



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Papel de las proteasas en la interacción de  
gametos en humanos

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. Analilia Saldívar Hernández

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín  
COMITÉ TUTORAL: Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz  
Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SALDIVAR HERNÁNDEZ ANA LILIA** con número de cuenta **510007922** con la tesis titulada: **"PAPEL DE LAS PROTEASAS EN LA INTERACCIÓN DE GAMETOS EN HUMANOS."** realizada bajo la dirección de: **DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN**

Presidente: DR. FERNANDO LARREA GALLO  
Vocal: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Secretario: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ  
Suplente: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ  
Suplente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de octubre de 2011

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM por la oportunidad de realizar la maestría y el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado a este trabajo de investigación (CONACyT 47011) y por la beca otorgada (No. de Registro 326183).

A la Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín por el tiempo, dedicación, confianza y paciencia para la realización de este trabajo, además de sus enseñanzas que contribuyeron con mi formación profesional.

A la Dra. Claudia Lydia Treviño y colaboradores por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Luis Arturo Baiza por sus aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al departamento de Biología de la reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando Larrea por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo.

A mis amigos y a mis compañeros del laboratorio, con quienes he compartido muchos momentos agradables.

A Helen y la Dra. Durand quienes me han permitido compartir con ellas momentos importantes.

A la familia Ellinghaus por apoyarme a lo largo de mi vida.

A Gaby, Jaime y Ma. Fernanda quienes han estado en momentos buenos y malos.

A mi familia que siempre está presente en todo momento.

A Dios porque siempre me ha llenado de bendiciones.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre por su amor, su confianza, su apoyo incondicional, por ser mi guía y un ejemplo de superación, además de creer en todo momento en mí.

A Carlos por ser un ejemplo de perseverancia, paciencia, determinación y superación. Gracias por todo este tiempo en el que has estado conmigo apoyándome y por los momentos que hemos compartido.

A Luz, Bernardo, Roberto y Alan que siempre me han dado su cariño, momentos divertidos y su aportación personal de cada uno.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Generalidades de la fecundación</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Interacción de gametos .....	3
<b>1.2. Gametogénesis</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Gameto femenino .....	3
1.2.1.1. Ovogénesis .....	3
1.2.1.2. Zona Pelúcida .....	6
<b>1.3. Gameto masculino</b> .....	<b>8</b>
1.3.1. Espermatogénesis .....	8
<b>1.4. Maduración del espermatozoide</b> .....	<b>12</b>
1.4.1. Maduración epididimal y formación del semen.....	12
1.4.2. Capacitación espermática .....	13
1.4.3. Reacción Acrosomal .....	14
<b>1.5. Proteasas espermáticas y su papel en la penetración de la ZP</b> .....	<b>16</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Objetivo general</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>5.1. Materiales</b> .....	<b>22</b>
<b>5.2. Estudios de ubiquitinación de la ZP humana</b> .....	<b>23</b>

5.2.1. Obtención y procesamiento de ovocitos.....	23
5.2.2. Inmunofluorescencia.....	24
<b>5.3. Obtención de proteínas rhZP purificadas.....</b>	<b>24</b>
5.3.1. Cultivo de la línea celular Sf9.....	24
5.3.2. Expresión de las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4.....	25
5.3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	26
5.3.4. Western Blot de proteínas (WB).....	27
5.3.5. Purificación de rhZP2, rhZP3 y rhZP4.....	27
<b>5.4. Caracterización de proteasas espermáticas.....</b>	<b>28</b>
5.4.1. Procesamiento de muestras de semen.....	28
5.4.2. Capacitación espermática.....	29
5.4.3. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la función espermática.....	29
5.4.4. Zimografía de proteasas de espermatozoide.....	30
<b>5.5. Degradación proteolítica de rhZP mediada por proteasas espermáticas.....</b>	<b>31</b>
<b>5.6. Análisis Estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1. Ubiquitinación de proteínas de la ZP nativa.....</b>	<b>32</b>
6.1.1. Cortes de ovario humano.....	32
6.1.2. Ovocitos maduros.....	33
<b>6.2. Obtención de proteínas rhZP purificadas.....</b>	<b>36</b>
6.2.1. Expresión de las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4.....	36
6.2.2. Inducción de ubiquitinación de proteínas en células Sf9.....	36
6.2.3. Obtención de proteínas rhZP ubiquitinadas.....	38
<b>6.3. Degradación proteolítica de rhZP por proteasas espermáticas.....</b>	<b>40</b>
<b>6.4. Caracterización de proteasas espermáticas.....</b>	<b>41</b>



6.4.1. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la función espermática .....	41
6.4.2. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la degradación de proteínas rhZP por espermatozoides .....	44
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 1. SOLUCIONES</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Maduración de folículos.....	5
Fig. 2.- Liberación del ovocito secundario .....	6
Fig. 3.- Modelo de la estructura de la ZP de ratón .....	8
Fig. 4.- Espermatogénesis.....	9
Fig. 5.- Fases de la espermatogénesis.....	10
Fig. 6.- Fases de la espermiogénesis.....	11
Fig. 7.- Proceso de capacitación .....	13
Fig. 8.- Esquema del desarrollo de la reacción acrosomal.....	16
Fig. 9.- Estructura del proteosoma.....	19
Fig. 10.- Sistema de expresión de proteínas rhZP.....	26
Fig. 11.- Ubiquitinación en folículos primarios de ovario humano.....	32
Fig. 12.- Ubiquitinación en ovocitos secundarios.....	33
Fig. 13.- Ubiquitinación en ovocitos de ratón.....	34
Fig. 14.- Ubiquitinación en ovocitos humanos.....	35
Fig. 15.- Caracterización de proteínas rhZP expresadas en células Sf9.....	36
Fig. 16.- Ubiquitinación de proteínas en células Sf9 sometidas a estrés térmico.....	37
Fig. 17.- Síntesis de proteínas en células Sf9 infectadas con virus recombinantes para la expresión de proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas y sometidas a estrés térmico.....	38

Fig. 18.- Caracterización de proteínas rhZP expresadas en células Sf9 sometidas a estrés térmico y purificadas mediante cromatografía de afinidad.....	40
Fig. 19.- Degradación de proteínas rhZP por espermatozoides humanos capacitados.....	41
Fig. 20.- Efecto del EDTA sobre la función espermática.....	42
Fig. 21.- Efecto de la O-fenantrolina sobre la función espermática .....	43
Fig. 22.- Efecto de la benzamidina sobre la función espermática. ....	43
Fig. 23.- Efecto del MG-132 sobre la función espermática .....	44
Fig. 24.- Inhibición de la degradación de rhZPs mediada por espermatozoides capacitados.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de referencia establecidos por la OMS para muestras de semen humano.....	28
Tabla 2. Condiciones de inducción de estrés térmico en células Sf9. ....	37

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
BCA	Ácido bincinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio divalente
Cal	Ionóforo de Calcio A23187
CGP	Células germinales primordiales
DE	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSA	Fracción Soluble Acrosomal
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HSA	Albúmina Sérica Human
mHTF	Medio mHTF
mHTFs	Medio mHTF suplementado
kDa	Kilodaltones
mHTF	Modified Human Tubal Fluid
MMPs	Metaloproteasas de matriz
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	Proteína cinasa A
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>

RA	Reacción acrosomal
rhZP	Proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Spm	Espermatozoides
TCA	Ácido tricloro acético
Ub	Ubiquitina
WB	Western Blot
ZP	Zona pelúcida

## RESUMEN

En mamíferos, los ovocitos están rodeados por una matriz extracelular conocida como zona pelúcida (ZP), la cual constituye una barrera para que el espermatozoide pueda fusionarse con el gameto femenino. Si bien la penetración de la ZP es uno de los eventos limitantes para lograr la fecundación, es una de las etapas menos estudiadas de la misma. Estudios previos sugieren que algunas proteasas espermáticas podrían contribuir a facilitar el paso del espermatozoide a través de la ZP; sin embargo, en humanos este proceso permanece todavía en gran medida desconocido. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de los espermatozoides de degradar proteínas recombinantes de la ZP humana (rhZPs) y caracterizar las proteasas involucradas. Para ello, las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas se expresaron en la línea celular Sf9 y se purificaron. La actividad proteolítica de espermatozoides humanos capacitados se estudió por medio de incubaciones con las rhZPs seguido de análisis por Western Blot, observándose que las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4 se hidrolizaban en presencia de espermatozoides capacitados. Para caracterizar las proteasas involucradas, se realizaron incubaciones paralelas en presencia de los inhibidores de proteasas O-fenantrolina, MG-132 y benzamidina, los cuales inhiben metaloproteasas, proteosoma y serina proteasas, respectivamente. Los resultados mostraron que O-fenantrolina inhibe la degradación de rhZP3, MG-132 inhibe la degradación de rhZP4 y benzamidina inhibe la degradación de las tres proteínas estudiadas, sugiriendo que metaloproteasas espermáticas pueden estar involucradas en la degradación específica de la proteína ZP3, que el proteosoma puede participar en la degradación de ZP4 y que serina proteasas podrían contribuir a la degradación localizada pero inespecífica de la ZP. Estas observaciones son relevantes para caracterizar el diálogo molecular entre gametos durante la fecundación y podrían contribuir a entender los fenómenos asociados con la penetración de la ZP en humanos.

## **ABSTRACT**

In mammals, oocytes are surrounded by an extracellular matrix known as the zona pellucida (ZP), which is a barrier for sperm fusion with the female gamete. While the penetration of the ZP is a limiting event to achieve fertilization, this is one of its least studied stages. Previous studies suggest that some sperm proteases could contribute to facilitate the passage of sperm through the ZP, but in human this process still remains unknown. The aim of this study was to determine the ability of sperm to degrade recombinant human ZP (rhZPs) proteins and characterize the proteases involved. For this, human proteins ZP2, ZP3 and ZP4 were expressed in the Sf9 cell line and purified. The proteolytic activity of capacitated human sperm was studied by incubation with rhZPs followed by Western Blot analysis, showing that proteins rhZP2, rhZP4 and rhZP3 were hydrolyzed in the presence of capacitated sperm. To characterize the proteases involved, parallel incubations were performed in the presence of the protease inhibitors O-phenanthroline, MG-132 and benzamidine, which inhibit metalloproteases, proteasome and serine proteases respectively. The results showed that O-phenanthroline inhibits the degradation of rhZP3, MG-132 inhibits the degradation of rhZP4 and benzamidine inhibited the degradation of the three proteins studied, suggesting that metalloproteases may be involved in sperm specific degradation of ZP3, the proteasome may participate in the degradation of ZP4 and serine proteases may contribute to localized but unspecific degradation of the ZP. These results are relevant to characterize the molecular dialogue between gametes during fertilization and may contribute to understand the phenomena associated with penetration of the ZP in humans.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Generalidades de la fecundación**

### **1.1.1. Interacción de gametos**

En mamíferos, para que la fecundación se lleve a cabo es necesario que el espermatozoide sea depositado en el tracto genital femenino y alcance el lugar donde se encuentra el ovocito maduro. Una vez logrado esto, el espermatozoide interacciona con el cúmulo oóforo y la zona pelúcida, la matriz extracelular que rodea al ovocito. Este evento da lugar a la liberación de enzimas contenidas en el acrosoma del espermatozoide, con la finalidad de penetrar la zona pelúcida. Finalmente el espermatozoide alcanza la membrana plasmática del ovocito y ambos gametos se fusionan para dar origen a un nuevo ser. De forma inmediata, el ovocito induce modificaciones de la zona pelúcida para evitar la fusión de más espermatozoides con el ovocito (poliespermia) <sup>1-3</sup>.

## **1.2. Gametogénesis**

Durante la embriogénesis de mamíferos, alrededor de la cuarta semana de vida intrauterina y junto a las crestas urogenitales se observa una estructura sexual conocida como cresta gonadal indiferenciada ya que se desarrolla de forma idéntica en embriones masculinos y femeninos <sup>4,5</sup>. Posteriormente entre la quinta y sexta semana, la cresta gonadal es colonizada por células germinales primordiales. Entre la sexta y octava semana, estas células comienzan a diferenciarse en ovogonias o espermatogonias, según el embrión sea del sexo femenino o masculino respectivamente <sup>6</sup>.

### **1.2.1. Gameto femenino**

#### **1.2.1.1. Ovogénesis**

La ovogénesis es el proceso mediante el cual se forma, desarrolla y crece el gameto femenino. En humanos, comienza durante el periodo embrionario y se completa después de la pubertad. Al final del tercer mes de vida intrauterina, la mayoría de las ovogonias se dividen por mitosis y se organizan en grupos rodeados por una capa de células epiteliales planas. La mayoría de las ovogonias siguen dividiéndose, pero algunas detendrán su crecimiento en la profase de la primera división meiótica formando ovocitos primarios. Para el quinto mes, el número total de células en el ovario alcanzan su máximo número, aproximadamente 7 millones de células, de

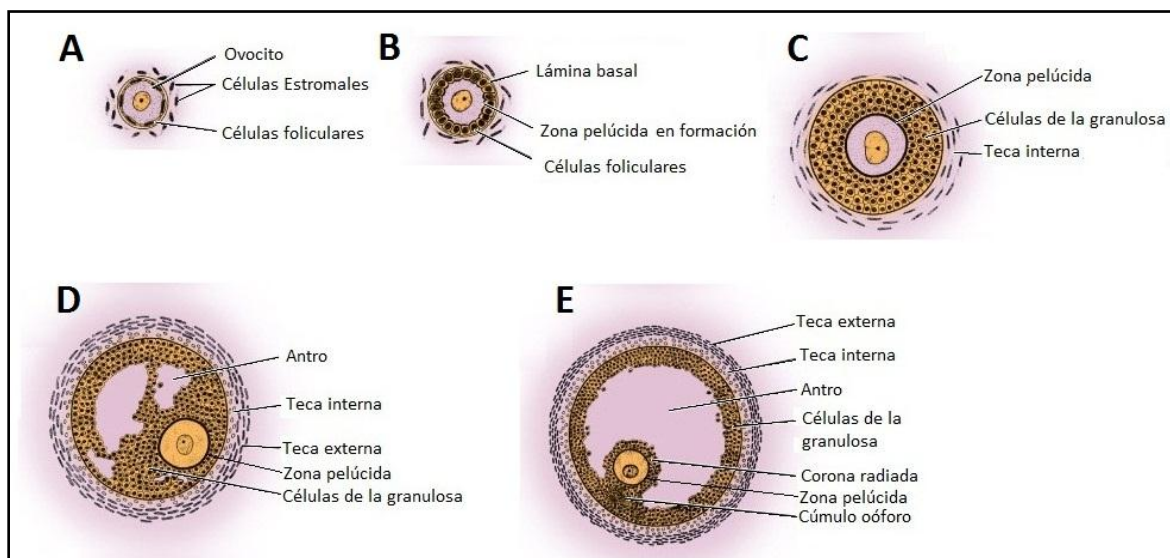


las cuales muchas ovogonias y ovocitos primarios entrarán en atresia. Por su parte, las ovogonias sobrevivientes entran en la profase de la primera división meiótica formando ovocitos primarios que se rodean por una capa de células foliculares, formando folículos primordiales (Fig. 1.A). Posteriormente, en el séptimo mes del desarrollo, la mayoría de los ovocitos primarios se degradan. Al nacimiento, los ovocitos primarios permanecen en profase I gracias al inhibidor de maduración del ovocito secretado por las células foliculares <sup>7</sup>. En este momento, se estima que hay entre 700 mil y 2 millones de ovocitos primarios, de los cuales muchos de ellos entrarán en atresia durante la niñez y al llegar la pubertad sólo habrá aproximadamente 400 mil ovocitos primarios, de los cuales 500 aproximadamente serán ovulados durante la vida fértil de la mujer <sup>7,8</sup>.

Durante la pubertad, en cada ciclo estral comienzan a madurar entre 15 y 20 folículos, proceso que ocurre en tres etapas: la primaria o pre-antral; la secundaria, antral o también conocida como De Graaf y la pre-ovulatoria <sup>7</sup>.

1. *Etapas primaria o pre-antral.*- El ovocito primario reinicia su crecimiento y las células que lo rodean proliferan y cambian de forma plana a cúbica para dar origen al folículo primario. Las células de la granulosa descansan en una membrana basal que las separa de las células del estroma circundante que constituyen la teca folicular, constituida por tejido conjuntivo y la membrana plasmática del ovocito. Posteriormente, las células de la granulosa proliferan formando varias capas que rodean al ovocito y se forma la zona pelúcida, a partir de glicoproteínas secretadas tanto por las células de la granulosa como por el ovocito. Posteriormente, la teca folicular se diferencia en una capa capsular denominada teca externa, una capa fibrosa externa y una capa vascular interna denominada teca interna, compuesta por células de secreción esteroidea y rica en vasos sanguíneos cuya función será nutrir al folículo en crecimiento (Fig. 1.B) <sup>9, 10</sup>. De igual forma, hay intercambio de materiales entre el ovocito y las células de la granulosa, a través de pequeñas prolongaciones que se originan en las células foliculares y atraviesan la zona pelúcida para unirse a la membrana plasmática del ovocito, formando el folículo secundario (Fig.1.C) <sup>3, 7</sup>.
2. *Etapas antral o De Graaf.*- A medida que el desarrollo folicular continúa, se forman espacios entre las células de la granulosa dando lugar a una cavidad llena de líquido folicular denominada antro, que inicialmente tienen una forma semilunar, conformando el folículo pre-antral (Fig. 1.D). Posteriormente el folículo evoluciona a Folículo de Graaf,

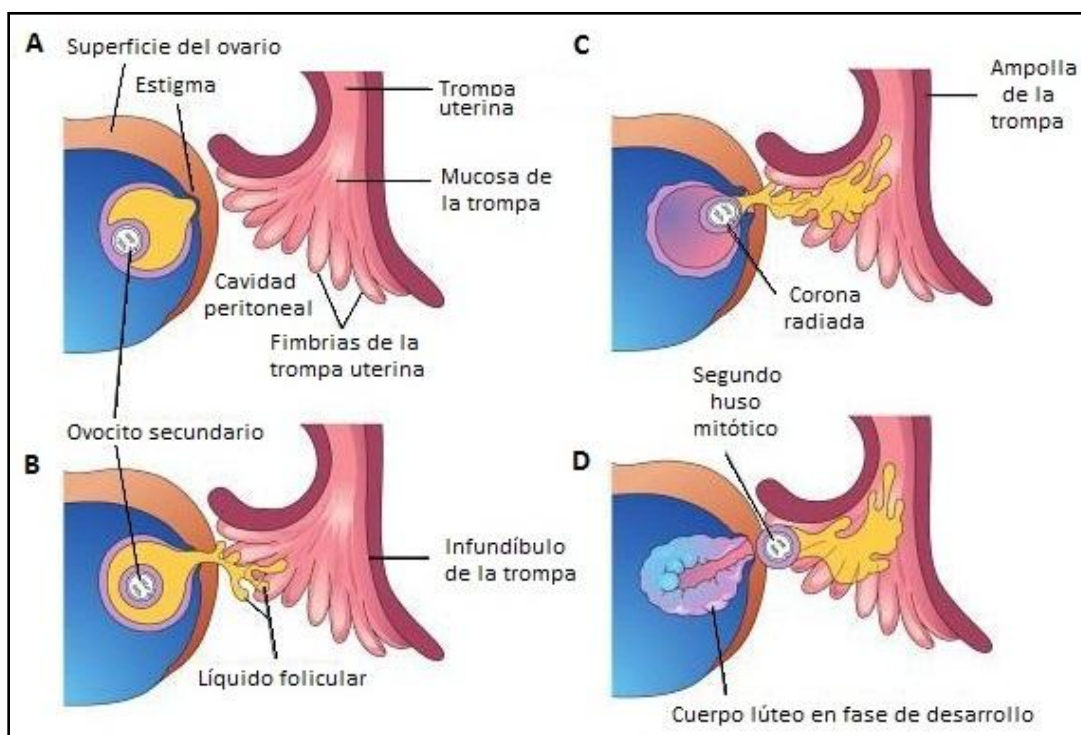
donde el antro se agranda y el ovocito se localiza periféricamente en el folículo junto con las células internas de la granulosa, formando el cúmulo óforo (Fig.1.E). Con cada ciclo ovárico, un número determinado de folículos comienza a desarrollarse, pero solo uno alcanzará la madurez y será ovulado, mientras que los demás entrarán en un proceso de atresia <sup>7, 9, 10</sup>.



**Fig. 1.- Maduración de folículos.** A) Folículo primordial, B) Folículo primario, C) folículo secundario, D) Folículo pre-antral, E) Folículo De Graaf. Modificada de Junqueira, 2005 <sup>11</sup>.

3. *Etapa ovulatoria.*- Previo a la ovulación hay un pico de LH que origina una prominencia en la superficie del ovario sobre la cual aparece una pequeña mancha avascular denominada estigma (Fig. 2.A), correspondiente a la zona de ruptura del folículo De Graaf <sup>7</sup>, además del rompimiento de las prolongaciones cúmulo óforo-ovocito originadas durante el desarrollo del folículo secundario por la producción de ácido hialurónico <sup>3</sup>. Por otro lado, se reanuda la meiosis dando lugar a 2 células hijas de tamaño diferente con 23 cromosomas cada una. La célula que recibe la mayor parte del citoplasma se denomina ovocito secundario, mientras que la que recibe la menor parte se denomina primer cuerpo polar. De manera inmediata, la célula entra en meiosis II, pero se detiene en metafase II aproximadamente 3 horas antes de la ovulación. Posteriormente en un periodo comprendido entre 12 y 24 horas posteriores a dicho pico, se lleva cabo la ovulación (Fig. 2.B). El estigma se rompe expulsando el líquido folicular (Fig. 2.C), seguido de la expulsión del complejo cúmulo-ovocito, conformado por el ovocito rodeado por las células del cúmulo inmersas en una matriz rica en proteínas y

carbohidratos como ácido hialurónico y glucosamina, también conocido como corona radiata. Horas después de que el ovocito ha sido expulsado, las células foliculares residuales colapsan, aumentan su tamaño y desarrollan inclusiones de lípidos para dar lugar al cuerpo lúteo <sup>12</sup>, cuya función es secretar estrógenos y progesterona que preparan al endometrio para la implantación del ovocito fecundado. Si no hay fecundación, el ovocito se degenera aproximadamente 24 horas después de la ovulación <sup>7</sup> y el cuerpo lúteo involuciona y degenera 10 ó 12 días después, dando lugar a la menstruación <sup>10</sup>.



**Fig. 2.- Liberación del ovocito secundario.** A) Formación del estigma, B) Rompimiento del estigma, C) Liberación del líquido folicular, D) Liberación del ovocito secundario y formación del cuerpo lúteo <sup>10</sup>.

### 1.2.1.2. Zona Pelúcida

Como ya se mencionó, los ovocitos maduros están rodeados por una matriz extracelular denominada zona pelúcida (ZP), la cual se ubica entre el ovocito y las células de la granulosa y se forma durante los estadios iniciales de la ovogénesis <sup>13, 14</sup>. La ZP está implicada en diferentes aspectos de la fecundación, que incluyen la inducción de la reacción acrosomal, la prevención de la poliespermia y brindar protección al embrión hasta el momento de la implantación <sup>15, 16</sup>. Esta estructura está formada por tres o cuatro glicoproteínas, dependiendo de la especie. Estas proteínas presentan un alto grado de glicosilación, modificación que ha demostrado tener un

papel importante en el mecanismo de reconocimiento de la ZP por el espermatozoide en algunas especies <sup>17</sup>. No obstante, existe evidencia de que el esqueleto peptídico también es esencial para el reconocimiento espermático <sup>18, 19</sup>.

Las proteínas ZP se caracterizan por tener un alto grado de similitud entre ellas y entre las proteínas ZP de diferentes especies. Se ha descrito la presencia de dominios estructurales que se describen a continuación

1. **Péptido señal:** Localizado en el extremo amino terminal, su función es dirigir la proteína hacia la vía secretora por medio de su importación a través del retículo endoplasmático (ER), lugar donde es removido proteolíticamente. Este proceso permite a la proteína adquirir su conformación nativa <sup>20, 21</sup>.
2. **Dominio ZP:** Se caracteriza por contener 8 residuos conservados de cisteína, comunes en proteínas extracelulares; se ha propuesto que este dominio es el responsable de la polimerización de las proteínas <sup>22</sup>.
3. **Dominio de corte proteolítico:** Las proteínas ZP contienen una secuencia consenso para la proteasa furina. El corte proteolítico por furina está implicado en el ensamblaje de proteínas de secreción <sup>23</sup>.
4. **Dominio transmembranal:** Se localiza en el extremo carboxilo terminal. Este dominio no es requerido para la secreción de la proteína, pero indirectamente se encuentra implicado en la polimerización de la proteína.

Gran parte del conocimiento generado sobre la estructura y función de la ZP en la fecundación se ha obtenido a partir de estudios en el modelo de ratón. La ZP murina se compone de 3 glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 <sup>24</sup>. Su estructura está conformada por cadenas de monómeros alternos de ZP2 y ZP3 que se repiten entre sí, formando largos filamentos que se interconectan por dímeros de ZP1 <sup>25, 26</sup> (Fig. 3). Se ha establecido que la unión primaria del espermatozoide se lleva a cabo con la proteína ZP3, la cual desencadena la reacción acrosomal, mientras que ZP2 se une al receptor secundario del espermatozoide reaccionado y ZP1 se encarga de mantener la integridad estructural de la matriz <sup>27</sup>. No obstante, en humanos la ZP está compuesta por 4 glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, donde la proteína ZP1 está presente en muy baja proporción <sup>15</sup>. Por tanto, el modelo estructural establecido para la ZP murina no puede ser directamente extrapolado a humanos <sup>13, 28</sup>, motivo por el cual hay un creciente interés en años recientes por dilucidar el papel de las proteínas ZP humanas. En humanos, la ZP1 <sup>29</sup>, la ZP3 <sup>30</sup> y la ZP4 <sup>31, 32</sup> son capaces de inducir la reacción

acrosomal del espermatozoide <sup>29, 31</sup>. En otras especies donde se ha descrito la presencia de la proteína ZP4, se ha establecido que tiene actividad de unión con el espermatozoide, como en el modelo porcino donde se ha descrito que el receptor primario del espermatozoide se une a un dímero conformado por ZP3 y ZP4 <sup>13, 33</sup>. Por su parte, la ZP2 humana es reconocida por espermatozoides reaccionados y por tanto es posible que cumpla una función relevante durante la penetración del espermatozoide <sup>34</sup>. Además, la ZP2 parece ser relevante en etapas posteriores a la interacción espermatozoide-ZP, ya que se ha demostrado que es degradada proteolíticamente luego de la fertilización <sup>16</sup>.

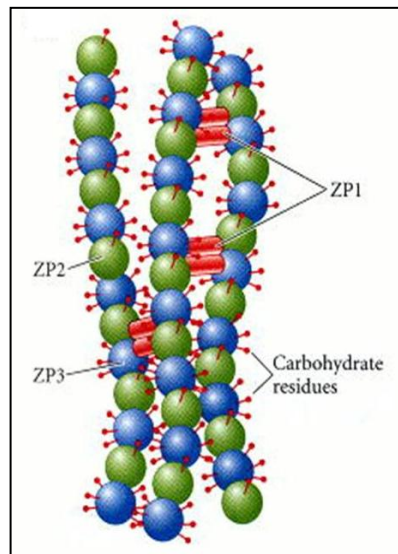


Fig. 3.- Modelo de la estructura de la ZP de ratón <sup>1</sup>.

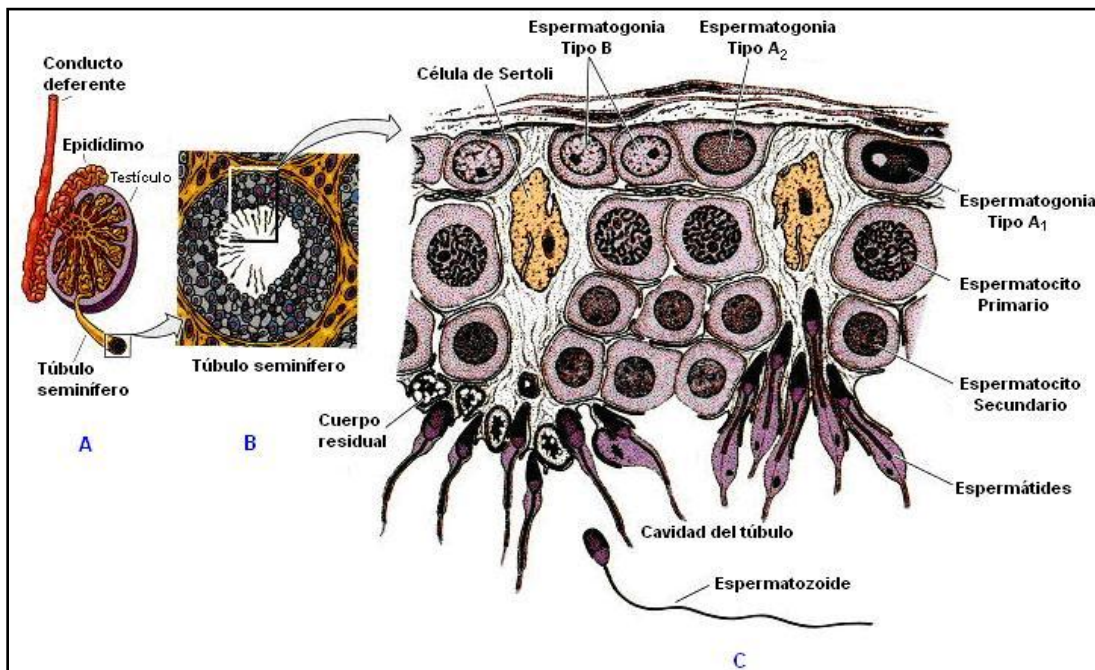
## 1.3. Gameto masculino

### 1.3.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis se define como la secuencia de acontecimientos por la cual las espermatogonias dan origen al espermatozoide. Se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos y es controlada por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada.

Al nacer, las células germinales primordiales se encuentran ubicadas dentro de los cordones sexuales y tienen una apariencia de células redondas y pálidas rodeadas de células de sostén provenientes del epitelio, que más tarde se convertirán en células de Sertoli. Poco antes de la pubertad, los cordones sexuales se ahuecan para formar los túbulos seminíferos al tiempo que las células germinales primordiales dan origen a células madre que posteriormente se

diferenciarán a espermatogonias tipo A, lo que marca el inicio de la espermatogénesis. Este evento es regulado por la hormona luteinizante (LH) que se une a receptores de las células de Leydig y estimula la producción de testosterona, que a su vez se une a las células de Sertoli y promueve la transición de espermatogonias a espermatozoides. Por otro lado, la hormona folículo estimulante (FSH) también se une a células de Sertoli y estimula la producción de fluido testicular y proteínas intracelulares receptoras de andrógenos <sup>7</sup> (Fig. 4.A y B). Mientras tanto, en el interior de los tubos seminíferos se lleva a cabo un movimiento celular organizado que va ascendiendo desde la membrana basal hacia la luz del túbulo seminífero a través de huecos entre las células de Sertoli (Fig. 4.C). En humanos, este proceso toma un lapso aproximado de 65 días y requiere de una temperatura 2-3°C por debajo de la temperatura corporal, factor importante en el número de espermatozoides producidos <sup>35-37</sup>.

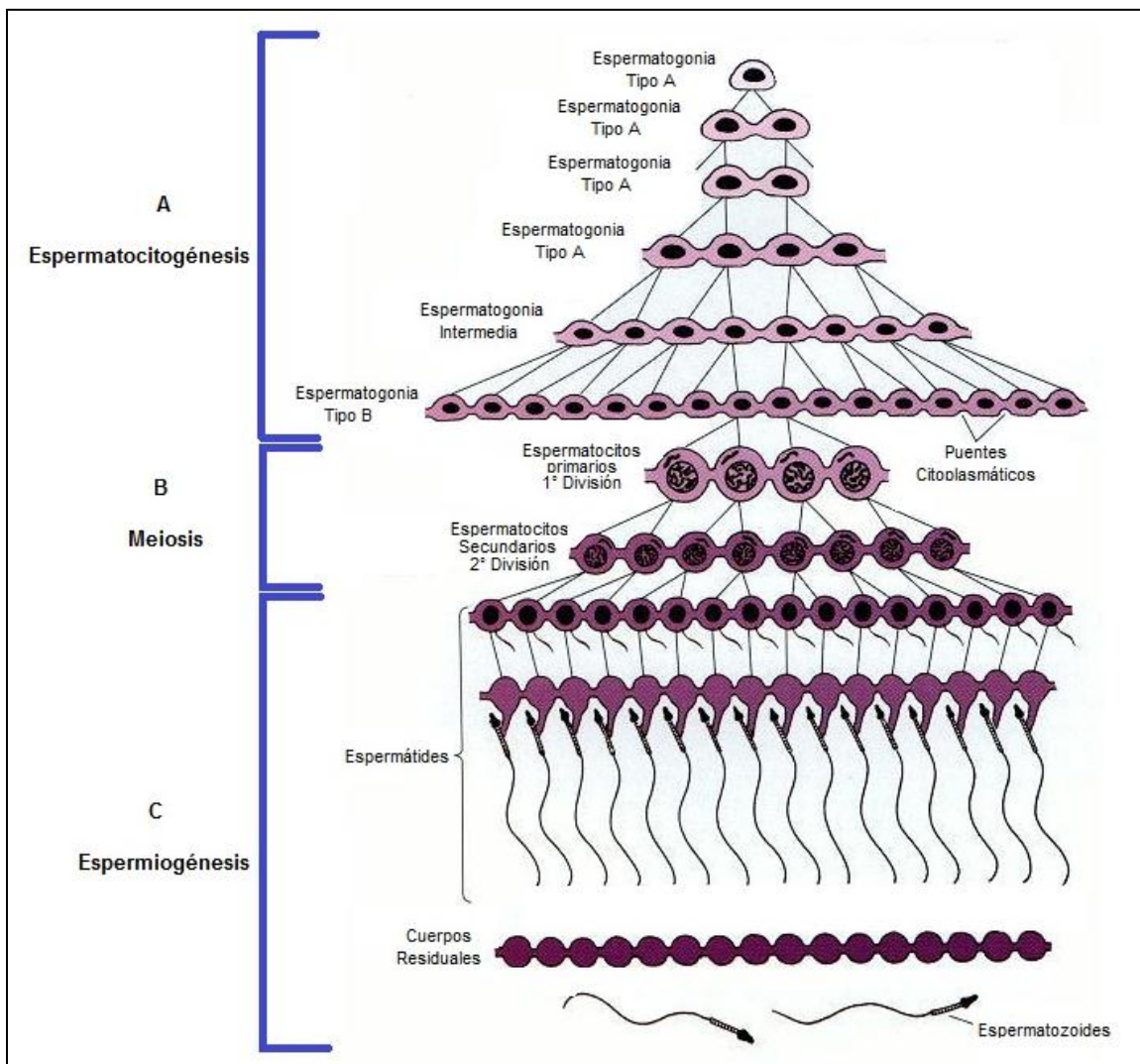


**Fig. 4.- Espermatogénesis.** A) Corte transversal de testículo, B) Corte transversal de un túbulo seminífero, C) Ubicación de las diferentes células de la línea germinal dentro del túbulo, durante la producción de espermatozoides <sup>38</sup>.

La espermatogénesis se divide en tres fases:

1. *Espermatocitogénesis*.- Consiste en la extensiva proliferación de células germinales que producen espermatogonias tipo A, las cuales seguirán dividiéndose nuevamente para dar lugar a espermatogonias tipo B. Estas últimas se dividirán mitóticamente para obtener espermatocitos primarios (Fig. 5.A) <sup>38, 39</sup>.

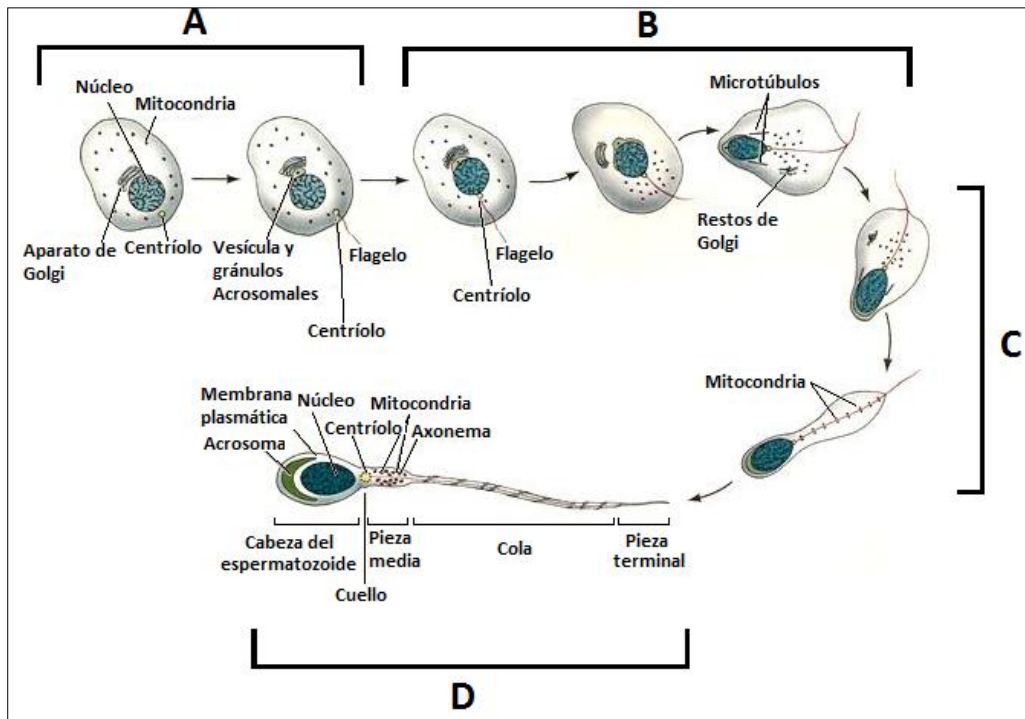
2. *Meiosis*.- Durante un lapso aproximado de 22 días, los espermatocitos primarios sufren una larga profase mitótica, seguida de una segunda división mitótica en la que hay intercambio de DNA y una primera división meiótica en la que se producen dos células diploides, denominadas espermatocitos secundarios (2n) (Fig. 5.B). Estos últimos sufren una segunda división meiótica, obteniendo 4 espermátidas haploides (1n), conectados entre sí a través de puentes citoplasmáticos (Fig. 5.C) <sup>40, 41</sup>.
3. *Espermiogénesis*.- Se caracteriza por una secuencia de transformaciones mediante las cuales las espermátidas redondas se convierten en espermatozoides, mediante la reorganización del núcleo y el citoplasma celular, además de la adquisición de un flagelo (Fig. 5.C).



**Fig. 5.- Fases de la espermatogénesis.** A) Espermatocitogénesis, B) Meiosis, C) Espermiogénesis. Modificado de Gilbert 2003 <sup>38</sup>.

La espermiogénesis se divide en 4 fases:

- a) *ase de Golgi*.- Se forma la vesícula acrosomal, como resultado de la fusión de pequeñas vesículas provenientes de la cara *trans* del complejo de Golgi. Los centriolos migran hacia el polo contrario de la vesícula acrosomal quedando alineados en ángulo recto con el núcleo y la membrana celular (Fig. 6.A).
- b) *Fase de capuchón*.- La vesícula acrosomal envuelve la mitad anterior del núcleo y la cromatina nuclear se condensa (Fig. 6.B).
- c) *Fase acrosomal*.- El acrosoma termina de formarse y se distribuye el contenido. El núcleo se alarga mientras en el citoplasma aumenta el número de microtúbulos, lo que ocasiona que el citoplasma se alargue y se desplace por detrás del polo posterior del núcleo. A continuación se forma la pieza media del espermatozoide al dispersarse los microtúbulos, al tiempo que las mitocondrias se agrupan alrededor del axonema central que consiste en dos microtúbulos centrales rodeados de nueve pares de microtúbulos separados de manera uniforme (Fig. 6.C) <sup>35, 41</sup>.



**Fig. 6.- Fases de la espermiogénesis.** A) Fase de Golgi, B) Fase de capuchón, C) Fase acrosomal, D) Fase de maduración morfológica. Modificado de Gilbert 2003 <sup>38</sup>.



- d) *Maduración morfológica.*- Las hidrolasas contenidas en las células de Sertoli fagocitan el exceso de citoplasma en cuello y pieza media. Se observan regiones bien definidas, que son la cabeza, que comprende el núcleo y el acrosoma; el cuello y la pieza media, donde se localizan las mitocondrias, el axonema y el centriolo; y el flagelo con la pieza final, que se utiliza para la locomoción (Fig.6.D).

## 1.4. Maduración del espermatozoide

### 1.4.1. Maduración epididimal y formación del semen

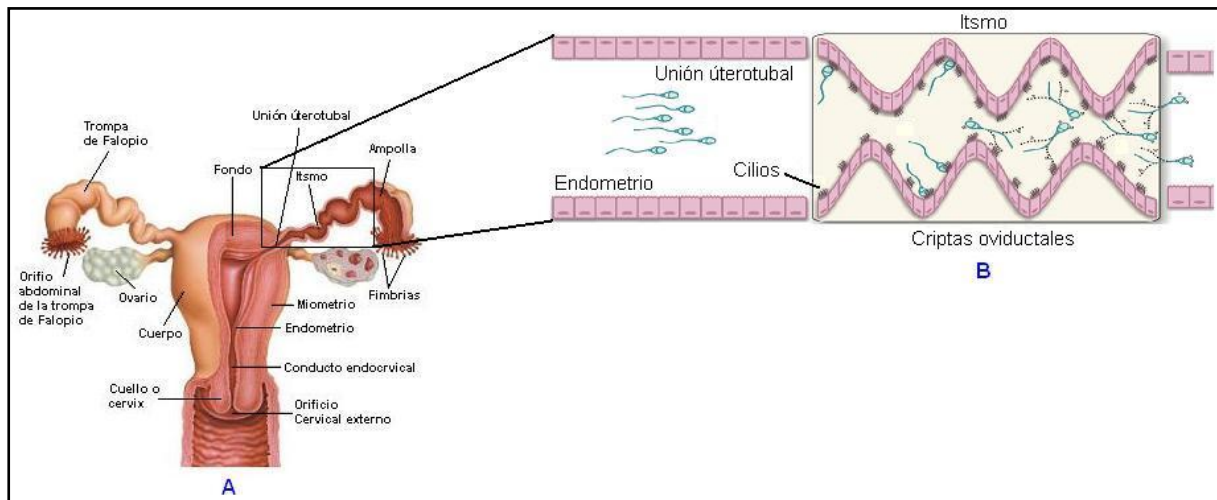
Al final de la espermatogénesis, los espermatozoides están morfológicamente diferenciados pero aún carecen de movilidad progresiva y la habilidad de unirse a la ZP. Los espermatozoides abandonan el testículo y llegan a la luz de los túbulos seminíferos donde son transportados por medio de contracciones peristálticas. Estos entran en los túbulos rectos, para posteriormente migrar a la *rete testis*, avanzan a los conductos eferentes y desembocan en el segmento proximal del epidídimo, donde adquieren la capacidad de moverse. Posteriormente los espermatozoides son transportados desde el segmento proximal hacia la parte distal, donde maduran y se almacenan hasta la eyaculación. La maduración se lleva a cabo mediante un proceso regulado por glicoproteínas, ácido siálico y glicerilfosforilcolina liberados del epitelio epididimal, los cuales inducen cambios en el espermatozoide como la remodelación de la membrana plasmática por medio de la modificación de fracciones de lípidos y proteínas. Durante la eyaculación, los espermatozoides almacenados en el epidídimo pasan a los conductos deferentes <sup>35, 42</sup>. En cuyo extremo distal presentan una dilatación denominada ampolla fusiforme que se conecta con las vesículas seminales. Cada vesícula seminal produce una secreción abundante en azúcares como fructosa (nutriente principal de los espermatozoides), prostaglandinas, proteínas, aminoácidos, ácido cítrico y ascórbico, la cual es expulsada durante cada emisión hacia el conducto eyaculador que desemboca en la uretra prostática. La próstata por su parte, incorpora al semen un líquido lechoso y poco denso que contiene iones calcio ( $Ca^{2+}$ ), fosfatasa ácida, ácido cítrico, amilasa y fibrolisina, las cuales podrían ayudar a neutralizar la acidez de las secreciones vaginales con la finalidad de favorecer la movilidad del espermatozoide <sup>41</sup>. Por último, el semen pasa a través del pene, conformado por tejido eréctil y parte de la uretra peneana. Durante la erección, los cuerpos cavernosos se hacen más turgentes que el cuerpo esponjoso, lo cual provoca que el semen sea expulsado <sup>35,</sup>

<sup>41</sup>.

### 1.4.2. Capacitación espermática

En 1951, Chang <sup>43</sup> y Austin <sup>44</sup> describieron de forma independiente que para que el espermatozoide sea capaz de fecundar al ovocito requiere de un periodo de residencia en el tracto genital femenino, donde el espermatozoide sufre los últimos cambios que lo habilitan para alcanzar el ovocito y fecundarlo, fenómeno que se ha denominado capacitación.

Fisiológicamente, la capacitación inicia cuando los espermatozoides son eyaculados y depositados dentro de la vagina, continúa durante su trayecto a través del cuello y del útero y se completa en la trompa de Falopio (Fig. 7.A). Posterior al paso de los espermatozoides por la unión uterotubal, estos pueden ser retenidos en los pliegues de la mucosa del istmo, el cual crea un microambiente capaz de retrasar la capacitación por al menos 24 horas (Fig. 7.B). Cuando la ovulación está cerca, factores femeninos aún desconocidos transportan a los espermatozoides del istmo al ámpula de manera gradual, lo que ayuda a reducir el número de espermatozoides disponibles en el punto de la fecundación, coadyuvando a evitar la poliespermia. De este modo, y asistidos por compuestos quimiotácticos, los espermatozoides son guiados hacia el complejo cúmulo-ovocito <sup>45, 46</sup>.



**Fig. 7.- Proceso de capacitación.** A) Aparato reproductivo femenino, B) Criptas oviductales donde se da la capacitación <sup>47</sup>.

La capacitación es la suma de múltiples eventos que conducen el aumento de la fosforilación de proteínas <sup>48, 49</sup>, la adquisición de un tipo de movilidad específica denominada hiperactivación <sup>50</sup> y la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal <sup>51</sup>. Bioquímicamente, la capacitación inicia cuando la albúmina, proteína que se encuentra presente en gran abundancia en las

secreciones del tracto femenino, remueve agentes decapitantes de la superficie del espermatozoide adquiridos durante su paso por el epidídimo, tales como glicoproteínas, colesterol y ácidos grasos <sup>46</sup>. Esto induce cambios en la distribución de fosfolípidos, que a su vez producen alteraciones en el potencial de membrana que ocasionan un incremento en la fluidez y la permeabilidad, que permiten el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) además de la activación de segundos mensajeros <sup>45</sup>. En espermatozoides bovinos, la capacitación induce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular 6 veces mayor al basal, lo que estimula a la ATPasa y la adenilciclase, seguida de un incremento en la producción de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), que a su vez activa a la proteína quinasa A (PKA) e induce la fosforilación de proteínas <sup>45, 52</sup>. En humanos, la fosforilación de proteínas se ha observado en el flagelo del espermatozoide <sup>53</sup> y está estrechamente relacionada con la hiperactivación espermática, la cual consiste en el cambio de una movilidad de baja amplitud, simétrica, lineal y progresiva a una movilidad con amplitud de onda mayor, no simétrica, no lineal y con un desplazamiento no progresivo <sup>54</sup>.

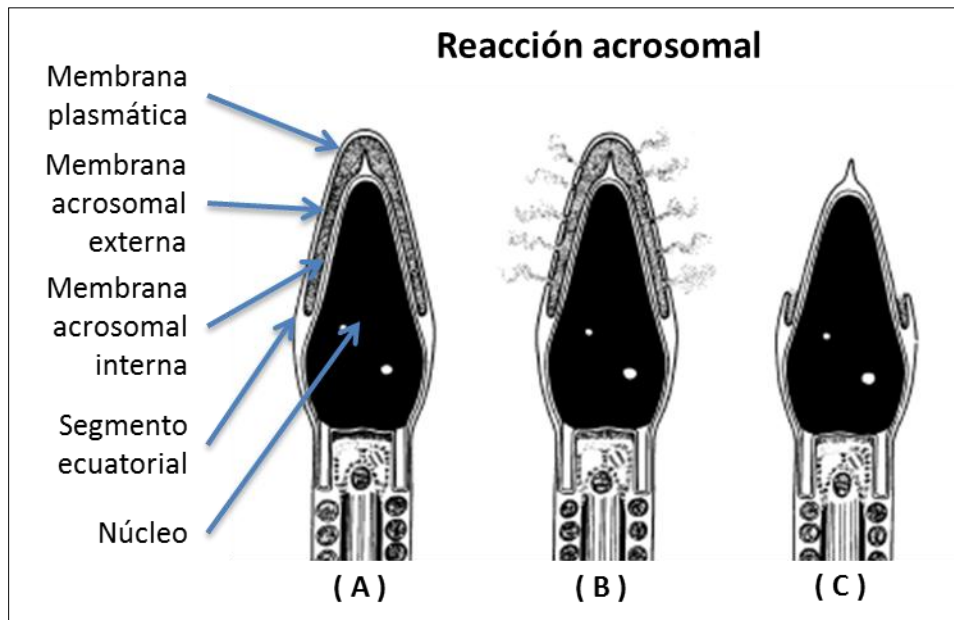
### **1.4.3. Reacción Acrosomal**

Uno de los procesos fundamentales de la fecundación es la penetración de la ZP, para lo cual se requiere que el espermatozoide lleve a cabo la reacción acrosomal (RA). El acrosoma es una estructura tipo saco que en su interior contiene enzimas hidrolíticas como glicohidrolasas, fosfatasas <sup>39</sup>, hialuronidasa <sup>55</sup> y proteasas, principalmente acrosina <sup>56</sup>. Está conformado por la membrana acrosomal externa situada bajo la membrana plasmática, la membrana acrosomal interna situada sobre el núcleo y una región ecuatorial en la cual se unen ambas membranas <sup>54</sup>. La RA es un proceso de exocitosis en la que hay liberación del contenido del acrosoma espermático <sup>54, 57</sup>. Este proceso inicia con la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, dando lugar a la formación de poros que permite la liberación gradual del contenido del acrosoma (Fig. 8). Se ha sugerido que la RA está regulada por cambios en elementos del citoesqueleto, donde los filamentos de F-actina sufren despolarización a su forma monomérica y soluble, denominada G-actina, provocando su dispersión y que ambas membranas se acerquen, al tiempo que la fosfolipasa A2 escinde ácidos grasos de los fosfolípidos promoviendo la fusión de ambas membranas <sup>45, 58, 59</sup>, lo cual origina la formación de las vesículas y la dispersión del contenido acrosomal, dejando expuesta la membrana acrosomal interna.

Estudios previos sugieren que la RA es un evento continuo que inicia con la capacitación y se acelera con la unión espermatozoide-ZP <sup>60, 61</sup>. La interacción del espermatozoide con algunas

moléculas en el entorno del complejo cúmulo-ovocito, como la progesterona, inician la RA <sup>62</sup>. Posteriormente, el espermatozoide interactúa con la ZP, donde se ha descrito que la ZP3 es un inductor de la RA en varias especies <sup>27</sup>. En ratones, cuando el espermatozoide se une a ZP3 se produce una despolarización de la membrana plasmática, lo que ocasiona un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular que activa a la fosfolipasa C. Esta a su vez produce un incremento de fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3) en el citosol que se une a receptores específicos que abren canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, como Cav3.2 <sup>63</sup>, permitiendo un influjo de  $Ca^{2+}$  que desencadena una cascada de transducción de señales que culminan con la exocitosis del acrosoma <sup>64-67</sup>. En espermatozoides humanos, se ha descrito que la ZP3 <sup>68</sup>, la ZP4 <sup>32</sup> y la ZP1 <sup>29</sup> son capaces de promover la RA, si bien los mecanismos empleados para ejercer sus efectos son diferentes <sup>31</sup>. No obstante, además de los inductores fisiológicos anteriormente descritos, hay evidencias de que la RA también puede ser inducida por acción mecánica <sup>69, 70</sup>. De igual forma, se han descrito inductores farmacológicos como el iónforo de calcio A23187, utilizado ampliamente en ensayos *in vitro* <sup>71</sup>.

Por otro lado, se ha sugerido que durante la RA podrían participar proteínas tipo SNARE, las cuales están presentes en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa. Las proteínas SNARE (receptores de unión a N-etilmaleimida soluble) se encuentran asociadas a membrana y son capaces de formar complejos extremadamente estables. En espermatozoides no capacitados, estas proteínas están inactivadas en complejos “*cis*”. Durante la capacitación, el incremento de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma promueve la producción de cAMP y activa a Rab3A, una proteína de unión de tipo GTP que activa al factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), la cual desensambla los complejos “*cis*” e induce su re-ensamblaje en complejos “*trans*”, permitiendo la formación de vesículas <sup>72, 73</sup>.



**Fig. 8.- Esquema del desarrollo de la reacción acrosomal.** A) Acrosoma intacto, conformado por la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa, ambas se unen en el segmento ecuatorial, B) Formación de vesículas a través de la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, C) Acrosoma reaccionado y exposición de la membrana acrosomal interna. Modificado de Yanagimachi 2006<sup>74</sup>.

### 1.5. Proteasas espermáticas y su papel en la penetración de la ZP

Una vez que el espermatozoide sufre la RA inicia la penetración de la ZP. Se han postulado dos mecanismos por los cuales el espermatozoide atraviesa la ZP. El primero propone que la penetración depende únicamente de la acción mecánica producida por la movilidad espermática, mientras que el segundo postula que, adicionalmente a la movilidad, las proteasas espermáticas podrían participar en la degradación localizada de la ZP facilitando el paso del espermatozoide a través de esta matriz<sup>75</sup>. Investigaciones llevadas a cabo por diferentes grupos han arrojado evidencias de que la degradación de la ZP podría llevarse a cabo tanto por la vía del proteosoma como por la vía lisosomal, razón por la que no ha sido posible postular un modelo único para la penetración de la ZP. En el ratón, se ha postulado que la acrosina (serina proteasa), TESP5–GPI (serina proteasa) y/o el proteosoma podrían estar involucradas en este proceso. Por lo tanto, las proteasas del espermatozoide humano han sido objeto de estudio y se han identificado hasta ahora algunas metaloproteasas, serina proteasas y el proteosoma 26S.

**Metaloproteasas.-** Son una familia de enzimas proteolíticas que degradan componentes de la matriz extracelular y la membrana basal<sup>76, 77</sup>. La mayoría de estas enzimas se secretan como zimógenos (pro-MMP), que requieren de un *switch* de cisteína–Zinc<sup>2+</sup> (Cys-Zn<sup>2+</sup>) y pH fisiológico

para ser activadas <sup>77</sup>. En espermatozoides humanos provenientes de muestras normales, se han caracterizado la pro-MMP9 (92 kDa), la pro-MMP2 (72 kDa) y la MMP2 (62 kDa). Todas estas proteasas muestran inhibición al incubarse con O-fenantrolina. Estudios *in vitro* sugieren que la mayoría de las MMPs se secretan poco tiempo después de que los espermatozoides humanos se capacitan en medio mHTF <sup>78</sup>. En espermatozoides porcinos, se han observado metaloproteasas con pesos moleculares de 45, 59, 64, 66 (MMP2), 78 (pro-MMP2) y 225 kDa (dímero de MMP-9). Experimentos de inhibición con EDTA en este modelo, inhiben a la metaloproteasa de 45 kDa, mientras que la O-fenantrolina inhibe todas las metaloproteasas detectadas <sup>79, 80</sup>.

**Serina proteasas.-** Son enzimas que contienen un aminoácido de serina en su centro activo, entre las se encuentran la tripsina y la quimiotripsina <sup>81</sup>. En espermatozoides de diferentes especies de mamíferos se han caracterizado diferentes serina proteasas que se describen a continuación:

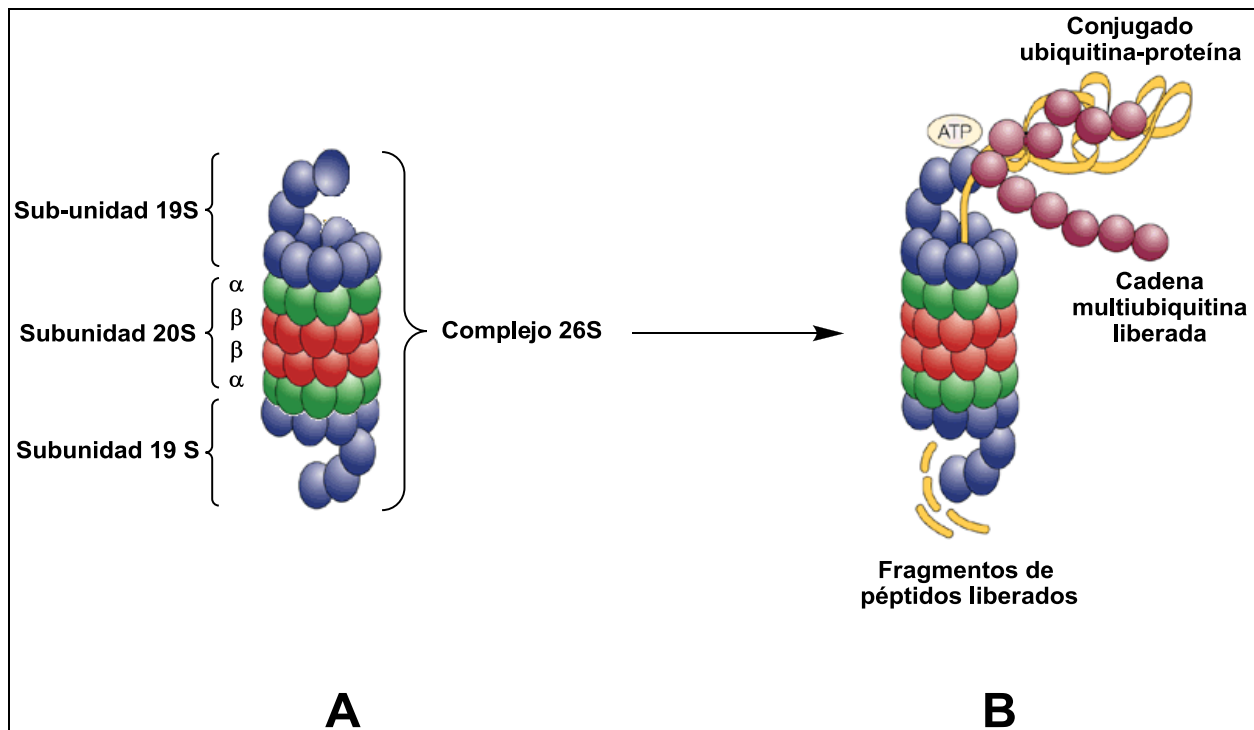
Acrosina.- Es una serina proteasa con actividad gelatinasa. Es el mayor componente del acrosoma; sin embargo, se ha demostrado que no es esencial en la fertilización. Estudios realizados en ratones *knockout* para acrosina (Acr -/-) han mostrado un retraso en la culminación de la fertilización sin que haya inhibición de la misma, razón por la cual se ha postulado que su función es dispersar el contenido del acrosoma durante la RA <sup>59, 82, 83</sup>.

TESP5.- Es una proteína integral de membrana de 42 kDa con actividad gelatinasa que está unida covalentemente a glucosil fosfatidil inositol (GPI). En estudios realizados con espermatozoides de ratón (Acr -/-) en presencia de *p*-aminobenzamidina, inhibidor de serina proteasas, se observó inhibición de la fertilización. Estos resultados demostraron la presencia de otra serina proteasa diferente de acrosina que era esencial para la fertilización <sup>82, 84, 85</sup>. Análisis posteriores demostraron que esta proteasa pertenece a una familia denominada TESP (Testicular Serine Protease) conformada por 5 miembros que van desde TESP-1 a TESP-5. En humanos el homólogo de TESP-5 se ha identificado como testisina, la cual se expresa abundantemente en testículo, aunque su papel durante la fecundación aún no se ha investigado <sup>86</sup>.

BSp66 y BSp120.- Son serina proteasas con actividad gelatinasa, localizadas en la región acrosomal de espermatozoides de rata, ratón y humano, que pueden presentar un peso molecular de 66 ó 120 kDa. En espermatozoides provenientes de una muestra de semen fresco, su peso es de 66 kDa, sin embargo, en espermatozoides criopreservados, esta proteasa

se dimeriza a través de puentes disulfuro y presenta un peso de 120 kDa. Se ha sugerido que durante la fecundación, esta proteasa actúa junto con la acrosina, ya que en estudios de fertilización *in vitro* en bovinos en los que se han utilizado espermatozoides expuestos a anticuerpos contra acrosina y BSp66, se ha observado una disminución en el porcentaje de ovocitos fertilizados <sup>87</sup>.

**Proteosoma.-** Otra vía que ha demostrado tener gran importancia en el proceso de fecundación es la vía ubiquitina-proteosoma, una vía de degradación evolutivamente conservada en células eucarióticas <sup>88</sup>. El proteosoma 26S es un complejo multienzimático, que consiste en una unidad catalítica en forma de barril denominada 20S, la cual contiene en ambos extremos una sub-unidad denominada 19S. A su vez, el complejo 20S se encuentra compuesto de 4 anillos, 2 anillos externos conformados por 7 subunidades tipo  $\alpha$  con nomenclatura definida como PSMA1-7, encargadas de modular la velocidad de entrada de proteínas marcadas para su degradación <sup>89</sup> y 2 anillos centrales conformados por 7 subunidades tipo  $\beta$ , cuya nomenclatura es designada como PSMB1-7 (Fig. 9.A). Las sub-unidades catalíticas del complejo son PSMB5-7, con actividad tipo tripsina y quimiotripsina <sup>88</sup>. Por otro lado, la sub-unidad 19S consiste de dos tipos de subunidades que se entremezclan a lo largo de la estructura. Tiene actividad de tipo isopeptidasa, reductasa y ATPasa, además de ser la encargada del reconocimiento y remoción de las cadenas de multiubiquitina, que sirven de marcaje para las proteínas que van a ser degradadas (Fig. 9.B) <sup>90</sup>.



**Fig. 9.- Estructura del proteosoma.** A) Conformación del proteosoma 26S, el cual consiste en una subunidad 19S en cada extremo y un barril central compuesto por 2 anillos  $\alpha$  y 2 anillos  $\beta$ , cada uno a su vez está compuesto por 7 sub-unidades, B) Degradación de proteínas marcadas con ubiquitina. Modificada de McNaught 2001 <sup>91</sup>.

Recientemente se han realizado una gran cantidad de investigaciones enfocadas a analizar la participación del proteosoma en la interacción de gametos, a partir de experimentos que demostraron su participación durante la fecundación en *H. roretzi* <sup>92</sup>. Trabajos realizados por diferentes grupos de trabajo han demostrado la presencia de proteosomas en espermatozoides de mamíferos, los cuales desempeñan diferentes funciones en el proceso de fecundación <sup>93-95</sup>.

Estudios realizados en modelo porcino, han demostrado la importancia de esta vía de degradación en el proceso de fertilización, ya que en la ZP de ovocitos porcinos se ha confirmado la presencia de proteínas ubiquitinadas, mientras que en la matriz acrosomal de espermatozoides se ha observado la presencia de proteosomas. La participación del proteosoma en la penetración de la ZP se ha evidenciado mediante experimentos de fertilización *in vitro* en los cuales se observó una inhibición total en la fertilización de ovocitos rodeados con ZP incubados con espermatozoides tratados previamente con MG-132, inhibidor del proteosoma <sup>88</sup>.



En espermatozoides humanos, se han localizado proteosomas en la superficie de la membrana plasmática, en membrana acrosomal interna <sup>93</sup> y en flagelo <sup>96</sup>. Se ha demostrado su participación durante la capacitación espermática, al remover proteínas asociadas a la membrana plasmática <sup>97</sup>, además de participar durante el proceso de RA, posiblemente a través de la degradación de proteínas asociadas con la membrana acrosomal externa <sup>98</sup>. De igual forma, se ha sugerido que los proteosomas localizados en la membrana acrosomal interna son retenidos después de la RA y proveen una continua actividad proteolítica durante la penetración de la ZP <sup>88, 93, 98</sup>.

Estas evidencias dan pauta para sugerir la importancia de la participación de las proteasas durante la fecundación. Sin embargo, cuestiones éticas y la dificultad para obtener proteínas purificadas de la ZP nativa dificultan el estudio de los diferentes mecanismos por los cuales se lleva a cabo la penetración de la ZP en humanos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El estudio de los procesos de interacción entre la ZP y el espermatozoide en humanos ha estado limitado debido a la dificultad de obtener ovocitos. Sin embargo, el desarrollo de tecnologías que permiten el aislamiento del cDNA para las proteínas ZP ha permitido la obtención de proteínas ZP recombinantes biológicamente activas. Esto abre la posibilidad de investigar la participación de las ZP en los mecanismos implicados en el proceso de fecundación humana. Evidencias previas sugieren que las proteasas espermáticas podrían estar involucradas en la interacción de los gametos, específicamente durante la penetración del espermatozoide a través de la ZP el cual es un proceso primordial para que la fecundación culmine con éxito, por lo que su caracterización contribuirá al mejor entendimiento de la fecundación en humanos.

## **3. HIPÓTESIS**

Si las proteasas del espermatozoide participan en el proceso de penetración de la zona pelúcida en humanos, al incubar espermatozoides capacitados con proteínas recombinantes de la ZP similares a sus homólogas nativas se observará actividad proteolítica sobre las mismas y se podrá identificar las enzimas involucradas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de los espermatozoides de degradar proteínas recombinantes de la ZP humanas similares a sus homólogas nativas y caracterizarlas.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Obtener proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana.
- Determinar si el espermatozoide es capaz de degradar proteolíticamente las proteínas recombinantes de la zona pelúcida.
- Caracterizar la naturaleza de las proteasas involucradas.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

Los vectores pAcHLT™ de Pharmingen (San Diego, EE.UU.) conteniendo los cDNAs que codifican para las proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas fueron donados por la Dra. Cecilia Cariño del INNSZ. El anticuerpo policlonal contra ZP total de cerdo fue donado por la Dra. Bonnie Dunbar del Depto. de Biología Celular de Baylor College of Medicine, Texas. La albúmina sérica humana (HSA), la albúmina sérica bovina (BSA), el piruvato de sodio, la aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC), el ionóforo de calcio A23187 (Cal), la solución de imidazol 3M, el azul de Coomassie R250, la proteína A conjugada a agarosa, la gamma-globulina, la anti-Ubiquitina de eritrocitos de bovino preparado en conejo (anti-Ub), la ubiquitina pura proveniente de eritrocitos de bovino (Ub), los inhibidores benzamidina, Z-Leu-Leu-Leu-al (MG-132) y 1,10-fenantrolina (O-fenantrolina), se obtuvieron de Sigma Chemical Co (St. Louis, EE.UU.). La solución de montaje VectaShield™ se obtuvo de Vector Laboratories (Bretton, Inglaterra). Las laminillas tratadas con poli-lisina Superfrost fueron obtenidas de Daigger (Illinois, EE.UU.). Los medios Isolate™, Sperm Washing Medium (SWM), Test Yolk Buffer (TYB) y modified Human Tubal Fluid (mHTF) se obtuvieron de Irving Scientific (Santa Ana, EE.UU.). El TNM-FH se obtuvo de Pharmingen (San Diego, EE.UU.). La agarosa acoplada a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.). El kit para cuantificación de proteínas basado en el ácido bicinconínico (BCA) se obtuvo de Pierce (Rockford, EE.UU.). El inhibidor de proteasas Complete se obtuvo de Roche (Penzberg, Alemania). El yodo 125 (<sup>125</sup>I) y el sistema de detección ECL Plus Western Blotting se obtuvieron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Las placas Biomax XAR se obtuvieron de Kodak (Cedex, Francia). Las columnas de filtración Amicon Ultra fueron obtenidas de Millipore (Bedford, EE.UU.). El cloruro de sodio, la urea, el clorhidrato de guanidina, el SDS, la glicina, el glicerol, el etanol y el ácido acético se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc, México). La acrilamida, la bisacrilamida, el TEMED, el persulfato de amonio, el tris, la membrana de nitrocelulosa y el marcador de alto peso molecular se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, EE.UU.). La solución substrato para peroxidasa de rábano ABTS, el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-Cy3 y el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano (HRP) se obtuvieron de Zymed (California, EE.UU.). Las placas de 96 pozos Maxisorp se obtuvieron de Nunc Brand Products (Massachusetts, EE.UU.). Se utilizaron dos microscopios, uno de epifluorescencia modelo 501 de Olympus (Melville, EE.UU.) y uno confocal Zeiss Lsm-510-meta (Weimar, Alemania); el

programa DP2-TWAIN de Olympus (Melville, EE.UU.) y un lector de ELISA Labsystems modelo Multiskan (Helsinki, Finlandia).

## **5.2. Estudios de ubiquitinación de la ZP humana**

Con la finalidad de determinar si las proteínas de la ZP humana se encuentran ubiquitinadas de forma fisiológica, se realizaron inmunofluorescencias de cortes de ovario y ovocitos humanos. Para ello, la técnica de inmunotinción de ovocitos fue previamente estandarizada empleando ovocitos de ratón en colaboración con la Dra. Claudia Treviño y la M. en C. Ana Alicia Sánchez Tusié, del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### **5.2.1. Obtención y procesamiento de ovocitos**

Con la finalidad de estudiar la presencia y ubicación de proteínas ubiquitinadas en la ZP, se utilizaron ovocitos murinos para estandarizar la técnica de inmunofluorescencia y posteriormente cortes de ovario y ovocitos humanos.

Para la obtención de ovocito murinos, se emplearon ratones hembras vírgenes de la cepa CD1 de aproximadamente 12 semanas de edad y con un peso entre 30 – 40 g, libres de patógenos. A los animales se les indujo superovulación a través de la administración de 5 UI de gonadotropina coriónica equina. Dos días después, se les administró 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) y luego de 15 horas se sacrificaron por dislocación cervical. Los ovarios se extrajeron y se colocaron en medio Human Tubal Fluid (mHTF), donde se manipularon para aislar los complejos cúmulo-ovocito, los cuales se incubaron con hialuronidasa para obtener únicamente los complejos ovocito-ZP. Del total de los ovocitos obtenidos, aproximadamente a la mitad se les extrajo el citoplasma para obtener únicamente la ZP. Para los análisis de inmunofluorescencia, tanto los ovocitos como las ZP fueron fijados con *p*-formaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

De igual forma se utilizaron cortes de ovario humano de 5  $\mu$ m obtenidos post-mortem del departamento de patología del Hospital General. Dichos cortes se fijaron en formalina e incluidos en parafina<sup>99</sup>. Previo al análisis de inmunofluorescencia, los cortes se desparafinaron e hidrataron para su posterior bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y utilizarse de forma inmediata para análisis de inmunofluorescencia. Con el fin de estudiar la ZP de ovocitos en estados avanzados de maduración, se obtuvieron ovocitos humanos, extraídos de mujeres estimuladas para ciclos de

reproducción asistida y se donaron para investigación al grupo de trabajo de la Dra. Claudia Treviño (IBT, UNAM) por la clínica de fertilidad INMATER. Los ovocitos libres de cúmulo se mantuvieron en N<sub>2</sub> líquido hasta el momento de su uso. Para llevar a cabo el protocolo, los ovocitos se descongelaron y fijaron con *p*-formaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y de manera inmediata se emplearon para análisis por inmunofluorescencia.

### **5.2.2. Inmunofluorescencia**

Los cortes de ovarios humanos se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios preparados en BSA al 1% en PBS, utilizando anti-HSPZ como control positivo o gamma-globulina como control negativo. Al término de la incubación las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C durante 1 hora con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 preparado en BSA al 1% en PBS. Las laminillas se lavaron con PBS y montadas con una solución de glicerol (Vectashield). Se observaron en el microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de 550-590 nm y capturaron con el programa PD2-TWAIN. Para el estudio de ovocitos murinos y humanos, una tercera parte de los ovocitos obtenidos se incubó con anti-HSPZ como control positivo, otra con anti-Ub y la última parte se incubó en ausencia de anticuerpo primario como control negativo. Las incubaciones se llevaron a cabo durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario IgG acoplado a Alexa Fluor 488 durante 2 horas a temperatura ambiente. Al término del tiempo de incubación, los ovocitos se lavaron con PBS y se observaron en microscopio confocal con un láser de 488 nm y una longitud de onda 500-530 nm, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## **5.3. Obtención de proteínas rhZP purificadas**

### **5.3.1. Cultivo de la línea celular Sf9**

La línea celular Sf9 proveniente de tejido ovárico de la pupa de mariposa *Spodoptera frugiperda*, se utilizó como sistema de expresión de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana ZP2, ZP3 y ZP4. Esta línea celular se cultiva en dos fases: en monocapa, para dar mantenimiento a la línea celular y en suspensión, para obtener células en gran cantidad. Estos procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a lo especificado por Summers y Smith<sup>100</sup> y Prasad y colaboradores<sup>101</sup>, los cuales se describen brevemente a continuación.

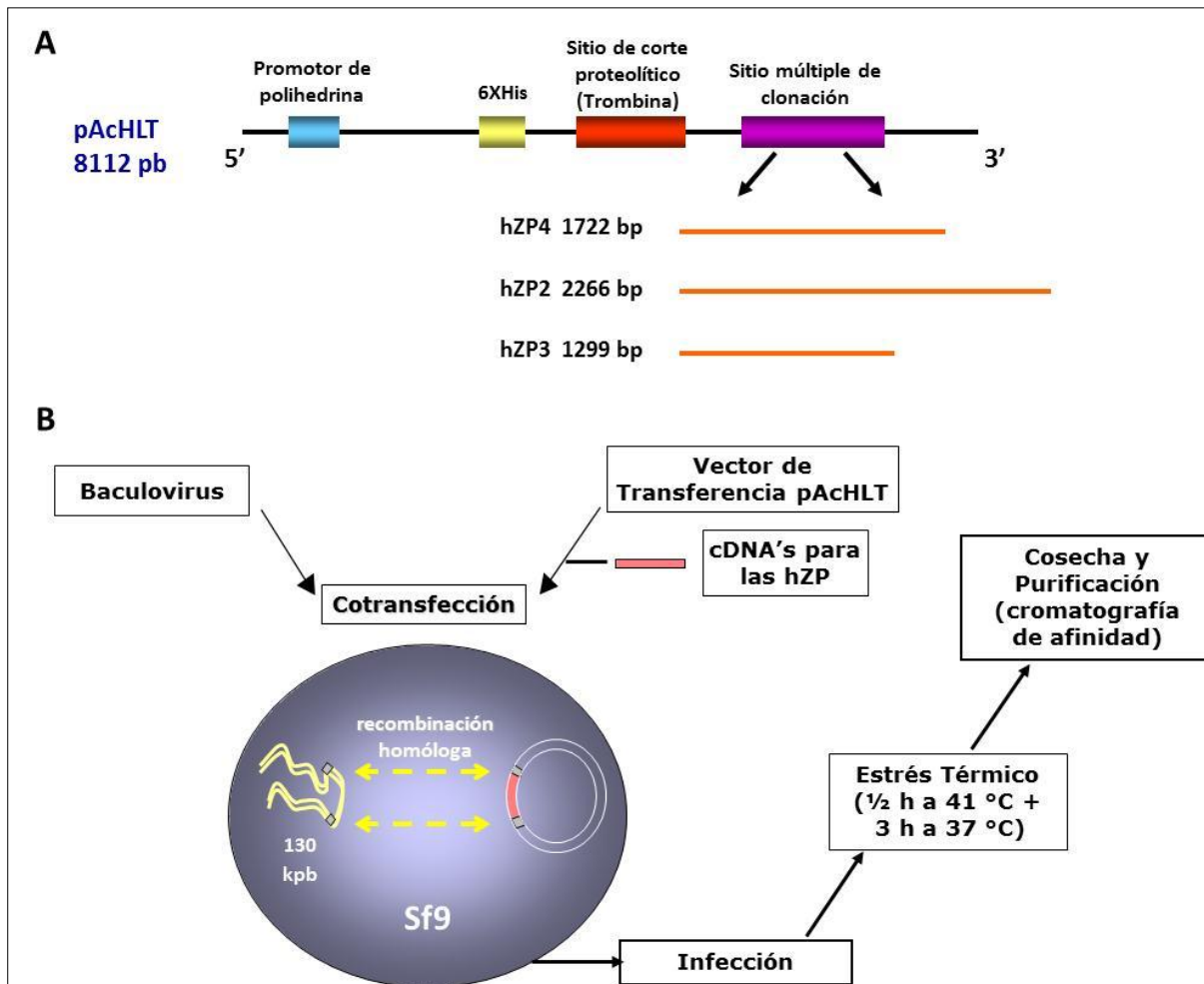
Tanto para el cultivo en monocapa, como el cultivo en suspensión se utilizó el medio de cultivo TNM-FH. El cultivo celular en monocapa se llevó a cabo en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> e incubados a una temperatura de 27°C y sin requerimiento de CO<sub>2</sub>, durante un periodo

aproximado de 5-7 días, tiempo durante el cual las células alcanzan su máximo crecimiento, por lo cual requieren que sean divididas para ampliar el número de las mismas, bien sea en monocapa o en suspensión. Para el cultivo en suspensión, las células se sembraron en frascos de cultivo con agitador magnético a una densidad aproximada de  $0.8-1.0 \times 10^6$  cel/ml en medio TNM-FH, y se incubaron a una velocidad de agitación de 60 rpm, en las mismas condiciones de temperatura y  $\text{CO}_2$  requeridas para el cultivo en monocapa. Cuando el cultivo alcanza una densidad entre  $1.5-2.0 \times 10^6$  cel/mL, se emplearon para infección con los baculovirus recombinantes para la expresión de las proteínas rhZP.

### **5.3.2. Expresión de las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4**

Con la finalidad de obtener proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas recombinantes, las células Sf9 fueron infectadas con baculovirus recombinantes que tienen insertados las diferentes secuencias de cDNA necesarias para la síntesis de estas proteínas (Fig. 10.A), los cuales fueron obtenidos acorde con lo descrito previamente <sup>32</sup>. Para llevar a cabo cada una de las infecciones se emplearon al menos  $100 \times 10^6$  células, las cuales fueron centrifugadas a 1,200–1,500 rpm, los botones celulares se re-suspendieron con los diferentes baculovirus recombinantes en medio TNM-FH y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, empleando una concentración de virus óptima según la titulación del mismo (Manual del Baculovirus Expression Vector System, Pharmingen). Al término de este tiempo, las infecciones se llevaron a una densidad final de  $1 \times 10^6$  cel/mL con medio THM-FH, y se incubaron en suspensión durante 5 días. Posteriormente, se procedió a la cosecha de cada infección, por medio de la centrifugación de las células a 1,200–1,500 rpm. Las células se lavaron 2 veces con PBS y los botones celulares se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$ , hasta el momento de su uso para la obtención de proteínas recombinantes puras. El grado de expresión de las proteínas recombinantes se verificó mediante SDS-PAGE (Apartado 5.3.3) y Western Blot (Apartado 5.3.4).

De igual forma, se determinó si este sistema de expresión podía ser útil para llevar a cabo estudios de degradación vía ubiquitina-proteosoma, a través de la caracterización de la presencia de proteínas ubiquitinadas en las células Sf9 mediante Western Blot. Para ello se emplearon células Sf9 tratadas bajo diferentes condiciones de presencia y ausencia de estrés térmico con el objeto de optimizar el nivel de ubiquitinación de proteínas celulares. Una vez establecidas las condiciones adecuadas de ubiquitinación, se realizaron infecciones para la obtención de las proteínas rhZP siguiendo el protocolo anteriormente descrito y se sometieron a las condiciones de estrés térmico establecidas previamente (Fig. 10.B).



**Fig. 10.- Sistema de expresión de proteínas rhZP.** A) Vector de expresión pAcHLT utilizado, el cual contiene un promotor de polihedrina para favorecer la producción de proteínas de la cápside, un dominio de 6 histidinas para su purificación, un sitio de corte proteolítico por trombina y un sitio múltiple de clonación, en donde se insertó el cDNA de las proteínas ZP, B) Esquema de la metodología utilizada para la obtención de rhZP en células Sf9.

### 5.3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Este procedimiento se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli <sup>102</sup>. Para ello las proteínas se desnaturalizaron mediante calentamiento en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 ó 12% en condiciones desnaturalizantes a 100V, en presencia de un estándar de peso molecular. Al término de la corrida electroforética, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para su análisis mediante Western Blot.

### **5.3.4. Western Blot de proteínas (WB)**

Con la finalidad de identificar proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con solución de bloqueo (TBST con leche descremada al 5%). Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario diluido en solución amortiguadora TBST durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con TBST, se llevó a cabo la detección antígeno-anticuerpo mediante incubación con proteína A-<sup>125</sup>I, seguida de exposición de la membrana a placas de autorradiografía a -70°C durante 24 horas. Alternativamente, la detección del anticuerpo primario se reveló mediante el uso de un anticuerpo secundario adecuado acoplado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000), y revelado mediante quimioluminiscencia utilizando ECL Plus Western Blotting Detection System como sustrato. Como anticuerpos primarios se utilizaron anti-ZP total de cerdo preparado en conejo (anti-HSPZ), que reconoce las proteínas de la ZP humana <sup>99</sup> (1:1,000); anti-Ubiquitina de eritrocitos de bovino preparado en conejo (anti-Ub) (1:100) y anti-β Tubulina monoclonal preparado en ratón (1:50,000).

### **5.3.5. Purificación de rhZP2, rhZP3 y rhZP4**

Las rhZPs fueron purificadas por cromatografía de afinidad. Debido a que las proteínas rhZP expresadas en este sistema no son secretadas al medio y se asocian a la membrana celular <sup>99</sup>, la purificación se realizó bajo condiciones desnaturalizantes con perlas de agarosa acopladas a níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA). Estas perlas muestran gran afinidad por grupos constituidos por 6 residuos consecutivos de histidina, contenidos en la secuencia de las proteínas rhZP <sup>32</sup>.

Los botones celulares recolectados con anterioridad se re-suspendieron en PBS con una mezcla de inhibidores de proteasas y las células en suspensión se sometieron a tratamiento para la ruptura de las membranas mediante ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se recuperó la fracción insoluble, la cual se re-suspendió en amortiguador de lisis con una concentración 2M de urea (Anexo 1) y se incubó durante 45 minutos en hielo. A continuación, el botón celular se recuperó centrifugando a 12,000 rpm durante 10 min y se re-suspendió en amortiguador de solubilización, con una concentración 6M de clorhidrato de guanidina (Anexo 1). La suspensión se incubó durante un lapso de 3 horas a temperatura ambiente con agitación y al término de la incubación, la suspensión se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. Por otro lado, las perlas de agarosa-NiNTA se pre-equilibraron con amortiguador de solubilización y se incubaron con el sobrenadante obtenido toda la noche a 4°C con



agitación. Al día siguiente, las resinas se lavaron con amortiguador de lavado a una concentración 6 M de urea (Anexo 1) y se siguió el protocolo de renaturalización de proteínas mediante un gradiente decreciente de urea, el cual se consiguió a través de la adición gradual de amortiguador de re-naturalización (Anexo 1). Finalmente, se llevó a cabo la elución de la proteína con una solución amortiguadora de imidazol 0.5 M (Anexo 1) <sup>32</sup>.

Al término de la purificación, se corroboró la pureza de las proteínas obtenidas mediante SDS-PAGE (Apartado 5.3.3) y WB (Apartado 5.3.4). Para su uso en los estudios de interacción con espermatozoides, las proteínas eluidas se dializaron en frío contra amortiguador de diálisis (Anexo 1), se concentraron y se cuantificaron por medio de la técnica del ácido bincinónico (BCA). Finalmente las proteínas obtenidas fueron caracterizadas mediante el uso de SDS-PAGE (Apartado 5.3.3) y WB (Apartado 5.3.4).

## 5.4. Caracterización de proteasas espermáticas

### 5.4.1. Procesamiento de muestras de semen

Las muestras de semen se donaron por voluntarios sanos entre 18 y 35 años con abstinencia sexual entre 3 y 5 días mediante masturbación y se recolectaron en frascos estériles. Los eyaculados se incubaron durante 1 hora a 37°C para permitir la licuefacción y se evaluaron de acuerdo a los parámetros y especificaciones de la Organización Mundial de la Salud <sup>103</sup>, los cuales se especifican en la tabla 1.

<b>Tabla 1. Valores de referencia establecidos por la OMS para muestras de semen humano</b>	
<b>Volumen</b>	2 mL ó más
<b>pH</b>	7.2 ó más
<b>Densidad</b>	20 X 10 <sup>6</sup> spm/mL ó más
<b>Número total de espermatozoides</b>	40 X 10 <sup>6</sup> spm por eyaculado ó más
<b>Movilidad</b>	50% o más de móviles (A+B)
<b>Tipo de movilidad</b>	A) Progresiva Lineal B) Progresiva Errática C) No progresiva D) Inmóviles
<b>Morfología normal</b>	Mínimo 15 % (criterio estricto)

### **5.4.2. Capacitación espermática**

Los espermatozoides se capacitaron *in vitro* simulando las condiciones en las que se lleva a cabo la capacitación espermática en el tracto genital femenino. Para ello, los espermatozoides se separaron del plasma seminal, a través de la centrifugación de las muestras a 1800 rpm durante 30 minutos a través de un gradiente de Percoll de densidades discontinuas (Isolate). Los botones de espermatozoides se lavaron con amortiguador de lavado de espermatozoides (SWM) y re-suspendidos en igual cantidad de SWM y medio de refrigeración de espermatozoides (TYB) e incubados toda la noche a 4°C. Al siguiente día se removió el sobrenadante y los botones de espermatozoides, se lavaron con medio Human Tubal Fluid (mHTF), suplementado con 0.3% de Albúmina Sérica Humana (HSA) y 1 mM de piruvato de sodio. Al término de los lavados, los botones de espermatozoides se dejaron en un volumen aproximado de 0.1 ml, se cubrieron sutilmente con 1–1.5 ml de mHTF suplementado (mHTFs) y se incubaron durante 1 hora a 37°C en un tubo inclinado a 45° para la recuperación de espermatozoides móviles mediante la técnica de *swim up*. Al término de la incubación, se colectaron los sobrenadantes donde se encontraban los espermatozoides móviles, y se incubaron a 37°C durante 5-7 horas, luego de evaluar la movilidad y el número total de espermatozoides recuperados.

### **5.4.3. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la función espermática**

Con el objeto de establecer las concentraciones efectivas de diferentes inhibidores sobre las proteasas espermáticas sin afectar la funcionalidad de la célula, los espermatozoides se incubaron con diversos inhibidores, que consistieron en MG-132 (inhibidor del proteosoma); O-fenantrolina y EDTA (inhibidores de metaloproteasas) y benzamidina (inhibidor de serina proteasas) a diferentes concentraciones y se evaluaron sus efectos sobre la viabilidad, la movilidad y la reacción acrosomal (RA) espontánea e inducida por ionóforo de calcio A23187 (Cal). Los posibles cambios en la movilidad espermática, se analizaron de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS (ver Tabla 1). Para determinar la viabilidad celular, los espermatozoides se tiñeron con el colorante vital azul tripano preparado con glutaraldehído al 12% y se evaluaron al menos 100 células por tratamiento. Los espermatozoides empleados para evaluar la RA espontánea se lavaron con PBS y se fijaron re-suspendiendo con etanol (EtOH) al 70%. Para la evaluación de la RA inducida con Cal, los espermatozoides se incubaron durante 30 minutos a 37°C en medio mHTF con Cal 10 µM. Luego se lavaron con PBS y se fijaron en EtOH al 70%. Finalmente, cada alícuota se empleó para preparar frotis en laminillas pre-tratadas con poli-l-lisina y se analizaron mediante la técnica de tinción de

acrosoma con la lectina *Pisum sativum* (PSA), acoplada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como se ha descrito previamente <sup>32</sup>. Los espermatozoides que mostraron señal homogénea en la región acrosomal se consideraron como intactos, mientras que los espermatozoides que no mostraron fluorescencia en esta región, que mostraron la región ecuatorial fluorescente o que mostraron tinción desigual se consideraron como reaccionados <sup>104-106</sup>. Para determinar el porcentaje de células con RA, se analizaron al menos 200 células por tratamiento en el microscopio de epifluorescencia con un filtro de emisión de 460-495 nm y 510-550 nm. Los valores de RA obtenidos se expresaron como porcentaje de células reaccionadas y se normalizaron contra los valores de RA obtenidos en el control negativo correspondiente.

#### **5.4.4. Zimografía de proteasas de espermatozoide**

Con la finalidad de determinar si las concentraciones de EDTA utilizadas en los análisis de función espermática son capaces de inhibir las proteasas contenidas en el espermatozoide, se utilizaron zimografías en geles de poliacrilamida al 10%, suplementados con gelatina al 0.1%. La técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido previamente <sup>107</sup>.

Para esta finalidad se prepararon geles de poliacrilamida al 10% conteniendo 0.1% de gelatina, en el cual se sembraron  $2 \times 10^6$  espermatozoides capacitados, obtenidos del procedimiento de capacitación (Apartado 5.4.2). Estas muestras se lavaron dos veces en PBS y se re-suspendieron con amortiguador de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol (Anexo 1). Una vez adicionado el amortiguador de carga, las muestras se homogenizaron y congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de uso. Previo a la corrida electroforética, las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 5 minutos y se colocaron en hielo hasta el momento de uso. Se colocaron en el mismo gel 3 carriles con la misma cantidad de espermatozoides y se separaron a 100V por 90 minutos. Posteriormente el gel se dividió acorde a las muestras a analizar y cada parte se incubó con amortiguador de re-naturalización (Anexo 1), en presencia o ausencia de EDTA 1, 2 ó 5 mM durante 30 minutos con agitación y a temperatura ambiente, seguido por dos incubaciones con amortiguador de desarrollo (Anexo 1), en presencia o ausencia de EDTA 1, 2 ó 5 mM, la primera incubación en las mismas condiciones requeridas para el amortiguador de desarrollo y la segunda a  $37^{\circ}\text{C}$ , sin agitación durante 20 horas para favorecer la actividad de las proteasas. La detección de la actividad proteolítica se realizó por medio de tinción con azul de Coomassie (Anexo 1) por espacio de 45 minutos y seguido de solución desteñidora (Anexo 1).

## 5.5. Degradación proteolítica de rhZP mediada por proteasas espermáticas

Con la finalidad de determinar si las proteínas rhZP eran degradadas por proteasas de espermatozoides humanos, se realizaron ensayos de interacción proteínas rhZP-espermatozoides. Para ello se utilizaron 10 µg de proteínas solubles purificadas rhZP2, rhZP3 y rhZP4. Cada proteína se incubó con  $2 \times 10^6$  espermatozoides humanos capacitados (Apartado 5.4.2) en mHTF, durante 16 horas a 37°C. Al término de la incubación, cada tratamiento se lavó con PBS a 3600 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y los botones celulares se re-suspendieron en amortiguador de carga (Anexo 1) y se guardaron a -20°C hasta el momento de su análisis mediante SDS-PAGE (Apartado 5.3.3) y WB incubado con anti-HSPZ (Apartado 5.3.4).

Con el objetivo de estudiar la vía de degradación de las rhZP mediada por proteasas de espermatozoides humanos, se utilizaron proteínas rhZP sometidas a estrés por choque térmico inmovilizadas en perlas de agarosa Ni-NTA y se incubaron con espermatozoides en ausencia o presencia de diferentes inhibidores. Para ello se utilizaron placas de 48 pozos bloqueadas con BSA al 3% en PBS toda la noche a 4°C, sin agitación. Al siguiente día la placa se lavó con PBS y se equilibró con mHTF. En cada uno de los pozos se colocaron proteínas rhZP inmovilizadas en Ni-NTA (8 µg para cada una) para proceder luego a incubarlos con  $2 \times 10^6$  spm capacitados/pozo en cámara húmeda a 37°C durante 16 horas. Estas incubaciones se llevaron a cabo en ausencia o presencia de diferentes inhibidores de proteasas MG-132 10 µM, O-fenantrolina 1 mM, benzamidina 1 mM, y sus respectivos vehículos utilizados como control. Al término de la incubación, los tratamientos se centrifugaron a 3600 rpm; el sobrenadante se recuperó para cuantificación de ubiquitina libre, las perlas de Ni-NTA se lavaron con PBS a 3600 rpm y 5000 rpm, durante 10 minutos y se re-suspendieron con amortiguador de carga con 2% de β-mercaptoetanol y se congelaron a -20°C para su posterior análisis de degradación mediante SDS-PAGE (Apartado 5.3.3) y WB incubado con anti-HSPZ (Apartado 5.3.4).

## 5.6. Análisis Estadístico

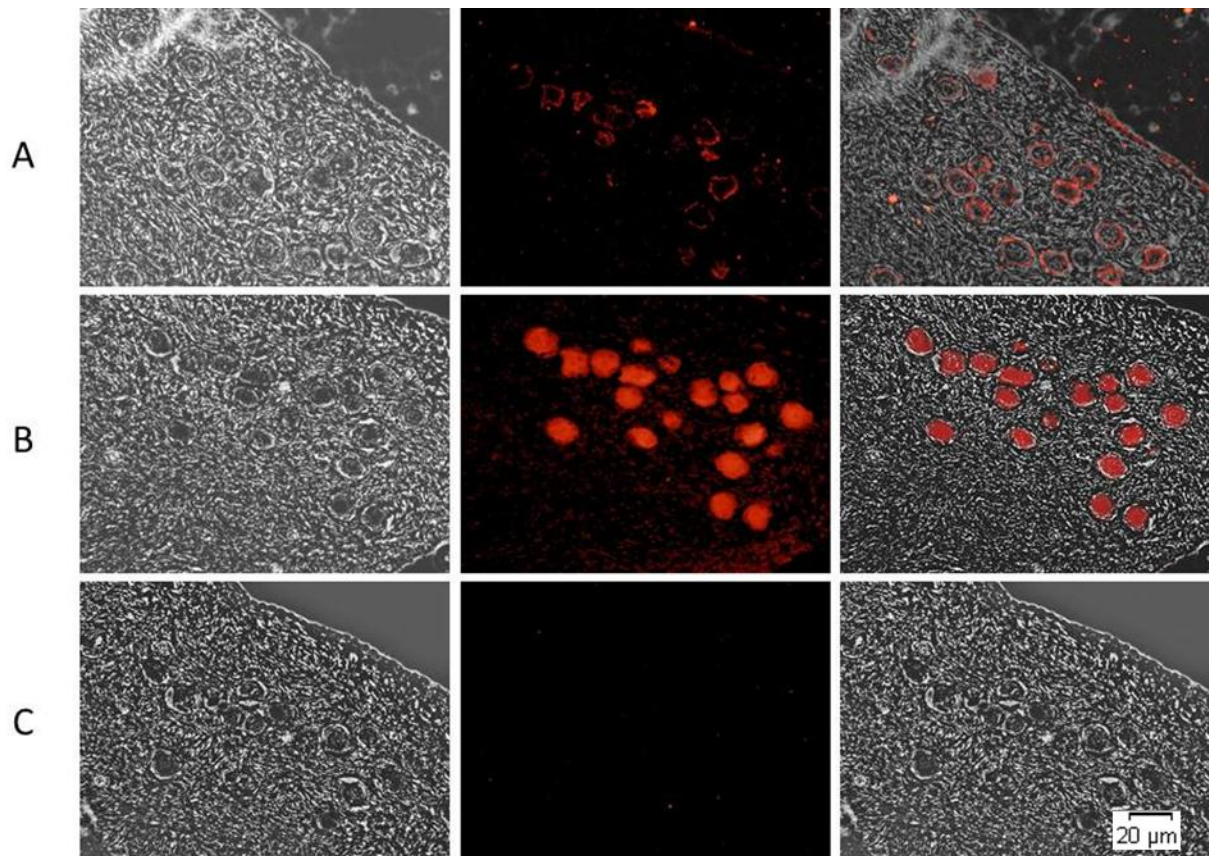
Las gráficas se presentan como la media  $\pm$  error estándar (EE). Los resultados de movilidad y RA se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey para comparación de grupos. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Ubiquitinación de proteínas de la ZP nativa

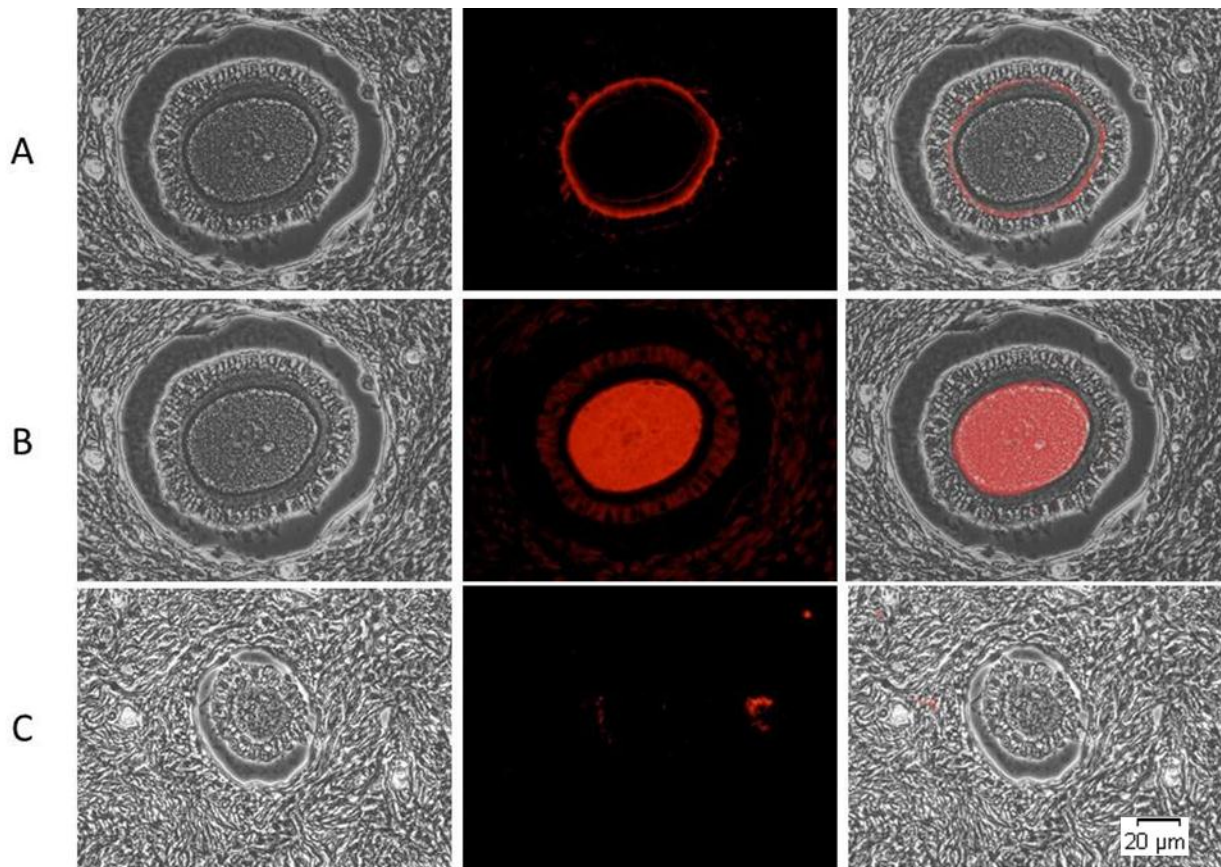
#### 6.1.1. Cortes de ovario humano

Se realizaron inmunofluorescencias de cortes de ovario humano fijados en formalina con la finalidad de determinar si hay ubiquitinación en las proteínas de la ZP nativa humana. En la Figura 11, se muestran cortes seriados en los que se observan folículos primarios (A, B y C), cuya ZP está es reconocida por el suero anti-HSPZ (A). Al incubar con anti-Ub, se observa ubiquitinación en el ovocito y ausencia de señal en la ZP (B). No se observa señal en los cortes incubados con gamma-globulina, la cual se empleó como control negativo en todos los ensayos de inmunofluorescencia que se realizaron (C).



**Fig. 11.- Ubiquitinación en folículos primarios de ovario humano.** Los cortes se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario: A) Anti-HSPZ, B) Anti-Ub, C) IgG. Izquierda: Contraste de fases; Centro: Inmunofluorescencia; Derecha: Sobreposición. Aumento 20 X.

Al analizar folículos secundarios en los cortes de ovario (Fig. 12), se observó, la ZP bien definida y de mayor grosor que en los folículos primarios (A). Igualmente, al incubar con anti-Ub se observó ubiquitinación en el ovocito y no en la ZP (B), lo que sugiere que en humanos hay ausencia de ubiquitinación de la ZP o bien ocurre en estadios más avanzados de maduración del ovocito.

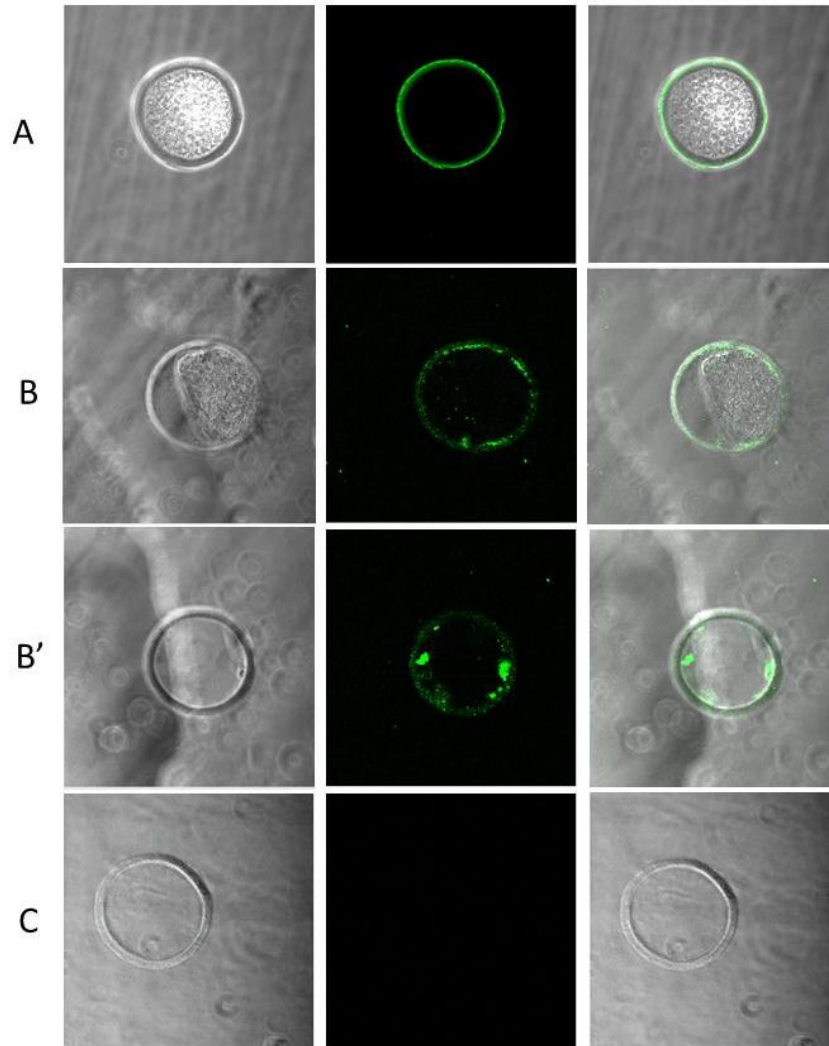


**Fig. 12.- Ubiquitinación en ovocitos secundarios.** Se utilizaron cortes de ovario humano, los cuales fueron analizados mediante inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario: A) Anti-HSPZ, B) Anti-Ub, C) IgG. Izquierda: Contraste de fases; Centro: Inmunofluorescencia; Derecha: Sobreposición. Aumento 40 X.

### 6.1.2. Ovocitos maduros

Con el objeto de estudiar la ubiquitinación de la ZP en ovocitos humanos maduros, previamente se realizaron análisis por inmunofluorescencias en ovocitos y ZP's de ratón obtenidos mediante superovulación de ratones hembra y fijados en formalina a fin de estandarizar las condiciones óptimas de manipulación para poder llevar a cabo este protocolo en ZP humana. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos al estudiar ovocitos murinos, observándose la

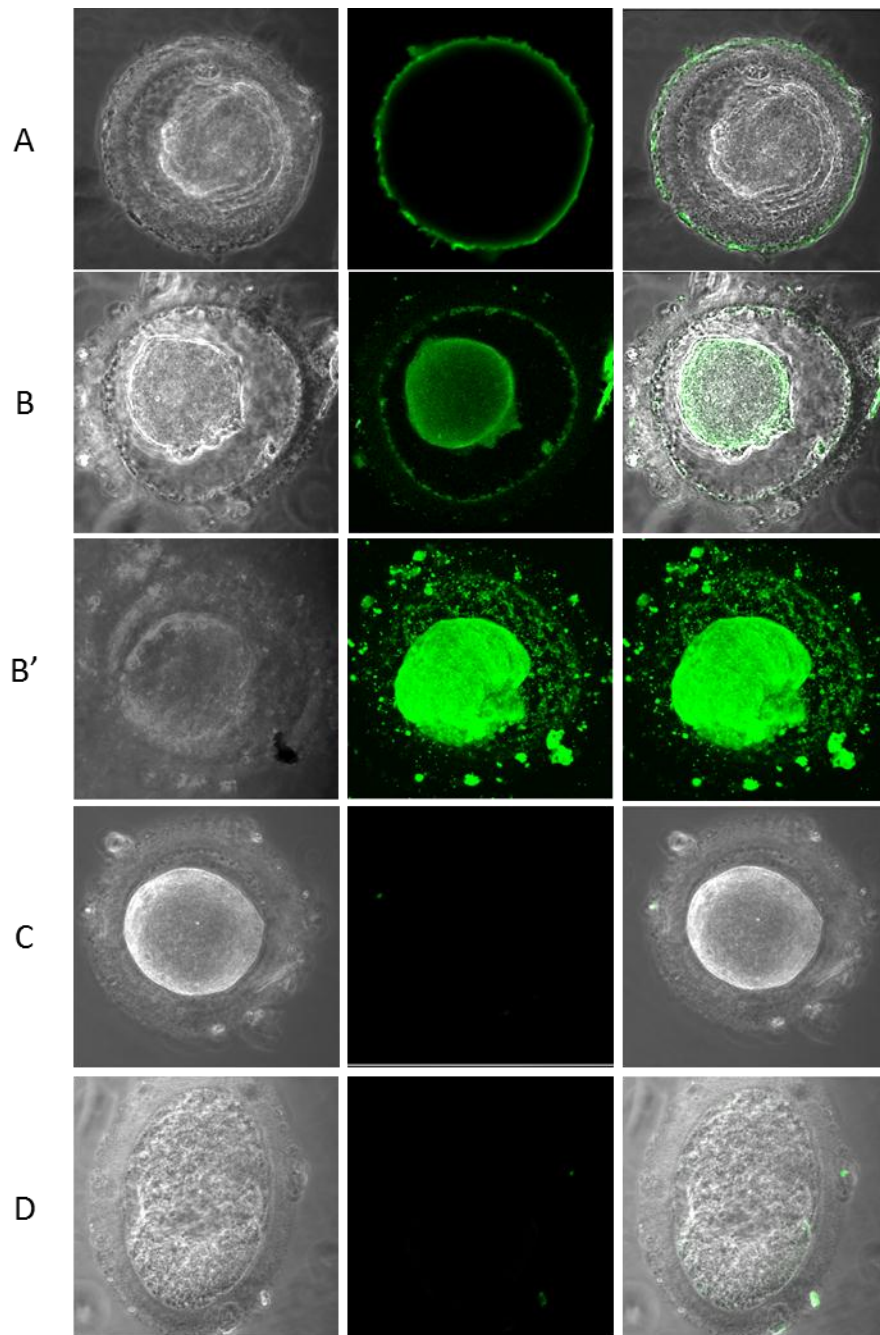
estructura de la ZP bien definida (A). Al incubar los ovocitos con anti-Ub, se observa ubiquitinación en la ZP y ausencia de señal en el ovocito (B y B'). En el control negativo llevados a cabo con ovocitos incubados en ausencia de anticuerpo primario no se observa fluorescencia (C).



**Fig. 13.- Ubiquitinación en ovocitos de ratón.** Ovocitos murinos fueron analizados mediante inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario: A) Ovocito rodeado con ZP incubado con Anti-HSPZ, B) Ovocito rodeado con ZP incubado con Anti-Ub, B') ZP incubada con Anti-Ub, C) Control negativo: Ausencia de anticuerpo primario. Izquierda: Contraste de fases; Centro: Inmunofluorescencia; Derecha: Sobreposición.

Al emplear la misma técnica para el análisis de ovocitos humanos (Fig. 14) se observó que la ZP estuvo bien definida (A) y que hubo ubiquitinación tanto en el ovocito como en la ZP (B y B'). En los controles negativos llevados a cabo con ovocitos incubados en ausencia de anticuerpo

primario (C) y bajo condiciones de competencia de Ub pura con anti-Ub no se observó fluorescencia, lo que corroboró la especificidad del anticuerpo (D).



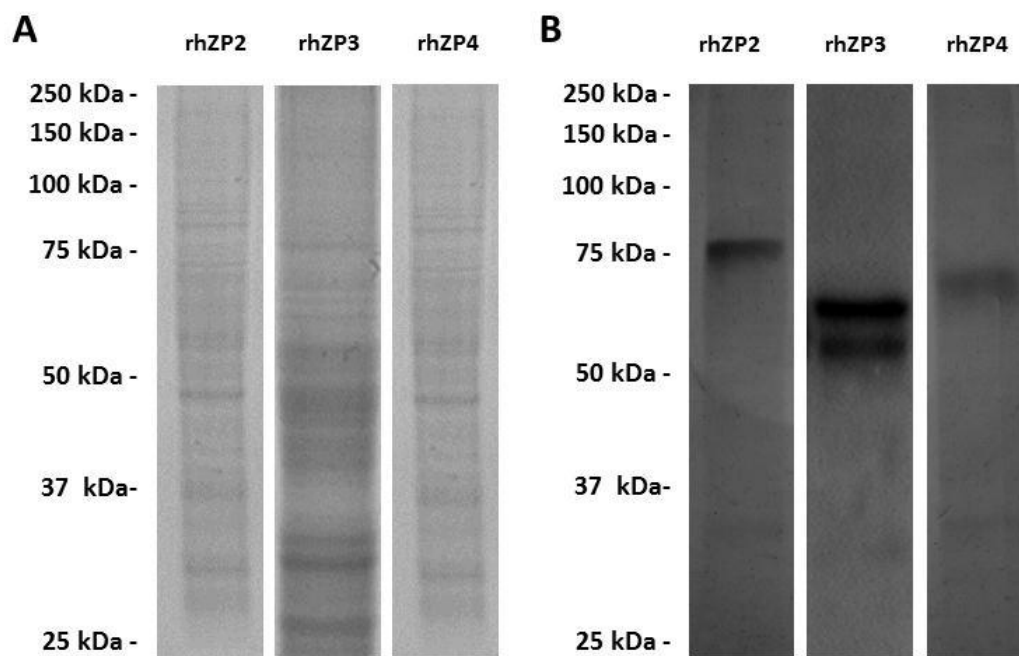
**Fig. 14.- Ubiquitinación en ovocitos humanos.** Ovocitos Humanos fueron analizados mediante inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario: A) Anti-HSPZ; B) Anti-Ub, B') Reconstrucción en 3D con anti-Ub, C) Control negativo, D) Ub pura + Anti-Ub. Izquierda: Contraste de fases; Centro: Inmunofluorescencia; Derecha: Sobreposición.



## 6.2. Obtención de proteínas rhZP purificadas

### 6.2.1. Expresión de las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4

Se obtuvieron proteínas recombinantes de la ZP humana por medio del sistema de expresión del baculovirus. Los botones celulares obtenidos se analizaron mediante SDS-PAGE y WB incubado con anti-HSPZ (Fig. 15). En el gel teñido con azul de Coomassie se observaron cargas de proteínas homogéneas (A). La identidad de las proteínas rhZP fue confirmada mediante WB, observándose que tienen masas moleculares de aproximadamente 80 kDa para ZP2, 55 y 65 kDa para ZP3 y 66 kDa para ZP4 (B), las cuales coinciden con los pesos moleculares reportados anteriormente para los cDNA de estas proteínas.



**Fig. 15.- Caracterización de proteínas rhZP expresadas en células Sf9.** A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, B) WB incubado con anti-HSPZ.

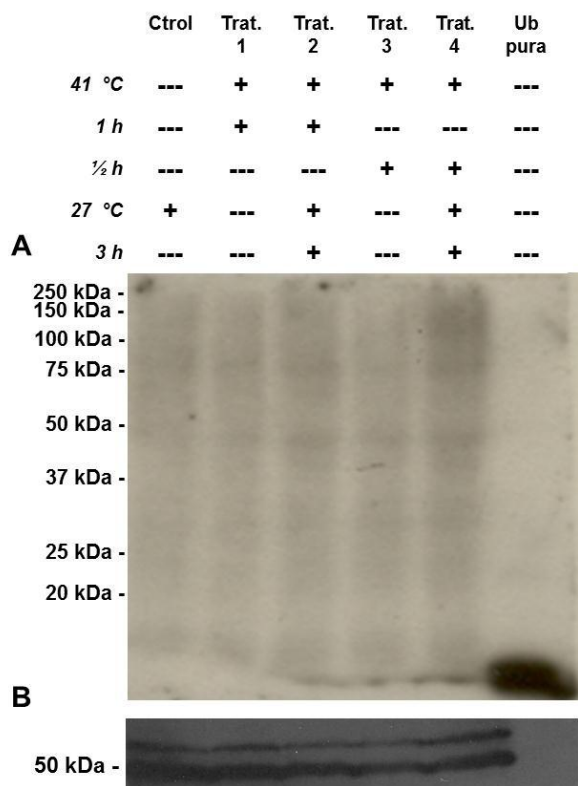
### 6.2.2. Inducción de ubiquitinación de proteínas en células Sf9

Con la finalidad de obtener proteínas ZP recombinantes ubiquitinadas, las células Sf9 se sometieron a diferentes condiciones de estrés térmico, resumidas en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones de inducción de estrés térmico en células Sf9.**

Tratamiento	Condiciones Estrés térmico	Condiciones Recuperación
1	41°C (1 h)	-----
2	41°C (1 h)	27°C (3 h)
3	41°C (½ h)	-----
4	41°C (½ h)	27°C (3 h)

Al término de cada tratamiento, las células fueron cosechadas y analizadas por medio de WB con anti-Ub (Fig. 16), observándose que al incubar las células ½ hora a 41°C seguido de un periodo de recuperación de 3 horas a 27°C (tratamiento 4) hubo un mayor grado ubiquitinación de proteína, sugiriendo que estas condiciones fueron adecuadas para la obtención de proteínas ubiquitinadas en las células Sf9.

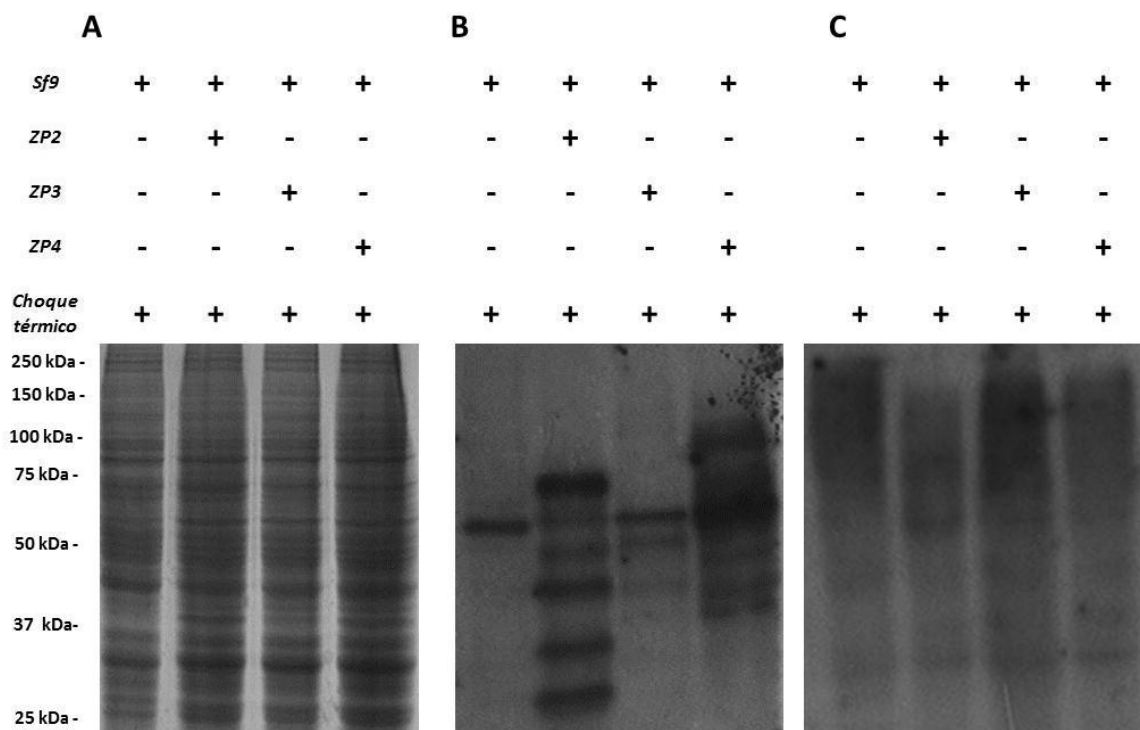


**Fig. 16.- Ubiquitinación de proteínas en células Sf9 sometidas a estrés térmico.** Las células tratadas como se describe en la Tabla 2 fueron analizadas mediante WB. Se incluyó un carril con Ub pura como control positivo del anticuerpo. A) WB incubado con anti-Ub, B) WB incubado con anti-β tubulina.

Para verificar una carga homogénea de proteínas, la membrana fue re-utilizada para su análisis mediante WB incubado con anti- $\beta$  tubulina (Apartado 5.3.4).

### 6.2.3. Obtención de proteínas rhZP ubiquitinadas

Posterior al procedimiento de infección de las células Sf9 con baculovirus recombinantes, estas fueron sometidas a estrés térmico, de acuerdo a las condiciones previamente establecidas. Los botones celulares obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE y WB incubado con anti-Ub y anti-HSPZ (Fig. 17).

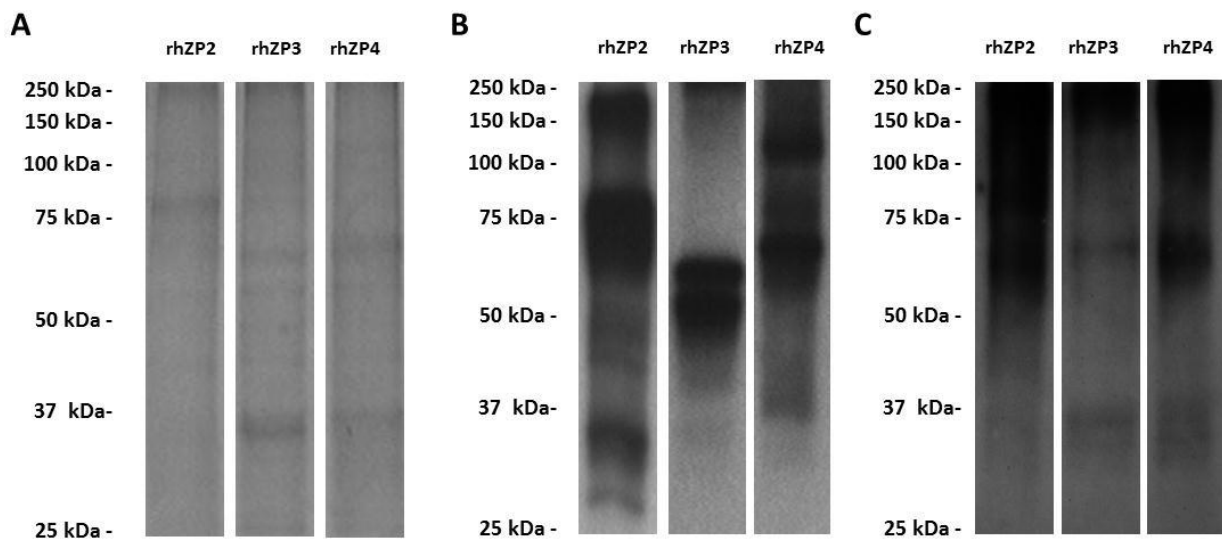


**Fig. 17.- Síntesis de proteínas en células Sf9 infectadas con virus recombinantes para la expresión de proteínas ZP2, ZP3 y ZP4 humanas y sometidas a estrés térmico.** A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, B) WB incubado con anti-HSPZ, C) WB incubado con anti-Ub.

En el gel teñido con azul de Coomassie se observó homogeneidad en la carga total de proteínas de los botones de células con y sin infección con baculovirus recombinantes (A). La identidad de las proteínas rhZP obtenidas fue verificada mediante WB con anti-HSPZ (B), observándose para rhZP2 una banda mayoritaria de aproximadamente 80 kDa y otras bandas de menor intensidad y menor masa molecular de aproximadamente 28, 35, 45, 48 y 55 kDa.

Con respecto a la proteína rhZP3, se observaron dos bandas de aproximadamente 50 y 55 kDa, y una banda de menor intensidad y peso molecular de aproximadamente 40 kDa. Para rhZP4, se observó una banda de mayor intensidad de aproximadamente 66 kDa, varias bandas de menor peso molecular comprendidas entre 37 y 55 kDa, además de otras bandas de mayor peso molecular comprendidas entre 70 y 250 kDa. Se sugiere que en cada caso, las bandas de menor masa molecular pueden corresponder a productos de degradación proteolítica debidas al tratamiento. Para corroborar si efectivamente se produjeron conjugados de proteína-ubiquitina en las diferentes infecciones, las mismas se analizaron adicionalmente mediante WB con anti-Ub (C) y se observó que tanto en las células Sf9 sin infectar como infectadas con los virus recombinantes para ZP2, ZP3 y ZP4 obtenidas se detectó la presencia de bandas de alto peso molecular, sugiriendo la posible presencia de proteínas conjugadas con ubiquitina en cada uno de los diferentes tratamientos.

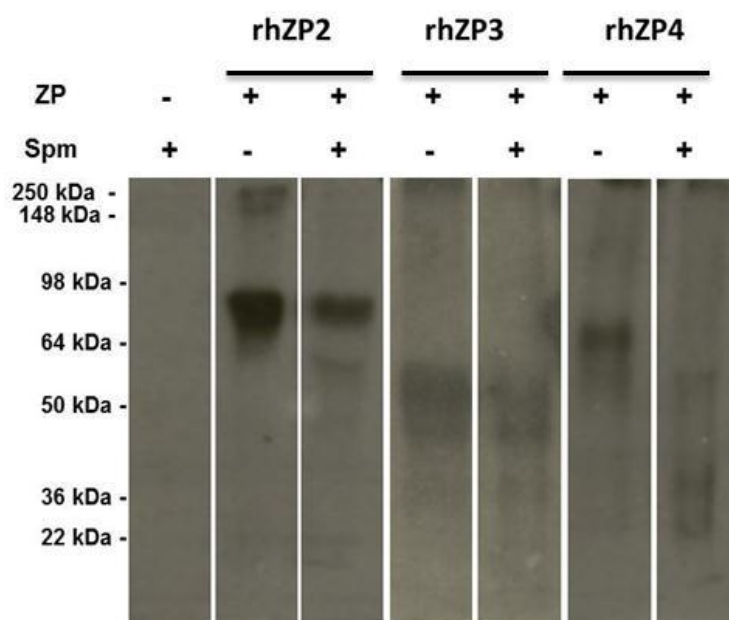
Posteriormente las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4 obtenidas, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad. Estas proteínas se mantuvieron inmovilizadas en la matriz de agarosa, con el objeto de optimizar la interacción entre el espermatozoide y las proteínas recombinantes. Su caracterización se llevó a cabo mediante SDS-PAGE y WB incubado con anti-HSPZ (Fig. 18). En el gel teñido con azul de Coomassie (A) se observa que se obtuvieron preparaciones donde predominaron bandas de proteínas con los pesos esperados para las proteínas recombinantes humanas ZP2 (85 kDa), ZP3 (55 y 65 kDa) y ZP4 (66 kDa), si bien se detectan algunos contaminantes de mayor y menor peso molecular. El WB correspondiente demostró la identidad de las proteínas obtenidas (B). Adicionalmente, para las preparaciones puras de proteína se observaron bandas de alto peso molecular que son más abundantes para rhZP4, mismas que podrían corresponder a una población de formas multiubiquitinadas de las proteínas rhZP. Para corroborar la presencia de conjugados de proteína-ubiquitina en las proteínas purificadas, las mismas se analizaron adicionalmente mediante WB con anti-Ub (C) se observó que tanto para rhZP2, rhZP3 y rhZP4 hay presencia de bandas de alto peso molecular, lo que sugiere la posible presencia de proteínas conjugadas con ubiquitina en cada purificación.



**Fig. 18.- Caracterización de proteínas rhZP expresadas en células Sf9 sometidas a estrés térmico y purificadas mediante cromatografía de afinidad.** A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, B) WB incubado con anti-HSPZ, C) WB incubado con anti-Ub.

### 6.3. Degradación proteolítica de rhZP por proteasas espermáticas

Con la finalidad de determinar si las proteínas rhZP obtenidas a través del sistema de expresión Sf9 eran degradadas por acción de las proteasas espermáticas, se incubaron espermatozoides capacitados provenientes de muestras de semen que cumplieron con los parámetros establecidos por la OMS (Tabla 1), con las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4 purificadas, durante 16 horas a 37°C. A continuación, las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y caracterizadas mediante WB con anti-HSPZ (Fig. 19). Los resultados obtenidos mostraron que las tres proteínas rhZP fueron degradadas proteolíticamente en presencia de espermatozoides, lo cual indicó que este modelo puede ser utilizado para el estudio de proteasas espermáticas involucradas en la degradación de las proteínas de la ZP.



**Fig. 19.- Degradación de proteínas rhZP por espermatozoides humanos capacitados.** WB incubado con anti-HSPZ.

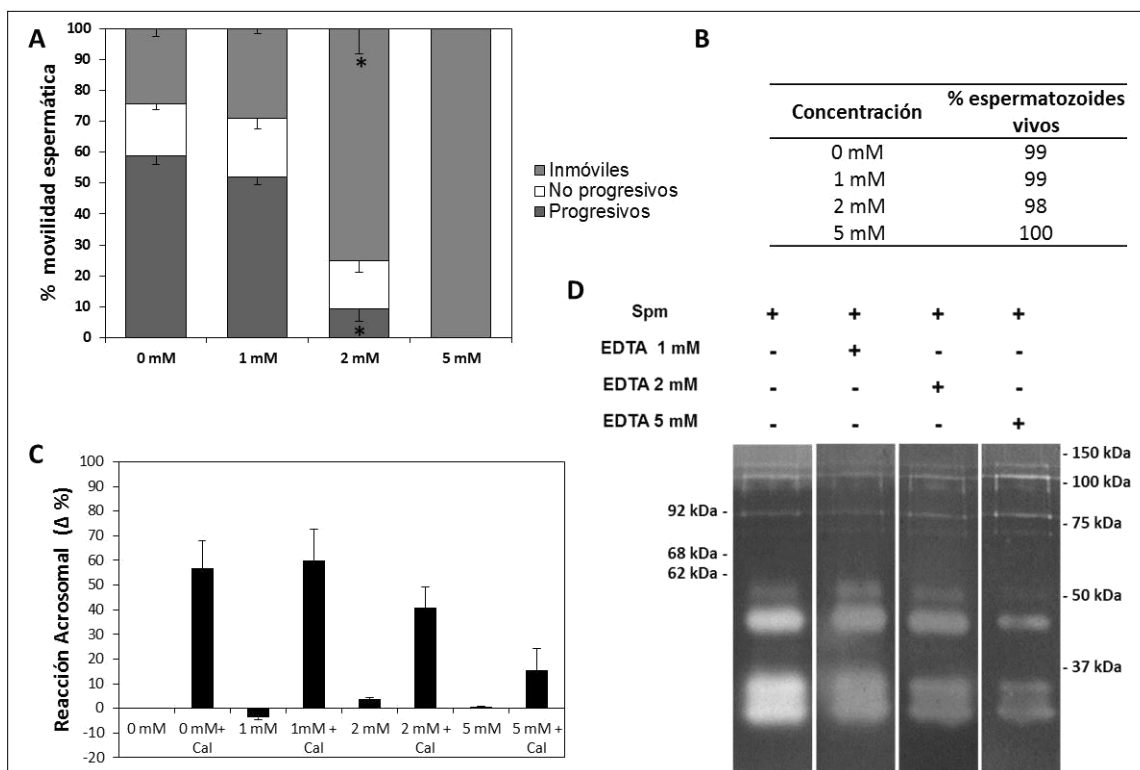
## 6.4. Caracterización de proteasas espermáticas

### 6.4.1. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la función espermática

Para caracterizar las diferentes proteasas del espermatozoide humano, se emplearon inhibidores específicos de la actividad proteolítica, para verificar su actividad y posible toxicidad sobre las células. Para ello, los espermatozoides se pre-incubaron con EDTA, O-fenantrolina, benzamidina y MG-132 a diferentes concentraciones y se analizaron sus efectos sobre la función espermática, específicamente sobre las variables de viabilidad, movilidad espermática y RA espontánea e inducida.

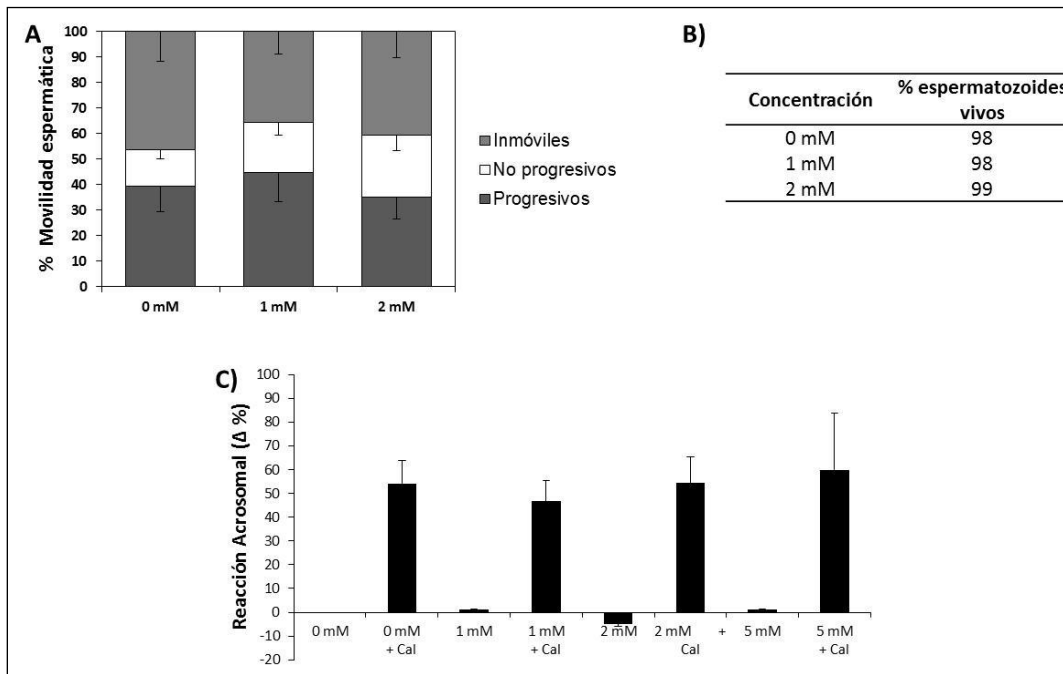
En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos para las variables de función espermática evaluadas al incubar con EDTA a concentraciones de 1, 2 y 5 mM. Los datos obtenidos mostraron que a partir de la concentración 2 mM, el porcentaje de espermatozoides inmóviles fue significativamente mayor con respecto al control (A). De igual modo, el EDTA alteró los valores de RA espontánea e inducida a partir de la concentración 2mM (C). En cambio, las diferentes concentraciones de EDTA probadas no tuvieron efecto sobre la viabilidad (B). Estos resultados sugirieron que los experimentos de inhibición proteolítica con EDTA debían llevarse a cabo en concentraciones inferiores a EDTA 2 mM; sin embargo, esta concentración no fue

suficiente para inhibir la actividad de las proteasas (D) por lo que los experimentos de inhibición de la degradación proteolítica de rhZPs por espermatozoides en presencia de EDTA no pudieron llevarse a cabo.

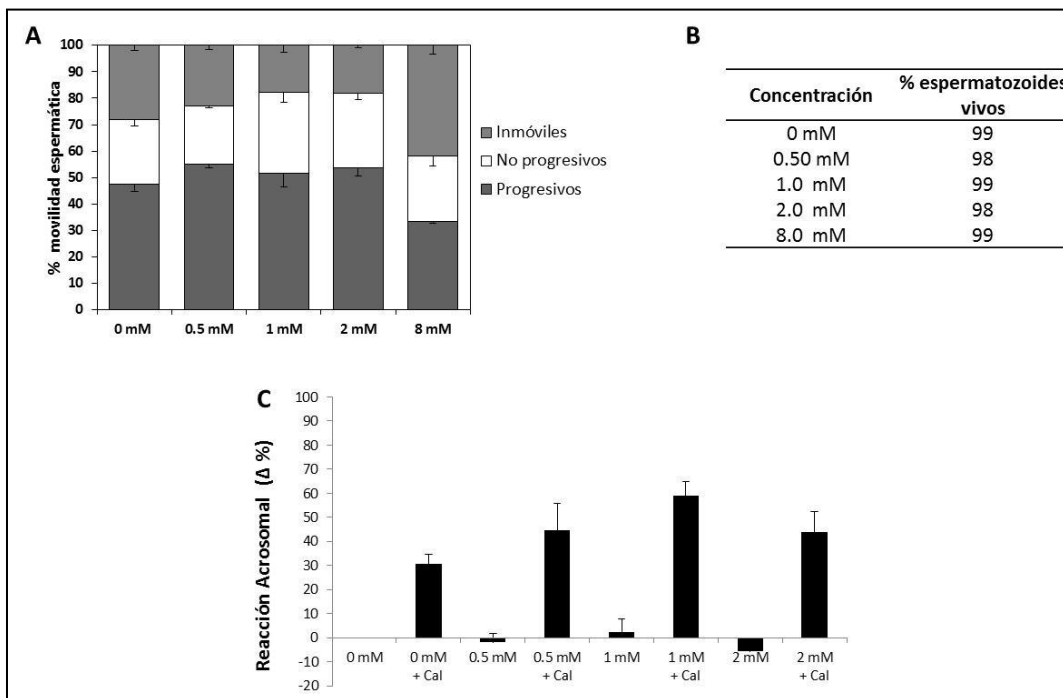


**Fig. 20.- Efecto del EDTA sobre la función espermática.** A) Movilidad espermática, B) Viabilidad celular, C) Reacción acrosomal espontánea e inducida por Cal, normalizada como se describe en Material y Métodos, D) Zimografía. Los datos se presentan como la media + E.E. n= 5. \*p <0.05 versus control.

Por su parte, el inhibidor de metaloproteasas O-fenantrolina fue probado a concentraciones 1 y 2 mM, para movilidad y viabilidad, además de 5 mM para RA. El análisis de los datos mostró que no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros, lo que indicó que ninguna de las concentraciones afecta las funciones espermáticas (Fig. 21). Resultados similares se obtuvieron al estudiar los efectos del inhibidor de serina proteasas benzamidina en concentraciones de 0.5, 1, 2 y 8 mM. (Fig. 22) y el inhibidor del proteosoma MG132 en concentración 10  $\mu$ M (Fig. 23). Estos resultados sugirieron que estos tres inhibidores podían ser empleados en ensayos con espermatozoides capacitados vivos sin alterar su funcionalidad.

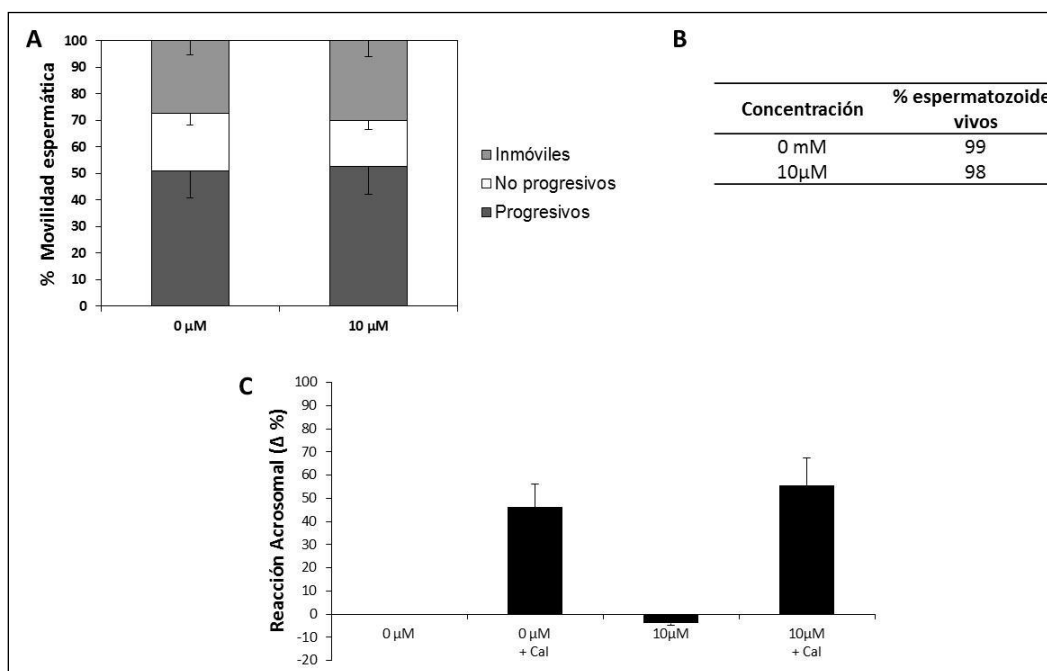


**Fig. 21.- Efecto de la O-fenantrolina sobre la función espermática.** A) Movilidad espermática, B) Viabilidad celular, C) Reacción acrosomal espontánea e inducida por Cal, normalizada como se describe en Material y Métodos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.E. n= 8.



**Fig. 22.- Efecto de la benzamidina sobre la función espermática.** A) Tipos de movilidad espermática, B).- Viabilidad celular, C) Reacción acrosomal espontánea e inducida por Cal, normalizada como se describe en Material y Métodos. Los datos se presentan como la media + E.E. n= 3.





**Fig. 23.- Efecto del MG-132 sobre la función espermática.** A) Movilidad espermática, B) Viabilidad celular, C) Reacción acrosomal espontánea e inducida por Cal, normalizada como se describe en Material y Métodos. Los datos se presentan como la media + E.E. n= 6

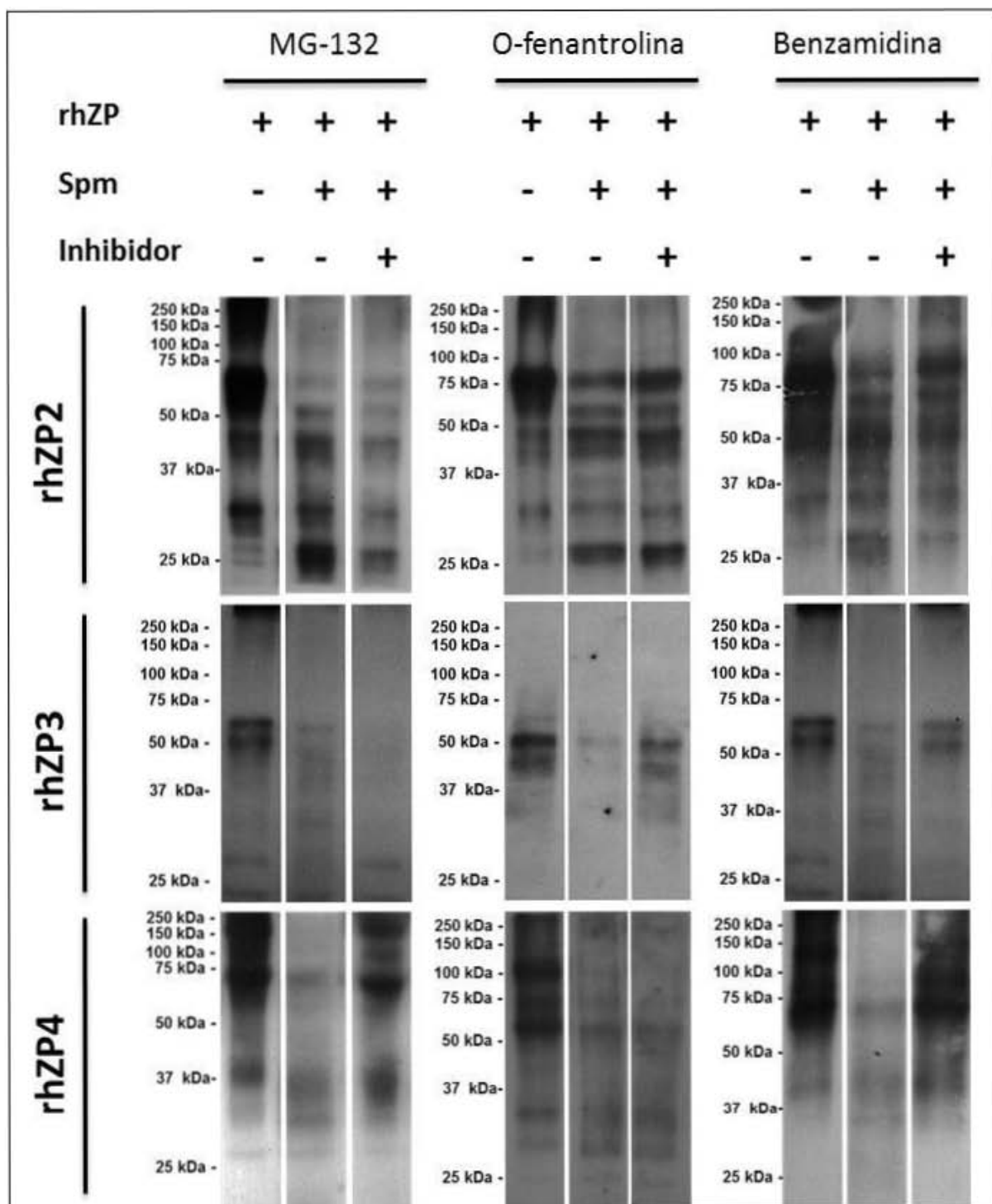
#### 6.4.2. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la degradación de proteínas rhZP por espermatozoides

Con el objetivo de determinar el tipo de proteasas espermáticas involucradas en la degradación de las proteínas rhZP, los ensayos de degradación de las mismas fueron llevados a cabo en presencia y ausencia de MG-132 (10  $\mu$ M), O-fenantrolina (1 mM) y benzamidina (1 mM). Estas concentraciones fueron seleccionadas en base a estudios previos que demuestran su efectividad para inhibir los sustratos sobre los que actúan<sup>80, 88, 108</sup>. Posteriormente las proteínas fueron separadas y caracterizadas mediante SDS-PAGE y WB incubado con anti-HSPZ (Fig. 24).

**rhZP2.-** La degradación proteolítica de rhZP2 mediada por espermatozoides no se vio afectada por la presencia de los inhibidores MG-132 y O-fenantrolina. En cambio, la benzamidina fue capaz de inhibir parcialmente la degradación de esta proteína, lo que podría sugerir que una o varias serina proteasas podrían estar involucradas en la degradación de esta.

**rhZP3.-** En cuanto a la degradación de rhZP3, el MG-132 no inhibió la actividad proteolítica del espermatozoide, mientras que en presencia de O-fenantrolina y benzamidina se observó inhibición de parcial de la degradación. Estos resultados sugirieron que tanto las metaloproteasas como las serina proteasas podrían estar involucradas en la degradación de esta proteína.

**rhZP4.-** Al estudiar los efectos de los inhibidores de proteasas empleados sobre la degradación de rhZP4 se observó que MG-132 y benzamidina inhibieron la degradación de esta proteína, mientras que en la proteína incubada con espermatozoides en presencia de O-fenantrolina no se observó inhibición de la degradación con respecto a su control. Estos resultados apuntan a que el espermatozoide utiliza dos vías diferentes para degradar ZP4, el proteosoma y serina proteasas.



**Fig. 24.- Inhibición de la degradación de rhZPs mediada por espermatozoides capacitados.** Proteínas rhZPs unidas a Ni-NTA se incubaron con espermatozoides capacitados durante 16 horas y se caracterizaron mediante WB incubado con anti-HSPZ. n=3.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La penetración de la ZP es uno de los eventos fundamentales dentro del proceso de fecundación. Trabajos previos con espermatozoides de mamíferos sugieren que la penetración puede estar facilitada por la digestión localizada de la ZP mediada por proteasas del espermatozoide <sup>75</sup>, ya que hay evidencias de que algunas proteasas participan durante este proceso, como el proteosoma en el modelo porcino <sup>88</sup> y la serina proteasa TESP-5 en ratón <sup>85</sup>.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la posible participación de las proteasas espermáticas en la degradación de las proteínas de la ZP. Para ello, se emplearon proteínas rhZP expresadas en la línea celular Sf9, mismas que previamente han mostrado ser biológicamente activas con espermatozoides humanos <sup>32, 109</sup>. Estas proteínas fueron incubadas con espermatozoides capacitados para determinar su capacidad de degradarlas, observándose que las rhZP eran susceptibles de ser digeridas por los espermatozoides. De este modo, establecimos un modelo que podía ser utilizado para estudiar mecanismos de degradación proteolítica mediada por espermatozoides. Los estudios enfocados a caracterizar el tipo de proteasas espermáticas involucradas se llevaron a cabo empleando diferentes inhibidores, seleccionándose el EDTA y la O-fenantrolina para inhibir metaloproteasas <sup>110</sup>, la benzamidina para inhibir serina proteasas <sup>108, 111</sup> y el MG-132 para inhibición del proteosoma <sup>88</sup>. Previamente, se establecieron condiciones adecuadas para el uso de estos inhibidores bajo las cuales mantuvieran su actividad inhibitoria sin comprometer la funcionalidad del espermatozoide. Para ello, los espermatozoides se incubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores y se evaluaron los efectos sobre movilidad, viabilidad y RA espontánea e inducida.

Con el objeto de estudiar la posible participación de las metaloproteasas en la degradación de las rhZP, se estudió el efecto del EDTA en diferentes concentraciones sobre los espermatozoides. Los análisis de función espermática realizados en presencia de concentraciones de EDTA iguales o mayores a 2 mM mostraron efectos adversos sobre la movilidad espermática, pero el efecto inhibitorio de este compuesto sobre las proteasas del espermatozoide sólo se observó a concentraciones superiores. Este inhibidor es un agente quelante incapaz de penetrar la membrana, evento que favorece el secuestro de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  presentes en el medio de incubación. El EDTA secuestra en primer lugar los iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el medio, debido a que presenta un pK- de 11.0 para el  $\text{Ca}^{2+}$  y de 8.64 para el  $\text{Mg}^{2+}$  <sup>112</sup>. El medio HTF utilizado en nuestros experimentos tiene una concentración de 2.04 mM

de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que en presencia de 2 mM EDTA este ion queda secuestrado casi en su totalidad. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible es insuficiente para que el espermatozoide siga realizando sus funciones vitales, ya que estudios previos han demostrado que la concentración mínima de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio requerida para que el espermatozoide pueda llevar a cabo la RA e interactuar con la ZP es 0.58 mM <sup>113</sup>. Por otra parte, el EDTA podría promover un déficit en las funciones espermáticas al obligar al espermatozoide a llevar a cabo un intercambio iónico <sup>112</sup>. Estudios realizados con quelantes extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  han demostrado que la reducción en la movilidad espermática observada no se relaciona de forma directa con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero sí con el influjo de sodio hacia el interior de la célula. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, hay un incremento en el  $\text{Na}^+$  intracelular que eleva la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-asa, limitando el suministro de ATP a la dineína ATP-asa, la cual es necesaria para la movilidad espermática <sup>114, 115</sup>. Por lo tanto, aunque el EDTA no afectó la viabilidad y la RA del espermatozoide, su efecto sobre la movilidad en combinación con la ausencia de inhibición de proteasas a concentraciones menores a 2 mM impidió su uso para los ensayos de inhibición de degradación de proteínas rhZP por proteasas de espermatozoides humanos capacitados.

La O-fenantrolina es un compuesto orgánico heterocíclico que forma complejos con la mayoría de los iones metálicos, por lo que actúa como inhibidor de metaloproteasas. Es capaz de atravesar la membrana de las células y tiene un  $\text{pK}_a$  de 6.55 para  $\text{Zn}^{2+}$ ; 1.2 para el  $\text{Mg}^{2+}$  y 0.7 para  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas características favorecen que el  $\text{Zn}^{2+}$  sea secuestrado de forma preferencial sobre los otros dos cationes presentes en el medio de capacitación, por lo que su mecanismo de acción es a través de la remoción de iones  $\text{Zn}^{2+}$  de las metaloproteasas. Estudios previos en mamíferos han demostrado que concentraciones mayores o iguales a 1 mM de O-fenantrolina, son suficientes para inhibir la actividad de metaloproteasas de espermatozoides <sup>80, 116</sup>. Para su uso en ensayos de función espermática, se probó a las concentraciones 1 y 2 mM, las cuales demostraron no alterar ninguno de los parámetros de función espermática analizados. Al llevar a cabo los ensayos de inhibición de la degradación proteolítica de proteínas rhZP con espermatozoides preincubados con O-fenantrolina se observó que inhibe la degradación de rhZP3 pero no la de rhZP2 y rhZP4, lo cual indica que las metaloproteasas podrían estar implicadas en la degradación de la proteína ZP3. Existen evidencias de que las metaloproteasas podrían participar en la fusión del espermatozoide con el ovocito en ratones <sup>116</sup>. Si bien en humanos se ha demostrado la presencia de metaloproteasas en espermatozoides, no hay estudios previos que sugieran su participación dentro del proceso de penetración de la ZP.

Un segundo grupo de proteasas presente en el espermatozoide son las serina proteasas. Si bien la acrosina es la serina proteasa más abundante en el espermatozoide de ratón, no es esencial para la fecundación; en cambio, las evidencias sugieren que la serina proteasa TESP5 es necesaria para la penetración de la ZP. Con la finalidad de estudiar si las serina proteasas también tienen un papel dentro de la degradación de las proteínas rhZP se utilizó el inhibidor benzamidina, inhibidor sintético de serina proteasas <sup>108</sup>. Este inhibidor fue caracterizado en un rango de concentraciones de 0.5 a 8.0 mM, las cuales fueron seleccionadas en base a estudios previos que han demostrado que concentraciones mayores a 0.1 mM son capaces de inhibir la actividad de la acrosina <sup>108, 111</sup>. Los ensayos de función espermática demostraron que ninguno de los parámetros analizados se vio afectado por este inhibidor a las concentraciones estudiadas. Posteriormente, en los ensayos de degradación de las rhZPs se observó que la benzamidina inhibe la degradación de rhZP2, rhZP3 y rhZP4, lo que sugiere que una o varias serina proteasas podrían estar involucradas en la degradación generalizada de las proteínas de la ZP.

En el espermatozoide de humano y de ratón se ha identificado otra proteasa de carácter multienzimático denominada proteosoma. El proteosoma contiene tres subunidades catalíticas ( $\beta$ 5-7), las cuales pueden ser inhibidas mediante el uso de MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) que se une fuertemente a las dos primeras subunidades y a la última con menor afinidad <sup>117</sup>. Para que el proteosoma cumpla su función, es necesario que las proteínas a ser degradadas estén marcadas mediante la conjugación de cadenas de ubiquitina. La ubiquitinación de la ZP se ha descrito en ovocitos maduros de porcinos, que al ser incubados con espermatozoides pretratados con MG-132 no fueron fecundados por incapacidad de los espermatozoides de penetrar la ZP <sup>88</sup>. Para determinar si existía la probabilidad de que el espermatozoide utilice esta vía de degradación de la ZP en humanos, se analizaron cortes de ovario y ovocitos maduros humanos. En los cortes se observaron folículos en diferentes estadios de desarrollo y se clasificaron como folículos primordiales, primarios y secundarios, de acuerdo a sus características morfológicas. En los análisis de inmunofluorescencia de los diferentes folículos observados, se observó la presencia de proteínas ubiquitinadas en el interior de los ovocitos en folículos primarios y de mayor grado de desarrollo, en tanto que en la ZP se observó ubiquitinación de estas proteínas sólo en los ovocitos maduros. La gran abundancia de proteínas ubiquitinadas en los ovocitos analizados podría sugerir que están en un proceso de atresia. En cada ciclo estral durante la vida reproductiva de las hembras de mamíferos se inicia la maduración de varios folículos, pero sólo uno o unos pocos de ellos son efectivamente

ovulados mientras que los demás son reabsorbidos <sup>118</sup>. La apoptosis parece ser el mecanismo adoptado para eliminar los folículos quiescentes en el ovario humano <sup>119</sup>, incluyendo los ovocitos en reabsorción durante la fase lútea <sup>120</sup>. La proteólisis específica mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma juega un papel relevante la apoptosis <sup>121, 122</sup> y por tanto podría ser un mecanismo utilizado para la eliminación de los ovocitos en reabsorción, si bien la confirmación de este planteamiento requiere de estudios adicionales. Por otra parte, se observó ubiquitinación de la ZP humana en la etapa de maduración que interacciona con los espermatozoides, lo que sugiere que es factible que el espermatozoide utilice esta vía para la degradación de la ZP. Como el MG-132 demostró no tener efectos deletéreos sobre el espermatozoide se empleó en los ensayos de degradación de las rhZPs, observándose que sólo inhibía la degradación de la proteína rhZP4 por espermatozoides. Esto apunta a que el proteosoma podría participar en la degradación de esta proteína durante la penetración de la ZP, si bien aún queda por demostrar si la proteína ZP4 se ubiquitina durante la maduración de ovocitos humanos *in vivo*.

Estos resultados demuestran que el espermatozoide puede degradar de forma específica e inespecífica proteínas rhZP y que por tanto es factible que degrade la ZP humana nativa durante el proceso de penetración. La degradación de las proteínas rhZP parece llevarse a cabo por proteasas con diferentes características, pero aún no han sido identificadas y se desconocen los mecanismos que regulan su actividad. Considerando que la obtención de material biológico constituye la principal limitante para estudiar los mecanismos que regulan la fecundación en humanos, el modelo aquí presentado constituye una herramienta de gran utilidad para estudios *in vitro* que permitirá en el futuro ahondar en los mecanismos moleculares implicados en la interacción de gametos en general y en la penetración de la ZP en particular, etapa limitante para el éxito de la fecundación.

## 8. CONCLUSIONES

- Las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana obtenidas son susceptibles de sufrir degradación proteolítica por proteasas de espermatozoides humanos.
- El espermatozoide utiliza diferentes tipos de proteasas para llevar a cabo la degradación de las proteínas rhZP2, rhZP3 y rhZP4 expresadas en la línea celular Sf9.
- Debido a la dificultad para obtener proteínas de la zona pelúcida nativas, este modelo puede ser útil para futuros estudios que sirvan para estudiar los mecanismos de degradación y penetración de esta matriz.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:415-442.
2. Dean J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest.* Apr 1992;89(4):1055-1059.
3. Jiménez LF, Merchant, H. *Biología celular y molecular.* México: Pearson educación; 2003.
4. Urbina M, Lerner J. *Fertilidad y Reproducción Asistida* Buenos Aires Médica Panamericana 2009.
5. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* Apr 1 2010;120(4):963-972.
6. Crisp TM. Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutat Res.* Dec 1992;296(1-2):89-106.
7. Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology.* 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
8. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med.* Aug 2005;23(3):234-241.
9. Levy MN, Stanton BA, Koepfen BM. *Fisiología.* Madrid, España: Elsevier; 2006.
10. Moore KL. *Embriología clínica: el desarrollo del ser humano.* 7ma ed. Madrid, España: Elsevier; 2004
11. Junqueira L. *Basic histology : text & atlas.* 11th ed. New York McGraw-Hil; 2005
12. Pocock G, Richards, C. *Fisiología Humana: La base de la Medicina.* España: Elsevier; 2005.
13. Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC, Barratt CL. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod.* May 2005;20(5):1148-1152.
14. Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int.* Jan 1996;20(1):33-39.
15. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod.* Jul 2004;19(7):1580-1586.
16. Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U, Donner P. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod.* Jun 1999;5(6):534-540.
17. Loeser CR, Lynch C, 2nd, Tulsiani DR. Characterization of the pharmacological-sensitivity profile of neoglycoprotein-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* Sep 1999;61(3):629-634.
18. Gahlay GK, Srivastava N, Govind CK, Gupta SK. Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa. *J Reprod Immunol.* Jan 2002;53(1-2):67-77.
19. Chapman N, Kessopoulou E, Andrews P, Hornby D, Barratt CR. The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro. *Biochem J.* Mar 1 1998;330 ( Pt 2):839-845.
20. Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:83-114.
21. Litscher ES, Qi H, Wassarman PM. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry.* Sep 21 1999;38(38):12280-12287.
22. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol.* Jun 2002;4(6):457-461.

23. Kiefer SM, Saling P. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol Reprod.* Feb 2002;66(2):407-414.
24. Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell.* Jul 1980;20(3):873-882.
25. Greve JM, Wassarman PM. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol.* Jan 20 1985;181(2):253-264.
26. Green DP. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod.* Sep 1997;2(3):147-156.
27. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* Jan 22 1999;96(2):175-183.
28. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem.* Sep 5 2008;283(36):24285-24289.
29. Ganguly A, Bukovsky A, Sharma RK, Bansal P, Bhandari B, Gupta SK. In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Hum Reprod.* Jul 2010;25(7):1643-1656.
30. van Duin M, Polman JE, De Breet IT, et al. Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod.* Oct 1994;51(4):607-617.
31. Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod.* May 2005;11(5):365-372.
32. Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, et al. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod.* Apr 2006;74(4):760-768.
33. Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem.* Mar 27 1998;273(13):7488-7494.
34. Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol.* Dec 2009;83(1-2):50-55.
35. Stevens A, Lowe JS. *Human histology.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier/Mosby; 2005.
36. Johnson MH, Everitt BJ. *Essential reproduction.* 6th ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub.; 2007.
37. Jonge CJD, Barratt CLR. *The sperm cell : production, maturation, fertilization, regeneration.* Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; 2006.
38. Gilbert SF. *Developmental biology.* 7th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2003.
39. Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys.* Jul 15 2000;379(2):173-182.
40. Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology,* 2001.
41. Fawcett D. *Compendio de Histología.* 1era ed ed. New York: McGraw Hill; 1999.
42. Ross M, H. *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular.* 5ta ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2007.
43. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* Oct 20 1951;168(4277):697-698.
44. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B.* Nov 1951;4(4):581-596.
45. Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys.* May 1 2009;485(1):72-81.

46. Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest.* Apr 1 2010;120(4):984-994.
47. Olivera M, Ruiz T, Tarazona, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec.* 2006;19(4):426-436.
48. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, et al. 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.* Jan 29 1999;274(5):3235-3242.
49. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* Jul 1998;59(1):1-6.
50. Fraser LR. Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* Oct 1995;10 Suppl 1:22-30.
51. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* Nov 9 2004;2:75.
52. Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 20 2009;106(3):667-668.
53. Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* Jan 2003;125(1):17-26.
54. Florman H. M, Ducibella T. Fertilization in mammals In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press; 2006:51-112.
55. Fraser LR. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. In: Fenichel P, Parinaud, Jean., ed. *Human Sperm Acrosome Reaction.* France Colloque/INSERM John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge; 1995:17-33.
56. Baba T, Watanabe K, Kashiwabara S, Arai Y. Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.* Feb 27 1989;244(2):296-300.
57. Sabeur K, Edwards DP, Meizel S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod.* May 1996;54(5):993-1001.
58. Spungin B, Margalit I, Breitbart H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.* Jun 1995;108 ( Pt 6):2525-2535.
59. Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BM. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res.* May 1 1998;240(2):151-164.
60. Kim KS, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol.* Dec 1 2003;264(1):141-152.
61. Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, et al. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 22 2011;108(12):4892-4896.
62. Meizel S, Turner KO, Nuccitelli R. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* Feb 1 1997;182(1):67-75.
63. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* Jun 2006;131(6):977-988.
64. Ward CR, Storey BT, Kopf GS. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem.* May 6 1994;269(18):13254-13258.
65. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* May 2000;11(5):1571-1584.
66. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca2+ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* May 2001;3(5):499-502.

67. Bendahmane M, Lynch C, 2nd, Tulsiani DR. Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys.* Jun 1 2001;390(1):1-8.
68. Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* Aug 1996;2(8):583-589.
69. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development.* Mar 2007;134(5):933-943.
70. Bedford JM. Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 22 2011;108(12):4703-4704.
71. Bielfeld P, Jeyendran RS, Zaneveld LJ. Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix. *Int J Fertil.* Sep-Oct 1991;36(5):302-306.
72. Mayorga LS, Tomes CN, Belmonte SA. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life.* Apr-May 2007;59(4-5):286-292.
73. Michaut M, Tomes CN, De Blas G, Yunes R, Mayorga LS. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 29 2000;97(18):9996-10001.
74. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press; 2006 189-317.
75. Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S, Baba T. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 2008;52(5-6):677-682.
76. Salamonsen LA. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* Jan-Feb 1996;7(1):28-34.
77. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* Jan 1997;3(1):27-45.
78. Buchman-Shaked O, Kraiem Z, Gonen Y, Goldman S. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. *J Androl.* Sep-Oct 2002;23(5):702-708.
79. Pipan MZ, Kosec M, Mrkun J, Zrimšek P. Gelatinases in Boar Seminal Plasma and Their Relation to Semen Indicators. *Acta Vet. Brno.* 2010;79:491-496.
80. Gottlieb W, Meizel S. Biochemical studies of metalloendoprotease activity in the spermatozoa of three mammalian species. *J Androl.* Jan-Feb 1987;8(1):14-24.
81. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry.* 3rd ed. San Francisco, Calif.: Benjamin Cummings; 2000.
82. Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem.* Dec 16 1994;269(50):31845-31849.
83. Yamagata K, Murayama K, Okabe M, et al. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem.* Apr 24 1998;273(17):10470-10474.
84. Yamagata K, Murayama K, Kohno N, Kashiwabara S, Baba T. p-Aminobenzamidine-sensitive acrosomal protease(s) other than acrosin serve the sperm penetration of the egg zona pellucida in mouse. *Zygote.* Nov 1998;6(4):311-319.
85. Honda A, Yamagata K, Sugiura S, Watanabe K, Baba T. A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J Biol Chem.* May 10 2002;277(19):16976-16984.

86. Hooper JD, Nicol DL, Dickinson JL, et al. Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* Jul 1 1999;59(13):3199-3205.
87. Cesari A, Katunar MR, Monclus MA, Vincenti A, Fornes MW. BSp66 protease is widespread in the acrosomal region of sperm from several mammalian species. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 12 2004;324(2):874-877.
88. Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol Reprod.* Nov 2004;71(5):1625-1637.
89. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* Apr 2002;82(2):373-428.
90. Lupas A, Koster AJ, Baumeister W. Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein.* 1993;47(4-6):252-273.
91. McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* Aug 2001;2(8):589-594.
92. Hoshi M, Numakunai T, Sawada H. Evidence for participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: effects of protease inhibitors. *Dev Biol.* Aug 1981;86(1):117-121.
93. Morales P, Kong M, Pizarro E, Pasten C. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum Reprod.* May 2003;18(5):1010-1017.
94. Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF. Proteasomes in human spermatozoa. *Int J Androl.* Jun 2000;23(3):169-177.
95. Pizarro E, Pasten C, Kong M, Morales P. Proteasomal activity in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* Sep 2004;69(1):87-93.
96. Rawe VY, Diaz ES, Abdelmassih R, et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Hum Reprod.* Mar 2008;23(3):573-580.
97. Kong M, Diaz ES, Morales P. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol Reprod.* May 2009;80(5):1026-1035.
98. Zimmerman S, Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *J Reprod Immunol.* Dec 2009;83(1-2):19-25.
99. Cariño C, Prasad S, Skinner S, et al. Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod Biomed Online.* Mar-Apr 2002;4(2):116-126.
100. Summers M SG. *A manual of methods for baculovirus vectors and Insect Cell Culture procedures.* EUA: Agricultural Experimental Station 1987.
101. Prasad SV, Mujtaba S, Lee VH, Dunbar BS. Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system. *Biol Reprod.* May 1995;52(5):1167-1178.
102. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* Aug 15 1970;227(5259):680-685.
103. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* 4th ed. Cambridge, U.K. ; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1999.
104. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Rooyen LH. Clinical importance of a micro-assay for the evaluation of sperm acrosome reaction using homologous zona pellucida. *Andrologia.* Mar 2001;33(2):87-93.
105. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, van Rooyen LH. Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. *Hum Reprod.* Jan 2001;16(1):138-144.

106. Mortimer D. *Practical laboratory andrology*. New York: Oxford University Press; 1994.
107. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol*. Apr 1990;1(2):99-106.
108. Perreault SD, Zirkin BR, Rogers BJ. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod*. Mar 1982;26(2):343-351.
109. Chirinos M, Carino C, Gonzalez-Gonzalez ME, Arreola E, Reveles R, Larrea F. Characterization of human sperm binding to homologous recombinant zona pellucida proteins. *Reprod Sci*. Sep 2011;18(9):876-885.
110. Sorensen MB, Stoltenberg M, Danscher G, Ernst E. Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Mol Hum Reprod*. Apr 1999;5(4):338-341.
111. Zahler WL, Polakoski KL. Benzamidine as an inhibitor of proacrosin activation in bull sperm. *Biochim Biophys Acta*. Feb 9 1977;480(2):461-468.
112. Lee CH, Anderson M, Chien YW. Characterization of in-vitro spermicidal activity of chelating agent against human sperm. *J Pharm Sci*. Jun 1996;85(6):649-654.
113. Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria F, Buffone M, Calamera JC, Tezon JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril*. Jun 2003;79(6):1396-1403.
114. Torres-Flores V, Picazo-Juarez G, Hernandez-Rueda Y, Darszon A, Gonzalez-Martinez MT. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod*. Oct 2011;26(10):2626-2635.
115. Torres-Flores V, Garcia-Sanchez NL, Gonzalez-Martinez MT. Intracellular sodium increase induced by external calcium removal in human sperm. *J Androl*. Jan-Feb 2008;29(1):63-69.
116. Correa LM, Cho C, Myles DG, Primakoff P. A role for a TIMP-3-sensitive, Zn(2+)-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. *Dev Biol*. Sep 1 2000;225(1):124-134.
117. Yokota N, Sawada H. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Dev Biol*. Aug 1 2007;308(1):222-231.
118. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod*. Nov 2000;63(5):1245-1252.
119. Depalo R, Nappi L, Loverro G, et al. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod*. Dec 2003;18(12):2678-2682.
120. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. Mar-Apr 2005;11(2):162-177.
121. Wojcik C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med*. Jan-Mar 2002;6(1):25-48.
122. Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Feb 2002;3(2):112-121.

## ANEXO 1. SOLUCIONES

### Amortiguador de Lisis; pH 8.0

Urea	2 M
Tris HCl	20 mM
NaCl	0.5 M
Tritón X-100	2 %

### Amortiguador de solubilización; pH 8.0

Tris.HCl	20 mM
NaCl	0.5 M
Imidazol	5 mM
Clorhidrato de Guanidina	6 M
$\beta$ -mercaptoetanol	10 mM (Agregar al momento de uso)

### Amortiguador de lavado; pH 8.0

Tris-HCl	20 mM
NaCl	0.5 M
Imidazol	5 mM
Urea	6 M
$\beta$ -mercaptoetanol	10 mM (Agregar al momento de uso)

### Amortiguador de re-naturalización; pH 7.8. Purificación proteínas

Tris-HCl	20 mM
NaCl	0.5 M
Imidazol	5 mM
Glicerol	2%
$\beta$ -mercaptoetanol	1 mM (Agregar al momento de uso)

### Amortiguador de Elución; pH 7.0

Tris-HCl	20 mM
NaCl	0.5 M
Imidazol	500 mM (Para 1X)

Glicerol	0.50%
$\beta$ -mercaptoetanol	1 mM (Agregar al momento de uso)

#### **Amortiguador de Diálisis; pH 8.0**

Tris base	20 mM
NaCl	0.5 M
Glicerol	0.2 %

#### **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS); pH 7.4**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	150 mM

#### **Solución amortiguadora de Tris (TBS); pH 7.5**

Tris base	10 mM
NaCl	154 mM
Tween 20	0.05 %

#### **Amortiguador de Carga; pH 6.8**

Tris base	0.625 M
SDS	2%
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.2 %
$\beta$ -mercaptoetanol	2%

#### **Solución de Azul de Coomassie**

Azul de Coomassie R 250	0.2 %
EtOH	50 %
Ácido acético	5 %

#### **Amortiguador de desarrollo, pH 8.0**

Tris-HCl	50 mM
NaCl	0.2M
CaCl <sub>2</sub> .	5mM
Tween 20	0.02%



**Amortiguador de re-naturalización. Zimografía**

Tritón X-100 25%

**Solución desteñidora**

EtOH 20%

Ácido acético 5 %

**Solución de carbonatos (ELISA); pH:9.6**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M

Preparar en fresco

**Amortiguador de ELISA**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.016 M

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.004 M

NaCl 0.14 M

**Amortiguador de Citratos; pH 4.5**

Citrato de Sodio 0.1 M

Ácido Cítrico 0.1 M

Mezclar parte iguales de cada uno y ajustar pH utilizando las mismas soluciones;  
usar en fresco; cubrir de la luz.