.6. Extracción de proteínas de espermatozoide

La extracción de las proteínas de espermatozoide capacitados se realizó en condiciones no desnaturizantes. Por cada 10×10^6 espermatozoides se adicionó 1mL de solución de extracción de proteínas (ver anexo I) más inhibidor de proteasas (Roche, Suiza). Se resuspendió y una vez que se observó homogénea la suspensión se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente se centrifugó durante 15min a 14000 rpm, se recuperó el sobrenadante y las proteínas se cuantificaron por BCA.

4.7. Espermoblot

El espermoblot es una técnica que se basa en el método de Western Blot, que se utilizó para determinar si hay unión de los espermatozoides humanos a las proteínas recombinantes de la ZP obtenidas en este trabajo.

Para ello se realizó la corrida electroforética de las proteínas recombinantes de la ZP en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. A las membranas se les adicionó solución de urea 6M para posteriormente agregar solución amortiguadora de renaturalización con el objetivo de hacer un gradiente decreciente de urea y así replegar las proteínas de la ZP.

A continuación, las membranas se bloquearon con BSA al 0.5% en TBST, y después de tres lavados con TBST se incubaron con espermatozoides capacitados en medio HTF suplementado por 1hr a 37°C. Terminado el periodo de incubación, se retiró el medio HTF suplementado y las membranas se lavaron con HTF sin suplementar. Posteriormente se añadió glutaraldehído al 8% en HTF y se

incubó durante 30 min .Trascurrido este tiempo las membranas se lavaron con TBST y se procedió a realizarla detección de espermatozoides unidos mediante Western Blot, empleando anticuerpo anti-Spm diluido 1:200 en TBST y proteína A marcada con I¹²⁵. Por último las membranas se sometieron a autorradiografía por 3 días a -70°C.

4.8. Ensayo de captura de ligandos (*Ligand Pull Down*)

Se realizó la captura de receptores espermáticos aplicando la técnica de *ligand pull down*. Este es un método *in vitro* utilizado para la determinación de interacciones físicas ligando-receptor mediante la utilización de una fase sólida en donde se inmovilizan las proteínas utilizadas para capturar los receptores de interés [59]. Sin embargo, la efectividad de esta técnica depende de realizar los ajustes adecuados para cada par ligando-receptor, por lo que nuestro primer objetivo fue estandarizar la técnica para nuestras proteínas.

Para la captura de receptores espermáticos se obtuvieron las proteínas de la ZP unidas a la resina, procesadas tal y como se describe en el apartado 4.1 pero sin eluir. En general se tomaron aproximadamente 60µL de la resina y se equilibró con solución amortiguadora de plegamiento. Luego se adicionaron 100µg del extracto de proteínas de espermatozoide más imidazol 20mM, BSA 0.1% e inhibidor de proteasas todo diluido en un volumen final de 800µL de solución amortiguadora de plegamiento, y se incubó a 4°C en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 1200 rpm y se lavó extensivamente con solución amortiguadora de plegamiento. Como control negativo se llevó a cabo el mismo procedimiento en paralelo utilizando la resina sin proteínas de la ZP incubada con los extractos de proteínas de espermatozoide.

Las proteínas de espermatozoide capturadas por las proteínas de la ZP se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12%. Para optimizar la captura de receptores espermáticos se probaron algunas modificaciones a la técnica anterior, mismas que se describen a continuación.

4.8.1. Biotinilación de las proteínas de espermatozoide

Uno de los cambios realizados fue la utilización de proteínas de espermatozoide biotiniladas para visualizar directamente todas aquellas proteínas de origen espermático que son capturadas por las proteínas de la ZP mediante la adición de avidina-HRP.

Para ello, el extracto de proteínas de espermatozoide se dializó contra PBS durante dos días para extraer el detergente Tritón X-100. Luego las proteínas del extracto de espermatozoides se biotinilaron según Rosenberg [60], para lo cual se utilizó NHS-Biotin (Sigma, Francia).

Al extracto de proteínas de espermatozoide se le adicionó biotina durante 3 hrs en agitación y nuevamente se procedió a dializar contra PBS para extraer el excedente de biotina. Para comprobar la eficiencia de la biotinilación se tomaron 20µg de proteína de espermatozoide biotiniladas y se llevó a cabo la corrida electroforética seguido de la transferencia a membranas de PVDF. La visualización de las proteínas se realizó mediante la adición de 0.5µg/mL de avidina-HRP (Sigma, Paris) y diaminobencidina (Sigma, EE.UU) como sustrato.

Una vez que se corroboró que las proteínas de espermatozoide fueron biotiniladas, se utilizaron en el ensayo de captura de receptores espermáticos en las mismas condiciones descritas en el apartado 4.8 empleando, 100 µg del extracto de proteínas de espermatozoide. Adicionalmente se aumentó el tiempo de incubación de las proteínas recombinantes de la ZP y el extracto de espermatozoides con la finalidad de llegar al equilibrio ligando receptor por ello se incubó durante toda la noche a 4°C.

4.8.2. Uso de entrecruzadores

Otra modificación probada fue la utilización de compuestos entrecruzadores con la finalidad de hacer más estables las uniones ligando-receptor, y así evitar la pérdida de receptores espermáticos capturados por las proteínas de la ZP, durante los lavados.

Para ello, luego de incubar el extracto de proteínas de espermatozoide sin biotinilar con cada una de las proteínas de la ZP unidas a la resina, se lavó con

solución amortiguadora de renaturalización y se adicionó el compuesto entrecruzador. Se hicieron pruebas con glutaraldehído 0.1% y paraformaldehído 0.1% diluido en solución amortiguadora de renaturalización, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lavados a la resina con solución amortiguadora de elución sin imidazol y se analizó por SDS-PAGE seguido por tinción de plata o azul de Coomassie.

4.9. Secuenciación de proteínas

Con el objetivo de identificar las proteínas aisladas, se secuenciaron utilizando la técnica de Peptide Mass Fingerprint que se basa en la identificación de proteínas por medio de su fragmentación para posteriormente realizar un análisis de masas mediante MALDI-TOF. La secuenciación de proteínas se realizó con el apoyo y asesoría del Dr. César Batista y el IQ Oscar Villa en el IBT UNAM.

Brevemente para lograr el objetivo se procedió a cortar las bandas observadas en el gel y se les adicionó solución desteñidora con la cual se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se agregó solución desteñidora y se dejó incubando por 3hrs más. Después se agregó acetonitrilo para deshidratar el gel y se evaporó utilizando un ultraconcentrador (Speed Vac), los trozos de gel se hidrataron y deshidrataron mediante la adición de solución de bicarbonato de amonio y acetonitrilo para favorecer que la tripsina se incorpore eficientemente por difusión. Posteriormente se concentró y agregaron 10 μ L tripsina por 10min a 4°C.

A continuación se agregó solución de bicarbonato de amonio para lavar y recuperar el producto de la digestión, el bicarbonato de amonio se evaporó y la muestra se inyectó al espectrofotómetro de masas (Spectra A220, Orbitrap XL, Thermo Scientific, EE.UU) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Una vez que se obtuvo la secuencia de péptidos, se utilizó el BLAST Tool del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) para comparar las secuencias de los péptidos encontrados con la base de datos de proteínas ya caracterizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes de la ZP

Las proteínas de la zona pelúcida purificadas fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y Western Blot como se muestra en la figura 1.

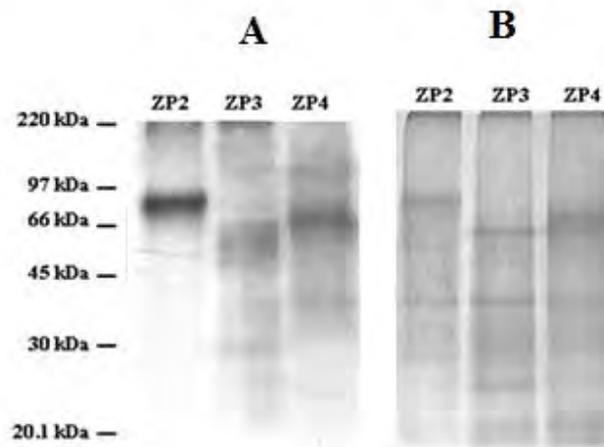


Fig. 9 Caracterización de las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 puras mediante A) Western Blot, utilizando anticuerpo anti-HSPZ y B) electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% seguido de tinción con plata.

Al realizar el análisis de Western Blot (fig. 9A) se observó que el anticuerpo anti-HSZP reconoce en cada carril solo una banda de proteína, sugiriendo que las proteínas de la ZP se expresaron en las células Sf9. A estas bandas se les estimaron sus pesos moleculares aparentes utilizando estándares de peso molecular, y aproximadamente tienen pesos de 85 kDa para ZP2, 55 kDa para ZP3 y 66 kDa para ZP4, los cuales son similares a los reportados para sus homólogas nativas [61, 62]. Además, en el gel teñido (fig. 9B) se observa que las bandas reconocidas por los anticuerpos son predominantes por lo que se lograron purificar adecuadamente.

5.2 Evaluación de la actividad biológica de las proteínas recombinantes de la ZP mediante inducción de la reacción acrosomal.

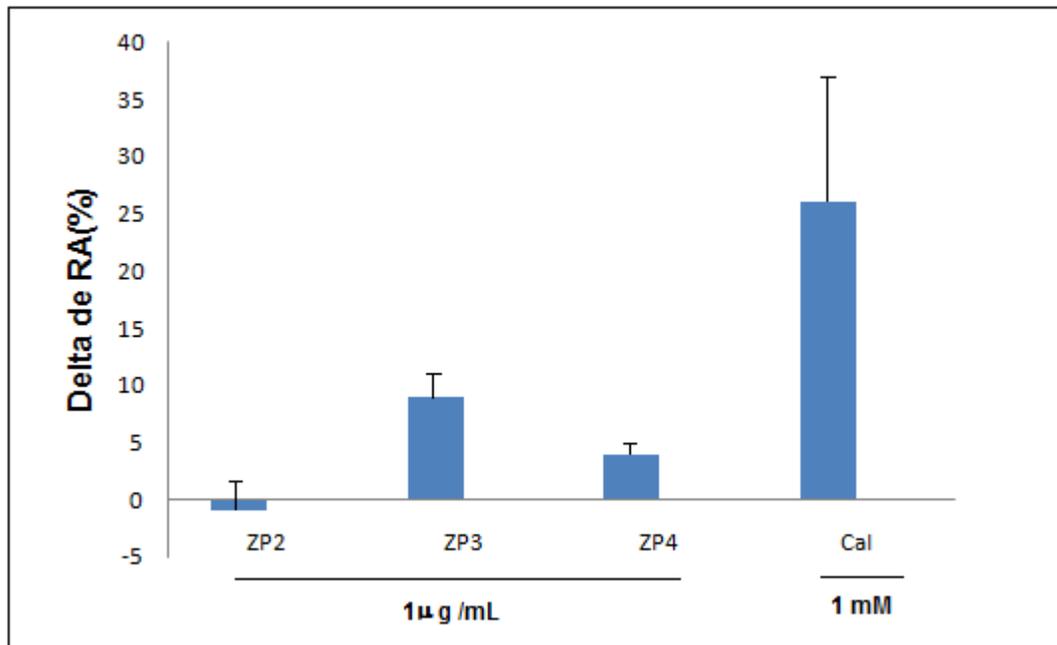


Fig. 10 Reacción acrosomal inducida por las proteínas recombinantes de la zona pelúcida n=4 experimentos. Media + DE, Cal= ionóforo de calcio.

Con el fin de determinar que las proteínas recombinantes de la ZP tienen actividad biológica se realizó un ensayo de la inducción de la reacción acrosomal a los espermatozoides.

En la figura 10 se muestran los resultados de los efectos de las proteínas recombinantes de la ZP sobre la reacción acrosomal, donde se observó que ZP3 y ZP4 indujeron la reacción acrosomal mientras que ZP2 no, tal y como se ha escrito en trabajos previos [63]. Se puede observar en la grafica que el porcentaje de espermatozoides que presentan reacción acrosomal con ionóforo de calcio es del 28% mientras que para ZP3 es 8% y ZP4 5%.

Estos resultados nos indican que las proteínas recombinantes ZP3 y ZP4 obtenidas tienen actividad biológica y pueden ser utilizadas para la captura de receptores espermáticos.

5.3 Extracto de proteínas de espermatozoide

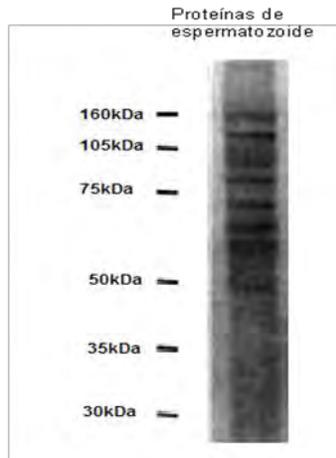


Fig. 11 Análisis mediante SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida del extracto de proteínas de espermatozoides obtenidos en condiciones no desnaturalizantes, teñido con azul de Coomassie.

En la figura 11 se pueden observar la mezcla de proteínas de espermatozoide obtenidas con la solución de extracción de proteínas. Se observa que son abundantes y no están degradadas por lo tanto se pueden utilizar para realizar ensayos de captura de receptores con proteínas recombinantes de la ZP.

5.4 Espermoblot

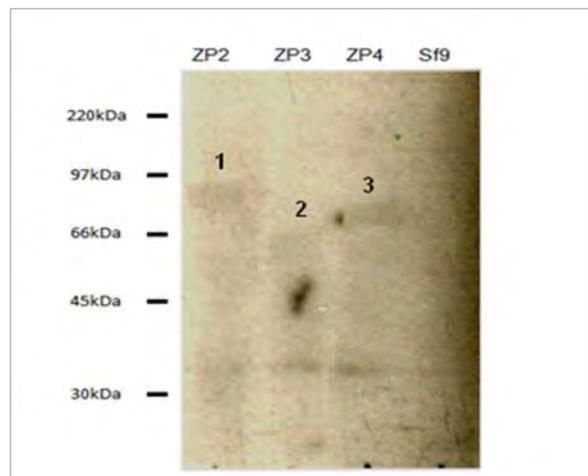


Fig.12 Espermoblot de extractos de proteínas de células Sf9 infectadas con virus recombinantes para ZP2, ZP3 y ZP4. Como control se utilizaron las proteínas de células Sf9 sin infectar (n=3).

El espermoblot se realizó con la finalidad de observar si existe unión entre los espermatozoides con las proteínas recombinantes de la ZP.

En la figura 12 se muestra el resultado de incubar 3.5×10^6 espermatozoides capacitados en medio HTF suplementado con las proteínas recombinantes de la ZP que se encuentran inmobilizadas en la membrana de PVDF utilizando la técnica de espermoblot. La señal observada se indica con los números 1,2 y 3 los pesos moleculares aparentes de estas bandas son de 86KDa, 55KDa y 67KDa, los cuales son similares a los descritos para las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 puras respectivamente, lo que sugiere que existe unión entre los espermatozoides y las proteínas recombinantes de la ZP. Por su parte, en el carril donde se encuentra el extracto de células Sf9 sin infectar con baculovirus recombinante para las proteínas de la ZP no se observa señal por lo que se trata de interacciones específicas entre los espermatozoides y las proteínas recombinantes de la ZP.

5.5 Ensayo de captura de ligandos

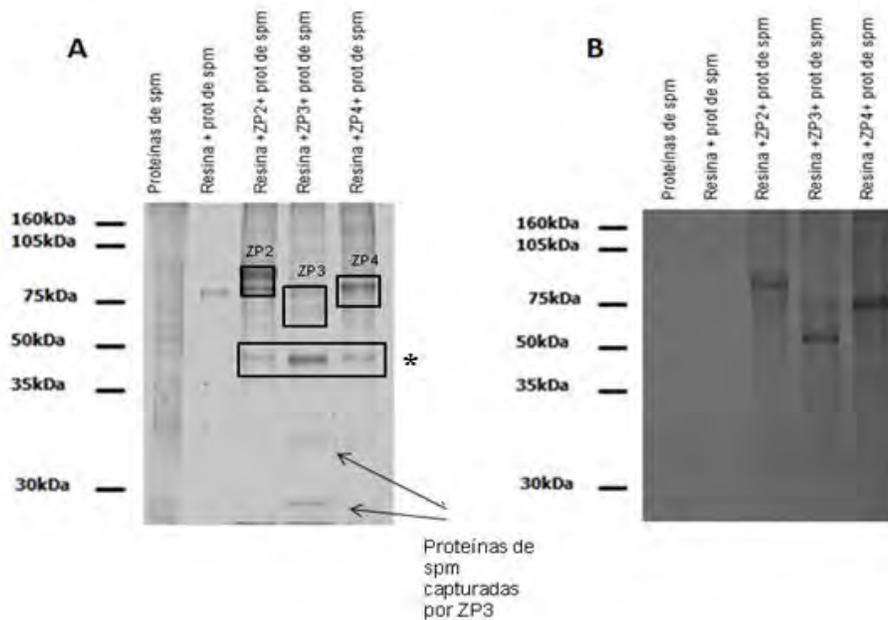


Fig. 13 Receptores espermáticos capturados mediante el ensayo de captura de ligandos, analizados por A) Electroforesis SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% seguido de tinción de plata y B) Western Blot con Anti-HSPZ (3hrs).

En la figura 13 se pueden observar los resultados obtenidos con el ensayo de captura de ligandos. En el primer carril de la figura 13 A se observa el extracto de proteínas de espermatozoide que se utilizó para realizar el ensayo, en el carril 2 se encuentra el control utilizado y se observó una banda alrededor de 75kDa producto de una interacción inespecífica entre la resina y el extracto de proteínas de espermatozoides, por lo que las bandas observadas a esta altura quedan descartadas.

En los carriles donde se encuentran las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 se observa un patrón de bandas alrededor de 45kDa (*) estas bandas pueden ser de origen espermático ya que no se observan en el Western Blot de la figura 13 B, pero cabe la posibilidad de que se trate de proteínas de las células Sf9 que unieron inespecíficamente a la resina durante la purificación. Se observa en la figura 13 A que la proteína recombinante ZP3 capturó 2 proteínas una de 28kDa y la otra de 32kDa.

En la figura 13 B se pueden visualizar las proteínas recombinantes de la ZP que se utilizaron para realizar en ensayo de captura de espermatozoides se observa que después de la incubación con los extractos de proteínas de espermatozoide no se encuentran degradadas.

Sin embargo en la región entre 50-85 kDa las proteínas recombinantes de la ZP impiden identificar proteínas de espermatozoide que hubiesen sido capturadas.

En vista de que la presencia de las proteínas recombinantes de la ZP interfieren parcialmente con los análisis, se decidió biotinilar el extracto de proteínas de espermatozoide para observar mediante la adición de avidina-HRP y diaminobencidina los receptores capturados por las proteínas de la ZP.

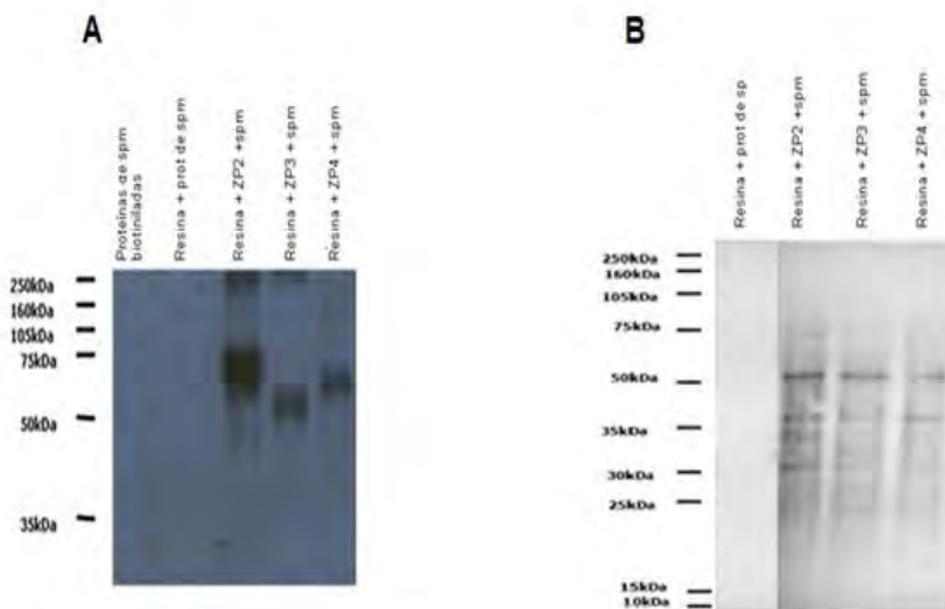


Fig.1

4 Análisis de las proteínas de espermatozoide biotiniladas que se unieron a las proteínas recombinantes de la ZP. A) Western Blot de las proteínas recombinantes de la ZP utilizadas para el ensayo de captura, B) Proteínas biotiniladas incubadas con avidina-HRP 0.5µg/ml y reveladas con diaminobencidina C) Proteínas biotiniladas incubadas con avidina-HRP 0.5µg/ml y reveladas por quimioluminiscencia ECL.

En la figura 14 A se observan las proteínas recombinantes de la ZP, se puede ver que están presentes en la resina que se utilizó para realizar el ensayo de captura de receptores espermáticos, por lo que se demuestra que estas se encuentran unidas a la resina y su peso molecular no varía por lo que no sufren degradación durante ensayo.

En la figura 14B se observa claramente las proteínas de espermatozoide capturadas por las proteínas recombinantes el método de revelado es más sensible y lo que se observó fue similar a la membrana de la figura 14B, el patrón de proteínas capturadas es el mismo para cada una de las proteínas recombinantes de la ZP.

Se ha descrito que la biotinilación no afecta la estructura tridimensional de las proteínas, ya que en trabajos previos se muestra que el proceso de biotinilación de una proteína no afecta la afinidad del ligando por su receptor, debido a que la biotina es una proteína de bajo peso molecular (244Da). Esto hace que su adición no modifique drásticamente las propiedades de las moléculas[65]. Sin embargo se observó que hay un exceso de biotina en el extracto de proteínas de espermatozoide como se puede ver en el carril 1 de la figura 14 B probablemente este exceso de biotina unió inespecíficamente las proteínas del extracto de espermatozoides con las proteínas de la ZP.

Por ello se decidió realizar otras modificaciones al ensayo de captura de receptores espermáticos.

Primero se decidió utilizar compuestos entrecruzadores, debido a que las interacciones entre las proteínas de espermatozoide y las proteínas recombinantes de la ZP no son lo suficientemente fuertes ya que el espermatozoide tiene que atravesar la ZP para que haya fusión entre la membrana interna del espermatozoide con el oolema, si las interacciones fueran de tipo covalente el espermatozoide se quedaría anclado en la ZP.

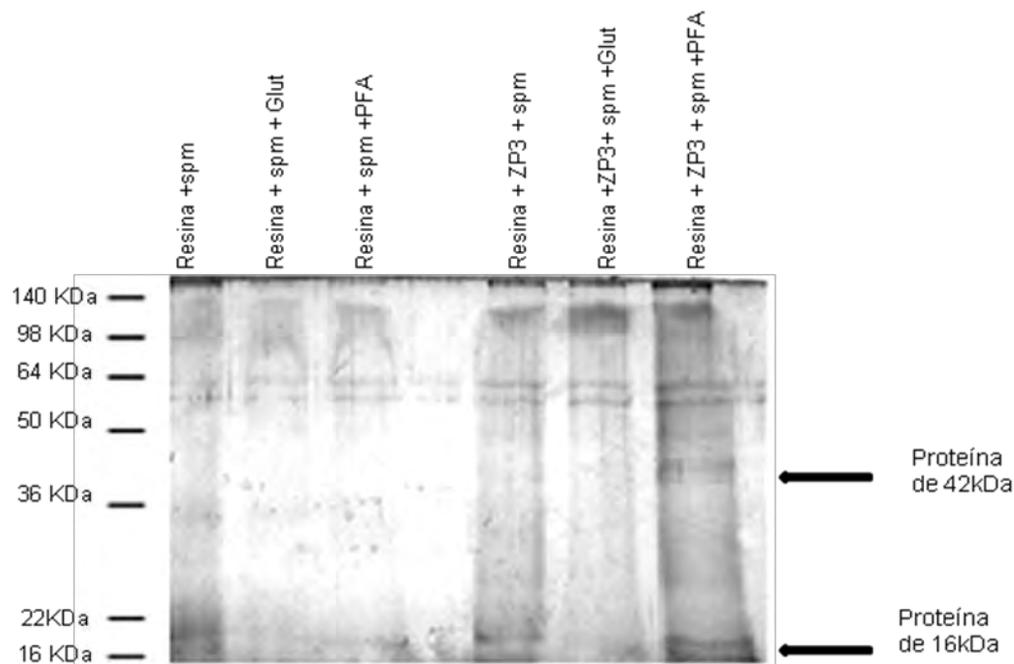


Fig. 15 Análisis electroforético SDS-PAGE en gel al 12% para observar las proteínas de espermatozoide que se unen a ZP3 utilizando diferentes compuestos entrecruzadores tinción con plata.

Los resultados obtenidos en una prueba realizada con la proteína recombinante ZP3 se muestran en la figura 15, donde el carril 1 se encuentra el extracto de proteínas de espermatozoide y la resina no se observa ninguna banda, aun en presencia de glutaraldehído y paraformaldehído como se muestra en los carriles 3 y 4. Por lo que las bandas observadas en ZP3 son específicas.

Las proteínas de espermatozoide capturadas específicamente por ZP3 son de aproximadamente 42kDa y 16KDa y se visualizaron en presencia de paraformaldehído, mientras que con glutaraldehído no se observaron las bandas.

Adicionalmente se observó un doblete de bandas de aproximadamente 64kDa que está presente en todos los carriles se ha descrito que es un artefacto del β -mercaptoetanol que se produce cuando hay un exceso y que se puede eliminar agregando a la solución de carga yodoacetamida[78].

Durante la estandarización del método de captura de receptores espermáticos, las modificaciones probadas que mejoraron la eficiencia y reproducibilidad del ensayo fueron las siguientes: Se mejoró el bloqueo de la resina mediante el aumento de imidazol de 20mM a 50mM, se aumentó el tiempo de incubación entre las proteínas recombinantes de la ZP y el extracto de proteínas de espermatozoide para lograr el equilibrio ligando receptor.

Y por último se agregó un compuesto entrecruzador paraformaldehído 0.1% para estabilizar las uniones ligando-receptor.

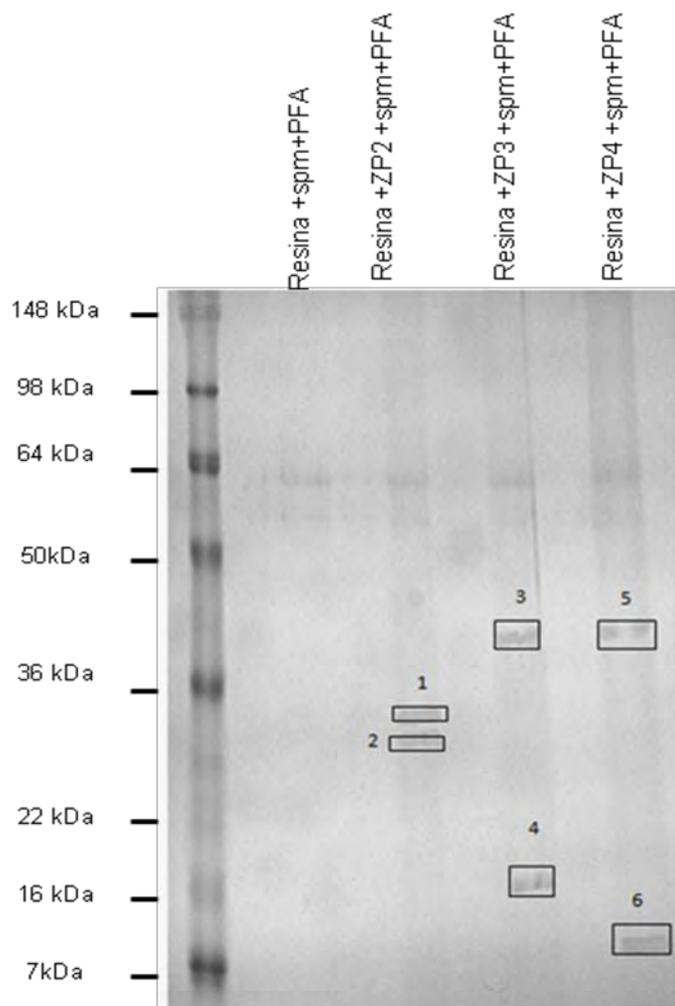


Fig. 16 Análisis electroforético SDS-PAGE en un gel de acrilamida del 10-15% de las proteínas de espermatozoide que se unen específicamente a las proteínas recombinantes de la ZP capturados en presencia de PFA y teñido con azul de coomassie. Los números asignados a las proteínas espermáticas son arbitrarios.

En la figura 16 se puede observar varias proteínas de diferente peso molecular capturadas por las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4. A estas bandas se les asignó una numeración arbitraria, como se muestra en la tabla 4, y se les estimó el peso molecular aparente para cada una de ellas.

Ligando	Proteína (número de asignación arbitraria)	Peso Molecular (KDa) proteína de spm unida a ZP
ZP2	1	34
	2	32
ZP3	3	42
	4	15
ZP4	5	42
	6	10

Tabla 4. Pesos moleculares estimados de las proteínas de espermatozoide que reconocieron Específicamente a las proteínas recombinantes de la ZP.

5.6 Secuenciación de péptidos de las proteínas aisladas para su caracterización.

Ligando	PM de las proteínas de spm capturadas (KDa)		Secuencia de péptidos identificados aislados	Probable identidad	Puntuación (Score)	E-valor
ZP2	1	34	VIPVLQTK	S100P	28.2	89
	2	32	LGEHNIDVLEGNEQFLNAAK	Serina proteasa	60.4	2X10 ⁻⁸
ZP3	3	42	CTVASTQEIT	IE-1 de Baculovirus	34.6	1.3
	4	15	LGEHNIEVLEGNEQFINAAK	Serina proteasa	60.4	2X10 ⁻⁸
			DLDSLAEV	Tirosina Cinasa	26.1	400
ZP4	5	42	CTVASTQEIT	IE-1 de Baculovirus	34.6	1.3
	6	10	STVTA	Ubiquitina peptidasa 3	20.2	16341

Tabla 5. Secuencias de las proteínas de espermatozoide obtenidas mediante ensayos de unión spm-ZP

En la tabla 5 se muestran los péptidos identificados al secuenciar cada una de las proteínas que fueron capturadas mediante los ensayos de unión espermatozoide. Estas proteínas se identificaron mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST, el cual calcula la significancia de sus resultados por lo que provee un parámetro confiable para conocer la probabilidad de que una proteína sea homóloga con otra que ya está totalmente secuenciada.

Para ello cada uno de los alineamientos realizados es evaluado para determinar su significancia estadística por lo que el programa elimina los alineamientos inconsistentes y los alineamientos resultantes son denominados pares de alta puntuación. Una vez realizado esto, se calcula la puntuación final de los alineamientos resultantes y se determina su significancia tomando en cuenta la probabilidad que tiene dicho alineamiento de haber sido obtenido por azar de acuerdo al tamaño de la base de datos. Al final solo se reportan los alineamientos que hayan tenido una probabilidad mayor mediante el parámetro E que es conocido como *e-value* (*e-value*) de corte, nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significancia estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento. En base a este criterio podemos decir que las proteínas 1,2 y 4 tienen una alta probabilidad de tener homología con la proteína que se encuentra en la base de datos.

Las proteínas 3 y 5 que tienen un peso molecular de 42kDa y que se unieron a ZP3 y ZP4 respectivamente corresponden a una proteína del vector de expresión por lo que se consideró una contaminación.

La proteína 1, que se unió a ZP2 tiene un peso molecular de 34kDa y corresponde a la proteína de unión a S100P. Esta proteína está relacionada con el metabolismo de calcio y forma parte de las proteínas de unión de la familia S100, las cuales son expresadas en diferentes tejidos [66]. Por ejemplo S100A1 y S100A2 se localizan en el citoplasma y núcleo de células musculares lisas, mientras que S100P se encuentra en el citoplasma de células placentarias[66]. En la actualidad no se ha reportado la presencia de esta proteína en espermatozoide de mamífero.

La proteína 2 de 32kDa capturada por ZP2 se trata de una serina proteasa. Las serina proteasas son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de péptidos y proteínas que poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática.

En espermatozoides se ha estudiado ampliamente un tipo de serina proteasa denominada acrosina, la cual se encuentra presente en el acrosoma de los espermatozoides y tiene un peso molecular entre 35kDa a 49kDa dependiendo si es α o β acrosina [60].

Para la proteína 4 de 15kDa de unión a ZP3 se obtuvieron dos péptidos, el primero se asocia con una serina proteasa y el segundo con una tirosina cinasa; esta última se descartó ya que su peso molecular es de 140kDa y además el valor de puntuación y e-valor dan una probabilidad menor en comparación a la serina proteasa.

La proteína de 10kDa que se unió a ZP4 se trata de la proteína ubiquitina peptidasa 3, la función de las proteínas ubiquitina proteasas es romper la unión proteína-ubiquitina evitando así la degradación de la proteína marcada.

6 DISCUSIÓN

La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido el objetivo de numerosos estudios a lo largo de los años. Dicha capacidad es el resultado de la habilidad del gameto masculino para capacitarse, llegar hasta el ovocito, atravesar la ZP, unirse a la membrana plasmática y fusionarse con ella para formar el pronúcleo masculino. Con el fin conocer la capacidad fecundante de los espermatozoides en humanos, se han realizado numerosos estudios buscando los parámetros que muestren la correlación más confiable con la fertilidad y permitan discriminar entre muestras de semen de alta y baja capacidad fecundante[21].

Los análisis convencionales de muestras de semen incluyen la determinación de la concentración espermática, estudios de la movilidad, análisis de la morfología, pero estos resultados no proporcionan un diagnóstico preciso, ya que muchas

muestras con valores adecuados en la espermatobioscopia presentan baja o nula capacidad de fecundar.

Es por ello que en la actualidad los análisis de fertilidad masculina están encaminados a estudiar las proteínas presentes en la superficie de la cabeza del espermatozoide y que están asociadas a la interacción entre gametos, con el objetivo de detectar defectos a nivel molecular[61]. Sin embargo, solamente unas pocas proteínas espermáticas han sido identificadas en humano hasta ahora y ninguna de ellas ha demostrado ser imprescindible para la fecundar.

Una limitante en el estudio de interacción de gametos en humanos es la dificultad para obtener ZP de humanos, la cual solo se puede obtener a partir de ovocitos recuperados de ciclos de hiperestimulación ovárica en clínicas de reproducción asistida. Además, no todos cumplen con los requerimientos de madurez, por lo cual son un material muy escaso y de calidad discutible para su uso en ensayos de unión con espermatozoides[62].

Por ello, en este trabajo nos propusimos trabajar con proteínas recombinantes de la ZP. Las proteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 expresadas en células de insecto Sf9 previamente han demostrado ser biológicamente activas debido a que inducen reacción acrosomal a espermatozoides humanos [62], por lo tanto pueden ser utilizadas para la captura de receptores espermáticos específicos y ensayos de interacción con espermatozoides en general.

En el presente trabajo se lograron aislar algunas proteínas de origen espermático de unión específica a ZP2, ZP3 y ZP4 (ver tabla 5). Una limitante para la identificación de estas proteínas durante la secuenciación fue la cantidad de muestra que se obtuvo a partir de los geles, esto se ve reflejado ya que se obtuvieron péptidos pequeños y por lo tanto el parámetro e-valor aumentó, disminuyendo la significancia del alineamiento y la probabilidad de que una proteína sea homóloga con otra que ya está totalmente secuenciada.

La proteína 1 de un peso aproximado de 34KDa que se une a ZP2 recombinante se trata de la proteína de unión a S100P. La proteína S100P es una proteína de unión a calcio, está involucrada en la regulación de varios procesos entre ellos la fosforilación de proteínas, crecimiento celular, movilidad, fertilización, regulación

del ciclo celular, transcripción y diferenciación. Sin embargo hasta la fecha no se ha descrito que esta proteína esté presente en el espermatozoide de mamíferos por lo tanto no se han realizado ensayos para conocer su localización dentro del espermatozoide y su participación durante la fecundación [63] .

Por otro lado también se aislaron dos serinas proteasas de espermatozoide humano que fueron capturadas por ZP2 y ZP3, las cuales deben ser caracterizadas para identificarlas adecuadamente. En espermatozoide se sabe que la serina proteasa acrosina participa en la unión entre el espermatozoide y el ovocito, la RA y la penetración a través de la ZP[63]. Otra serina proteasa del espermatozoide es la Bsp66, la cual se encontró en la membrana de la cabeza de espermatozoides de bovino y no tiene reacción cruzada con los anticuerpos anti-acrosina y anti-proacrosina; probablemente esta proteína se encuentre presente en los espermatozoides de otros mamíferos, ya que en espermatozoides de hámster se ha observado la presencia de esta proteína y en ensayos de unión se observó que al incubar espermatozoide de hámster con anticuerpo anti-Bsp66 el número de espermatozoide que se une a ZP disminuye [64].Entonces es posible que esté involucrada en la interacción con la ZP.

Sin embargo la proteína Bsp66 presenta un peso molecular de 66kDa el cual no corresponde con el peso molecular de las serinas proteasas encontradas ya que presentan un peso de 32kDa y 15kDa, queda por investigar si la proteína homóloga en el humano presenta diferente peso molecular o si las proteínas aisladas son péptidos derivados de una degradación proteolítica de una proteasas de mayor tamaño.

Otra serina proteasa que ha sido identificada recientemente se denomina TESP5 se encontró en la superficie de los espermatozoides de ratón es una enzima que está involucrada en la penetración del espermatozoide a través de la ZP, aunque se ha demostrado que en ratones que no tienen el gen que codifica para esta proteína siguen siendo fértiles, sin embargo el numero de espermatozoide que se unen a la ZP es muy bajo en condiciones in vitro [65]. Las proteínas serinas proteasas han demostrado ser importantes durante la interacción entre gametos por lo cual son candidatas para seguir realizando estudios. Por lo que sería

importante identificar las serinas proteasas que se fueron capturados por ZP2 y ZP3.

La proteína de 10kDa que se unió a ZP4 se trata de la ubiquitina peptidasa específica 3. Esta proteína forma parte del sistema ubiquitina-proteosoma, el cual recientemente fue descrito en espermatozoides humanos y de ratón un complejo proteásico multienzimático o proteosoma, con actividad enzimática tipo tripsina, tipo quimotripsina y peptidilglutamil peptidasa [66]. El complejo proteásico enzimático está constituido por un cuerpo proteolítico llamado proteosoma 26S (aprox. 2000 kDa), el que puede asociarse a proteínas reguladoras, ATPasas y activadores[66].

La principal función del proteosoma es la de degradar la mayor parte de las proteínas nucleares y citosólicas, después de que éstas son marcadas para su destrucción por la unión covalente de moléculas de ubiquitina[66].

Otros estudios han demostrado que varios receptores de superficie que señalan a través de la activación de proteína tirosina cinasa se ubiquitinan y degradan en respuesta a la unión con el ligando o a la fosforilación[66]. Finalmente, la estructura, composición y localización intracelular del proteosoma puede variar en relación a su función, siendo el caso que en espermatozoides se ha descrito su presencia extracelularmente [66].

La función biológica de los proteosomas en los espermatozoides de mamíferos estaría relacionada con la regulación de la fisiología espermática en una o más etapas claves del proceso de fecundación. Específicamente se ha determinado que están involucradas en la RA, la unión y penetración a través de la ZP y en la fusión con la membrana plasmática del ovocito. Aun queda por determinar si las proteínas de la ZP humana se ubiquitinan aunque en cerdo ya se ha observado este fenómeno [67, 68].

Sin embargo para determinar si estas proteínas están implicadas en el proceso de fecundación es necesario realizar análisis inmunohistoquímicos para observar su localización en el espermatozoide al igual que ensayos de unión espermatozoide – ZP y ensayos de inhibición de las diferentes funciones espermáticas [66].

Las proteínas de espermatozoide encontradas abren la posibilidad de estudiar la interacción espermatozoide-ZP utilizando nuevas aproximaciones. De comprobarse la participación de estas proteínas en la interacción de gametos se corroboraría la hipótesis de que la fecundación no depende de una interacción ligando receptor ya que pueden existir varios receptores para un varios ligandos localizados en la proteína ZP debido a que la composición de la membrana plasmática de espermatozoide de mamífero es muy compleja.

Es por ello que convendría realizar lista de proteínas de espermatozoide aisladas y caracterizadas en la actualidad para observar cual tiene mayor impacto en el proceso de fecundación durante la interacción de gametos.

7 Conclusiones

- La técnica estandarizada de captura de ligandos permitió capturar proteínas de espermatozoide en base a su afinidad por las proteínas recombinantes.
- Las proteínas de espermatozoides aisladas son S100P de 34kDa que se une a ZP2, Ubiquitina peptidasa 3 de 10kDa que se une a ZP4, serina proteasa de 32kDa y 15kDa que se une a ZP2 y ZP3 respectivamente. Estas proteínas deben ser estudiadas para conocer su ubicación dentro del espermatozoide y su función durante el proceso de fecundación en humanos.

ANEXO I Composición de los diferentes amortiguadores empleados

Solución amortiguadora de lisis: Urea 2M, Tris-HCl 20mM, pH (8.8), NaCl 0.5M, Triton-X-100 al 2%.

Solución amortiguadora de solubilización: Tris-HCl 20mM, pH 8.0, NaCl 0.5M, Imidazol 5mM, Clorhidrato de Guanidina 6M, β -mercaptoetanol 10mM.

Solución amortiguadora de lavado: Tris-HCl, pH 8.0, 20mM, NaCl 0.5M, Imidazol 5mM, Urea 6M, β -mercaptoetanol 10mM

Solución amortiguadora de plegamiento: Tris-HCl 20mM, pH 7.8, NaCl 0.5M, Imidazol 5mM, Glicerol 1%, β -mercaptoetanol 1mM.

Solución amortiguadora de elución: Tris-HCl 20mM, pH 7.0, NaCl 0.5M, Imidazol 500mM, Glicerol 0.5%, β -mercaptoetanol 1mM.

Solución amortiguadora de renaturalización: Tris-HCl 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM, β -mercaptoetanol 1mM

Solución de extracción de proteínas: 1% Triton-X-100, Tris-HCl 50mM, pH 7.4, NaCl 300mM, EDTA 5mM.

Solución amortiguadora utilizada para el Western Blot (TBST): (Tris-HCl 20mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 0.02% y)

Solución de Carga: 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, azul de bromofenol y 2% de β -mercaptoetanol

Solución amortiguadora de diálisis: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 8.0.

Solución de Urea: Urea 6M, DTT 0.1M, glicerol 0.1% pH 7.4.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Miller D.J, Shi X, Burkin H. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res*, 2002. **57**: p. 37-73.
2. Lasserre A, Gonzalez-Echeverria F, Moules C, Tezon J. G, Miranda P. Vazquez- Levin M. H. Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertil Steril*, 2003. **79 Suppl 3**: p. 1606-15.
3. Wassarman PM, Jovine L, Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(2): p. E59-64.
4. Gartner L, Hiatt J.L. *Histología texto y atlas*. Editorial McGraw Hill, Interamericana México 1997.
5. Stevens A, Stevens J. *Histología Humana*. Editorial Elsevier España, Madrid 2006.
6. Relucenti M, Heyn R, Correr S, Familiari G. Cumulus oophorus extracellular matrix in the human oocyte: a role for adhesive proteins. *Ital J Anat Embryol*, 2005. **110** (2 Suppl 1): p. 219-24.
7. Wassarman PM. Fertilization in animals. *Dev Genet*, 1999. **25**(2): p. 83-6.
8. Tresguerres J.A.F. *Fisiología Humana*. Editorial McGraw Hill. Interamericana. España 1992.
9. Guizar J. *Genética Clínica*. Editorial Manual Moderno, 3era ed. México 2001.
10. Sipila P, Jalkanen J, Huhtaniemi I. T, Poutanen M. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception. *Reproduction*, 2009. **137**(3): p. 379-89.
11. Busso D, Cohen D, Maldera J, Dematteis A, Cuasnicu P. S. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod*, 2007. **77**(5): p. 848-54.

12. Cohen D.J, Da Ros V. G, Busso D, Ellerman D. A, Maldera J. A, Goldweic S, Cuasnicu P. S. Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl*, 2007. **9**(4): p. 528-32.
13. Zhou C.X, Zhang Y. L, Xiao L, Zheng M, Leung K. M, Chan M. Y, Lo P. S, Tsang L. L, Wong H. Y, Ho L. S, Chung Y. W, Chan H. C. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(5): p. 458-64.
14. Tollner T.L, Yudin A. I, Treece C. A, Overstreet J. W, Cherr, G. N. Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: the absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. *Mol Reprod Dev*, 2004. **69**(3): p. 325-37.
15. Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci*, 2004. **82-83**: p. 341-7.
16. Hall G. *Tratado de Fisiología Médica*, Editorial MacGraw Hill Interamericana, vol 9. México 1997.
17. Olivera M, Ruiz T, Tarazona, Giraldo C, Tarazona, Giraldo C, El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev col cienc Pec*, 2006. **19**(4): p. 426-436.
18. Visconti P.E, Westbrook V. A, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman A. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol*, 2002. **53**(1-2): p. 133-50.
19. Visconti P.E, Galantino-Homer H, Moore G. D, Bailey J. L, Ning X, Fornes M, Kopf G. S. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, 1998. **19**(2): p. 242-8.
20. Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **187**(1-2): p. 139-44.
21. Canovas S, Coy P. [Molecular feactures of fertilization: gamete binding and fusion]. *Rev Invest Clin*, 2008. **60**(5): p. 403-13.

22. Herrick S, Schweissinger D, Kim S, Bayan K, Mann S, Cardullo R. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol*, 2005. **202**(3): p. 663-71.
23. Cardona-Maya W.D. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides Humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 2005. **29**(7): p. 676-684.
24. Visconti P.E, Galantino-Homer H, Ning X, Moore G. D, Valenzuela J. P, Jorgez C. J, Alvarez J. G, Kopf G. S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(5): p. 3235-42.
25. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 2005. **129**(3): p. 263-8.
26. Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y., Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod*, 1997. **2**(3): p. 165-74.
27. Chiu P.C, Wong B.S, Lee C.L, Pang R. T, Lee K.F, Sumitro S.B, Gupta S. K. Yeung W. S. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Hum Reprod*, 2008. **23**(6): p. 1385-93.
28. 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.
29. Chirinos M, Caballero-Campo P, Martin R, González-González M.E, Larrea F, Nuñez R, Caballero P. Nuevos enfoques en el estudio y diagnóstico de la infertilidad masculina. Aportaciones de la investigación básica al conocimiento de la función espermática. *Rev Int Androl.*, 2007. **5**(3): p. 1-7.
30. Rankin T.L, Coleman J. S, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner S. G, Castle P, 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**(1): p.33-43.

31. Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M. Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(12): p. 3587-94.
32. Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, Kuwayama M, Hashimoto Y, Suzuki A, Takeda Y, Nakano M. Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev*, 2001. **59**(2): p. 221-6.
33. Clark GF, Dell A. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem*, 2006. **281**: p. 13853-13856.
34. Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*, 1999. **126**(17): p. 3847-55.
35. Gupta S.K, Chakravarty S, Suraj K, Bansal P, Ganguly A, Jain M. K, Bhandari B. Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007. **63**: p. 203-16.
36. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin T. L, Dean J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development*, 2007. **134**(5): p. 933-43.
37. Talbot P, Shur B.D, Myles D.G. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod*, 2003. **68**(1): p. 1-9.
38. Rath D, Hopfer-Petersen E, Michelmann H. W, Schwartz P, Witzendorff D, Ebeling S, Ekhlesi-Hundrieser M, Piehler E, Petrunkina A, Romar R. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2006. **62**: p. 317-30.
39. Wassarman P.M. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays*, 2009. **31**(2): p. 153-8.
40. Hardy D.M, Garbers D.L. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von

Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1995. **270**(44): p. 26025-8.

41. Rodeheffer C, Shur B.D., Characterization of a novel ZP3-independent sperm binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development*, 2004. **131**(3): p. 503-12.

42. Shur B.D, Rodeheffer C, Ensslin M. A, Lyng R, Raymond A. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **250**(1-2): p. 137-48.

43. Suri A. Sperm specific proteins-potential candidate molecules for fertility control. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 10.

44. Sabeur K, Cherr G. N, Yudin A. I, Primakoff P, Li M. W, Overstreet J. W. The PH-20 protein in human spermatozoa. *J Androl*, 1997. **18**(2): p. 151-8.

45. Brewis, I.A. C.H. Wong, Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev Reprod*, 1999. **4**(3): p. 135-42.

46 Buffone M.G, Foster J.A, Gerton G.L. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol*, 2008. **52**(5-6): p. 511-22.

47. Ensslin M.A, Shur B.D. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell*, 2003. **114**(4): p. 405-17.

48. Shetty J, Wolkowicz M. J, Digilio L. C, Klotz K. L, Jayes F. L, Diekman A. B, Westbrook V. A, Farris E. M, Hao Z, Coonrod S. A, Flickinger C. J, Herr J. C. SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction. *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 30506-15.

49. Kim E, Park K. E, Kim J. S, Baek D. C, Lee J. W, Lee S. R, Kim M. S, Kim S. H, Kim C. S, Koo D. B, Kang H. S, Ryoo Z. Y, Chang K. T. Importance of the porcine ADAM3 disintegrin domain in sperm-egg interaction. *J Reprod Dev*, 2009. **55**(2): p. 156-62.

50. Naz R.K. Status of contraceptive vaccines. *Am J Reprod Immunol*, 2009. **61**(1): p. 11-8.

51. Haase B, Schlotterer C, Hundrieser M. E, Kuiper H, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*, 2005. **352**: p. 20-9.
52. Bi M, Hickox J. R, Winfrey V. P, Olson G. E, Hardy D. M. Processing, localization and binding activity of zonadhesin suggest a function in sperm adhesion to the zona pellucida during exocytosis of the acrosome. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 2): p. 477-88.
53. Evans J.P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update*, 2002. **8**(4): p. 297-311.
54. Jahn R. H, Grubmuller. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(4): p. 488-95.
55. Cariño C, Prasad S, Skinner S, Dunbar B, Chirinos M, Schwoebel E, Larrea F, Dunbar B. Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod Biomed Online*, 2002. **4**(2): p. 116-26.
56. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
57. World Health Organization WHO Laboratory Manual for examination of Human Semen and Sperm and Sperm -Cervical Mucus Interction 4ed, ed. Cambridge U.K. 1999, New York.
58. Boomsma C.M, Heineman M. J, Cohlen B. J, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(4): p. CD004507.
59. Einarson M.B, Orlinick J.R. Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. In *Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 37-57. 2002.
60. Rosenberg, I.M., *Protein Analysis and Purification*, B. Techniques, Editor. 1996, Massachusetts.
61. Liang L.F, Dean J. Oocyte development: molecular biology of the zona pellucida. *Vitam Horm*, 1993. **47**: p. 115-59.
62. Bauskin A.R, Franken D. R, Eberspaecher U, Donner P. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod*, 1999. **5**(6): p. 534-40.
63. Caballero-Campo P, Chirinos M, Xue J. Fan, González- González M E ,

Larrea F, Galicia-Chavarria M, Gerton G.L. Biological Effects of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins on Sperm Function. *Biol Reprod*, 2006. **74**(4): p. 760-768.

64. Lachance C, Bailey J.L, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod*, 2007. **22**(10): p. 2606-14.

65. Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlen M. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, 2005. **26**(3): p. 501-10.

66. Santamaria K, Rintala D, Shaw G. Calcium-dependent and - independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, 2006. **396**: p. 201–214.

67. Baska KM, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi YJ, Sutovsky P. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol*, 2008. **3**(215): p. 684-696.

68. Sloper M, Eyre HJ, Wang XW, Sutherland GR, Baker RT. Characterization and chromosomal localization of USP3, a novel human ubiquitin-specific protease. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 26878-84.

Serre C. Zona pellucida from fertilised human oocytes induces a voltage-dependent calcium influx and the acrosome reaction in spermatozoa, but cannot be penetrated by sperm. *BMC Dev Biol*, 2006. **6**: p. 59.

69. Dallapiccola B. G, Novelli. Male infertility, pleiotropic genes, and increased risk of diseases in future generations. *J Endocrinol Invest*, 2000. **23**(9): p. 557-9.

70. Honda A, Siruntawineti J, Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update*, 2002. **8**(5): p. 405-12.

71. Cesari A, Katunar M. R, Monclus M. A, Vincenti A, De Rosas J. C, Fornes, M. W. Serine protease activity, bovine sperm protease, 66 kDa (BSp66), is present in hamster sperm and is involved in sperm-zona interaction. *Reproduction*, 2005. **129**(3): p. 291-8.

72. Kong M, Diaz E.S, Morales P. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol Reprod*, 2009. **80**(5): p. 1026-35.

73. Chakravarty S, Bansal P, Sutovsky P, Gupta S. K, Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*, 2008. **16**(3): p. 391-400.
74. Sutovsky P, Manandhar G, McCauley T. C, Caamano J. N. Sutovsky M, Thompson W. E, Day B. N, Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, 2004. **71**(5): p. 1625-37
75. Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara. Met al., Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev*, 2004. **68**(1): p. 115-24
76. Zahn A, Furlong L. I, Biancotti J.C, Ghiringhelli P. D, Marijn-Briggiler C. I, Vazquez-Levin M.H. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *J Reprod Immunol*, 2002. **54**(1-2): p. 43-63.
77. Yamashita M, Honda A, Ogura A, Kashiwabara S, Fukami K , Baba T. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells*, 2008. **13**(10): p. 1001-13.
78. Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler J, Hanash S, Somerlot Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition iodoacetamide to the equilibration buffer. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **8**(2): p. 122-124.