

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECEPTORAS DEL
ESPERMATOZOIDE EN LA ZONA PELÚCIDA DEL OVOCITO
HUMANO.**

TESIS QUE PRESENTA

Q.F.B. ERNESTO ARREOLA BEDOLLA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTORA

Dra Mayel Chirinos Espin

Asesores internos

Dr. Edmundo Bonilla González

Dr. Pablo Damián Matzumura

Asesor externo

Dr. Fernando Larrea Gallo

México, D.F.

Diciembre 2003

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra en el padrón de programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por CONACyT con número 153018.

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECEPTORAS DEL
ESPERMATOZOIDE EN LA ZONA PELÚCIDA DEL
OVOCITO HUMANO.**

TESIS QUE PRESENTA EL

Q.F.B. Ernesto Arreola Bedolla

Para optar por el grado de:

Maestría en Biología Experimental

TUTORA

Dra. MAYEL CHIRINOS ESPIN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

COMITÉ TUTOTIAL

Tutora

Dra Mayel Chirinos Espin

Departamento de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Ciencias Médica y de la Nutrición
Salvador Zubirán

Asesores Internos

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

Dr. Pablo Damián Matzumura

Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

Asesor Externo

Dr. Fernando Larrea Gallo

Departamento de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Ciencias Médica y de la Nutrición
Salvador Zubirán

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRAN” Y EN EL GRUPO DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA “AGN Y ASOCIADOS”, BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. MAYEL CHIRINOS ESPIN.

Agradecimientos

A mi hija Iلسita: Por ser mi motor, mi razón de vivir y el corazón que me mantiene vivo.

A mi Madre y Hermana: Gracias a ustedes por que siento que desde algún lugar me dan las fuerzas para salir delante de todos los suvenires que he pasado para salir adelante.

A mi padre: Por enseñarme valores y principios que me han ayudado en mi vida profesional para ser mejor profesionista y ser humano, por ti soy y por ti seguiré adelante.

Gracias papá.

A mi Pollo. Que a pesar que el destino ha sido cruel, no nos ha querido juntar, pero creo que se esta reservando algo mejor para nosotros. Ya eres parte de mi vida y de mis ilusiones como ser humano y doy gracias al creador Por haberte puesto en mi camino y te doy a ti las gracias por darme tanto cariño inmerecido y ganas de vivir con fe, que a veces pierdo y que tu me ayudas a encontrarla con tanta devoción, lo cual es impagable lo que has hecho por mi y que siento que seguirás haciendo. Este trabajo te lo dedico con todo mi amor y cariño ya que tú fuiste un motor importante para que se terminara. Podría seguir escribiendo miles de cuartillas de todas las cosas buenas que me has dado y de todo ello solo se me ocurren dos palabras.

!! Muchas Gracias jj

Te quiero Silvia Siomara

Eres

!!!! Genial jiiii

INDICE

ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y METODOS	24
3.1 Material	24
3.2 Vectores de expresión	25
3.3 Cultivo de células	26
3.4 Transfección de células Sf9	26
3.5 Expresión de las proteínas de la ZP humana en la línea celular Sf9	27
3.6 Separación de la proteínas recombinantes de la zona pelúcida (hZP's) mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	27
3.7 Identificación de las hZP's recombinantes por medio de Western blot	28
3.8 Purificación de las proteínas	28
3.9 Muestras de semen	29
3.9.1 Capacitación espermática	30
3.9.2 Evaluación de la unión de los espermatozoides a las distintas proteínas hZP's recombinantes	31
3.9.3 Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Purificación y caracterización de las proteínas rhZP's humanos.	33
4.2 Validación del ensayo de EspermoELISA	35
4.3 Ensayos de unión de espermatozoides capacitados con las proteínas recombinantes purificadas de la zona pelúcida humana (hZP) mediante EspermoELISA	37
4.4 Variabilidad entre ensayos.	38
4.5 Ensayos de unión utilizando combinaciones de las rhZP's	39
5. DISCUSIÓN	42
6. CONCLUSIÓN	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46

ABREVIATURAS.

ZP	zona pelúcida
hZP	zona pelucida humana
mZP1, 2 y 3	zona pelucida de ratón
rhZP1, 2 y 3	zona pelucida recombinante humana
FIV	fertilización <i>in vitro</i> .
IU	inseminación intrauterina
ICSI	inyección intracitoplasmática del espermatozoide
TRA.	técnicas de reproducción asistida
ADAM	metaloproteasas disintegrinas
(GluNAc)	N-acetilglucosamina.
(GalT-I)	β -1,4-galactosyltransferasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
RA	reacción acrosomal.

1. INTRODUCCIÓN

La fertilización se inicia con la unión de un espermatozoide y un ovocito, la cual en mamíferos se lleva a cabo en la parte alta de alguna de las dos trompas de Falopio. El reconocimiento entre gametos comprende una serie de eventos regulados por receptores. Para que el ovocito pueda ser fecundado debe pasar por el proceso de maduración. Asimismo, para que el espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito, previamente debe pasar por las etapas de maduración, capacitación y reacción acrosomal. Si alguno de estos mecanismos falla, entonces los gametos serán incapaces de llevar a cabo la fertilización y por tanto se puede considerar como factor causante de infertilidad (Speroff *et al*, 1989).

1.1 MADURACION DEL OVOCITO.

La maduración del ovocito involucra una serie de cambios, siendo el principal la meiosis, la cual tiene la finalidad de reducir de 46 cromosomas (diploide) que observa en las células somáticas humanas, a 23 cromosomas (haploide) que se observa en los gametos. Por otro lado se modifica la morfología del ovocito, al aumentar el citoplasma gradualmente de tamaño. Cuando alcanza su madurez mide aproximadamente 120 μm de diámetro. Primeramente permanecen por periodos prolongados en profase I, en los cuales crecen en tamaño y en muchos casos pueden detenerse en metafase II, esperando a ser fertilizados (Dietl, 1999).

El proceso de desarrollo de los ovocitos, la ovogénesis, varía entre especies. En el humano, durante el periodo embrionario (etapa prenatal) las células germinales migran hacia donde se forman las gónadas, proliferando por mitosis, hasta diferenciarse a ovocitos primarios. Durante la etapa posnatal, el ovocito primario empieza a aumentar de tamaño y las células foliculares que lo rodean cambian su morfología, convirtiéndose de planas a cúbicas y proliferan para formar un epitelio estratificado denominado células de la granulosa, entonces el folículo recibe el nombre de folículo primario. Por su parte las células de la granulosa descansan sobre una membrana basal que las separa de las células del estroma circundante, que forman la teca folicular. Además durante la foliculogénesis se secretan glicoproteínas que se depositan en la superficie del ovocito, lo que origina la formación de la zona pelúcida (Figura 1). En este estado comienza la primera división meiótica, en la cual el ADN es

replicado y por lo tanto cada cromosoma estará conformado por dos cromátidas (Browder, 1985). Los pares de cromosomas homólogos se ubican a lo largo de sus ejes y ocurre un entrecruzamiento entre las cromátidas de los cromosomas apareados. Después de este evento, las células permanecen detenidas en la profase I de la meiosis por un periodo que puede variar desde pocos días hasta muchos años dependiendo de la especie. En muchos ovocitos la actividad biosintética intensiva se ve reflejada en la estructura de los cromosomas, los cuales se descondensan y forman asas laterales indicando que hay actividad transcripcional (Baker, 1992).

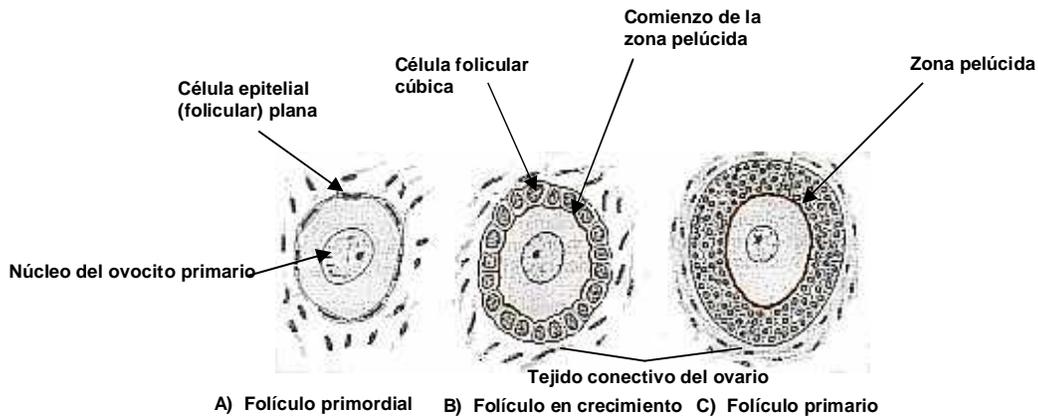


Figura 1. A) Esquema de un folículo primordial formado por el ovocito primario rodeado por una capa de células epiteliales planas. B) Al continuar la maduración del folículo, las células foliculares se tornan cúbicas. Comienzan entonces a secretar la zona pelúcida, que se advierte en forma de placa irregular en la superficie del ovocito. C) A medida que avanza la maduración las células foliculares forman una capa estratificada de células de la granulosa alrededor del ovocito, formando un folículo primario (Sadler 2001).

La siguiente fase de desarrollo del ovocito se ha denominado maduración y usualmente ocurre en el periodo de madurez sexual (pubertad), cuando se inicia la estimulación hormonal (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH). Bajo esta influencia, las células empiezan a progresar a través de la profase I de la meiosis, fase en la cual los cromosomas se recondensan, la envoltura nuclear se rompe y los cromosomas homólogos replicados se segregan en dos núcleos (Roeder, 1990). Al término de la profase I, el citoplasma se divide asimétricamente para producir dos células: una muy pequeña, no funcional, con núcleo y poco citoplasma la cual se denomina cuerpo polar, y la otra de mayor tamaño a la cual se denomina ovocito secundario. En este estado cada uno de los cromosomas permanece aún

compuesto por dos cromátidas hermanas. Éstas no se separarán hasta antes de la segunda división meiótica, dividiéndose en dos células por medio de un proceso idéntico a la mitosis. Después de esta separación de cromosomas en la anafase II, el citoplasma del ovocito secundario se vuelve a dividir asimétricamente para producir un ovocito maduro y un segundo cuerpo polar, cada uno con un número haploide de cromosomas individuales (Roeder, 1990) (Figura 2). En el momento en el que el ovocito maduro presenta formación de huso mitótico con los cromosomas alineados sobre la lámina de metafase es liberado del ovario hasta la trompa de Falopio en donde será fertilizado, a este proceso se le denomina ovulación. (Alberts *et al*, 1994). La segunda división de maduración llega a su término sólo si el ovocito es fecundado; de lo contrario la célula se degenera aproximadamente 24 horas después de la ovulación (Wassarman, 1999).

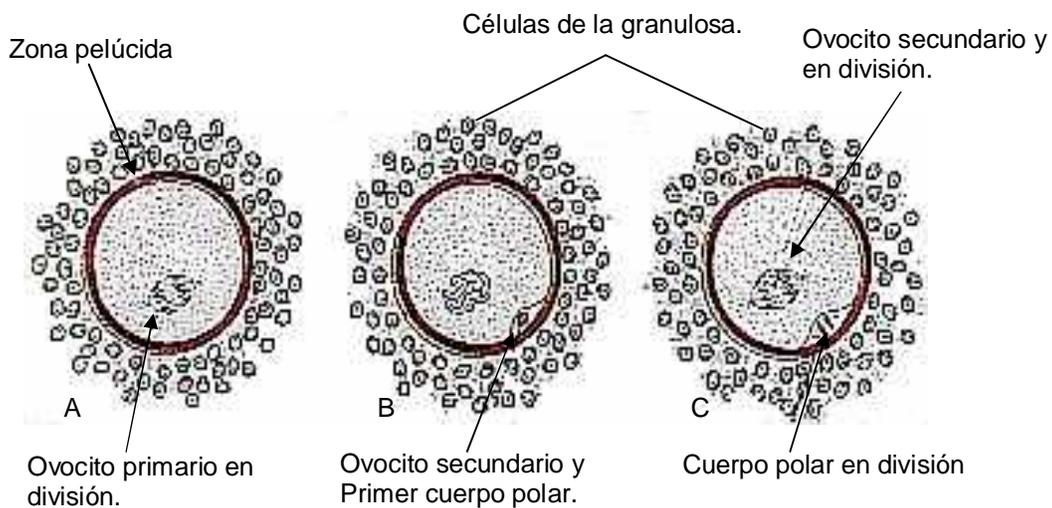


Figura 2. Maduración del ovocito: A. Ovocito primario que presenta el huso de la primera división meiótica. B. Ovocito secundario y primer cuerpo polar. Obsérvese que no hay membrana nuclear. Ovocito secundario, en el cual se advierte el huso de la segunda división meiótica. Asimismo, el primer cuerpo polar se halla en la etapa de división.

MECANISMOS DE MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La espermatogénesis, es una secuencia de eventos citológicos que culminan con la formación de un espermatozoide maduro los cuales son producidos constantemente en los testículos de individuos adultos. El desarrollo se inicia con las espermatogonias, las cuales están localizadas en el epitelio de los túbulos seminíferos y contienen un número cromosómico diploide $2n$. Posteriormente las espermatogonias migran hacia las células de Sertoli que se localizan en el interior de los túbulos seminíferos, y estas células tienen la función de dar soporte a las espermatogonias para que se lleve a cabo eficientemente la espermatogénesis. Posteriormente, va aumentando el tamaño de las espermatogonias hasta convertirse en un espermatocito primario, el cual se dividirá por meiosis en dos células denominadas espermatocitos secundarios (Figura 4). Seguido de este evento ocurre una segunda división meiótica, formando 4 espermátides (contienen un número cromosómico haploide que se diferenciarán hasta espermatozoides. A esta etapa de la espermatogénesis se le denomina espermiogénesis (Yu, 1994). Los cambios que experimenta la espermátide para transformarse en espermatozoide son: a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que le ayudaran a la penetración del ovocito; b) condensación del núcleo; c) formación del cuello, pieza media y flagelo y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (Figura 3) (Sadler, 2001).

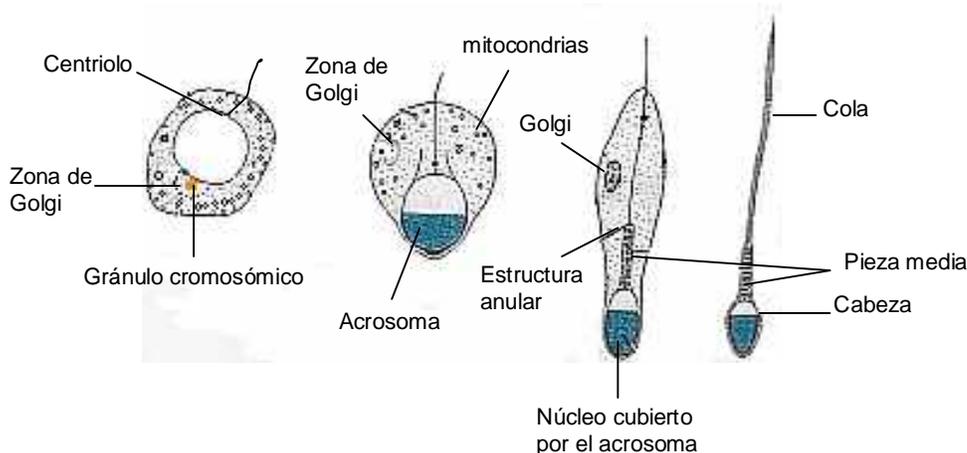


Figura 3. Dibujo esquemático de las etapas más importantes de la transformación de la espermátides humana a espermatozoide. (Sadler, 2001).

Los espermatozoides recién liberados dentro del lumen del túbulo seminífero están inmaduros y el proceso de maduración ocurre en el epidídimo donde se modifica la membrana plasmática del espermatozoide. Estos cambios consisten en un aumento en la cantidad de glicoproteínas en la superficie de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994) y modificaciones importantes en el contenido de lípidos.

En el caso de cerdos, toros, carneros, cobayos y ratas hay una disminución en la concentración de colesterol (Aveldano *et al*, 1992), En espermatozoides de humano se produce un incremento en la cantidad de colesterol sulfatado y fosfolípidos, los cuales se encuentran contenidos en la región del acrosoma ocupando aproximadamente un 20 % del área de la superficie de la cabeza (Holt, 1995).

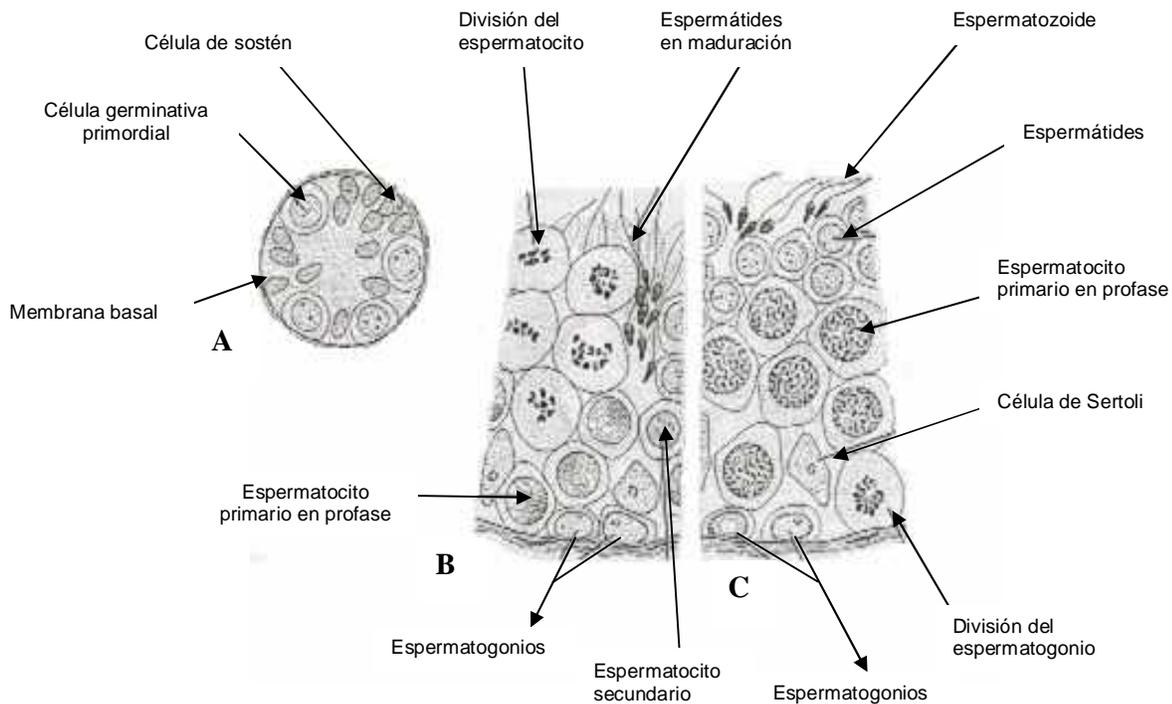


Figura 4. A. Corte transversal de un cordón sexual primitivo en un neonato del sexo masculino, en el cual se advierten las células germinativas primordiales y las células de sostén. B y C. Dos segmentos de un conducto seminífero en corte transversal. Obsérvense las distintas etapas de la espermatogénesis. Tomado de Embriología médica, 2001.

Para que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito es necesario que se lleven a cabo dos eventos importantes: la capacitación y la reacción acrosomal (Lamirande *et al.*, 1997).

1.2.1 CAPACITACION:

La capacitación espermática puede ser definida como una serie de cambios bioquímicos que ocurren en la membrana plasmática y que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal (Lamirande *et al.*, 1997). La capacitación se produce en el tracto reproductor femenino después de la eyaculación. Es un proceso que involucra un rearrreglo gradual de las glicoproteínas periféricas y redistribución de glicoproteínas integrales de membrana. Hay reducción del colesterol de la membrana y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos (Fraser y McDermott, 1992).

Los espermatozoides durante su estancia en el epidídimo permanecen inmóviles, tienen bajas concentraciones de cAMP y calcio, además queda inhabilitada la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Durante las etapas iniciales de la capacitación, estas condiciones se revierten. El calcio intracelular y cAMP aumentan su concentración, además se comienzan a generar las ROS y en consecuencia el espermatozoide desarrolla en esta etapa un aumento de su movilidad que se conoce como “hiperactivación“, que consiste en la aparición de movimientos vigorosos caracterizados por una mayor frecuencia y amplitud de los movimientos del flagelo, proporcionando un gran empuje para atravesar el cúmulo oóforo que contienen las células de la granulosa, hasta llegar a la zona pelúcida (Lamirande *et al.*, 1997). Dentro de la cascada de eventos que suceden en la capacitación, está el aumento en la fosforilación de proteínas que tienen residuos de tirosinas y serina/treonina, de las cuales se conocen dos, p105 y p81 (Leclerc *et al.*, 1997), este proceso es consecuencia de los cambios inducidos por las ROS (Aitken, 1997). El calcio extracelular es imprescindible para completar la capacitación así como el sodio, el potasio y el bicarbonato (Lamirande *et al.*, 1997). Después de pasar el cúmulo oóforo, el espermatozoide interacciona con la zona pelúcida por medio de receptores que se encuentran en la membrana plasmática por encima del acrosoma, lo que desencadena la reacción acrosomal (Tulsiani *et al.*, 1998).

1.2.2 REACCION ACROSOMAL (RA).

El acrosoma es un organelo derivado del aparato de Golgi, el cual se desarrolla durante la espermatogénesis y ha sido comparado con un lisosoma o gránulo secretor, situado en la cabeza del espermatozoide (Flechon *et al.*, 1986). La reacción acrosomal (RA) es un proceso fisiológico que se produce después de la capacitación y conduce a

la exocitosis del contenido acrosomal. Mientras que la capacitación es un proceso reversible, la RA es irreversible (Negro-Vilar y Pérez-Palacios, 1991). Se sabe que hay dos clases de inductores de la RA, los fisiológicos como la progesterona, el fluido folicular y la zona pelúcida (ZP3) (Schuffner *et al.*, 2002) y los no fisiológicos: como el ionoforo de calcio (A23187), la pentoxifilina y glicoproteínas sintéticas (neoglicoproteínas ngps) (Ain *et al.*, 1999; Bendahmane *et al.*, 2002). Sin embargo el inductor principal de la RA en condiciones fisiológicas es la zona pelúcida. Las características más importantes de la reacción acrosomal son:

a) se requiere de la presencia de calcio extracelular, el cual es captado por las células espermáticas, promovido por la presencia de ionóforos capaces de producir el intercambio $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ a través de la membrana del espermatozoide.

b) morfológicamente, la RA en el humano y en otros mamíferos consiste en formar poros, originados por múltiples fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide.

c) se libera el contenido acrosomal, principalmente hialuronidasa y acrosina (Figura 5). La liberación de estas enzimas facilita que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida y se fusione con la membrana plasmática del ovocito (Tulsiani *et al.*, 1998; Franken *et al.*, 2000; Bendahmane *et al.*, 2002). En este contexto se ha descrito que los filamentos de actina tienen un papel importante en la fusión y vesiculación de membranas espermáticas. La polimerización de la actina está involucrada en la inducción de la RA, ya que al utilizar anticuerpos monoclonales anti-actina se inhibe de manera importante la RA inducida por ZP y la hiperactividad del espermatozoide humano (Liu *et al.*, 2002).

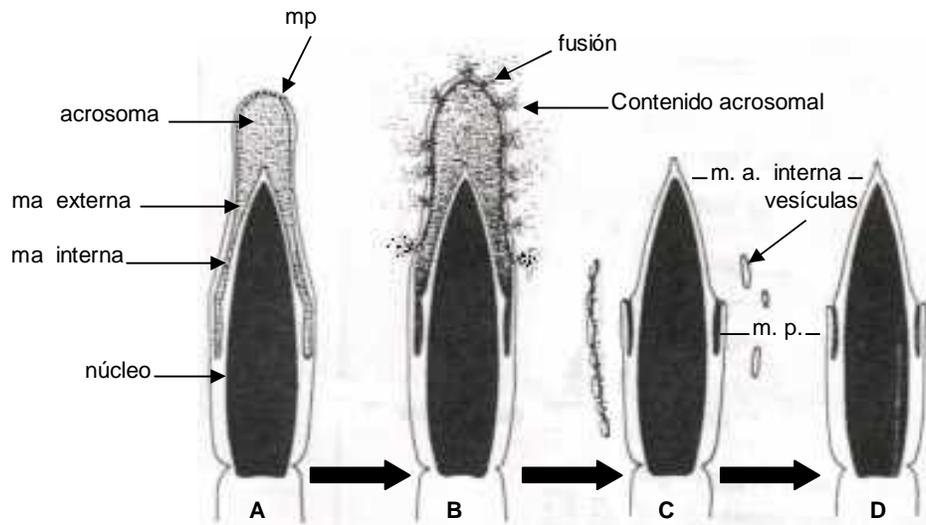


Figura 5. Diagrama esquemático de la reacción acrosomal en espermatozoides de mamíferos. A) espermatozoide con su acrosoma intacto. B) fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. C) y D) vesículas de membranas híbridas, compuesta de m.p. y m.a. externa. m.p. membrana plasmática; ma membrana acrosomal. Tomada de Wassarman (1996).

1.3 INTERACCIÓN DE GAMETOS

La interacción de los gametos está dada por una larga secuencia de eventos, que concluyen con la penetración del espermatozoide, aportando su información genética para la formación de un individuo.

Los eventos tempranos de la fertilización los podemos ordenar de la siguiente manera: 1) reconocimiento y adhesión del espermatozoide capacitado a la ZP; 2) fijación a la ZP; 3) inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides; 4) penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida; 5) fusión de las membranas plasmáticas de los gametos, 6) inducción de la reacción cortical, donde se produce la exocitosis del contenido de los gránulos corticales, y 7) reacomodo estructural de los carbohidratos de la ZP por acción de las enzimas de los gránulos corticales para evitar la poliespermia (Figura 6). (Wassarman, 1999; Manna *et al.*, 2001). A nivel de la interacción espermatozoide-ovocito se ha observado que las glicoproteínas conocidas como metaloproteasas disintegrinas (ADAMs), tienen un papel importante en el proceso de interacción espermatozoide-ovocito, intervienen en la fusión de los gametos, se encuentran en la parte posterior de la cabeza de los espermatozoides, las cuales se unirán a las integrinas y un complejo de transpaninas localizadas en la membrana plasmática del ovocito. La fertilina es una glicoproteína

espermática, pertenece a la familia de las ADAMs, localizada en la membrana plasmática del espermatozoide en la parte ecuatorial y es un heterodímero de fertilina α y fertilina β . Durante la maduración espermática la fertilina α y β , son incorporadas a la membrana y se ha visto que en su ausencia se puede prevenirse la unión de los gametos (Wassarman 1999) (Evans, 2002). La ciritestina es otra glicoproteína que pertenece a las ADAMs originada en las células testiculares e incorporadas a la membrana del acrosoma. (Linder *et al.*, 1997) En este contexto se ha visto específicamente que la fertilina- β y la ciritestina inhiben la unión del espermatozoide y la fusión a la membrana plasmática del ovocito (Yuan *et al.*, 1997) (Evans, 2002). Las testasas son glicoproteína que también pertenecen a la familia de las ADAMs, se han localizado en la parte ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide humano y se ha propuesto que tienen actividad fusogenica (Zhu *et al.*, 2001). Un común denominador en las etapas iniciales del proceso reproductivo, es la participación de la zona pelúcida, donde tanto las proteínas que la conforman como los carbohidratos que están unidos a estas proteínas juegan un papel primordial en la determinación de sus funciones, ya sea como sitio de reconocimiento especie-específico, unión de gametos o activador de la reacción acrosomal.

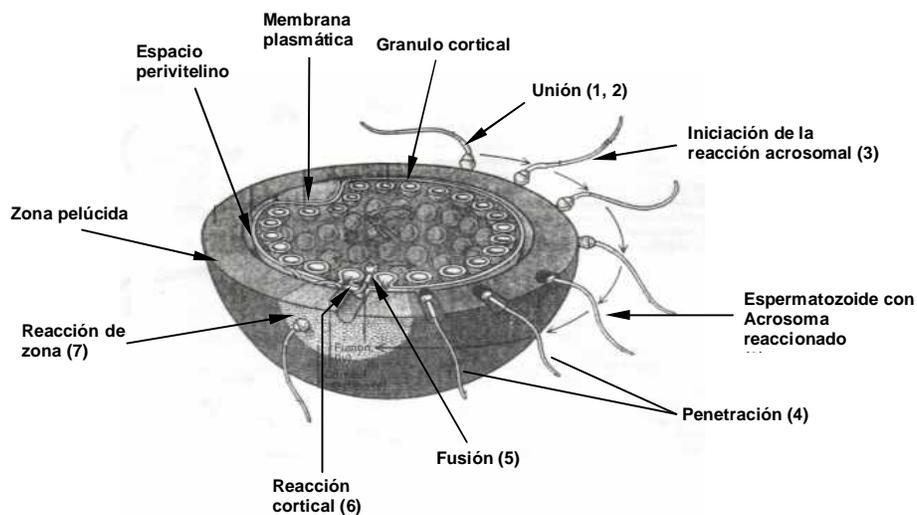


Figura 6. Diagrama esquemático de los eventos que ocurren durante la fertilización. Tomado de Wassarman (1999).

1.4 PAPEL DE LA ZONA PELUCIDA DURANTE LA FERTILIZACIÓN.

Como se mencionó anteriormente el proceso reproductivo comprende una serie de eventos en los cuales está involucrada la zona pelúcida (ZP). Este es un elemento importante e indispensable durante la fertilización en mamíferos. Cualquier defecto en la estructura de la ZP se puede considerar como factor de infertilidad (Liu *et al.*, 2001).

La ZP contiene receptores que van a mediar la interacción inicial con el espermatozoide, reconociendo los sitios de fijación específicos, estableciendo vínculos irreversibles entre las dos superficies celulares; este reconocimiento es especie específico. Así mismo, la ZP es inductora de la reacción acrosomal en los espermatozoides capacitados, modifica su estructura para prevenir la entrada de más espermatozoides (poliespermia) y protege al embrión hasta su implantación su implantación (Dietl, 1999).

La zona pelúcida está formada por tres familias de glicoproteínas llamadas ZP1, ZP2 y ZP3 (también conocidas como ZPB, ZPA y ZPC respectivamente). Cada familia de glicoproteínas está conformada por un esqueleto polipeptídico que presenta entre 50 y 98 % de homología entre diferentes especies (Prasad *et al.*, 1996) y sus tres componentes se encuentran glicosilados de forma heterogénea (Talevi *et al.*, 1999). La secuencia de aminoácidos tanto para ZP2 como para ZP3, muestran una conservación significativa entre ratón y humano, ZP2/A 57 % de identidad y ZP3/C 67 % de identidad. En contraste, se ha encontrado solamente un 33 % de identidad de la ZP1/B. Estudios recientes, basados en la medición de intrones y exones, así como el análisis de las regiones promotoras de los genes de ZP de mamífero, han sugerido que los genes humanos para ZP1 y ZPB podrían ser diferentes (Hughes y Barratt, 1999). Los cDNA humanos de ZP1, ZP2 y ZP3 han sido aislados (hZP3, Chamberlain y Dean, 1990; hZP2, Liang y Dean, 1993; hZP1, Harris *et al.*, 1994).y las proteínas recombinantes correspondientes se han expresado en células de ovario de hámster chino demostrando que activan la reacción del acrosoma (Harris y Persen, 2003).

Muy poco se conoce acerca de las proteínas nativas de ZP humanas (Harris *et al.*, 1999). Por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de ZP solubilizadas, se han podido identificar tres proteínas, ZP1 (90-110 kDa), ZP2 (64-78 kDa) y ZP3 (57-73 kDa). Se ha visto que la proteína de 90-110 kDa desaparece después de la fertilización, debido a los cambios conformacionales que lleva a cabo la zona pelúcida posfertilización (Shabanowitz y O'Rand, 1988 a, b; Bauskin *et al.*,

1999), este mismo comportamiento se ha observado en la zona pelúcida de ratón (mZP3) (Wassarman, 1988).

El origen de las glicoproteínas de la zona pelúcida en humanos y en otros mamíferos euterianos ha sido materia de controversia.

Se ha propuesto que el origen de las glicoproteínas de la hZP puede ser el ovocito durante la etapa temprana de la ovogénesis, en el desarrollo folicular y en las células de la granulosa (Epifano *et al.*, 1995; Hinsch *et al.*, 1999; Greenhouse *et al.*, 1999). Cariño y colaboradores (2002) demostraron que el sitio donde se expresan los genes de la zona pelúcida humana (hZP), está localizada en el ovocito y en las células de la granulosa, utilizando anticuerpos seleccionados para hZP1, hZP2 y hZP3. Localizaron, hZP1 y hZP2 en la matriz de ZP de ovocitos maduros pero no en el folículo primordial ni en el primario, por otro lado hZP3 fue detectada en el ovocito del folículo primordial, primario y en células de la granulosa del folículo maduro. En contraste Eberspaecher y colaboradores (2001) demostraron la localización de las tres proteínas hZP en ovocitos de folículos primordiales de ovario humano utilizando anticuerpos policlonales provenientes de hZP recombinante.

En ratón (que es el sistema más estudiado), la zona de expresión de los genes para mZP, durante el crecimiento es el ovocito y no las células foliculares ni en las células de la granulosa. (Bleil y Wassarman, 1980; Hinsch *et al.*, 1999). Sin embargo el mecanismo exacto aun no se explicado con claridad. El-Mestrah y colaboradores (2002) han realizados estudios acerca de la localización de ZP1, ZP2 y ZP3, postulando que los organelos subcelulares: complejo de Golgi, gránulos de secreción, agregados vesiculares y estructuras de unión a membrana, participan activamente en el procesamiento de estas tres glicoproteínas antes de ser secretadas para formar la zona pelúcida. La localización topográfica de ZP1, ZP2 y ZP3 en los agregados vesiculares, los cuales están muy cercanos a la superficie del ovocito, respalda el papel de estos agregados vesiculares como intermediarios en la vía de secreción de las glicoproteínas de la ZP. La síntesis de la ZP parece ser diferente de acuerdo a la especie animal, al igual que la estructura de sus carbohidratos y la cantidad de glicosilación, lo que da lugar al reconocimiento específico entre especies (Vaughan y Dunbar, 1993; Dunbar, *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 1997).

El modelo estructural de la ZP, se ha derivado a partir de observaciones ultraestructurales en ratones, las cuales han sugerido que se trata de una red filamentosa estructuralmente bien definida, (Bauskin *et al.*, 1999). Los filamentos

están contruidos por moléculas alternadas de ZP2 y ZP3, entrecruzadas por ZP1 a través de uniones disulfuro intermoleculares (Figura 7). De acuerdo al modelo postulado por Wassarman (Mortillo y Wassarman., 1991), cada unidad de ZP2-ZP3 se estima que tiene una longitud entre 15 y 17 nm a lo largo del eje de filamentos de la ZP y que existe una relación de 1: 5 para ZP1: ZP2-ZP3, la media de la longitud de los sitios de unión para cada uno de éstos filamentos es de aproximadamente 75 a 85 nm (Wassarman., 1999).

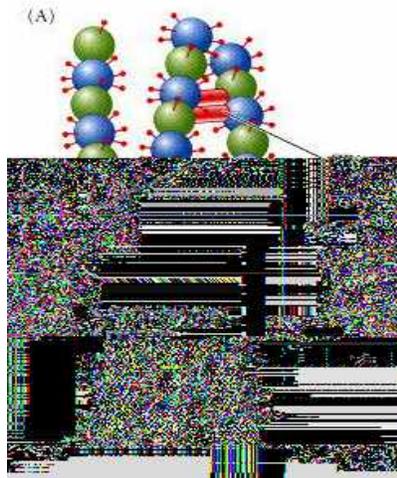


Figura 7. Estructura de la zona pelúcida de ratón. (Tomado de Wassarman, 1999).

1.5 MOLECULAS QUE PARTICIPAN EN LA UNIÓN ZP-ESPERMATOZOIDE.

1.5.1 RECEPTORES DE LA ZONA PELÚCIDA:

Una de las funciones más importantes que lleva a cabo la zona pelúcida, es la de receptora del espermatozoide. Se ha descrito que la mayoría de las proteínas de la ZP de los mamíferos presentan residuos de manosas, α -galactosa o N-acetilglucosamina como moléculas receptoras del espermatozoide. En la ZP de humano se ha demostrado la participación de una β -hexosaminidasa en la interacción espermatozoide-zona pelúcida. (Bleil y Wassarman, 1988 ; Dunbar *et al.*, 1994 ; Ozgur *et al.*, 1998 ; Miranda *et al.*, 2000). Se ha demostrando en una serie de trabajos realizados en ratón, la participación de un receptor primario y un receptor secundario en este modelo.

Muchos estudios han demostrado que la ZP3 actúa como receptor primario durante la fertilización en mamíferos incluyendo al humano. En ratón se ha visto que

removiendo o bloqueando los residuos de N-acetilglucosamina (GluNAc) de ZP3, se inhibe la unión con el espermatozoide. De forma similar, si se remueve o bloquean residuos de α -galactosa, β -galactosa, manosas y fucosas también se bloquea éste reconocimiento, por lo que se han propuesto estos oligosacáridos como mediadores tanto la unión inicial de los gametos como la activación de la reacción acrosomal (Wassarman, 1988; Cornwall *et al.*, 1991; Schuffner *et al.*, 2002). En ratones, la actividad de la ZP3 como receptora del espermatozoide se ha atribuido a la presencia de residuos de α -1,3-galactosa en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Florman y Wassarman, 1985; Bleil y Wassarman, 1988) y a la presencia de N-acetilglucosamina (Miller y col., 1992). Sin embargo, estos resultados obtenidos *in vitro* se contradicen, observaciones de estudios realizados *in vivo* utilizando ratones *knockout*, donde se ha encontrado que ratones hembras carentes de la enzima glicosiltransferasa, necesaria para glicosilar residuos terminales con α -1,3-galactosa, son fértiles (Thall y col., 1995). También, ratones machos privados del receptor putativo para la N-acetilglucosamina en la superficie del espermatozoide son capaces de fecundar (Lu y Shur, 1997). Por lo tanto, el papel de los carbohidratos de la ZP en la unión del espermatozoide no está claro. En todo caso, existe evidencia de que el esqueleto peptídico es esencial para el reconocimiento espermático de la ZP (Yonezawa *et al.*, 1995; Zayas *et al.*, 1995).

Se ha propuesto que la ZP2 actúa como un receptor secundario ya que esta glicoproteína mantiene la unión de los espermatozoides que han sufrido la RA a la ZP y ayuda en la penetración del espermatozoide a través de la ZP (Bleil *et al.*, 1988). Otro trabajo que demuestra la importancia de ZP2 utilizando anticuerpos anti- ZP2 (mAb ZP2-20) en ensayos de hemizona, y espermatozoides con RA inducida se inhibe la unión del espermatozoide con la ZP en bovino y humano (Hinsch *et al.*, 2003).

En ratón mientras que ZP2 y ZP3 están involucradas en las funciones biológicas (unión al espermatozoide) y estructurales de la zona pelúcida, para la ZP1, solo se han observado funciones estructurales, (Wassarman, 1999).

Como se mencionó en apartados anteriores mucho de lo que se sabe acerca del fenómeno reproductivo se ha realizado en ratón, sin embargo, no todos los mamíferos comparten las mismas características en el proceso de fertilización. Por ejemplo, en el cerdo la ZP3 β (homóloga de la ZP3 de ratón) no tiene la función de receptor inicial del espermatozoide y se ha sugerido que su papel es estabilizar la estructura de la ZP3 α , que aparentemente presenta la función receptora en esta especie (Prasad *et al.*,

1996). Sin embargo cuando se encuentran ZPB/ZPC) y ZP1/ZP3), la interacción inicial es mas efectiva y quizás este heterodímero sea necesario para la unión con el espermatozoide de cerdo (Yurewicz, 1998).

1.5.2 RECEPTORES DEL ESPERMATOZOIDE QUE SE UNEN A LA ZP

Los receptores espermáticos para la ZP pueden estar localizados en la membrana plasmática o en la membrana interna del acrosoma, según su participan en la unión primaria o secundaria con la ZP. Muchas son las proteínas espermáticas que han sido involucradas en el reconocimiento de la ZP en diferentes especies.

En ratón se ha identificado la participación de la glicoproteína sp56 localizada en la membrana plasmática del espermatozoide y tiene afinidad por mZP3 y residuos de α -galactosa (Bookbinder *et al.*, 1995). También se ha identificado una proteína de 95 kDa (P95) con actividad de tirosina-cinasa a la cual se le ha denominado proteína ZRK (zona receptor kinase) (Saling *et al.*, 1995), esta ha sido localizada en la superficie del espermatozoide, está asociada con la unión a la ZP y probablemente participe en la inducción de la reacción acrosomal. Se han postulado dos hipótesis sobre la función de esta proteína: una propone que la P95 es el mismo receptor de la proteína tirosincinasa y la otra que P95 sirve como receptor a ZP3 (Bruker y Lipford, 1995). La alta conservación evolutiva de los receptores para tirosina-cinasa, al igual que la conservación de su ligando correspondiente, la ZP3, podría sugerir la existencia de un homólogo (RTK-unido a ZP3) en humanos (Saling *et al.*, 1995). La zonadhesinas, P47 y un grupo de proteínas denominadas espermoadhesinas (todas estudiadas en cerdo), las cuales tienen afinidad por la ZP y son proteínas de membrana periférica, la proacrosina, P-selectina y sp38 se encuentra en la matriz del acrosoma y son liberadas durante la reacción acrosomal, y podrían participar en la unión secundaria en la zona receptora. (Hardy y Garbers, 1995; Ensslin *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 1995; Geng *et al.*, 1997 ; Adham *et al.*, 1997)

En humanos, se ha sugerido que participen la p66 de origen epididimal (Lasserre *et al.*, 2003), la SLLP1 intra-acrosomal (Mandal *et al.*, 2003) o el antígeno de fertilización FA-1 (Kadam y col., 1995), aún se desconocen sus ligandos en la superficie de la ZP humana. Otra proteína de membrana plasmática que al parecer interviene en la unión de los gametos es la SLIP1, fue localizada en células testiculares de ratón y presentes en la membrana del espermatozoide humano (Rattanachaiyanont *et al.*, 2001) Sólo para el receptor de glicina del espermatozoide (GlyR) se ha

determinado que es capaz de unirse a la hZP3 recombinante, y que ambos participan en la reacción acrosomal inducida por la ZP (Bray *et al.*, 2002). Por otra parte, también las proteínas de la superficie del espermatozoide están altamente glicosiladas y se ha sugerido que tienen un papel importante durante la fertilización, si bien los estudios que avalan esta hipótesis se han llevado a cabo principalmente en mamíferos no humanos (Zara y Naz, 1998). Se ha determinado que los residuos de N-acetilglucosamina presentes en la ZP3 de ratón y porcina interactúa con la enzima β -1,4-galactosiltransferasa (GalT-I) del espermatozoide, esto se demostró realizando una digestión de los residuos de GlcNAc, provocando la incapacidad de unión de los gametos (Miller *et al.*, 1992). En ratón y en el humano esta enzima se ha localizado en la membrana interna del espermatozoide y a lo largo de la región ecuatorial (Sullivan *et al.*, 1989) (Shur y Nelly, 1988) (Miller *et al.*, 1992) (figura 8).

Todo lo anterior refleja que la interacción entre el espermatozoide y la ZP es un fenómeno complejo donde al parecer participan o pueden participar varias moléculas receptoras: redundancia.

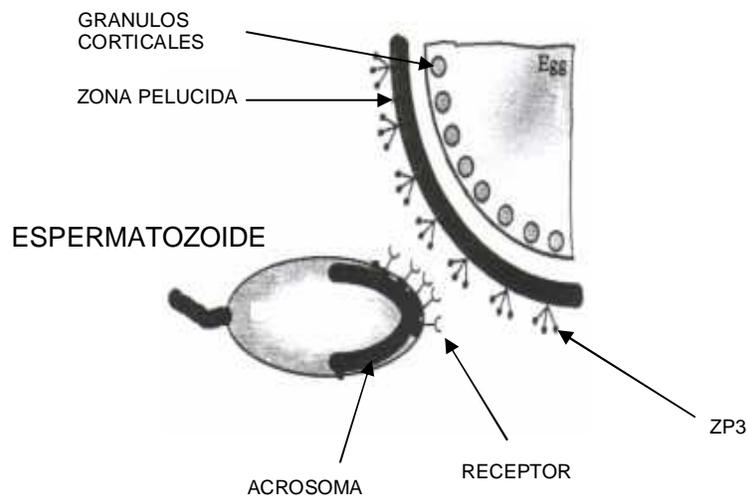


Figura 8. Modelo esquemático de los principales receptores espermáticos. Espermatozoide con su acrosoma intacto, completa capacitación y se une a la ZP. La ZP3 se une al espermatozoide a través de receptor o complejo receptor que incluye (GalT-I), iniciando la excitosis del contenido acrosomal. Tomado de Miller y colaboradores (2002).

2. OBJETIVOS

Los estudios de la interacción ZP-espermatozoide en ratón son importantes, pero en vista de que los resultados difieren entre las especies estudiadas no se puede postular un modelo general. Existen evidencias de que algunos problemas de infertilidad masculina se derivan de deficiencias en el reconocimiento y penetración de la zona pelúcida (Liu y Baker, 2000).

El estudio de la interacción espermatozoide-zona pelúcida en humanos ha estado limitada debido a la dificultad para la obtención de material biológico (ovocitos), razón por la cual se desconocen muchos aspectos del fenómeno. En la actualidad, el progreso en tecnologías de ADN recombinantes y expresión en líneas celulares han permitido la clonación y expresión de proteínas para su uso en investigación. Por lo anteriormente explicado el objetivo central del presente trabajo es identificar la o las proteínas de la zona pelúcida humana que interactúan con el espermatozoide.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana.
- Caracterizar los productos de expresión.
- Purificar las proteínas de la zona pelúcida humana.
- Identificar las proteínas de la zona pelúcida que participan en el reconocimiento con el espermatozoide.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material:

El cDNA para la ZP1 fue donado por la doctora Bonnie Dunbar del Departamento de Biología Celular y Molecular del Baylor College of Medicine, Houston, Texas, al igual que los anticuerpos dirigidos contra zona pelúcida de cerdo (HSZP) y los anticuerpos contra membrana de espermatozoides humanos, preparados en conejos. El anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa de rábano y el substrato ABTS y H₂O₂ fueron comprados en los laboratorios ZYMED. Las placas de ELISA de fondo plano fueron adquiridas en Nalge NUNC Internacional Corporation. (Rochester, NY). Los cDNA que codifican para ZP2 y ZP3, fueron donados por el Dr. Jurrien Dean del Nacional Institute of Health (USA). La línea celular Sf9 fue donada por la Dra Mary Estes del Departamento de Virología Molecular del Baylor College of Medicine, Houston, Texas. El vector de expresión pAcHLT, el estuche de transfección BaculoGold™, el medio TNM-FH suplementado con suero fetal bovino y la agarosa Agarplaque Plus se adquirieron en los laboratorios Pharmingen (San Diego, CA). El rojo neutro, el antibiótico-antimicótico 10X, EDTA, glicerol, Tris base, piruvato de sodio, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y Triton X100, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, TEMED, 2β-mercaptoetanol, persulfato de amonio, Tween 20, acrilamida, bis N,N'-metilen-bis-acrilamida, azul de bromofenol, ácido 2-[N-ciclohexilamino] etano-sulfónico (CHES) y azul brillante de Coomassie R-250 se compraron en los laboratorios Bio-Rad (Hercules, CA). Los fosfatos monobásicos y dibásico de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, metanol, ácido acético glacial, glutaraldehído, citrato de sodio, ácido cítrico y glicerol se compraron en J.T. Baker S.A. (México). La proteína A marcada con I¹²⁵ y los estándares de peso molecular de DNA se obtuvieron de Amersham Int. (Inglaterra). La matriz de Ni-NTA-agarosa (ácido nitrilotriacético, unido a níquel) fue adquirida a QIAGEN Inc. (Valencia, CA). La membrana de polivinildifluorido (PVDF) se adquirió de NEN life Sciences (Boston, MA). Las placas de rayos X se obtuvieron de Kodak Co. (México). Los medios de separación (Isolate), los medios capacitantes Human tubal fluid HTF modificado [HEPES], Modified Sperm Washing Medium y el medio de refrigeración Test Yolk Buffer se obtuvieron de Irving Scientific (Santa Ana

CA). La zona pelucida comercial de cerdo se adquirió en Calbiochem (Germany). Las muestras de semen fueron cedidas por la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados del Hospital Ángeles del Pedregal (México D.F.), previa autorización del director de la institución Dr. Alfonso Gutiérrez Najar.

3.2 Vectores de expresión.

Los vectores de expresión con los cDNA para ZP1, ZP2 y ZP3 fueron cedidos por la Dra. Cecilia Cariño, los cuales fueron construidos como parte de su tesis doctoral en el INCMNSZ (Cariño *et al.*, 2002). Brevemente, se obtuvieron así: el cDNA para ZP1 humano se obtuvo por medio de RT-PCR de RNA de ovario humano. El producto de 1722 pb fue secuenciado para constatar que coincidiera con la secuencia publicada para ZP1, (Harris *et al.*, 1994). Los cDNA para las ZP1 y ZP3 humanas se clonaron en los vectores de expresión pAChLTA utilizando los fragmentos de 1722 pb y de 1299 pb respectivamente mientras que el fragmento de 2266 pb que codifica para ZP2 se clonó en el vector pAChLT B.

El vector de expresión pAChLT está constituido por los siguientes elementos: un promotor de polihedrina que se encarga de regular la transcripción de la proteína, un sitio de 6 histidinas el cual se utilizó para purificar los productos de expresión, un sitio de corte proteolítico para la liberación de la proteína de la porción del vector previa y la región de múltiple clonación, en el cual se incorporaron los cDNAs, que codifican para cada una de las proteínas de la zona pelúcida, ver figura 9.

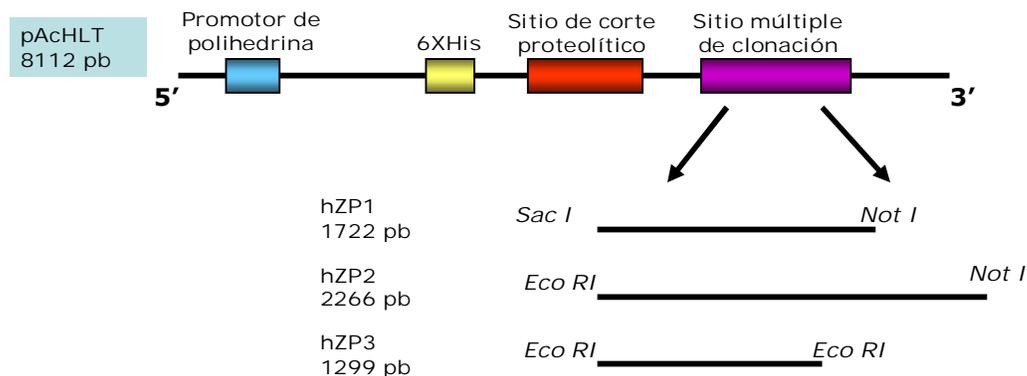


Figura 9. Diagrama del vector de expresión pAChLT

3.3 Cultivo de células:

La división del cultivo en monocapa se realizó cada 7 días en 15 mL del volumen total del medio. Las células se cultivaron en monocapa en cajas de cultivo y se resuspendieron en frascos bioreactores de 100 y 250 mL. La expresión de las proteínas de la zona pelúcida se realizó en la línea celular de insecto Sf9, la cual proviene del ovario de la mariposa *Spodoptera frugiperda* en estado larvario. Los procedimientos para el cultivo de células, infección viral y el aislamiento del virus recombinante se realizaron de acuerdo con lo descrito previamente por Summers y Smith (1987) y Prasad y colaboradores (1995). Estas células fueron propagadas en medio TNM-FH con suero fetal bovino al 10 %. Al cultivo en bioreactor se le renovó el medio cada 4 días y se utilizó un antibiótico-antimicótico para prevenir la contaminación de los cultivos.

Para ello se obtuvieron los lisados celulares de la siguiente manera: se centrifugaron 100 mL de las células infectadas con el virus recombinante, que se encontraban en suspensión y posteriormente se resuspendió el pellet en 4-5 mL de TrisHCl pH 8.0 20mM. Después se sometió a ciclos de congelación-descongelación, para lisar las células, y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 40 minutos a 4°C. Por último se agrega 1 mL de buffer de lisis (Urea 2M, TrisHCl 20mM, Tritón X-100 2 % pH 8.0), se homogeniza perfectamente y se recupera el pellet centrifugando a 12,000 rpm 10 minutos.

3.4 Transfección de células Sf9:

Los vectores con los cDNA se cotransfectaron con el virus lineal tipo silvestre *Autographa californica* (AcNPV) dentro de las células Sf9 utilizando el estuche de transfección BaculoGold™ (Pharming, San Diego, CA) de acuerdo con las especificaciones dadas por el fabricante.

El método consistió en precipitar el DNA con cloruro de calcio. Brevemente, se mezclaron 0.5 µg del DNA viral y 2 µg del vector pAcHLT conteniendo las secuencias de DNA para cada proteína de la ZP humana. Se agregó la mezcla a 2×10^6 células en cajas de cultivo celular de 60 mm. Después se depositó gota a gota la solución de transfección (HEPES 25 mM pH 7.1, cloruro de calcio 125 mM, cloruro de sodio 140 mM). Las cajas se incubaron durante cuatro horas a 27°C y se substituyó el medio de transfección por medio TNM-FH. Al término de cuatro días de

incubación se colectó el sobrenadante con el cual se realizaron análisis de placa. Como control negativo se realizó una transfección con el virus linearizado y el vector pAcHLT sin inserto en las mismas condiciones de la transfección experimental.

3.5 Expresión de las proteínas de la ZP humana en la línea celular Sf9

Se infectaron cultivos de células en monocapa con el medio de transfección con los baculovirus recombinantes para realizar análisis de placa. Esto se llevó a cabo en cajas de cultivo celular de 6 pozos con un total de $1.5-2.0 \times 10^6$ células por pozo. Las células infectadas se cubrieron con una capa de agarosa Agarplaque Plus al 1 % y se incubaron 6 días a 27°C hasta que las placas se desarrollaron. La identificación de las placas que presentaron lisis positiva se realizó por tinción con el colorante rojo neutro, en donde las células infectadas y lisadas no se tiñen, mientras que las células que no se infectaron y no se lisaron se tiñen con el colorante.

Las placas de lisis se recuperaron y resuspendieron en medio de cultivo TNM-FH a 4°C en tubos de 1.0 mL para eluir las partículas virales. Los medios que contienen los virus recombinantes obtenidos de las placas, se emplearon para llevar a cabo la expresión de las proteínas de la ZP humana, esto se realizó de la siguiente forma: se infectaron 3×10^6 células con el virus del análisis de placa, los cuales se incubaron por 4 días, se recolectó el medio de infección y se realizó un ensayo de expresión de proteínas en 6×10^5 células por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos. Posterior a la infección con el virus, se cambió el medio por medio fresco y las cajas se incubaron durante 72 horas a 27°C . La evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ZP humana se determinó por análisis de electroforesis de SDS-PAGE y Western blot, tal y como se explica en el apartado 3.6 y 3.7.

3.6 Separación de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida (hZP's) mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La expresión de las proteínas recombinantes se evaluó mediante análisis del lisado celular electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, bajo condiciones reductoras y en presencia de SDS (Laemmli, 1970). El lisado celular (apartado 3.3), se resuspendió en solución de muestra (CHES 0.05 M, SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol, 2 β -mercaptoetanol 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH 9.5) se depositaron en los geles de

poliacrilamida y por carril se sembró de 40 a 70 μg de proteína. La electroforesis se desarrolló a 90 volt. Inmediatamente después de finalizada la electroforesis, los geles se colocaron en solución de tinción (Azul de Coomassie R-250 0.2 %) durante 1 hora y posteriormente en solución decolorante (metanol 20 % y ácido acético 5 %).

3.7 Identificación de las hZP's recombinantes por medio de Western blots.

Alternativamente a la tinción con Coomassie blue, los geles se electrotransfirieron a una membrana de PVDF a 80 volts durante 2 horas y 4°C (Towbin y Gordon, 1984). Luego la membrana se bloqueó en solución amortiguadora de TBS (tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM, Tween 20 0.02 % y pH 7.4) con 5 % de leche descremada durante 2 horas o toda la noche. Después, la membrana se incubó con un anticuerpo primario anti-zona pelúcida de cerdo (r anti-HSPZ) durante dos horas a una dilución 1:1000 en la misma solución de TBS con agitación. A continuación se lavó tres veces la membrana con TBS, durante 10 minutos cada lavado con agitación y por último se incubó con proteína A marcada con I^{125} . Las membranas fueron sujetas a autorradiografía a - 70°C toda la noche. Se incluyeron estándares de peso molecular conocido para la estimación de la movilidad electroforética de los productos de expresión.

3.8 Purificación de las proteínas

Para purificar las proteínas recombinantes de la zona pelúcida expresadas en células de insecto infectadas con baculovirus se utilizó la matriz de Ni-NTA agarosa la cual es una matriz metalo-quelante que captura proteínas que tienen en su estructura una región de 6 histidinas, formando complejos moleculares muy fuertes (Steinert *et al.*, 1996). Brevemente, el botón de células infectadas se lisó (apartado 3.3) (aproximadamente 80 mg de proteína total/1 mL de Ni-NTA), y resuspendió en 1 mL de amortiguador de solubilización (Tris-HCl 20mM, NaCl 0.5 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M, 2 β -mercaptoetanol 5 mM) incubando durante 1 hora con agitación. Se centrifugó durante 30 minutos a 12,000 rpm recuperando el sobrenadante, el cual se mezcló con 1 mL de Ni-NTA (que previamente se lavó con agua destilada-desionizada y se equilibró con amortiguador de solubilización) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con 2 mL de amortiguador de solubilización y dos veces más con amortiguador de lavado (TrisHCl 20mM, NaCl 0.5 M, Imidazol

5mM, Urea 6 M y 2 β -mercaptoetanol 5mM). Posteriormente se renaturalizaron utilizando el amortiguador de lavado sin urea, que diluyó la urea en un gradiente de 6 – 0 M. La Ni-NTA se incubó en cada etapa del gradiente durante 10 minutos con agitación. Las proteínas ZP's recombinantes renaturalizadas son eluidas con 1 mL de amortiguador de elución (TrisHCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol en concentraciones crecientes de 50 a 500 mM, 2 β -mercaptoetanol 5 mM). Las incubaciones con cada solución son de 15 minutos a 4°C. En cada paso de la purificación se utilizan concentraciones pequeñas de imidazol 20 mM con el objeto de recuperar la mayor cantidad de proteínas. Posteriormente se realizaron análisis de SDS-PAGE y Western blot (ver apartados 3.6 y 3.7.) para evaluar la pureza de las proteínas.

3.9 Muestras de semen.

Se analizaron muestras de semen provenientes de donantes que han sido utilizados previamente para realizar procedimientos de reproducción asistida con éxito de embarazo con tres días de abstinencia sexual. El eyaculado se obtuvo por masturbación y se comenzó a procesar la muestra después de su licuefacción a 37°C. Para evaluar las muestras se toman en cuenta los siguientes parámetros (World Health Organization 2002).

- Movilidad: Se determinó por observación directa al microscopio óptico 40X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles contando 200 células.
- Motilidad: Se valoró el porcentaje de cada tipo de motilidad, y se expresa en orden creciente.
 - Ø 1 + motilidad *in situ*
 - Ø 2 + desplazamiento en forma circular
 - Ø 3 + desplazamiento errático o zig – zag
 - Ø 4 + desplazamiento lineal rápido.
- Morfología. Se evaluó realizando un frotis, contando 200 espermatozoides al azar observando si presentan morfología normal y anormal. No se empleó el criterio estricto de Kruger.
- Densidad. Se contaron los espermatozoides en una cámara de Neubauer y se determinó la concentración en # de espermatozoides /mL

EVALUACIÓN ESPERMÁTICA BÁSICA	VALORES DE REFERENCIA
Espermatozoides normales	> 25 %
Movilidad espermática	> 50 %
Motilidad espermática	1+ < 2+ < 3+ < 4+
Densidad espermática	> 21 millones /mL

Tabla 1.- Valores de referencia recomendados por la World Health Organization (2002), para determinar que las muestras de semen son normales.

3.9.1 Capacitación espermática.

Se aislaron los espermatozoides del plasma seminal, empleando un gradiente de concentración al 50 % y 90 % (Isolate), se centrifugó la muestra a 1800 rpm por 30 minutos, se retiró el sobrenadante y el botón de espermatozoides se lavó dos veces con medio Modified Sperm Washing Medium, a 1500 rpm durante 15 minutos, se resuspendió el botón de espermatozoides en medio capacitante (Sperm Washing Medium y Test Yolk Buffer, v/v) y se guardó a 4°C durante 24 horas.

Se resuspendió el botón de espermatozoides en medio HTF complementado (albúmina sérica humana al 0.3 % y piruvato de sodio al 0.325 mM) y se centrifugó a 1500 rpm 10 minutos. Después se incubó durante 30 minutos a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂ con aproximadamente 4 mL de medio HTF complementado. Se reevaluó la muestra capacitada utilizando los mismos parámetros iniciales de movilidad, motilidad, densidad y morfología.

3.9.2 Evaluación de la unión de los espermatozoides a las distintas proteínas hZP's recombinantes.

Para detectar a qué proteína o proteínas se unen los espermatozoides, se utilizó una técnica basada en el ensayo inmunoenzimático ELISA de captura, con modificaciones para capturar células vivas en vez de moléculas. Esta técnica fue denominada **EspermoELISA**.

Las placas de ELISA de fondo plano fueron sensibilizadas durante toda la noche con 25, 50 y 100 ng de proteínas purificadas las cuales se diluyeron en un volumen final de 100 µl de solución amortiguadora de carbonato de sodio al 0.1 M, pH 9.6. Cada muestra a estudiar se utilizó por triplicado. Se lavaron las placas dos veces con amortiguador de fosfatos PBS (fosfato monobásico de sodio 4 mM, fosfato dibásico de sodio 16 mM, cloruro de sodio 0.1 M y pH 7.3). Se bloqueó la placa toda la noche a 4°C con 200 µL de solución bloqueadora (fosfato dibásico de sodio 20 mM, ajustado a pH 8.8 con fosfato monobásico de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0.15 M y 5 % de leche descremada).

Posteriormente las placas se lavaron dos veces con PBS a 37°C y una vez con medio HTF a la misma temperatura. Los espermatozoides capacitados se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células por pozo en un volumen final de 100 µl, y se incubaron durante 20 minutos a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂.

Al término de la incubación, se lavó cuidadosamente dos veces con amortiguador de fosfatos a 37 °C. A continuación se fijaron los espermatozoides unidos con una solución de glutaraldehído al 10 % en PBS (100 µl por pozo) durante dos horas. Se lavaron los pozos dos veces con PBS y se agregó solución bloqueadora (200 µl por pozo), incubando toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces con PBS y se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-espermatozoide (1:1000), preparado en 5 % de leche descremada en PBS e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavó tres veces con PBS y se agregó anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa preparado en (1:2000) preparado en 5 % de leche descremada en PBS incubando durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó dos veces con PBS y se adicionó el substrato (ABTS + H₂O₂) preparado en amortiguador de citratos (citrato de sodio 0.1 M, ácido cítrico 0.1 M pH 4.4 – 4.5). Se

incubó 15 minutos y se procedió a leer la placa en el lector de ELISA (MultiSkan, Labsystems) a una DO de 405.

3.9.3 Análisis estadístico:

Para determinar si las diferencias son significativas entre la unión a las diferentes proteínas probadas de los espermatozoides, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Además se realizó el estadístico de correlación y regresión lineal para estudiar la variabilidad que hay entre ensayos. Los datos se procesaron en el programa GraphPad InStat (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1 Purificación y caracterización de las proteínas rhZP's humanos

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que juega un papel importante en la interacción espermatozoide-óvulo y está compuesta por tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3. Para estudiar este proceso de la fertilización y conocer que glicoproteína interactúa con el espermatozoide, se expresaron las tres proteínas ZP recombinantes humanas. Los vectores de expresión para ZP1, ZP2 y ZP3 fueron preparados por la Dra. Cecilia Cariño como parte de su tesis doctoral en el INNSZ (Cariño *et al.*, 2002) y gentilmente cedidos como parte de este trabajo.

Las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana (rhZP) expresadas en el sistema de células eucarióticas de insecto (Sf9) sufren modificaciones postraduccionales como la glicosilación, la cual es de gran importancia en la interacción de los gametos.

Sin embargo en este sistema las rhZP no son secretadas al medio de cultivo, permaneciendo ancladas en la fracción insoluble. Por lo tanto, las células fueron lisadas bajo condiciones desnaturizantes y se incubaron con una matriz de Ni-NTA agarosa, la cual captura proteínas que tienen en su estructura una región de 6 histidinas (Steinert *et al.*, 1996) y se eluyeron con gradientes de imidazol.

Los lisados celulares y las proteínas purificadas fueron sometidos a los análisis de electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (Figura 10A) y Western blot (Figura 10B).

En el carril 2 de esta figura se encuentra el extracto de células Sf9 infectado con el virus recombinante sin el cDNA, el cual fue utilizado como control para distinguir las proteínas de estas células de las proteínas recombinantes de interés. En los carriles 3, 5 y 7 se muestra el patrón electroforético de los lisados de células Sf9 infectadas con los vectores de expresión para hZP1, hZP2 y hZP3 respectivamente. En los tres casos se observa la aparición de una banda mayoritaria de proteínas que no se observa en el extracto de células Sf9 silvestres. Dichas bandas de proteína aparecen nuevamente en las eluciones que se llevaron a cabo luego de la purificación de cada una de las proteínas recombinantes (ver carriles 4, 6 y 8), confirmándose que las bandas de proteínas que aparecieron en los lisados celulares contienen una cola de 6 histidinas y por lo tanto corresponden a las proteínas recombinantes expresadas. A

estas proteínas se les estimó sus pesos moleculares aparentes utilizando estándares de peso molecular (carril 1). Sus pesos moleculares aproximados son de 66 kDa para ZP1, 85 kDa para ZP2 y 55 kDa para ZP3, los cuales son similares a los reportados para sus homólogos nativos (Liang y Dean, 1993) (Charberlain y Dean, 1990) (Bauskin *et al.*, 1999). Cabe señalar que para la proteína rhZP3, se observa una banda en menor intensidad respecto a rhZP1 y rhZP2. Esto se debe a que el rendimiento de la proteína purificada fue bajo. En contraste los resultados obtenidos de las pruebas biológicas muestran que a pesar de este inconveniente en el método de purificación no afecta en la fisiología de la proteína rhZP3, como se demostrará mas adelante.

Las proteínas separadas se transfirieron a la membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos anti-ZP porcina. Este anticuerpo se utiliza debido a que la ZP porcina guardan un alto porcentaje de homologia con la del humano (Harris *et al.*, 1994) y se ha demostrado que reconoce proteínas recombinantes ZP humanas (Cariño *et al.*, 2002).

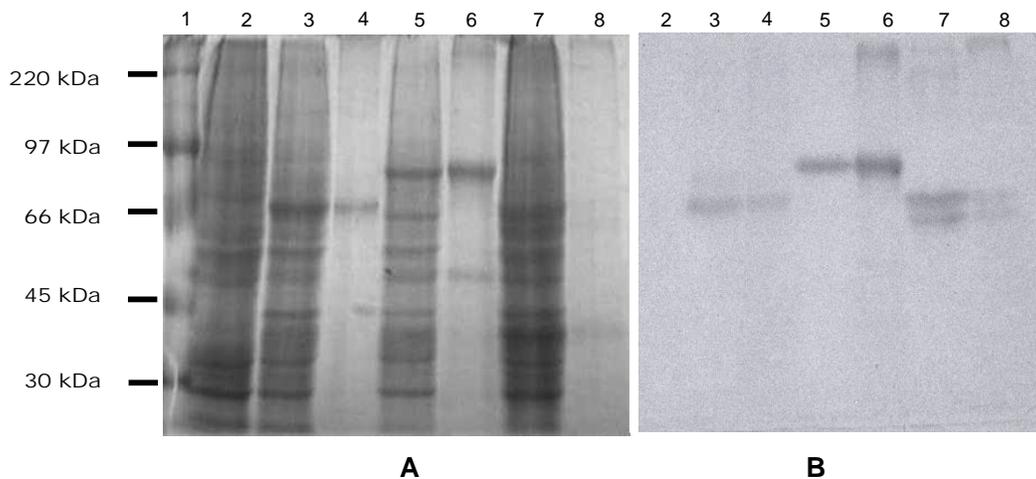


Figura 10. Caracterización inmunológica mediante análisis de electroforesis SDS-PAGE (A) y Western blot (B) de los lisados de células Sf9 con baculovirus recombinante y las proteínas purificadas. (1) Estándares de peso molecular; (2) Extracto de células Sf9 infectadas con el virus sin inserto; (3) Extracto de células Sf9 infectadas con el vector recombinante para ZP1; (4) Proteína purificada ZP1; (5) Extracto de células Sf9 infectadas con el vector recombinante para ZP2, (6) Proteína purificada ZP2; (7) Extracto de células Sf9 infectadas con el vector recombinante para ZP3; (8) Proteína purificada ZP3.

Como puede observarse en la figura 10B, el anticuerpo reconoció eficientemente a las diferentes proteínas purificadas ya que podemos apreciar claramente la presencia de una banda única tanto en los extractos como en las

proteínas eluidas, además coinciden con los tamaños de las proteínas rhZP's observadas en el gel de poliacrilamida, confirmándose la identidad de estas proteínas (rhZP's). Es importante destacar que en donde se encuentra el control de células Sf9 sin el cDNA, el anticuerpo no reconoció ninguna proteína (el anticuerpo es específico). Además se logro observar a la rhZP3 la cual no se observaba claramente en el gel.

4.2 Validación del ensayo de EspermoELISA.

Mucho de lo que se conoce acerca de la ZP en el proceso de la fertilización de mamíferos ha sido obtenido a partir de estudios en ratones, cerdo, conejos, primates, etc. En humanos muy poco se sabe acerca de estas estructuras y los sistemas para poder evaluarlos tienen la limitante del difícil acceso al material biológico (ovocitos) para su estudio. Los análisis utilizados que emplean ZP's nativas son: el ensayo de hZP solubilizada (Franken *et al.*, 2000), donde se evalúan los espermatozoides que sufren RA inducida por la ZP, y el ensayo competitivo de hemizona (Windt *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1992) que consiste en obtener mecánicamente una ZP nativa e incubar una mitad con los espermatozoides a estudiar y se compara el número de células unidas con la otra mitad que se incuba con una muestra control. Otro método alternativo utilizado para evaluar el proceso reproductivo son los ensayos de aglutinación utilizando glicoproteínas sintéticas (neoglicoproteínas funcionales ngps) conjugadas a albúmina sérica bovina mediante uniones covalentes. Los residuos de manosa y amino azúcares (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina) unidos a BSA se usan para cubrir esferas de sefarosa y se ha demostrado que este complejo mimetiza mZP3 y es capaz de inducir la RA (Bendahmane y Tulsiani, 2003). En estos métodos la forma de evaluar la unión espermática a la ZP nativa o a las esferas de sefarosa recubiertas con neoglicoproteínas es subjetiva, ya que se cuenta al microscopio el porcentaje de los espermatozoides que llevaron a cabo reacción acrosomal o que se unieron y esto puede generar un error de apreciación.

En vista de esto, se ha hecho necesario el desarrollo de métodos alternativos para evaluar la unión de espermatozoides a la ZP, utilizando para ello las proteínas recombinantes de la ZP, las cuales han demostrado tener actividad biológica (Bray *et al.*, 2002) y se pueden obtener en grandes cantidades.

Para poder evaluar el proceso de fertilización en fase sólida, introdujimos modificaciones en el protocolo del ensayo de ELISA para usar espermatozoides vivos

y a este método lo denominamos **EspermoELISA**. El mismo consiste en sensibilizar placas de ELISA con las diferentes rhZP's obtenidas en las células Sf9 y purificadas, e incubar con espermatozoides humanos capacitados, provenientes de donadores con fertilidad comprobada, empleados anteriormente en: IIU, FIV e ICSI. Aquellos espermatozoides que sean capaces de unirse específicamente a las proteínas adheridas a los pozos se fijan con glutaraldehído. El complejo espermatozoide-proteína se detecta con anticuerpo anti-membrana de espermatozoide humano, que a su vez se incuba con anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Finalmente se revela con un sustrato cromogénico de ABTS más peróxido de hidrógeno.

Para validar el ensayo de EspermoELISA comenzamos por establecer la especificidad del mismo. Como se observa en la figura 11, al incubar los espermatozoides con proteínas no relacionadas (BSA y HSA), éstos no se unieron a éstas proteínas de manera significativa, lo que nos sugiere que los espermatozoides no se unen de manera inespecífica. Vemos una ligera unión en el caso de espermatozoides- ZP comercial de cerdo, fenómeno que pudiera deberse a que hay un alto porcentaje de homología con las proteínas ZP de humano y por ello vemos que hay diferencias significativas entre ZP comercial de cerdo y los otros controles. Además, se realizaron pruebas con las proteínas de rhZP's sin espermatozoides (-SPM) para descartar uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados y artefactos que pudiesen alterar el ensayo, como puede observarse no detectamos ningún tipo de unión inespecífica. A estos resultados se les dio un tratamiento estadístico de ANOVA, $n = 16$, ensayos realizados por triplicado, $p \leq 0.0001$.

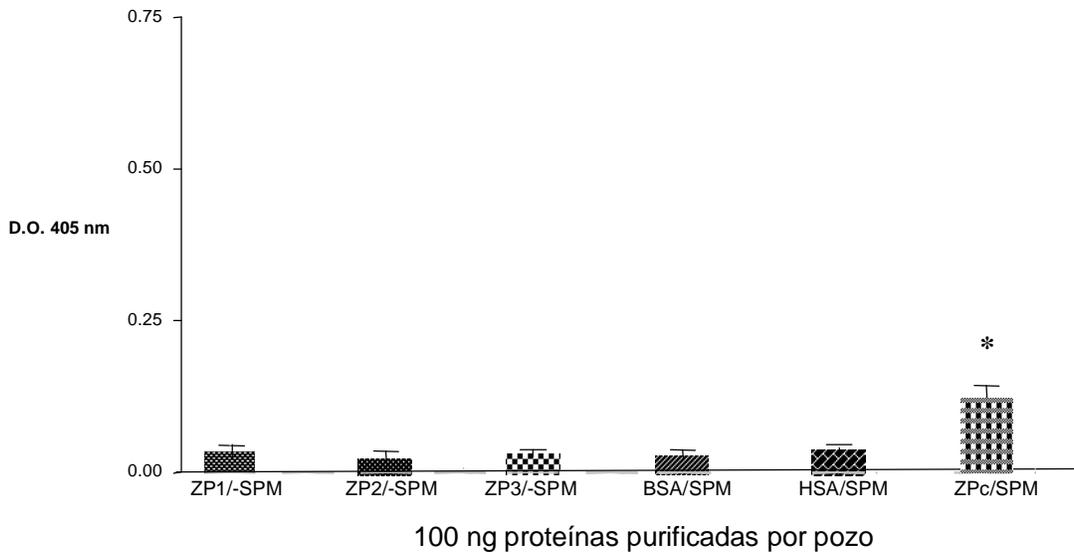


Figura 11. Controles negativos del ensayo de EspermoELISA. En primer lugar se muestran rhZP1, rhZP2 y rhZP3 sin espermatozoides (-SPM). A continuación se muestran los espermatozoides incubados con proteínas no relacionadas, albúmina sérica bovina (BSA), y humana (HSA). Por último, los espermatozoides incubados con zona pelucida comercial de cerdo (ZPc) $p \leq 0.0001$.

4.3 Ensayos de unión de espermatozoides capacitados con las proteínas recombinantes purificadas de la zona pelucida humana (rhZP) mediante EspermoELISA

Se sensibilizaron las placas de ELISA con las proteínas recombinantes purificadas, rhZP1, rhZP2 y rhZP3 a diferentes concentraciones y posteriormente se incubaron con espermatozoides capacitados. La unión de los espermatozoides a las 3 rhZP's es dependiente de la cantidad de proteína con la que se incubó (dosis-dependiente). El análisis de varianza ANOVA y Tukey-Kramer aplicado a los 16 experimentos realizados, revelan que hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres concentraciones de proteína siendo ZP 100 > ZP 50 > ZP 25 ($p \leq 0.001$) para las 3 rhZP's. Como puede observarse en la figura 12 encontramos que la mayor unión que tiene el gameto masculino por estas proteínas está dada principalmente por ZP1 y ZP3 y en una menor proporción por ZP2. Realizando una comparación, entre cada una de las proteínas, utilizando la cantidad de 100 ng por pozo, la unión de los espermatozoides fue: ZP1 > ZP2 > ZP3 ($p \leq 0.001$). Con 25 y 50 ng encontramos que ZP1 es mayor que ZP2 y que ZP3, para un valor $p \leq 0.001$. Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre ZP2 > ZP3 ($p \geq 0.05$) a estas concentraciones. En base

a estos resultados se decidió utilizar para los ensayos posteriores la concentración de 100 ng por pozo.

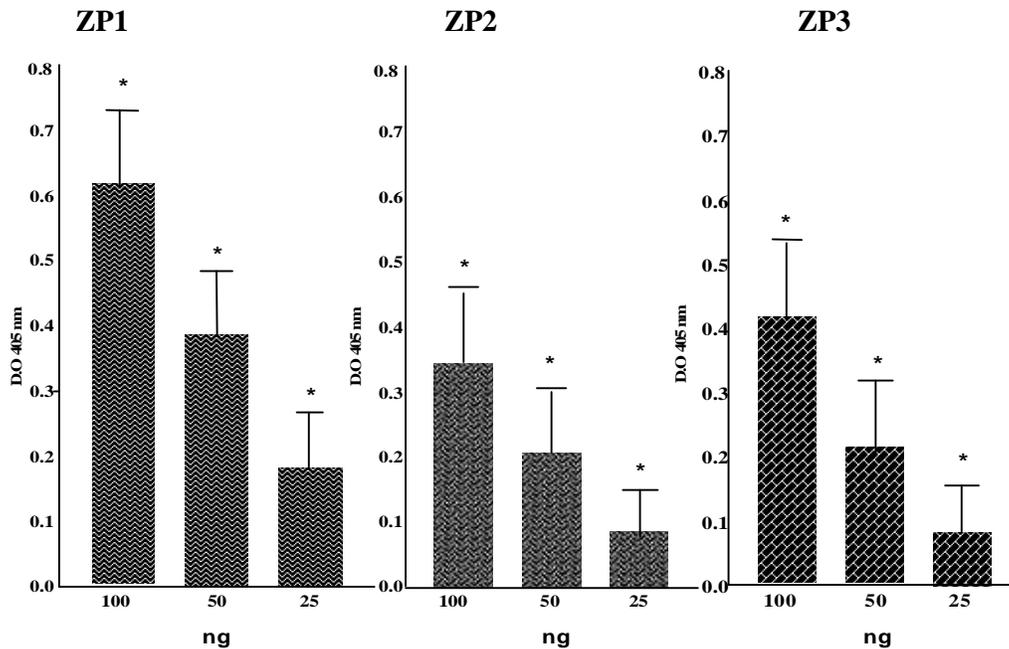


Figura 12. Ensayos de unión con los espermatozoides capacitados y las proteínas purificadas hZP's a diferentes concentraciones. ZP1, ZP2 y ZP3. n=16 cada ensayo realizado por triplicado * $p \leq 0.0001$

4.4 Variabilidad entre ensayos.

Se eligieron al azar 4 experimentos para observar la variabilidad en las muestras de semen provenientes de diferentes donantes respecto a su capacidad de unirse a hZP's. Como podemos observar en la figura 13, encontramos que la unión mostrada por los espermatozoides de cada muestra se comportó siempre como una función lineal (Correlación y regresión lineal, $r = 0.9$), de forma tal que al aumentar la cantidad de proteína de captura siempre se obtienen valores mayores de unión. Por otro lado, los valores de unión obtenidos para cada muestra de semen son diferentes ($p \leq 0.0002$). Puede observarse que para el caso de ZP1 y ZP2 se observa mayor homosedasticidad comparándolas con las ZP3. Esto pudiera deberse a que la unión a ZP3 depende de que los espermatozoides no hayan sufrido la RA, la cual se puede producir de manera espontánea en proporción variable (Green et al., 1999). Para corroborar esta hipótesis, sería necesario evaluar el estatus del acrosoma de las

muestras empleadas mediante la técnica de incubación con lectinas fluorescente (Fierro *et al.*, 1996) o la tinción con Coomassie blue (Larson y Miller, 1999).

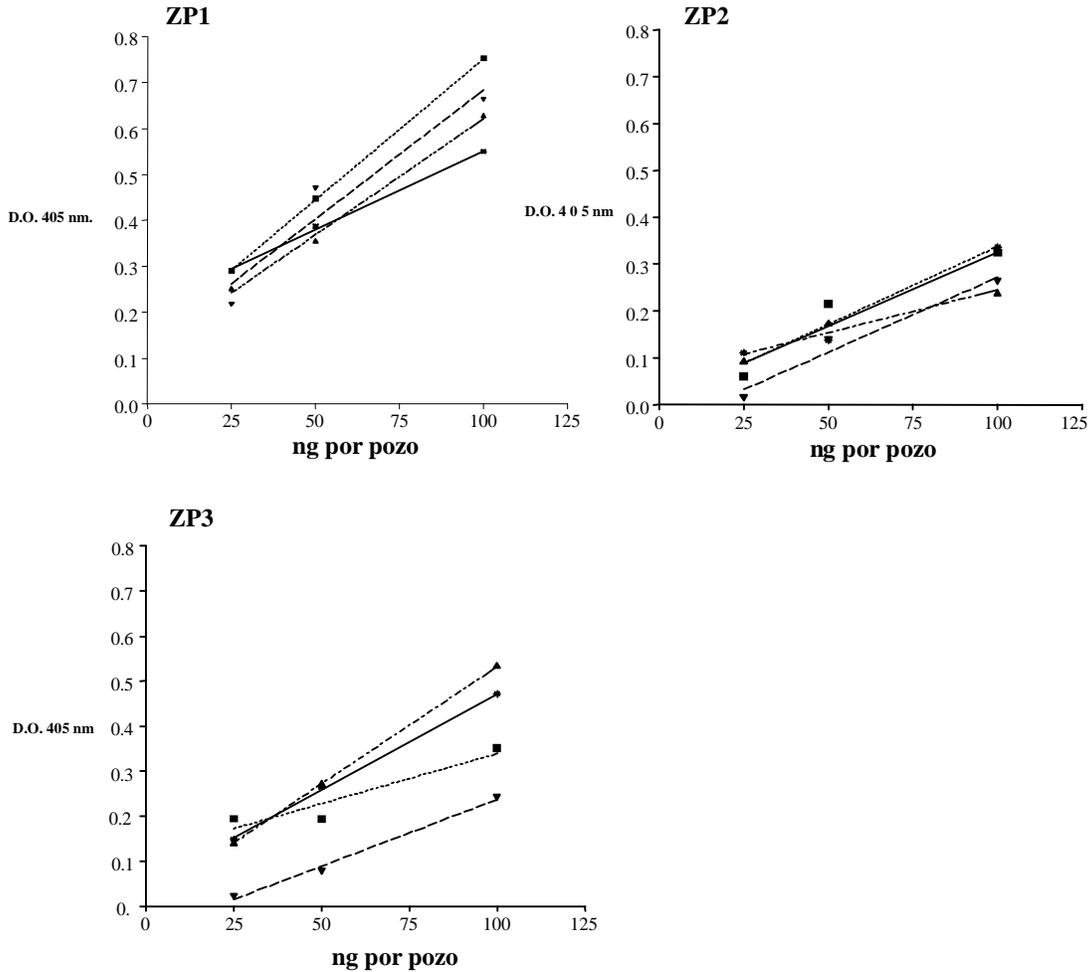


Figura 13. Curva dosis respuesta para la unión de espermatozoides a las diferentes rhZP's, a varias concentraciones. Los 4 experimentos mostrados se eligieron al azar.

4.5 Ensayos de unión utilizando combinaciones de las rhZP's

La mayor parte de los estudios acerca de los mecanismos de la fertilización, están enfocados a evaluar la interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida. El modelo más utilizado es el de ratón, en el que han concluido que la zona pelúcida tiene funciones de fijación e inducción de la reacción acrosomal (RA) en espermatozoides capacitados. Brevemente, la mZP3 actúa como receptor primario, mediante la unión inicial con el ovocito y activa la reacción acrosomal. Una vez que se indujo la RA, la mZP2 actúa como receptor secundario, uniendo al espermatozoide reaccionado y facilitando su penetración a través de la zona pelúcida, para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. La mZP1 demostró poseer funciones de

conservación de la estructura de la matriz sirviendo como enlace entre los filamentos formados por mZP2 y mZP3 (Wassarman, 1988) (Wassarman, 2002). Sin embargo, en el cerdo se muestra un comportamiento diferente, ya que se ha demostrado que al unir la subunidad ZP3 α con ZP1 hay mayor unión con la combinación de estas proteínas (Yurewicz *et al.*, 1993).

El propósito del ensayo de las combinaciones de rhZP's fue estudiar que proteína o proteínas están encargadas de llevar a cabo el reconocimiento primario en el proceso reproductivo en humanos. La estrategia que se siguió para llevar a cabo este experimento fue combinar las rhZP's de la siguiente manera: ZP1-ZP3, ZP1-ZP2, ZP2-ZP3 y ZP1-ZP2-ZP3, utilizando 50 ng de cada proteína para todas las mezclas. Como control empleamos las proteínas individuales. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran en la figura 14.

El análisis de varianza ANOVA y Tukey-Kramer revelaron que la unión de los espermatozoides incubados con la combinación de ZP1-ZP3 son significativamente mayores a la de las otras mezclas, siendo de ZP1-ZP3 > ZP1-ZP2 > ZP2-ZP3 ($p \leq 0.001$). Sin embargo, al compararlo con la mezcla de las tres proteínas no se encontraron diferencias significativas entre ($p > 0.05$). Esto sugiere que al parecer, en presencia de rhZP1 con rhZP3 la unión es tan efectiva como cuando están presentes las tres proteínas, haciendo suponer que la proteína ZP2 no contribuye al proceso de unión de espermatozoides.

Cabe mencionar que los valores que se muestran en la figura 12, en donde utilizamos 50 ng de rhZP, no muestran diferencias significativas entre rhZP2 y rhZP3 y en los resultados que se muestran en la figura 14 si se observan diferencias significativas. Ésto es debido a la variabilidad de las muestras espermáticas, sin embargo mantienen un comportamiento lineal, tal y como lo demostramos en la figura 13. Por otro lado el tamaño de muestra del experimento de las combinaciones es mucho menor y tal vez esto sea causa de estas diferencias por lo que es necesario aumentar el tamaño de muestra para obtener resultados más homogéneos.

Estos resultados nos demostraron que las proteínas rhZP1 y rhZP3 expresadas en células Sf9 juegan un papel importante en la unión de los espermatozoides humanos y sugieren que estas proteínas participan en el reconocimiento de los gametos humanos.

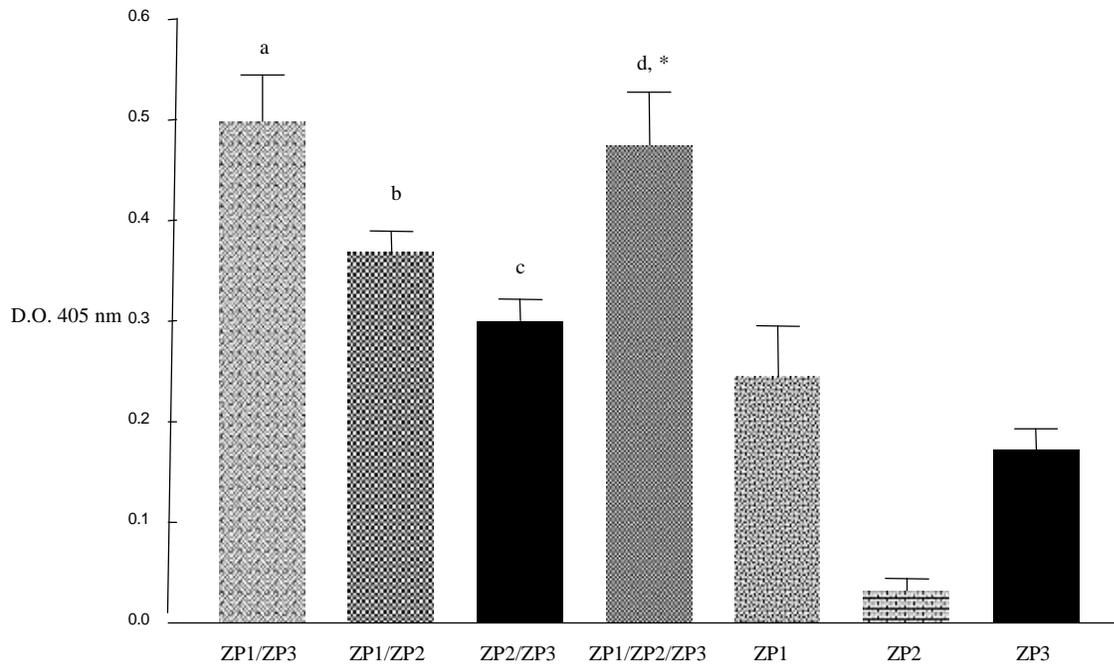


Figura 14. Unión de espermatozoides a diferentes combinaciones de las proteínas rhZP1, rhZP2 y rhZP3 (50 ng de cada proteína). Como control se utilizaron las proteínas individuales.

a: ZP1/ZP3 > ZP1/ZP2, ZP2/ZP3, ZP1, ZP3 ($p < 0.001$)

b: ZP1/ZP2 > ZP2/ZP3, ZP1, ZP2 ($p < 0.01$)

c: ZP3/ZP2 > ZP3, ZP2 ($p < 0.001$)

d: ZP1/ZP2/ZP3 > ZP1/ZP2, ZP2/ZP3 ($p < 0.001$)

* : ZP1/ZP3 vs. ZP1/ZP2/ZP3, n.s.

5. DISCUSION

Los estudios realizados en el campo de la interacción espermatozoide-zona pelúcida habían estado limitados por la dificultad para la obtención de material biológico (ovocitos). Sin embargo el uso de proteínas recombinantes ha permitido realizar más estudios acerca de las funciones biológicas de la zona pelúcida. En el presente trabajo de tesis se expresaron las tres proteínas de ZP humana en células de insecto Sf9, para obtener proteínas similares a las nativas. Los pesos moleculares de los productos de expresión fueron: 66 kDa para rhZP1, 85 kDa para rhZP2 y 55 kDa para rhZP3. Los pesos moleculares estimados a partir de las secuencias de cDNA para las proteínas humanas son de 57 kDa para hZP1, 82 kDa para hZP2 y 47 kDa para hZP3 (Harris et al., 1994; Liang y Dean 1993; Chamberlin y Dean 1990). Esto nos sugiere que las proteínas expresadas en las células de insecto son glicosiladas, ya que presentan mayores pesos moleculares.

Se han caracterizado las proteínas de la ZP humana nativa las cuales presentan un peso aproximado de 60-73 para hZP1, 80-110 para hZP2 y 53-60 kDa para hZP3 (Bauskin *et al.*, 1999). Esto nos puede sugerir que la glicosilación de las células de insecto es similar a las proteínas nativas.

Mediante el ensayo de EspermoELISA, fue posible estudiar la actividad biológica de estas proteínas recombinantes.

La importancia de este método radica en que es un sistema sencillo, eficiente, cuantitativo y que no depende de la subjetividad del evaluador. Es similar al ensayo de ELISA, con la variante de que en lugar de unir moléculas, se capturan células y se fijan a la placa para después continuar con los mismos pasos de la ELISA convencional.

En la validación de este ensayo empleamos como controles negativos, proteínas no relacionadas como la BSA y la HSA, y también se utilizó rhZP's incubados sin espermatozoides encontrando que los espermatozoides no se unieron inespecíficamente y no hay artefactos que alteren el ensayo. Por otro lado, los espermatozoides sí se unieron de manera específica a las tres rhZP's, demostrando con estos resultados que las proteínas recombinantes se pueden utilizar para estudiar las interacciones con el espermatozoide. Las uniones fueron dosis dependiente ya que a

mayor cantidad de proteína se observó una mayor unión espermática, siendo este comportamiento lineal. La técnica demostró ser reproducible y sensible, encontrándose una unión significativamente mejor en 100 ng que en 50 y 25 ng. Sin embargo observamos que hay correlación entre la variabilidad entre los ensayos y la heterogeneidad de las muestras de los donantes, pero es importante destacar que este comportamiento siempre fue lineal, por lo tanto no es posible definir aún el punto de corte con una N pequeña y establecer rangos normales de unión a éstas proteínas, por lo que a futuro se aumentará el tamaño de muestra para poder encontrar el punto de corte idónea para el ensayo.

Los resultados obtenidos sugieren que la teoría de la especie-especificidad es cierta ya que la unión espermatozoides-rhZP's fue significativamente mayor comparada con la unión espermatozoide-ZP comercial de cerdo (Talevi *et al.*, 1999; Wassarman, 1999).

Se observó que hay unión espermática significativamente mayor en rhZP1 y rhZP3 comparado con rhZP2, que pareciera no participar en este reconocimiento inicial, sin embargo podemos observar unión a esta proteína, esto se puede deber a que los espermatozoides experimentan RA espontánea y por ende se unen a rhZP2 como sucede en ratón (Green *et al.*, 1999; Bleil *et al.*, 1988). Por otra parte, la unión a ZP3 es inferior a la de ZP1, a pesar de que se conoce que la ZP3 participa en la unión primaria y es inductora de la RA (Wassarman *et al.*, 1999; Schuffner *et al.*, 2002). Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que los estudios presentados se hicieron a un tiempo de incubación fijo (20 min.), en el cual ya buena parte de la población de espermatozoides sufrió la RA (Bray *et al.*, 2002) y por tanto la unión a ZP3 ya puede estar disminuida.

Cuando se estimó la unión espermática a las mezclas de proteínas recombinantes, vimos como fueron más efectivas las uniones donde estaba rhZP1-rhZP3 juntas que separadas, inclusive en cualquier mezcla donde estuvieran presentes una de ellas la unión es mayor. En la mezcla de las tres proteínas (rhZP1-rhZP2-rhZP3) no hubo diferencias significativas con respecto a la mezcla rhZP1-rhZP3, por lo que podemos inferir con estos resultados que la unión inicial de los gametos humanos puede estar dado por la cooperación entre rhZP1-rhZP3, como sucede en el cerdo (Yurewicz, 1998) y no es un evento en el que participe una sola proteína como pasa en el ratón (Wassarman, 1999). A futuro se pretende trabajar bajo diferentes

condiciones, utilizando espermatozoides con y sin reacción acrosomal, para distinguir uniones primarias y secundarias.

La evaluación espermática es muy importante para el diagnóstico de la infertilidad masculina ya que en función de la calidad de la muestra se selecciona la TRA a utilizar FIV o ICSI (Liu y Baker, 2002). Los análisis de semen convencionales incluyen morfología, motilidad, movilidad, densidad, sin embargo, no proveen información suficiente acerca de la fisiología del espermatozoide. Las pruebas que se han desarrollado para evaluar el funcionamiento espermático son: ensayos de hemizona competitivo, ZP solubilizada, Micro-ensayos con ZP solubilizada (Windt *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1992; Franken *et al.*, 2000), sin embargo la limitación de estos ensayos son la dificultad para obtener la zona pelucida nativa para llevarlos a cabo lo que hace tardado y difícil su realización y la subjetividad del evaluador para calificar la reacción acrosomal que llevan a cabo los espermatozoides (Baker *et al.*, 2000). Por lo que proponemos que el ensayo de EspermoELISA, por su simplicidad y eficiencia puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de la infertilidad masculina, además que puede ayudar a la decisión clínica de la técnica de reproducción asistida más adecuada para cada pareja infértil.

6. CONCLUSIONES:

- a. Se obtuvieron proteínas de la zona pelúcida humana: hZP1, hZP2 y hZP3 recombinantes expresadas en células Sf9 y se purificaron. Estas proteínas son similares a las nativas en peso molecular y reconocimiento antigénico.

- b. En este ensayo se evaluaron las proteínas que están involucradas en el reconocimiento espermatozoide-hZP, proponiendo a la rhZP1 y rhZP3 como candidatas a participar en el reconocimiento del espermatozoide en el proceso de fertilización.

- c. Se desarrollo una metodología para determinar la unión de espermatozoides a proteínas recombinantes de la ZP humana que es específica, sensible y fácil de llevar a cabo en el laboratorio. Por tanto puede ser una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico de la infertilidad masculina.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adham IM., Nayernia K. and W. Engel (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod. Dev.* **46**: 370-376.
- Ahuja K.K. (1985) Carbohydrate determinants envolved in mammalian fertilization. *Am J. Anat.* **174**: 207-223.
- Ain R., Devi K.U., Shivaji S. y P.B. Seshagiri (1999) Pentoxifyline-stimulated Capacitation and reaction acrosomal in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Mol. Human. Reprod.* **5**: 618-626.
- Aitken R.J. (1997) Molecular mechanism regulating human Sperm fuction. *Mol. Hum. Reprod.* **3**: 169-173.
- Alberts B., Brayn D., Lewis J., Raff M. y K.D. Roberts. (1994). *Molecular Biology of The Cell*, Tercera edición. Ed. Garland Publishing, Inc. New York, NY.
- Austin C.R. (1987). Capacitation of spermatozoa. *J Fertil.* **12**:25-31.
- Aveldano M.I., Rotstein N.P. y N. Vermouth. (1992). Lipid remodeling during epididymal maduration of rat spermatozoa. *Biochem J*; **283**: 235-241.
- Bauskin, A.R., Franken D.R., Eberspaecher U. y P. Donner. (1999). Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol. Hum. Reprod.* **5**: 534-540.
- Baker T.G. (1992). Oogenesis and ovulation. In: *Reproduction in Mammals*, Cambridge University Press. Segunda edición. ed. New York, NY.
- Baker H.W.G., Liu D.Y., Garret C. and M. Martic (2000). The human acrosome reaction. *Asian J. Androl.* **2**: 172-178.
- Bendahmane M., Zeng H.T. and D.R.T. Tulsiani (2002). Assessment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non carbohydrate agonists. *Arch. Bioch. and Bioph.* **404**: 38-47.
- Bendahmane M., and D.R.T. Tulsiani (2003). Capacited acrosome-intac mouse spermatozoa bind to Sepharosa beads coated whith functional neoglycoproteins. *Archives of Biochesmestry and Biophysics*, 415: 203-212.
- Bleil J.D. and P.M. Wassarman. (1980). Syntesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **77**: 1029-1033.

- Bleil J.D. and P.M. Wassarman. (1988). Galactose at the non-reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Dev Biol*, **128**: 376-386.
- Bleil J.D., Greve J.M. and P.M. Wassarman. (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to egg. *Dev. Biol*, **128**: 376-385.
- Bookbinder L.H., Cheng A. and J.D. Bleid (1995) Tissue and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science*. **269**: 86-89.
- Bray Ch., Son J.H., Kumar P., Harris J.D. and S. Meizel (2002) A Role the Human Sperm Glycine Receptor/Cl Channel in the Acrosome Reaction Initiated by Recombinant ZP3. *Biol. Reprod.* **66**: 91-97.
- Bruker C. y G.B. Lipford. (1995) The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanism. An update. *Hum Reprod Update*. **1**:51-62.
- Cariño C., Prasad S., Skinner S., Dunbar B., Chirinos M., Schwoebel E., Larrea F. y B. Dubar. (2002). Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod BioMed. Online*, **4**:116-126.
- Chamberlain M.E. y J. Dean. (1990). Human homologue of the mouse sperm receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6014-6018.
- Cooper T.G. (1990). In defense of a function for the human epididymis. *Fertil Steril*, **54**: 965-975.
- Cornwall G.A., Tulsiani D.R. y M.C. Orgebin-Crist (1991). Inhibition of the mouse sperm surface α -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod.* **44**: 913-921
- Cummins J.M. y R. Yanagimachi. (1986). Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa in vitro in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gam Res*, **15**: 187-212.
- Dietl J. (1999). *The mammalian egg coat: Structure and Fuction*, Segunda edición, Berlin, Springer-Verlang Inc.
- Dunbar B.S, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S. y B. Wilkins. (1994). The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fertil Dev*, **6**:331-347.
- El-Mestrah M., Castle P.E., Borossa G. y F.W.K. Kan. (2002). Subcellular Distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 Glicoproteins During Folliculogenesis and

- Demonstration of Their Topographical Disposition Within the Zona matrix of Mouse Ovarian oocytes. *Biol Reprod*, **66** (4): 866-876.
- Ensslin M., Vogel T., Calvete J.J., Thole H.H., Schidtke J., Matsuda T. and E. Topfer-Petersen (1998). Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory protein. *Biol. Reprod.* **58**: 1057-1064.
- Eberspaecher U, Becker A and P. Bringmann (2001). Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovarios. *Cell and Tissue Research* **303**: 277-287.
- Epifano O. J. y J. Dean (1994). Biology and Structure of the zona pellucida: a target for immunocontracepcion. *Reprod Fertil Dev*, **6**: 319-330.
- Epifano O. J., Liang L., Familiari M., Moos M.C., y J. Dean. (1995). Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development*, **121**: 1947-1956.
- Evans J.P. (2002). The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod*, **8**: 297-311.
- Fléchon J.E., Harrison R. A., Flechon B. y J. Escaig. (1986). Fertile life of acrosome reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp. Zool*, **220**: 109-115.
- Florman H.M. and P.M. Wassarman. (1985). O-Linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* **41**: 313-324.
- Franken D.R., Bastiaan H.S. y S.C. Oehninger. (2000). Physiological of the Acrosome reaction in Human sperm: Validation of a Microassay Using Minimal Volumes of solubilized, Homologous Zona pellucida. *J Assist. Reprod. Genetic*, **17**: 156-161
- Fraser F.R. and C.A. McDermott. (1992). Ca (2+) related changes in the mouse sperm capacitation state a possible role for Ca (2+) ATPase. *J Reprod Fertil*, **96**:363-377.
- Fierro R., Daniel M., Foliguet B, Bene MC, Barbarino-Monnier P. and G.C. Faure. (1996). Lectin-binding sites on humana Sperm during acrosome reaction: modifications judged by electrón microscopy/flor cytometry. *Archives of Andrology*, **36**: 187-196.
- Geng J.G., Raub T.J., Baker C.A., Sawada G.A., Ma L. and A.P. Elhammer (1997). Expression of a P-selectina ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-

- selectina on membrane acrosomal of porcine sperm-cell. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions- J. Cell. Biol **137**: 743-754.
- Green S., Fishel S. and P. Rowe. (1999) The incidence of spontaneous acrosoma reaction in homogeneous population of hyperactivated human spermatozoa. Human Reproduction, **14**: 1819-1822.
- Greenhouse S., Castle P.E. y J. Dean. (1999). Antibodies to human induce reversible contraception in transgenic mice with "humanized" zonae pellicidae. Hum Reprod, **14**: 593-600.
- Grynkiewicz G., Penie M. and R.Y. Tsien. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent proprieties. J Biol Chem, **260**: 3440-3450.
- Hardy D.M. and D.L. Garbers (1995). A sperm membrane protein that bind in a species-specific manner to the eggs extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. J. Biol.Chem **270**: 26025-26028
- Harris J.D., Hibler D.W. y G.K. Fontenot. (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC genes families. DNA Seq, **4**: 361-393.
- Harris J.D., Seid X.H., Fontenot G.K. y H.F. Liu. (1999). Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. Prot Exp Pur, **16**: 298-307.
- Harris J.D. y C.E. Pierson (2003). Cloning and Expression of Cynomogus Mokey and Baboon Zona pellucida Proteins. Mol. Reprod. Dev. **65**: 237-244
- Hinsch E., Oehninger S., Schill W.B. y K.D. Hinsch. (1999). Species specificity of human and murine anti-ZP3 synthetic peptide antisera and use of the antibodies for localization and identification of ZP3 or ZPC domains of functional significance. Hum Reprod, **14**: 419-428.
- Hinsch E., George S., Oehninger S., and K.D. Hinsch. (2003). Localization and functional importance of a conserved zona pellucida 2 protein domain in the human and bovine ovary using monoclonal anti-ZP2 peptide antibodies. Theriogenology. **60**: 1331-1344.
- Hughes DC y C.L. Barratt. (1999). Identification of the true orthologue of mouse ZP1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida ?. Bioch Bioph Acta, **1447**:303-306.
- Jansen S., Ekhlesi-Hundrieser M. and E Topfer-Petersen. (2001) Sperm adhesion molecules:structure and function. Cell. Tiss.Organs. **168**: 82-92.

- Kadam A.L., Fateh M. and R.K. Naz (1995) Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in human. *J. Reprod Immunol.* **29**: 19-30.
- Knobil E and J.D. Neill. (1994). *The Physiology of Reproduction*, Segunda ed. New York, NY: Raven Press.
- Laglais J., Zollinger M., Plante L., Chapdelaine A., Bleau G. y K.D. Roberts. (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc Natl Acad Sci*, **78**:7266-7270.
- Larson J. and D.J. Miller (1999). Simple Histochemical stain for acrosome on sperm from several species. *Mol. Reprod and Devel.* **52**: 445-449.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamirande E., Leclerc P. y C. Gagnon. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, **3**:173-194.
- Lasserre A., Gonzalez-Echeverría F., Moules C., Tezón J.G., Miranda P.V. and M.H. Vazquez-Levin. (2003) Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertility and Sterility*. **79**: 1606-1615.
- Leclerc P and E. Lamirande (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm Capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Rad. Biol. Med.* **22**: 643-656.
- Lee V.H. and B.S. Dubar. (1993). Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev Biol*, **155**: 371-382.
- Liang, L.F. and J. Dean. (1993). Human homologue of the mouse gene encoding ZP2, the major component of the zona pellucida. *Dev Biol*, **156**: 399-408.
- Linder B., Bammer S. and U.A. Heinlein (1997) Delayed translation and post-translation processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome. *Exp Cell Res*, **221**: 66-72.
- Liu D.Y. and H.W. Baker (2000). Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*, **15**: 702-708

- Liu D.Y., Clarke G.N., Martic M., Garrett C and H.W. Gorodon-Baker (2001). Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. *Hum Rep*, **16**: 1185-1190.
- Liu D.Y., Martic M., Clarke G.N., Grkovic I., Garrett C., Dunlop M. E. and H.W. Baker. (2002). An anti-actin monoclonal inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction and hyperactivated motility of human sperm. *Mol Hum Reprod*, **8**: 37-47.
- Liu D.Y. and H.W. Baker. (2002). Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J. Androl*, **4**: 281-285.
- Lu Q. and B.D. Shur (1997). Sperm from β -1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reaction and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* **124**: 4121-4131.
- Mandal A., Klotz K.L., Shetty J., Jayes F.L., Wolkowicz M.J., Bolling L.C., Coonrod S.A., Black M.B., Diezman A.B., Haystead T.A., Flickinger C.J. and J.C. Herr. (2003) SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, e lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **68**: 1525-1537.
- Manna C., Rienzi L., Greco E., Rahman A., Poverini R., Siracusa G. y M. Deferid (2001). Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. *Zygote*. **9**: 201-210.
- Mengel-Gaw L., McCoy-Maman M. and D. Tiemeir (1991). Genomic structure and expression of human β -1,4-galactosyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, **176**: 1269-1276.
- Miranda P., Gonzales-Echevarría F., Marín-Briggiler C., Brandelli A., Blaquier J. y J. Tezón. (1997). Glycosidic residues involved in human Sperm-zona pellucida binding *in vitro*. *Mol Hum Reprod*, **3(5)**: 399-404.
- Miranda P.V. (1998). Human Sperm-zona interaction. *Mol Hum Reprod*, **4**:523-525.
- Miranda P.V., Gonzalez-Echeverría F., Blaquier J.A., Maduran D.J. y J.G. Tezón (2000), Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human Sperm-zona pellucida interaction *in vitro*. *Mol Human Reprod*, **6**: 699-706.
- Miller D.J., Macek MB. and B.D. Shur (1992). Complementary between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, **357**: 589-593.

- Miller D.J., Shi X. and H. Burkin (2002). Molecular Basis of Mammalian Gamete Binding. *Mol. Recent Progress in Hormone Research*, **57**:37-73.
- Mori E., Kashiwabara S., Baba T., Inagaki Y. and T. Mori (1995) Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Dev. Biol.* **168**: 575-583.
- Mortillo S. and PM. Wassarman (1991). Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Develop*, **113**: 141-151.
- Negro-Vilar A. y G. Pérez-Palacios. (1991). *Reproduction, Growth and Development*, Primera edn. New York, NY.
- Ozgur K., Patankar M.S., Oehninger S. y G.F. Clark. (1998). Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Mol Hum Reprod*, **4**: 318-324.
- Parinaud M. (1995). Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability. *Fertil Steril*, **63**:598-603.
- Prasad S.V., Mujtaba S., Lee V.H. y B.S. Dunbar. (1995). Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-Kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system. *Biol Reprod*, **52**: 1167-1178.
- Prasad S.V., Wilkins B. y B.S. Dunbar. (1996). Molecular Biology approaches to evaluate species variation in immunogenicity of zona pellucida proteins. *J Reprod Fertil*, **50**:143-149.
- Rattanachaiyanont M., Weerachayanukul W., Léveillé M.C., Taylor T., Amorus D., Leader A. and N. Tanphaichitr. (2001). Anti-SLIP1- reactive exist on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding. *Mol. Hum Reprod*, **7**: 633-640.
- Ringuette M.J., Sobieski D.A., Chamow S.M. y J. Dean. (1986). Oocyte-specific gene-expression: molecular characterization of cDNA coding for ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci*, **83**:4341-4345.
- Roeder G.S. (1990). Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends Genet.* **6**:385-389.
- Sadler T.W. (2001). *Langman's Medical Embriology*, Séptima edición. Ed Williams and Williams, Baltimore, Maryland.

- Saling P.M., Burks D.J., Carballada M.R., Dowda C.A., Leyton L., Mc Leskey S.B., Robinson A. y C.N. Tomes. (1995). Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK. *Human Sperm Acrosome Reaction*. **236**: 85-104.
- Schuffner A.A., Bastiaan H.S., Duran H.E., Lin Z.Y., Morshedi M., Franken D.R. y S. Oehninger (2002). Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G_i protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol. Hum Reprod*, **8**: 722-728.
- Shabanowitz R.B. y M.G. O'Rand. (1988 A). Molecular changes in the human zona pellucida associated with fertilization and human sperm-zona interaction. *Ann NY Acad. Sci*, **541**: 621-632.
- Shabanowitz R.B. y M.G. O'Rand. (1988 B). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil*, **82**: 151-161.
- Siitieri J.E., Dandekar P. y S. Meizel. (1988). Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cell. *J Exp Zool*. **246**:71-80.
- Speroff L., Glass R.H. y N.G. Kase. (1989). *Clinical, Gynecologic, Endocrinology and Infertility*, Cuarta edicion edn. Baltimore Maryland, 21202, USA: WILLIAMS & WILLIAMS Inc.
- Steinert K., Artz C., Fabis R. y A. Ribbe. (1996). Comparison of chelating resins for purification of 6xHis-tagged proteins. *QIAGEN News*, **5**: 12.
- Shur B.D. and C.A. Neely. (1988) Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm β 1,4 galactosyltransferase. *J. Biol Chem*, **263**: 17706-17714.
- Summer M.D. y G.E. Smith. (1987). *A manual of methods of baculovirus vector and insect cell culture procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1055,
- Sullivan R, Ross P. y B. Berube. (1989). Immunodetectable galactosyltransferase is associated only with human spermatozoa of high buoyant density. *Biochem Biophys Res Commun*, **162**: 184-188.
- Talevi R., Gualtieri R., Tartaglione G. y A. Fortunato (1999). Heterogeneity of the zona pellucida carbohydrate distribution in human oocytes failing to fertilize in vitro. *Hum Reprod*, **12**: 2773-2780.

- Thall A.D., Maly P and J.B. Lowe (1995) Oocyte gal α 1,3gal epitopes implicated in sperm adhesion to zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required sequences for fertilization in the mouse. *J. Biol. Chem.* **270**: 21437-21440.
- Tesarik J. (1985). Comparison of acrosoma reaction inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore a 23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fétil*, **74**:383-388.
- Tesarik J., Mendoza C., Moos J. y A. Carreras. (1992). Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface, *Fertil Steril*, **58**: 784-792.
- Towbin H y J. Gordon. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J Immunol Methods*, **72**:313-40.
- Tulsiani D.R.P., Skudlarek M.D. y M.C. Orgebin-Crist. (1990). Human sperm plasma membranes possess a-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol Reprod*, **42**:843-858.
- Tulsiani D.R.P., Abou-Halia A., Loeser C.R. y B.M. J. Pereira. (1998). The Biological and Funcional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mamalian Fertilization. *Exp Cell Res*, **240**:151-164.
- Vaughan H.L. y B. Dunbar. (1993). Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian Follicles. *Develop Biol*, **155**: 371-382.
- Ward C.R., Storey B.T. and G.S. Kopf (1992) Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular. *J Biol Chem.* **267**: 14061-14067.
- Wassarman P.M. (1987). Early events in mammalian fertilization. *Annu Rev Cell Biol*, **3**: 109-142.
- Wassarman P.M. (1988). Zona Pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem*, **57**:415-442.
- Wassarman P.M. (1999). Mammalian fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis and Fusion Cell, **96**:175-183.
- Wassarman P.M. (1999). Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization. *J Reprod Fert.* **116**: 211-216.
- Wassarman P.M y E.S. Litscher. (2001). Toward the molecules basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cell Tiss Organs*, **168**: 36-45.
- Wassarman P.M., Jovine L. y E.S. Litscher (2001). A prolife of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol*, **3**: 359-364.

- Wassarman P.M. (2002). Sperm Receptor and Fertilization in Mammals. *Mount J Med*, **69**:148-155.
- Windt M.L., Franken D.R., de Beer P.M., Bouic P.J. y T.F. Kruger. (1991). The hemizona assay (HZA) as an experimental model to evaluate the inhibition of sperm binding to the murine zona pellucida by isolated zona pellucida protein. *Androl*, **23**: 209-212.
- World Health Organization. (2002). WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- Yu H.S. (1994). Human Reproductive Biology. Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. In the Physiology of Reproduction, pp. 189-317. Edited by Knobil, E. Neill, J. D. New York: Raven Press Ltd.
- Yonezawa N, Aoki H, Hatanaka Y and M. Nakano (1995). Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Eur J Biochem*. **233**: 35-41.
- Yuan R., Primakoff P. and D.G. Myles (1997). A role for the disintegrin domain of cystestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol*, **137**: 105-112.
- Yurewicz, E.C., Hibler D. y G.K. Fontenot. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding ZP3 α , a sperm binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochem Biophys Acta*, **1174**: 211-214.
- Yurewicz, E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N. y D.A. Gage. (1998) Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem*, **273**: 7488-7494.
- Zara J and R.K. Naz (1998) The role carbohydrates in mammalian sperm-egg interaction: How important are carbohydrates epitopes. *Frontiers in Bioscience* **3**: 1028-1038.
- Zayas H., Bonilla E., Ducolomb Y., Casas E., Córdova A., and M. Betancourt.(1995) Affinity of pig zona pellucida peptides for sperm proteins. *Med. Sci. Res*. **23**: 831-832.
- Zhu G.Z., Myles D. y P. Primakoff (2001). Testase 1 (ADAM 24) a plasm membrane-anchored sperm protease implicated in sperm fuction during epididimal maturation or fertilization. *J Cell Sci*, **114**: 1787-1789.

Los integrantes de este jurado, designados por la división de Ciencias Biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 15 de Diciembre del 2003.

Dra Mayel Chirinos Espin
Presidente

Dr. Fernando Larrea Gallo
Secretario

Dr. Edmundo Bonilla González
Vocal

Dr. Pablo Damián Matzumura
Vocal