



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

***INHIBICIÓN DE LA UNIÓN IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES A LA
ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS DE CERDO POR UNA PROTEÍNA
ESPERMÁTICA DE 55 kDa.***

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Biología Experimental

Presenta:

BIÓL. EXP. HÉCTOR ZAYAS PÉREZ

México, D.F.

Mayo de 1998.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. José Miguel Betancourt Rule, del mismo laboratorio, la Asesoría del M. en B.E. Eduardo Casas Hernández, del mismo laboratorio y la Asesoría del M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz, del Laboratorio de Regulación Endócrina de la UAM-Iztapalapa. A todos ellos un cumplido agradecimiento por la atención y dedicación constantes, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por CONACyT mediante el convenio clave 5-1407PN y por la Beca de Maestría número 95360.

“ Durante muchos siglos, se ha sostenido que cada adelanto en el conocimiento nos acerca un paso más a la *Verdad*, de modo que muchas veces la búsqueda de *La Verdad* fue tomada como una forma de acercarse a Dios como una ruta hacia la santidad; como un nuevo intento de llegar al árbol del conocimiento, sólo que esta vez haciéndolo sin comer manzanas, sino mediante el rezo, o la filosofía, o ... la investigación científica”.

— Marcelino Cerejido —

Para Paty y Marie-Anne,
por quienes gustoso acepté
dedicarles el resto de mi vida ...

Agradecimientos

A toda mi familia, especialmente a mis Padres, quienes renunciaron a constantes oportunidades por dárme las a mi

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Celular por su amistad y por hacer más ligero el trabajo cuando parecía más pesado.



Con todo mi cariño y respeto, como un sencillo
homenaje póstumo a ti, mi mejor amigo

Gracias Gerardo

RESUMEN

En un trabajo previo (Zayas y cols., 1995), se ha mostrado evidencia de afinidad entre la proteína denominada ZP3 (ZP3- α + ZP3- β) de ovocitos de cerdo con una proteína de 55 kDa de espermatozoides de la misma especie por medio de Western-blot. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la función biológica de esta proteína durante la unión ovocito-espermatozoide, así como como su localización *in situ*.

Los ovocitos se maduraron durante 48 h. Los espermatozoides, se dividieron en dos porciones; la primera se usó para obtener un extracto de proteínas del que se aisló y purificó la proteína de 55kDa. La otra porción se capacitó para los subsecuentes ensayos de inhibición de la unión e inmunolocalización. De la proteína purificada, una parte se destinó para la producción de anticuerpos contra ésta. Para estudiar la función de la proteína espermática como receptor, se incubaron a los ovocitos maduros, con la proteína de 55 kDa durante 1 h, se lavaron y se incubaron nuevamente en presencia de 1×10^5 espermatozoides capacitados. En otro experimento, los espermatozoides capacitados se incubaron en presencia de anticuerpos contra la proteína espermática durante 1 h, se lavaron y se incubaron con ovocitos madurados. Para la inmunolocalización, se trabajó con espermatozoides capacitados, y a una parte de ellos se les indujo la reacción acrosomal. Los espermatozoides capacitados y reaccionados se incubaron de manera independiente con anticuerpos contra la proteína espermática durante 12 h, después de tres lavados se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína, se lavaron nuevamente y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia.

Los resultados mostraron que hay correlación entre la concentración de la proteína y el porcentaje de bloqueo de la unión, siendo la máxima la de 50 $\mu\text{g/ml}$ al lograr inhibir en un 100 %. Al utilizar el anticuerpo anti-55kDa en una dilución 1:100, también se inhibió la unión totalmente. En los ensayos de inmunolocalización con anticuerpos producidos en el laboratorio, cuando los espermatozoides han pasado solamente por el período de capacitación, sitúan a la proteína en la cabeza del

espermatozoide de manera homogénea, preferentemente localizada en la parte apical, mientras que cuando el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal, este borde desaparece manteniéndose la fluorescencia homogénea en toda la cabeza. Estos resultados indican que existe una especificidad en la unión de la proteína de 55 kDa del espermatozoide con la ZP de ovocitos, por lo que ésta puede ser la responsable de la unión primaria de los gametos durante la fertilización.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	6
III. HIPÓTESIS	7
IV. OBJETIVO GENERAL	7
V. OBJETIVOS PARTICULARES	7
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	9
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	10
VII.1 Obtención de semen porcino	10
VII.2 Obtención y purificación de la proteína de 55 kDa	10
VII.3 Capacitación de los espermatozoides	11
VII.4 Evaluación de la capacitación espermática con la tinción doble	11
VII.5 Obtención y maduración de ovocitos	12
VII.6 Lavado de ovocitos e incubación con la proteína espermática de 55 kDa	13
VII.7 Tinción de ovocitos para la evaluación de la maduración	13
VII.8 Ensayo de bloqueo directo a la unión entre espermatozoides y ovocitos-55 kDa	13
VII.9 Producción de anticuerpos	14
VII.9.1 Preparación y aplicación del antígeno	14
VII.9.2 Obtención y titulación del anticuerpo	14
VII.10 Ensayo de bloqueo indirecto a la unión entre espermatozoides-anti-55 kDa y ovocitos	15
VII.11 Localización de la proteína de 55 kDa en el espermatozoide	16
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
IX. RESULTADOS	17
IX.1 Obtención de la proteína de 55 kDa	17
IX.2 Capacitación y evaluación de la reacción acrosomal	17
IX.3 Maduración de ovocitos	20
IX.4 Bloqueo directo de la unión espermatozoide y ovocito por la adición de la proteína de 55 kDa	20

ÍNDICE (continuación)

IX.5 Obtención y titulación del anticuerpo anti-55 kDa	25
IX.6 Bloqueo indirecto de la unión espermatozoides-anti-55 kDa y ovocitos	26
IX.7 Inmunolocalización de la proteína espermática de 55 kDa	28
X. DISCUSIÓN	30
XI. CONCLUSIONES	34
XII. ANEXOS	36
XIII. BIBLIOGRAFÍA	42

INTRODUCCIÓN

El proceso biológico de la fertilización en todas las especies de mamíferos comienza por el reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) del ovocito, a través de receptores en la superficie de ambos gametos. La unión del espermatozoide a la ZP va seguida de la reacción acrosomal, que tiene por objeto, abrirle paso a través de la ZP hasta alcanzar la membrana plasmática del ovocito (Longo y Yanagimachi, 1993). Durante dicha reacción, se forman microvesículas que constan de membrana plasmática del espermatozoide y de la membrana acrosomal externa. Estas vesículas terminan por ser expulsadas, por lo que la ZP del ovocito adyacente queda expuesta a la capa interna de la membrana del acrosoma y a las enzimas de éste (Wassarman, 1989). Uno de los espermatozoides, entre la multitud de los que avanzan y logran alcanzar el espacio perivitelino, entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito, se fusiona con esta última y deposita su genoma para formar el pronúcleo masculino, asociándose con el femenino y dar lugar al cigoto.

Se han descrito proteínas que funcionan como receptores en ambos gametos, definiendo como receptor a una proteína que se une a una molécula extracelular específica (ligando) e inicia una respuesta en la célula (Alberts y cols., 1994). Algunas de estas han sido aisladas y parcialmente caracterizadas, con el objeto de determinar su función y con ello, explicar importantes eventos fisiológicos como el reconocimiento especie-específico (Yanagimachi, 1994).

En cuanto a los gametos femeninos, la ZP porcina es la superficie considerada como ligando para proteínas de espermatozoides. Dicha ZP es una envoltura de naturaleza glucoproteica que rodea al ovocito y por sus componentes ha sido clasificada en cuatro "familias" de glucoproteínas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) bajo condiciones reductoras de puentes disulfuro (Hedrick y Wardrip, 1981). Estas "familias" de glucoproteínas son de 25, 55, 65 y 90 kDa. Cuando la ZP es separada por 2D-PAGE en condiciones no reductoras, dos de las familias de glucoproteínas, la de 25 y 65 kDa, co-migran como una sola de 90 kDa (Wardrip y Hedrick, 1985). Si la ZP es fraccionada por electroforesis en geles de poliacrilamida con el uso de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de una dimensión en condiciones no reductoras, se observan tres familias de glucoproteínas: ZP1 (90 kDa), ZP3- α (55 kDa) y ZP3- β (55 kDa) (las glucoproteínas ZP3- α y ZP3- β presentan el

mismo peso molecular pero diferente punto isoeléctrico) que cuando son desglucosiladas dan lugar a tres cadenas polipeptídicas de 68, 40 y 37 kDa respectivamente (Hedrick y Wardrip, 1987), de las cuales solamente los carbohidratos del componente ZP3 presentan actividad receptora con espermatozoides de la misma especie (Sacco y cols., 1989; Yurewicz y cols., 1991). El Cuadro 1 muestra los componentes de la ZP porcina en diferentes condiciones de obtención.

**CUADRO. 1. CORRELACIÓN ENTRE LOS COMPONENTES DE LA ZP DE CERDO
GLUCOSILADOS Y DESGLUCOSILADOS**
(Hedrick y Wadrip, 1987)

<i>Reducidos glucosilados</i>	<i>Reducidos desglucosilados</i>
90 kDa	68 kDa
65 kDa	56 kDa
55 kDa	40 kDa 37 kDa
25 kDa	15 kDa
<i>No reducidos glucosilados</i>	<i>No reducidos desglucosilados</i>
90 kDa	68 kDa
55 kDa (α)	40 kDa
55 kDa (β)	37 kDa

La unión de espermatozoides a la ZP de ovocitos es un paso decisivo en la fertilización en mamíferos. Por esta razón, algunas proteínas ya han sido caracterizadas; tal es el caso de la proteína espermática PH-20 en cobayos, la galactosiltransferasa en ratón, y una proteína de 27 kDa en espermatozoides humanos, entre otras. Sin embargo, revisando la literatura, en cerdo existe controversia con respecto a la cantidad de proteínas descritas en espermatozoides, entre las que se encuentran las espermadhesinas, la APz, la proacrosina y la acrosina, entre otras.

Primakoff y cols. (1985) en un trabajo realizado en cobayos, lograron inhibir un 90% de la unión entre gametos con el uso de anticuerpos monoclonales contra PH-20, una proteína de cadena sencilla anclada en la membrana de espermatozoides capacitados. Dicho anclaje está

dado por medio de una molécula de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Myles y Primakoff, 1997). La proteína PH-20 actúa durante dos etapas diferentes de la fertilización; en el espermatozoide con el acrosoma íntegro, tiene una actividad de hialuronidasa que es indispensable para que el espermatozoide penetre a través de la capa de células cúmulo que rodean al ovocito. En el espermatozoide con el acrosoma reaccionado, la proteína PH-20 tiene una función necesaria para la unión espermatozoide-zona pelúcida denominada unión secundaria (Hunnicutt y cols., 1996).

En el ratón, para identificar los componentes de espermatozoides involucrados en la unión a la ZP, Bunch y Saling (1991), usaron fracciones enriquecidas de membranas de espermatozoides de la región caudal del epidídimo para determinar la capacidad bloqueadora de la unión entre gametos, encontrando un 53% de bloqueo cuando los ovocitos libres de células cúmulo fueron pretratados con una fracción membranal equivalente a 1000 espermatozoides. Dicha fracción contiene proteínas con pesos moleculares de 100-120, 40-45 y 23-24 kDa y aunque no se sabe con precisión cuál o cuáles son las proteínas responsables del bloqueo de la unión, se ha propuesto a la galactosiltransferasa (Shur y Hall, 1982), la manosidasa (Tulsiani y cols., 1990) y la sialiltransferasa (Durr y cols., 1977), todas ellas presentes en espermatozoides capacitados.

En humanos se ha tratado de determinar la naturaleza molecular de aquellos componentes de espermatozoides capacitados relevantes para la fertilización. En 1994, Dubova-Mihailova y cols. demostraron que anticuerpos monoclonales producidos contra una proteína espermática de 27 kDa, inhiben la penetración de espermatozoides humanos a ovocitos de hamster libres de ZP en un 40%. Cuando estos mismos anticuerpos son probados en experimentos de inhibición de la unión de espermatozoides a la ZP en ensayos de hemizona, con ovocitos humanos, no se observa bloqueo, sugiriendo que el epítipo antigénico de esta proteína de 27 kDa podría jugar un papel importante en la fusión ovocito-espermatozoide y no en la unión espermatozoide-ZP.

En espermatozoides de cerdo, se han descrito diversas proteínas y aunque todas tienen "afinidad" por la ZP de la misma especie, presentan claras diferencias de peso molecular y sin conocerse hasta ahora si existe relación entre cada una de ellas.

Peterson y Hunt (1989) han reportado la presencia de una proteína de membrana plasmática (APz) tanto en espermatozoides capacitados como en no capacitados, con un peso molecular de 55 kDa separada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Esta proteína es capaz de bloquear parcialmente la unión entre gametos cuando se adiciona a los ovocitos maduros. El uso de anticuerpos contra esta proteína bloquea la unión de los gametos en un 60%.

Hardy y Garbers (1994), empleando ZP completa de cerdo como una matriz de afinidad para aislar proteínas de membranas de espermatozoides de la misma especie solubilizadas en SDS al 2%, encontraron cinco proteínas, con pesos moleculares de 170, 150, 130, 56, y 50 kDa cuando se aíslan por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Cuando estas mismas proteínas son sometidas a SDS-PAGE aplicando condiciones reductoras, las tres primeras se separan individualmente en subunidades de 105 y 45 kDa cada una conservando la capacidad de unirse a la ZP de manera especie-específica.

Por medio de la cromatografía de afinidad, en espermatozoides de cerdo se han identificado proteínas con peso molecular bajo (12-16 kDa) que presentan un reconocimiento a la ZP completa, siendo las más abundantes las espermadhesinas AWN y AQN-3 (estas espermadhesinas conforman un grupo de polipéptidos encontrados en el plasma seminal y/o asociados con la superficie del espermatozoide (Töpfer-Petersen y cols., 1995)), así como una proteína de unión a la heparina (Enblin y cols., 1995), que aunque no tiene actividad de unión a la ZP, se ha observado que proviene del plasma seminal y se asocia a la superficie del espermatozoide (Sanz y cols., 1993). Se ha observado que esta proteína de unión a la heparina, también se comporta como una proteína de unión a fosforilcolina, por lo que se le ha catalogado como un marcador de diferenciación de superficie celular (Aoki, y cols., 1994) dada su capacidad de unión a otras superficies de membrana por la vía de fosfolípidos aniónicos. La proteína de unión a la heparina, así como las proteínas AWN y AQN, han sido catalogadas como miembros de la familia de las espermadhesinas en el cerdo y cuyo papel es el de interactuar con el ovocito, dada su disposición en la superficie del espermatozoide (Calvete y cols., 1995). Algunas evidencias bioquímicas, como el reconocimiento de AWN a la ZP completa aislada y la presencia de AWN en espermatozoides capacitados *in vitro*, no así en espermatozoides sin capacitar, indican que los miembros de la familia de las espermadhesinas en el cerdo juegan un papel muy importante en por lo menos dos aspectos de la fertilización: la capacitación de espermatozoides (Dostàlovà y cols., 1994) y la interacción inicial entre

gametos (Dostàlovà y cols., 1995). De las diferentes espermadhesinas descritas, sólo una se ha reportado que tiene actividad competitiva en la unión entre gametos dependiendo de la concentración de proteína (Veselský y cols. 1992). El peso molecular de esta glucoproteína es de 15 kDa y no se sabe con precisión si se trata de una de las ya descritas espermadhesinas AWN o AQN.

En los años 60's, en una serie de trabajos conducentes a estudiar las enzimas que degradan a la ZP, se le dió el nombre de acrosina a una enzima con actividad semejante a la tripsina. Se encontró que la acrosina está asociada al acrosoma en espermatozoides de mamíferos. La obtenida de espermatozoides de cerdo, tiene un peso de 55 kDa (Polakoski y Parrish, 1977). La acrosina causa la escisión específica de sólo ciertas porciones de la ZP (Urch y cols., 1985a; Dunbar y cols., 1985). La "familia" de glucoproteínas de 90 kDa de la ZP y sus componentes, así como los de la "familia" de las glucoproteínas de 65 kDa, son específicamente hidrolizadas por la acrosina a pequeños polipéptidos no retenidos en SDS-PAGE (Urch y cols., 1985b); mientras que las "familias" de 55 kDa (ZP3- α y ZP3- β) no son afectadas por la enzima. Para poder llevar a cabo su función, la acrosina se une a la ZP y se ha propuesto que esta interacción puede ser de tipo carbohidrato-proteína, proteína-proteína o ambas (Yanagimachi, 1981). Se ha bloqueado la fertilización entre gametos con inhibidores del sitio activo de la acrosina, tanto *in vitro* (Stambaugh y cols., 1969), como *in vivo* (Zaneveld y cols., 1971) aunque utilizando como modelo el conejo, sin embargo, el bloqueo nunca fue total y una vez que algunos de los espermatozoides estuvieron fuertemente unidos a la ZP homóloga, los inhibidores del sitio con actividad de tripsina de la acrosina, no impidieron la posterior hidrólisis o penetración de la ZP (Hartmann y Hutchison, 1974).

En un trabajo previo (Zayas y cols., 1995) con el uso del Western-blot (Towbin y cols., 1979), se encontró en espermatozoides de cerdo una proteína con peso molecular de 55 kDa, que reconoció selectivamente a la ZP de la misma especie; en forma particular al componente glucoproteico de 55 kDa (ZP3- α y ZP3- β) y sus correspondientes péptidos de 40 y 37 kDa. En este trabajo, las proteínas de espermatozoides, así como las glucoproteínas de la ZP fueron separadas bajo condiciones no-reductoras y recobradas por electroelución (Gerton y cols., 1982).

Anticuerpos producidos contra algunas de las proteínas de espermatozoides que se han mencionado, producen inhibición parcial de la fertilización *in vitro*. Se ha postulado que el mecanismo principal de esta acción puede ser el enmascaramiento de estas proteínas en el espermatozoide por un mecanismo de impedimento estérico (Aitken y Richardson, 1982) o por unión directa del anticuerpo al sitio de recepción en la ZP (Sacco y cols., 1984).

Dada la amplia variedad de proteínas identificadas por diferentes autores en el espermatozoide de cerdo que presentan "afinidad" por la ZP, es probable que la fertilización sea un proceso mediado por múltiples sistemas ligando-receptor (Töpfer-Petersen y Calvete, 1996) o que se trate en algunos de los estudios de las mismas proteínas, que dependiendo del método de extracción y purificación, presentan diferencias en su peso molecular, que entre otras razones, puede ser por su grado de glucosilación (Peterson y cols., 1991).

JUSTIFICACIÓN

Se han reportado una gran cantidad de estudios de proteínas en espermatozoides de varios mamíferos. Dichas proteínas presentan un reconocimiento por la ZP homóloga y son capaces de bloquear parcialmente la unión cuando son adicionadas a ovocitos *in vitro*. En espermatozoides de cerdo, sin embargo, se han identificado varias proteínas con diferentes métodos de extracción, además de presentar diferencias en su peso molecular. En un trabajo previo (Zayas y cols., 1995) se encontró en cerdo una proteína espermática de 55 kDa que reconoció bioquímicamente a la ZP de la misma especie, de modo particular a su componente de 55 kDa (α y β). En el presente trabajo se pretende extraer esta proteína de espermatozoides recién eyaculados para estudiar su función durante la unión de los gametos, así como su localización *in situ* y con ello aportar información conducente a identificar las moléculas que participan en el reconocimiento especie-específico entre gametos de cerdo, además de establecer una posible relación con las proteínas ya reportadas.

HIPÓTESIS

Si la afinidad bioquímica exhibida durante el Western-blot es biológicamente relevante y si la proteína espermática electroeluída mantiene esta afinidad, entonces la proteína puede unirse a la ZP completa de ovocitos madurados *in vitro* y se esperaría que se cumplieran al menos cinco criterios para que una proteína espermática que se une a la ZP del ovocito se considere receptor:

- 1) Afinidad demostrable entre la proteína espermática y su ligando en la ZP.
- 2) Especificidad entre la proteína espermática y su ligando.
- 3) Unión saturable.
- 4) Apropiaada localización sobre la membrana plasmática en el momento adecuado y,
- 5) Interferencia de la interacción entre gametos que debería reducir el porcentaje de unión.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la localización y función de la proteína de 55 kDa identificada previamente en nuestro laboratorio y que se encuentra presente en espermatozoides de cerdo.

OBJETIVOS PARTICULARES

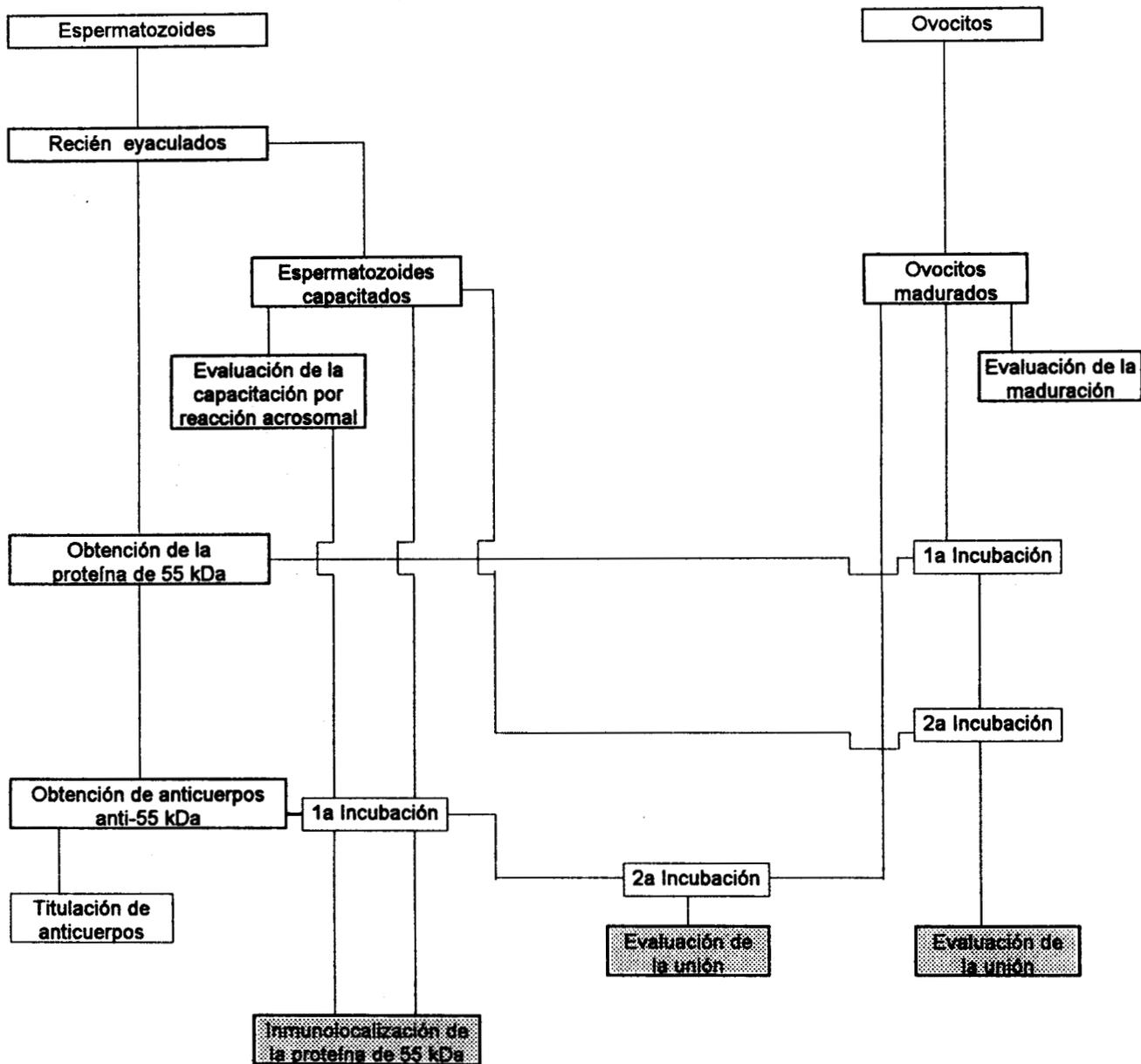
- (1) Extraer y purificar cantidades suficientes de la proteína de 55 kDa de espermatozoides de cerdo recién eyaculados.
- (2) Estandarizar la técnica de maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo.
- (3) Estandarizar la técnica de capacitación espermática, así como su evaluación por la técnica de tinción doble (Hoechst 33258-Lectina conjugada a fluoresceína).

(4) Determinar si la proteína espermática de 55 kDa compite por los sitios de reconocimiento en la ZP homóloga, bloqueando la unión entre gametos.

(5) Obtener anticuerpos contra la proteína espermática de 55 kDa y determinar de una manera indirecta la capacidad de bloqueo de la unión entre gametos.

(6) Con el uso de anticuerpos obtenidos en el laboratorio, localizar a la proteína en el espermatozoide.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de semen porcino

Las muestras de semen porcino (raza York) se obtuvieron de la granja "Los Virreyes", en los Reyes la Paz, Edo. de México por el método de "la mano enguantada", se filtraron a través de una gasa para eliminar las partículas gelatinosas y se transportaron al laboratorio a 37 °C en un tiempo no mayor a una hora, donde se incubaron a 39 °C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ en una incubadora (LAB-LINE INSTRUMENTS, INC.), hasta su uso.

Obtención y purificación de la proteína de 55 kDa.

Para aislar la proteína de 55 kDa se empleó el método descrito por Zayas y cols. (1995). Los espermatozoides recién eyaculados fueron lavados seis veces por centrifugación a 800 g con una solución amortiguadora de cloruro de sodio 140 mM, fosfato de sodio dibásico 20 mM y fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0.2 mM ajustándose el pH a 7.4 (Russell y cols., 1985). Las proteínas espermáticas se extrajeron con SDS al 2%, glicerol al 13% y Tris 62.4 mM a pH 6.8 (O'Rand y cols., 1985) durante 12 h a 4 °C. El extracto fue centrifugado a 4 000 g durante 10 min y las proteínas del sobrenadante fueron resueltas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). El gel se incubó en acetato de sodio 4M hasta visualizar la banda correspondiente a la proteína de 55 kDa que se recortó y se recuperó en un electroelusor (BIO-RAD Modelo 422). Posteriormente se dializó en una membrana (SPECTRA/POR, SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES, INC., USA) de tamaño de poro 12-14 kDa durante 12 h a 4 °C. Se purificó, removiendo el detergente y las sales remanentes del amortiguador por medio de filtración con filtros de corte de tamaño de poro de 30,000 (MICRON SEPARATIONS INC., USA) y centrifugación con agua desionizada a 1500 g durante 5 min a 4 °C (esta operación se repitió 10 veces). La proteína se concentró a temperatura ambiente por centrifugación en un concentrador Eppendorf (BRINKMAN INSTRUMENTS, INC.) y se congeló en alícuotas de 100 µl con una concentración de 1 mg/ml a -70 °C hasta su uso. Durante el proceso de purificación, se separaron también con los filtros a las proteínas con peso molecular menor a

30 kDa del extracto de espermatozoides que se emplearon como controles negativos de bloqueo directo e indirecto (ver resultados).

Capacitación de los espermatozoides.

Se colocaron 0.9 ml de medio de capacitación TALP-Hepes (ver anexos) en cada uno de los pozos de una caja de plástico Nunc (NUNCLON, DENMARK) de 4 pozos y se incubaron a 39 °C. Se colocó 1 ml de la muestra de semen en un tubo de centrifuga, agregando 2 ml de medio TALP-Hepes previamente calentado a 39 °C, se resuspendió suavemente con pipeta Pasteur y se centrifugó a 320 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante conteniendo el plasma seminal. Se llevó el paquete celular a 1 ml con medio TALP-Hepes, se resuspendió y se tomó una alícuota de esta suspensión para obtener aproximadamente 15×10^6 espermatozoides y llevar a 1 ml cada pozo con medio TALP-Hepes e incubar a 39 °C durante 4 h para su capacitación (Bonilla y cols., 1994).

Evaluación de la capacitación espermática con la tinción doble (Hoechst-Lectina fluorescente).

Dado que la capacitación se define como el proceso mediante el cual los espermatozoides de los mamíferos se preparan para llevar a cabo la reacción acrosomal y fertilizar al ovocito (Yanagimachi, 1994), una manera de evaluarla es determinar cuántos espermatozoides pueden realizar la reacción acrosomal después de un período de capacitación.

La evaluación de la capacitación se realizó según Berger (1990), al inicio y al final del período de capacitación de la siguiente manera: Se agregaron 20 μ l de una solución de progesterona (SIGMA) (500 μ g/ml) a un pozo con aproximadamente 15×10^6 espermatozoides /ml de TALP-Hepes para tener una concentración final en el pozo de 10 μ g/ml, y se incubó a 39 °C durante 15 min (el uso de la progesterona como inductor de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo fue previamente estudiada en nuestro laboratorio). Se agregaron 10 μ l de una solución de Hoechst 33258 (SIGMA) (100 μ g/ml) preparada el día de uso, para tener una concentración final de 1 μ g /ml de solución de espermatozoides y se incubó 8 min a

39°C. Se centrifugaron 100 µl de la solución de espermatozoides a 650 g durante 10 min en polivinilpirrolidona-40 (PVP-40) al 2 % en PBS. Se cortó el tubo por encima del paquete celular, para asegurar la eliminación de Hoechst, y eliminar también la solución de PVP-40 remanente. Los espermatozoides se fijaron con 50 µl de etanol frío, se resuspendieron suavemente y se dejaron reposar 5 min. Se hicieron preparaciones en portaobjetos que se dejaron secar al aire y en oscuridad. Se colocaron 20 µl lectina (200 µg/ml en PBS), que se preparó el día de uso. Se colocó un cubreobjetos y se incubó a 39°C durante 8 min en atmósfera húmeda y en oscuridad. Se removió el cubreobjetos y el exceso de lectina lavando con agua destilada. Se dejaron secar las preparaciones a 39 °C en la oscuridad. Se colocaron de 5-10 µl de glicerol al 90% sobre los portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se evaluó la integridad de la membrana y el estado del acrosoma en un microscopio de epifluorescencia (ZEISS) a 1000 aumentos. Se evaluó la integridad de la membrana de los espermatozoides en un campo, irradiando con ultravioleta (360 nm) y a continuación el estado del acrosoma de los espermatozoides vivos del mismo campo iluminando con ultravioleta (495 nm). Se analizaron 200 espermatozoides por preparación.

Obtención y maduración de ovocitos

Las muestras de ovarios se obtuvieron del rastro porcino ABC de los Reyes la Paz, Edo. de México y se transportaron al laboratorio en solución salina estéril (NaCl 0.157M) (ver anexos) a 39 °C, de donde fueron obtenidos los ovocitos para su maduración (Betancourt y cols., 1993) de la siguiente manera: Se lavaron 3 veces los ovarios con solución salina estéril a 39 °C. Se puncionaron los folículos de 3 a 5 mm de diámetro con una jeringa estéril con aguja calibre 21x32 (BECTON DICKINSON, MEXICO). Se depositó el líquido folicular en tubos de centrífuga de policarbonato estériles. Se dejó sedimentar al menos 15 min. Se tomó el paquete celular con una pipeta Pasteur y se depositó en una caja de Petri para seleccionar a los ovocitos bajo el microscopio de disección. Se recuperaron los ovocitos que mostraron una capa de células foliculares compacta, empleando una pipeta Pasteur alargada, con un diámetro ligeramente superior al del ovocito. Se pasaron los ovocitos seleccionados a una gota de 60 µl de medio de maduración. Se lavaron dos veces más pasando sucesivamente los ovocitos a dos gotas de medio de maduración, para retirar los restos celulares. Se sembraron de 15 a 20 ovocitos por microgota (60 µl) de medio de maduración suplementado incluida en

aceite de parafina. Se incubaron durante 48 h. Para la descripción del aceite de parafina, el medio de maduración y su suplemento se recomienda ver los anexos.

Lavado de ovocitos e incubación con la proteína espermática de 55 kDa.

Después del período de maduración, las células del cúmulo fueron removidas de los ovocitos, para fertilizarlos de acuerdo a Betancourt y cols. (1993): Después de 48 h de incubación, se transfirieron los ovocitos a una microgota de medio de maduración suplementado y fresco en una caja de Petri estéril. Se lavaron los ovocitos transfiriéndolos a otra gota de medio de maduración empleando una pipeta Pasteur alargada para retirar las células del cúmulo. Después de retirar completamente las células foliculares, los ovocitos se transfirieron a una microgota (60 μ l) de medio de fertilización, incluida en aceite de parafina (ver anexos) y se le adicionó la proteína espermática de 55 kDa durante 1h.

Tinción de ovocitos para la evaluación de maduración.

Se recuperaron los ovocitos con pipeta Pasteur alargada de la manera indicada anteriormente. Se colocaron los ovocitos en 1 ml de fijador de Carnoy (metanol-ácido acético en proporción 3:1) recién preparado. Se dejaron en la solución fijadora al menos 40 minutos. Se recuperaron los ovocitos y se colocaron en un portaobjetos. Se agregó una gota de orceína acética al 2%, y se dejaron teñir durante 5 minutos. Se colocó un cubreobjetos y se examinaron bajo el microscopio para evaluar la maduración con los siguientes criterios:

- a) Los ovocitos inmaduros se reconocieron por la presencia de la vesícula germinal;
- b) Los ovocitos madurados se reconocieron por la presencia de cromosomas.

Ensayo de bloqueo directo a la unión entre espermatozoides y ovocitos-55 kDa.

Cuando la muestra de semen se encontraba en buenas condiciones de capacitación (capaces de llevar a cabo la reacción acrosomal), además de presentar buena movilidad después de la capacitación, se realizó la incubación agregando 1×10^5 espermatozoides en la

gota de medio de fertilización que contenía a los ovocitos libres de células foliculares y a los cuales se les había adicionado, una hora después del término de la maduración, la proteína de 55 kDa a concentraciones de 15, 30, 40, 50 y 100 µg/ml por separado. Se lavaron los ovocitos 3 veces con medio de fertilización y se observaron en un microscopio de contraste de fases para contar los espermatozoides unidos al ovocito. Solamente se contaron los espermatozoides unidos a la ZP en el ecuador del ovocito. Como control, se realizó este mismo ensayo sin la adición de la proteína de 55 kDa o con la adición de las mismas cantidades de otras proteínas del espermatozoide que no presentaron afinidad por la ZP en Western-blot (proteínas con peso molecular de 30 kDa o menos). Esta prueba se hizo en ciego.

Producción de anticuerpos anti-55 kDa.

Preparación y aplicación del antígeno.

Se preparó la solución de antígeno con 120 µg de proteína espermática de 55 kDa en 375 µl de PBS a la cual se agregó un volumen igual de adyuvante completo de Freund (375 µl) (SIGMA). Se mezcló la suspensión y se inyectó un volumen de 250 µl intraperitonealmente a cada uno de tres ratones de aproximadamente 5 semanas de nacidos. Transcurridos 30 días, se inyectó nuevamente a cada ratón una cantidad igual de proteína espermática sin adyuvante (40 µg/125 µl).

Obtención y titulación del anticuerpo

Transcurridos 3 días de la hiperinmunización, se sacrificaron los ratones y se recogió la sangre de la vena femoral en un tubo Eppendorff. El tubo se dejó tapado en refrigeración 12 h. Transcurrido este tiempo se desprendió el coágulo de las paredes del tubo con la ayuda de un palillo de madera y se centrifugó a 4 500 g durante 5 min. El sobrenadante obtenido (antisuero) se guardó en alícuotas a -70 °C hasta su uso. El antisuero se tituló por duplicado haciendo las diluciones 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900 y 1:218700 en una placa de 96 pozos donde también se incluyó el suero preinmune de un ratón

control de la siguiente manera: La placa de 96 pozos se lavó con alcohol y después de secarla se colocó en cada pozo una cantidad de 50 ng de antígeno (proteína de 55 kDa)/50 µl de agua desionizada y se incubó toda la noche o hasta que se secase por completo la solución. Se reconstituyó el antígeno con 100 µl de solución bloqueadora (solución al 0.1% de leche en polvo en PBS) durante 1h y se secó nuevamente. Se agregó el anticuerpo anti-55 kDa en las diluciones mencionadas durante 1h. Se lavaron todos los pozos 10 veces con una solución de PBS-Tween 20 al 0.05% y se secaron los pozos. Se agregaron a cada pozo 50 µl de Anti-IgG conjugada con peroxidasa (SIGMA) diluída 1:20 con PBS y se incubó la placa durante 40 min. Se lavaron nuevamente 10 veces con PBS-Tween. Se agregaron 100 µl de solución de sustrato (ABTS-H₂O₂) (ver anexos) a cada pozo y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Se leyó en un lector de ELISA (TITERTEK MULTISKAN) a 405 nm. Tanto el protocolo de preparación y aplicación de antígeno como el de obtención y titulación del anticuerpo se llevaron a cabo para las proteínas de espermatozoides con peso molecular de 30 kDa o menos.

Ensayo de bloqueo indirecto a la unión entre espermatozoides-anti-55 kDa y ovocitos.

Cuando la muestra de semen se encontraba en buenas condiciones de capacitación (capaces de llevar a cabo la reacción acrosomal), además de presentar buena movilidad después de la capacitación, se realizó la incubación de 15×10^6 espermatozoides en presencia del anticuerpo anti-55 kDa a diluciones de 1:100, 1:50 y 1:20 una hora antes de completarse el período de 4 h de capacitación. Transcurrido este tiempo, 1×10^5 espermatozoides de cada dilución fueron lavados y adicionados a diferentes pozos con ovocitos maduros y previamente colocados en medio de fertilización. Transcurrida una hora, se lavaron 3 veces a los ovocitos y se observaron en un microscopio de contraste de fases para contar los espermatozoides unidos a ellos. Solamente se contaron los espermatozoides unidos a la ZP en el ecuador del ovocito. Como control, se realizaron estos mismos ensayos; uno positivo, sin la adición del anticuerpo anti-55 kDa a los espermatozoides y otro con la adición de anticuerpos contra otras proteínas del espermatozoide que no presentaron afinidad por la ZP en Western-blot (proteínas con peso molecular de 30 kDa o menos). Esta evaluación se hizo en ciego.

Localización de la proteína de 55 kDa en el espermatozoide

Una vez que se obtuvo y se tituló el anticuerpo, se incubaron cuatro pozos con 15×10^6 espermatozoides cada uno, bajo las condiciones que se detallan en la Figura 1.

FIGURA 1. CONDICIONES DE INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA DE 55 kDa.

 Pozo 1: <i>Espermatozoides Capacitados</i> Sin inducción de RA* Anti- 55 kDa Anti-IgG-FITC**	 Pozo 2: <i>Espermatozoides con RA</i> Inductor: Zona Pelúcida Anti-55 kDa Anti-IgG-FITC
 Pozo 3: <i>Espermatozoides con RA</i> Inductor: Progesterona Anti- Zona Pelúcida Anti-IgG-FITC <i>(control)</i>	 Pozo 4: <i>Espermatozoides con RA</i> Inductor: Progesterona Anti- Zona Pelúcida Anti-IgG-FITC <i>(control)</i>

Aquellos pozos en los que se adicionó el antisuero anti-55 kDa, se emplearon diluciones de 1:100, 1:50 y 1:20 durante 12 h; se lavaron y se incubaron en presencia de un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína durante 4 h, determinando así la localización en un microscopio de epifluorescencia. Como experimentos controles se realizaron ensayos de la misma manera; uno, empleando anticuerpos contra ZP, y otro, en ausencia del primer anticuerpo.
*Reacción Acrosomal. **Isotiocianato de fluoresceína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para encontrar la relación entre concentración de proteína de 55 kDa y el bloqueo de la unión entre gametos, se realizó un análisis de covarianza como prueba de correlación simple (modelo no rectilíneo) y un análisis de regresión logarítmica.

RESULTADOS

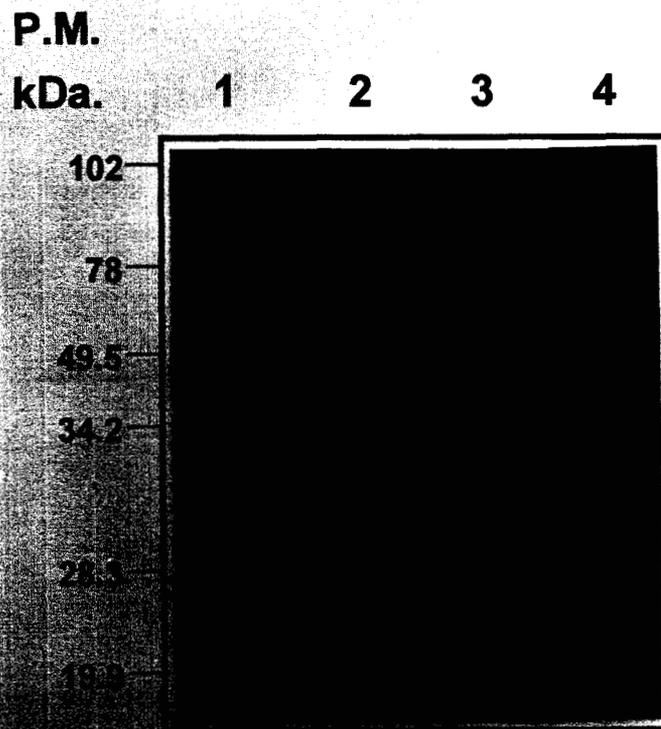
Obtención de la proteína de 55 kDa.

La proteína de 55 kDa de espermatozoides de cerdo fue obtenida por el método empleado por Zayas y cols. (1995) (Figura 2). La cuantificación de la proteína se llevó a cabo por el método de Lowry y cols. (1951) usando albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA) como referencia; obteniéndose 6-8 mg de proteína de 55 kDa / litro de semen procesado.

Capacitación y evaluación de la reacción acrosomal

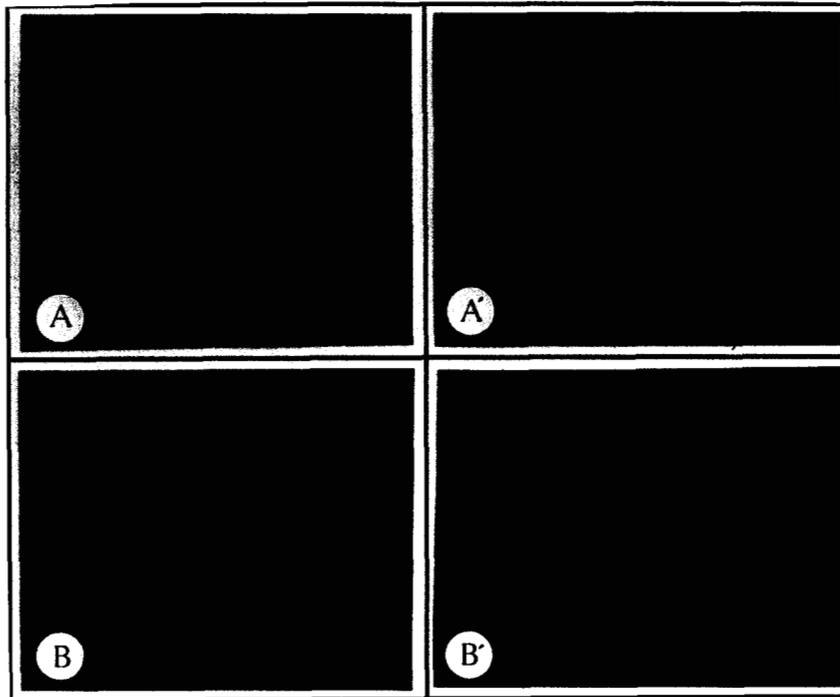
Dado que el plasma seminal evita que los espermatozoides se capaciten y puedan llevar a cabo la reacción acrosomal (Bonilla y cols., 1996), éste se separó por centrifugación con el procedimiento descrito por Bonilla y cols. (1994). Para asegurar que los espermatozoides estuvieran capacitados, se determinó el porcentaje de reacción acrosomal con el uso de la tinción doble (Hoechst-Lectina), usando como inductor progesterona hidrosoluble a una concentración final de 10 µg/ml (Figura. 3). Los resultados de cada ensayo de capacitación y reacción acrosomal de los espermatozoides utilizadas en este trabajo se resumen en el Cuadro 2.

FIGURA 2. AISLAMIENTO DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA DE 55 kDa.



La figura muestra una electroforesis en la que se ha resuelto la proteína espermática de 55 kDa aislada (carriles 2 y 3), y purificada (carril 4) comparada con estándares de peso molecular conocido (carril 1).

FIGURA 3. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS



La Figura muestra los patrones de fluorescencia en espermatozoides capacitados (A y A') y en espermatozoides que además de capacitados, tienen su acrosoma reaccionado por inducción con progesterona (B y B'). Nótese la fluorescencia homogénea en la cabeza de los espermatozoides capacitados, mientras que en los recuadros inferiores, esta fluorescencia se pierde cuando las células han atravesado por la reacción acrosomal como producto de una buena capacitación.

**Cuadro 2. CONDICIONES DE LOS ESPERMATOZOIDES
ANTES Y DESPUÉS DE LA CAPACITACIÓN**

Raza	York
Viabilidad al llegar al laboratorio y después de 4h de capacitación. (Integridad de la membrana)	98 %
Movilidad	85-90 %
Concentración (por ml de semen)	400-600 x 10 ⁶
REACCION ACROSOMAL (RA)	
RA Espontánea al llegar al laboratorio	2-4-%
RA Espontánea después de 4 h de capacitación	2-5 %
RA Inducida después de 4 h de capacitación	30-35 %

La movilidad se evaluó bajo el microscopio tomando en cuenta que la muestra de semen era recién eyaculada y obtenida del seminal 2 veces por semana como máximo. La concentración se calculó en una cámara Neubauer (BRAND, GERMANY). El porcentaje de reacción acrosomal se evaluó antes y después del período de capacitación (RA Espontánea) en todas las muestras utilizadas durante el presente trabajo. Una vez que se indujo la RA con progesterona, el porcentaje de espermatozoides reaccionados incrementó notablemente lo cual indica que los espermatozoides se capacitaron adecuadamente bajo las condiciones previamente descritas. Se contaron 200 espermatozoides por preparación y se consideraron con RA inducida aquellos espermatozoides que presentaban su acrosoma escasamente fluorescente además de no teñirse con Hoechst 33258.

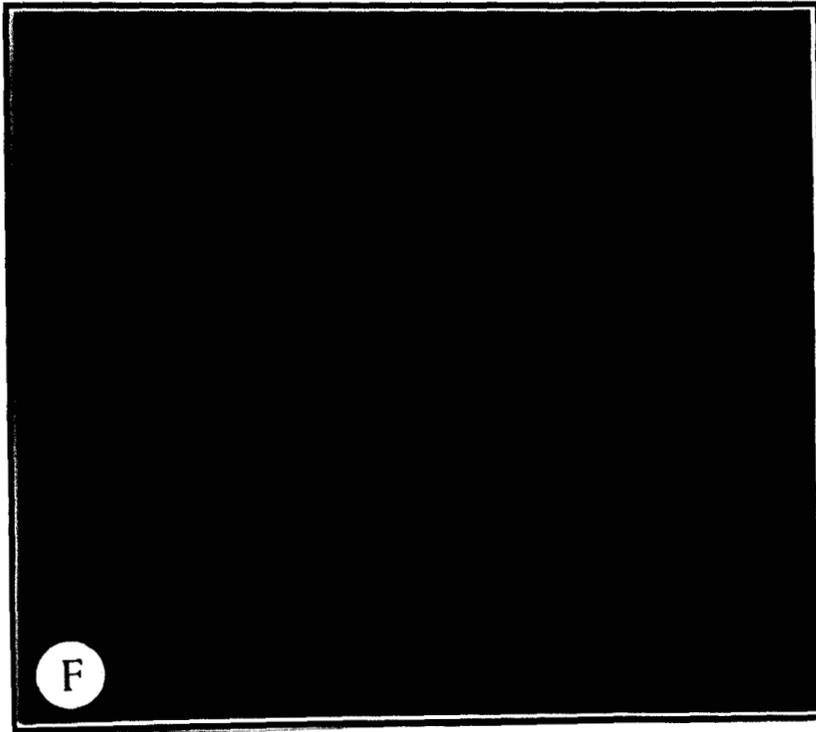
Maduración de ovocitos

Para cada experimento de bloqueo directo e indirecto se preparó un pozo adicional con 20 ovocitos para el control de la maduración. En todos los experimentos se obtuvo una maduración de ovocitos del 80% o más. La maduración se determinó por la presencia de cromosomas (Fig. 4).

Bloqueo directo de la unión espermatozoide y ovocito por la adición de la proteína de 55 kDa.

Sólo las concentraciones de 50 y 100 µg de la proteína purificada bloquearon en un 100 % la unión ovocito-espermatozoide cuando se adicionó una hora antes de la inseminación (Cuadro 3). Como control positivo se usó un pozo sin proteína espermática de 55 kDa y como control negativo un pozo donde se adicionaron proteínas de espermatozoides con

FIGURA 4. MADURACIÓN DE OVOCITOS



La Figura muestra los cromosomas de un ovocito como producto de una buena maduración *in vitro*. El otro grupo de cromosomas corresponde al pronúcleo masculino.

222877

PM < 30 kDa, en cuyos casos no se bloqueó la unión. En un pozo más, se adicionó únicamente el amortiguador de elución bajo el tratamiento de purificación que se dió a las proteínas. Para el caso de los controles la mayor cantidad de espermatozoides que se podía contar fue de aproximadamente 40, por lo que en esos casos se indica como >40.

Cuadro 3. BLOQUEO DE LA UNIÓN OVOCITO-ESPERMATOZOIDE *IN VITRO* POR ACCIÓN DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA DE 55 kDa.

	Control	Proteína de 55 kDa		Proteína de < 30 kDa		Con amortiguador de elusión
		(50 µg)	(100 µg)	(50 µg)	(100 µg)	
Experimento 1 n=12	38	0	0	>40	>40	>40
Experimento 2 n=13	>40	1	0	>40	>40	>40
Experimento 3 n=15	>40	0	0	>40	>40	>40

Los datos muestran que a una concentración final de 50 y 100 µg de la proteína espermática de 55 kDa, no ocurre la unión de espermatozoides a la ZP de ovocitos madurados, en tanto que otro tipo de proteínas propias del espermatozoide, así como el amortiguador de elución, no logran bloquear la unión. Los números indican la cantidad de espermatozoides unidos por ovocito. n = número de ovocitos por dosis/por experimento.

Para determinar si había una relación entre la concentración de la proteína y el bloqueo de la unión, se realizó una serie de experimentos con tres concentraciones menores a 50 µg (Cuadro 4). La Figura 5 muestra que cuando se trabajó una concentración de 40 µg/ml de medio de maduración, se empiezan a observar algunos espermatozoides unidos por ovocito. Cuando la concentración de proteína fue de 30 µg/ml de medio de maduración, el número de espermatozoides unidos incrementó ligeramente con respecto a la concentración anterior. Finalmente, cuando se trabajó con una concentración de 15 µg/ml de medio de maduración, el número de espermatozoides unidos incrementó aún más, sin llegar a la cantidad observada en los controles. La Figura 6 muestra de una manera gráfica el comportamiento de saturación de los sitios de "afinidad" en la ZP para la proteína de 55 kDa en el espermatozoide. El análisis de

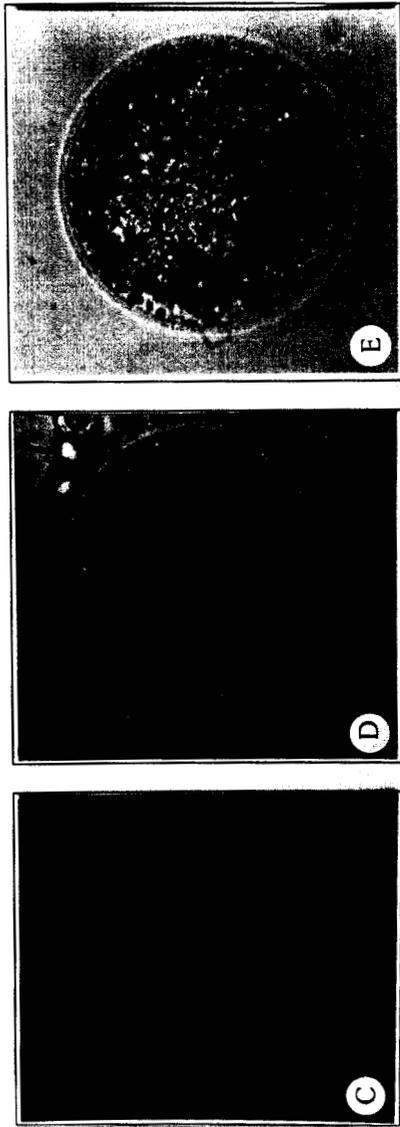
covarianza mostró que existe correlación significativa con una $p < 0.05$ entre los mg de proteína de 55 kDa empleados y el número de espermatozoides unidos por ovocito. El análisis de regresión mostró una $r = -0.95$.

Cuadro 4. RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE 55 kDa Y BLOQUEO DE LA UNIÓN.

	Proteína de 55 kDa				Control
	(50 µg)	(40 µg)	(30 µg)	(15 µg)	
Experimento 1 n=13	0	8*	12*	16*	>40
Experimento 2 n=15	0	9*	10*	19*	>40
Experimento 3 n=15	0	5*	10*	18*	>40

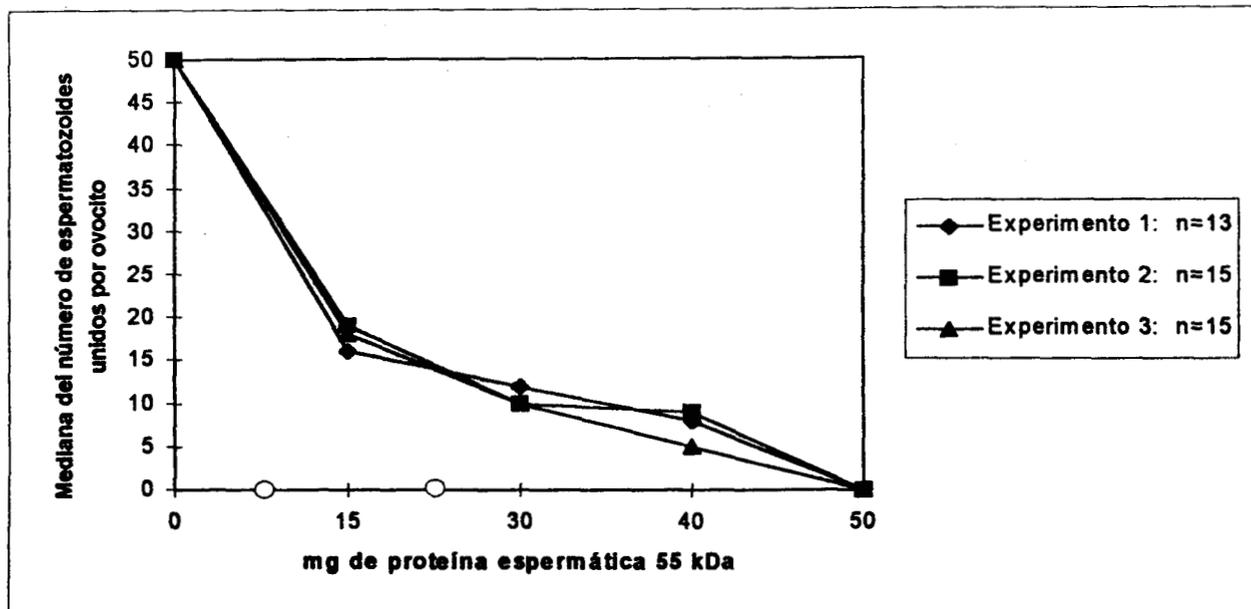
Los datos muestran que conforme aumenta la concentración final de la proteína espermática de 55 kDa disminuye la cantidad de espermatozoides unidos a la ZP, lo cual indica una posible saturación de los sitios receptores para la proteína espermática en la ZP de ovocitos madurados. n=número de ovocitos por concentración / por experimento. *mediana del número de espermatozoides unidos por ovocito.

FIGURA 5. BLOQUEO DE LA UNIÓN ENTRE GAMETOS COMO EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA PROTEÍNA DE 55 kDa.



La Figura muestra el efecto de la adición de la proteína espermática de 55 kDa a diferentes concentraciones a ovocitos madurados previamente a la coincubación con espermatozoides capacitados. Nótese que cuando no esta presente la proteína espermática, una gran cantidad de espermatozoides pueden unirse al ovocito (C); mientras que a concentraciones de 40, 30 y 15 $\mu\text{g/ml}$, se observan algunos espermatozoides unidos (D). A concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$, se logra bloquear totalmente la unión entre gametos (E).

FIGURA 6. BLOQUEO DE LA UNIÓN OVOCITO-ESPERMATOZOIDE *IN VITRO* POR LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA DE 55 kDa A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

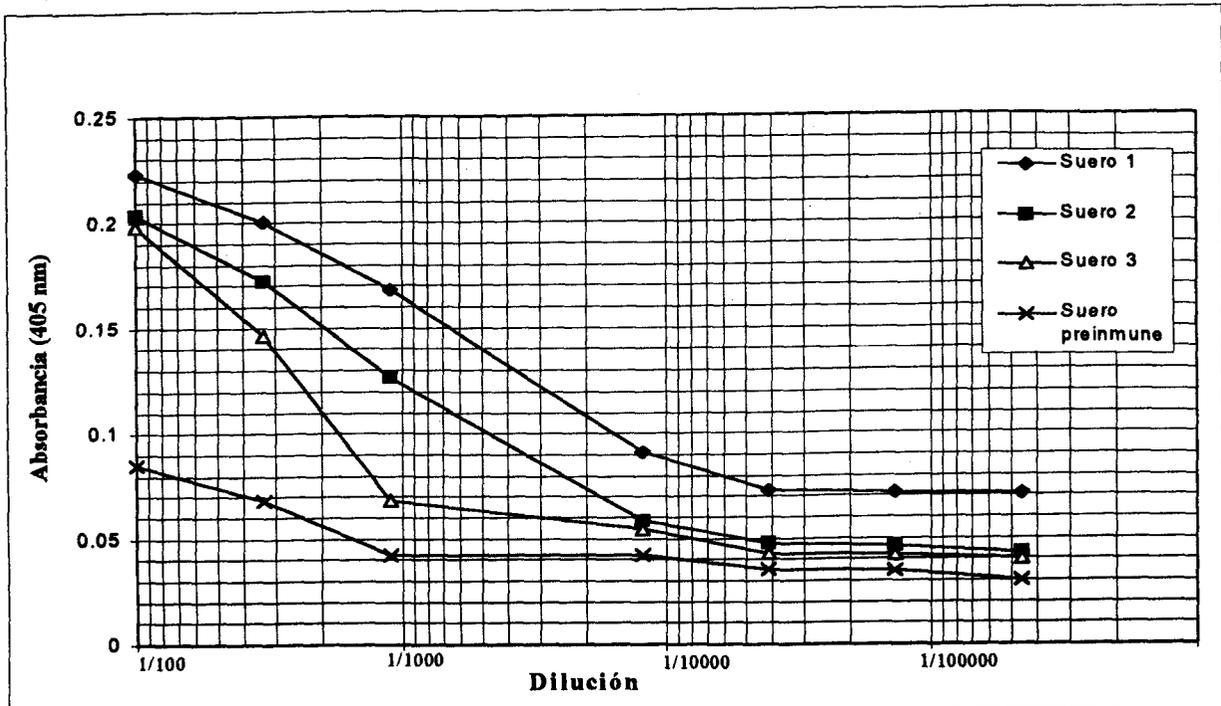


La gráfica muestra un comportamiento de saturación de los sitios receptores en la ZP para la proteína de 55 kDa; en la medida que se incrementa la concentración de la proteína espermática, disminuye el número de espermatozoides unidos en cada ovocito. n=número de ovocitos por dosis/por experimento. (○) indica discontinuidad en la escala. Correlación significativa, $P < 0.05$ y $r = -0.95$.

Obtención y titulación del anticuerpo anti-55 kDa.

El título del anticuerpo (50 % del decaimiento de la afinidad del anticuerpo por el antígeno) presente en el suero de cada uno de los ratones, se determinó por el método de ELISA a una absorbancia de 405 nm, empleando como antígeno a la proteína espermática de 55 kDa (Figura 7). El título para el antisuero de dos ratones fue superior a 1:900, el antisuero de un tercer ratón presentó un título superior a 1:300.

FIGURA 7. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-55 kDa.



La gráfica muestra que los antisueros obtenidos de cada ratón presentaron afinidad por el antígeno (proteína espermática 55 kDa) por el método de ELISA. La absorbancia del complejo antígeno-anticuerpo para cada uno de ellos disminuye conforme se diluye la proteína espermática. Las diluciones fueron: 1:100, 1:300, 1:900, 1:8100, 1:24300, 1:72900, y 1:218700.

Bloqueo indirecto de la unión espermatozoides-anti-55 kDa y ovocitos.

Para bloquear la unión entre gametos de una manera indirecta, se probaron tres diluciones del antisuero anti-55 kDa que presentó el mayor título: 1:100, 1:400 y 1:800 de las cuales la primera bloqueó totalmente la unión cuando el antisuero fue incubado en presencia de los espermatozoides una hora antes de terminar el período de capacitación (Cuadro 5). Cuando el antisuero se diluyó 1:400, se observaron algunos espermatozoides unidos, mientras que la dilución 1:800 no bloqueó la unión.

**Cuadro 5. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN OVOCITO-ESPERMATOZOIDE
POR ANTISUERO ANTI-55 kDa.**

	Con anti-55 kDa			
	Control	(1:100)	(1:400)	(1:800)
Experimento 1 n=14	>40	0	8*	>40
Experimento 2 n=14	>40	0	2*	>40
Experimento 3 n=15	>40	0	6*	>40

Los datos muestran que a una dilución 1:100 del antisuero se logra inhibir la unión entre gametos probablemente por bloqueo de la proteína *in situ* por el correspondiente anticuerpo. n = número de ovocitos por dosis/por experimento. Los números indican la cantidad de espermatozoides unidos por ovocito. *mediana del número de espermatozoides unidos por ovocito.

En otra serie de experimentos de bloqueo indirecto, se repitió únicamente la dilución 1:100 del antisuero por haber bloqueado totalmente la unión entre gametos, y para ser comparado con antisuero anti <30 kDa a la misma dilución, así como con suero preinmune, con los que no se observó bloqueo (Cuadro 6).

**Cuadro 6. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN OVOCITO-ESPERMATOZOIDE POR ANTISUERO
CONTRA OTRAS PROTEÍNAS DEL ESPERMATOZOIDE.**

	Control (sin anticuerpos)	Con anti-55 kDa (1:100)	Con anti <30 kDa (1:100)	Con suero de ratón no inmunizado (1:100)
Experimento 1 n=15	>40	0	>40	>40
Experimento 2 n=15	>40	0	>40	>40
Experimento 3 n=16	>40	0	>40	>40

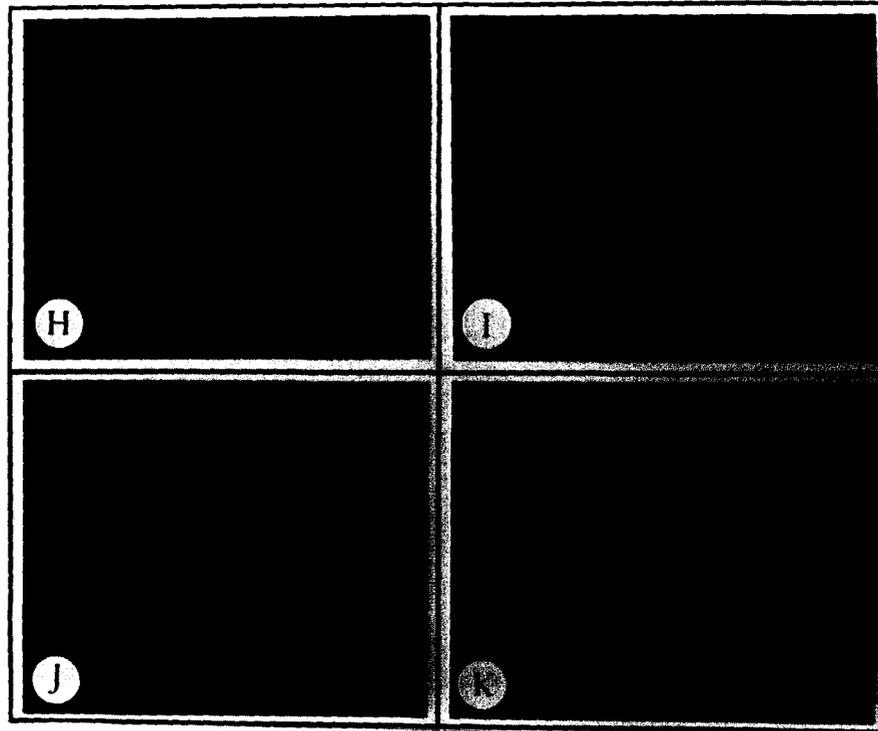
Los datos muestran que cuando se incuban los espermatozoides en presencia de antisuero contra otras proteínas del espermatozoide diferentes a la de 55 kDa, no se logra inhibir la unión. n=número de ovocitos por pozo/por experimento. Los números indican la cantidad de espermatozoides unidos por ovocito.

Inmunolocalización de la proteína espermática de 55 kDa.

Con los anticuerpos producidos en el laboratorio, se distinguieron dos patrones de fluorescencia. Los espermatozoides capacitados, mostraron en la mayor parte de la superficie (cabeza y cola) una ligera fluorescencia homogénea, presentando una más intensa en el borde apical de la cabeza, mientras que los que sufrieron reacción acrosomal por inducción con progesterona, perdieron esa banda intensamente fluorescente, manteniéndose una débil fluorescencia distribuída homogéneamente en la superficie de los espermatozoides (Figura 8). No hubo diferencias en los patrones de fluorescencia para cada una de las diluciones empleadas. Cuando se incubaron los espermatozoides con antisuero anti-ZP (control), no se observó fluorescencia en alguna parte de ellos. Los espermatozoides tratados únicamente con el segundo anticuerpo (anti-IgG conjugada con fluoresceína) tampoco mostraron fluorescencia.

Espermatozoides recién eyaculados muestran fluorescencia homogénea en la cabeza, ligeramente más intensa que en los capacitados. Esta observación se debe a que probablemente existe una migración de las proteínas de unión —difusas en la cabeza del espermatozoide —a la zona postacrosomal de espermatozoides que han atravesado por el

FIGURA 8. INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA DE 55 kDa.



La figura muestra que cuando los espermatozoides son recién eyaculados, el antisuero contra 55 kDa se une de manera homogénea a toda la cabeza y cola del espermatozoide (H), mientras que cuando son capacitados por un período de 4 h, la proteína se localiza en el borde apical de la cabeza (I, J y K) como un preludio a la unión con el ovocito.

período de capacitación, lo que explica la presencia de la banda intensamente fluorescente, que se pierde una vez que se ha inducido la reacción acrosomal.

DISCUSIÓN

En un trabajo previo se ha mostrado la afinidad bioquímica por Western-blot de una proteína espermática de cerdo de 55 kDa con la ZP de ovocitos de la misma especie (Zayas y cols., 1995). No obstante, se ha reportado una gran variedad de proteínas con la misma característica — el reconocimiento de la ZP — que da inicio al proceso de la fertilización. Aunque el reconocimiento ovocito-espermatozoide es sólo una parte de la fertilización, es en sí mismo complejo, un proceso de múltiples pasos (revisado por Ward y Kopf, 1993; Yanagimachi, 1994). Es posible que la mayoría de estas proteínas participen en la unión del espermatozoide a la ZP y que la identificada por nosotros sea también necesaria pero no única para esta interacción.

Las diferencias descritas para las proteínas de espermatozoides de cerdo pueden ser causadas por las fuentes y métodos de extracción y purificación. Para el caso de las espermadhesinas, la mayoría se producen por secreción del epitelio de la vesícula seminal (Veselský y cols., 1992), donde la concentración de diferentes espermadhesinas está entre 0.6-7.2 mg/ml (Dostálová y cols., 1994). En un trabajo reciente, Capková y Pèknicova (1997), usaron plasma seminal como fuente de una espermadhesina de 17 kDa (llamada ACR.3). El plasma fue adicionado a espermatozoides antes de la coincubación con ovocitos; la unión entre gametos disminuyó y los resultados confirmaron observaciones previas de Peterson y cols. (1984) y de Bonilla y cols. (1996), quienes describieron un efecto inhibitorio del plasma seminal sobre el reconocimiento ovocito-espermatozoide. En experimentos posteriores de unión, la proteína ACR.3 purificada fue directamente adicionada a los espermatozoides, dando como resultado una reducción de la unión al ovocito, similar al observado con plasma seminal. No obstante, se ha descrito que el plasma seminal contiene más proteínas del tipo de las adhesinas que se unen al espermatozoide pero que también muestran afinidad a la ZP, como AQN-1, AQN-2, AQN-3 y las AWN (Calvete y cols., 1995),

que son adheridos al tercio apical del acrosoma, el lugar donde el espermatozoide porcino inicia la unión a la ZP del ovocito. Se ha observado que alrededor del 60 % de las espermadhesinas AQN-1, AQN-2 y AQN-3 integradas al espermatozoide, son liberadas después de 3 h del proceso de capacitación *in vitro*; la cantidad de AWN-1 decrece a los niveles encontrados sobre la membrana plasmática de espermatozoides epididimarios y la población completa de AWN-2 se pierde. Además, la microscopía de inmunofluorescencia revela la presencia de epítopes de AWN-1 y AWN-2 sobre el borde acrosomal de espermatozoides capacitados, así como a espermatozoides unidos a ZP. Esta interacción puede ser inhibida por preincubación con proteína AWN purificada (Calvete y cols., 1995). En general, estos datos indican que las diferentes subpoblaciones de espermadhesinas pueden jugar diversos papeles, ya sea como factores estabilizantes del acrosoma, como elementos de capacitación y/o receptores para la ZP. Sin embargo, como estas espermadhesinas pertenecen a una familia de proteínas de masa molecular bajo (12-16 kDa), además de ser aisladas fundamentalmente de plasma seminal a diferencia de la proteína espermática de 55 kDa estudiada por nosotros, por lo que difícilmente existe relación entre la familia de las espermadhesinas y la proteína de 55 kDa.

Con excepción de las espermadhesinas antes mencionadas, la mayoría de los estudios citados en el presente trabajo reportan entre otras, la presencia de proteínas de 52-55 kDa con actividad receptora para la ZP, que puede corresponder a la APz reportada por Peterson y cols. (1991) o a la acrosina reportada por Polakoski y Parrish (1977). Esta última, la acrosina, funciona en la unión del espermatozoide a la ZP y en la penetración de la misma. Esta es una glucoproteína de triple dominio que contiene un sitio activo de serina-proteasa, un dominio de unión hidrofóbico y un dominio de unión a carbohidratos (Hedrick y cols., 1989). Tal estructura puede hacer posible que con los diferentes métodos de extracción y purificación se esté alterando alguno de los dominios, el proteolítico o el hidrofóbico, pero sin alterar el de unión a carbohidratos, por lo que se conserva la estructura necesaria de reconocimiento a la ZP y con esto un bloqueo parcial tanto de la unión como de la fertilización cuando se adiciona *in vitro*.

Con el objeto de entender mejor la función de estas proteínas en las etapas iniciales de la fertilización, este trabajo consistió en aislar la proteína espermática de 55 kDa identificada previamente y probar su capacidad competitiva con la misma proteína *in situ*, determinando el porcentaje de inhibición de la unión entre gametos de cerdo.

Basados en criterios establecidos para el complejo ligando-receptor en otros sistemas y las observaciones de que los receptores de adhesión celular son frecuentemente de baja afinidad, se esperaba que se cumplieran al menos cinco criterios para una proteína espermática que se une a la ZP del ovocito: 1) Afinidad demostrable entre la proteína espermática y su ligando en la ZP, 2) razonable especificidad entre la proteína espermática y su ligando, 3) unión saturable, 4) apropiada localización sobre la membrana plasmática en el momento adecuado y 5) interferencia de la interacción entre gametos que debería reducir el porcentaje de unión. Si la afinidad bioquímica exhibida durante el Western-blot es biológicamente relevante y si la proteína espermática electroeluída mantuvo esta afinidad bioquímica, entonces la proteína puede unirse a la ZP de ovocitos madurados *in vitro* (Berger y cols., 1998).

Todo el proceso de extracción y purificación de la proteína espermática de 55 kDa, particularmente la electroforesis en SDS, la electroelución y la diálisis, pudieron afectar la actividad biológica propuesta, dando como resultado una disminución o pérdida de su función; sin embargo, algunas proteínas retienen o recuperan su actividad biológica durante la transferencia a nitrocelulosa después de la electroforesis (Kuzmenko y cols., 1994; Ocrant y cols., 1992); por lo que como parte de un seguimiento de recuperación de proteína y retención de la "afinidad" por la ZP, una vez que se aisló y purificó la mayor cantidad de proteína espermática de interés, se cuantificó y se evaluó por Western-blot su "afinidad" por la ZP solubilizada. El porcentaje de recuperación de la proteína espermática después de la electroforesis y electroelusión fue del 90%; asimismo, la proteína aislada y purificada conservó su capacidad de unirse a la ZP, evidenciada por Western-blot.

La unión de la proteína electroeluída y purificada bloqueó la unión de espermatozoides capacitados a sus correspondientes ligandos en la ZP, inhibiendo la interacción ovocito-espermatozoide y con ello probablemente la fertilización. La proteína espermática de 55 kDa exhibió una capacidad de bloqueo de interacción de gametos homólogos dependiente de la concentración, ni las proteínas control ni el amortiguador de electroelución afectaron la unión *in vitro* entre los gametos.

La unión de la proteína espermática aislada, electroeluída y purificada a la ZP de ovocitos madurados *in vitro*, indica que esta proteína conservó la afinidad por la ZP^{*} demostrada previamente por Western-blot (Zayas y cols., 1995), y con ello, mantuvo su

función biológica de reconocer y unirse a la ZP, ocupando los sitios existentes y evitando que las correspondientes proteínas de los espermatozoides capacitados se unieran al ovocito.

Esta proteína espermática está localizada en la cabeza del espermatozoide, concentrándose principalmente en el borde postacrosomal según lo revela el uso de inmunofluorescencia indirecta; por lo que la proteína se encuentra presente en el lugar apropiado para la interacción con el ovocito, es decir, en la cabeza del espermatozoide después de ser capacitado.

Seguramente los experimentos de afinidad de ZP solubilizada con proteínas de espermatozoides extraídas con detergentes, son diferentes de la interacción que ocurre *in vivo*. Por un lado, las afinidades para la unión pueden ser disminuídas en presencia de los detergentes usados. Por otro lado, pueden ocurrir posibles modificaciones de la interacción espermatozoide-zona pelúcida en el momento inicial de la unión (por ejemplo reclutamiento de las lectinas de superficie) o modificación de la ZP inducida por el espermatozoide, como ya ha sido reportado por Hartmann y Hutchison (1980). Sin embargo, la proteína espermática identificada por nosotros conservó la afinidad por la ZP de ovocitos madurados, mostrada previamente al transferir proteínas de espermatozoides a papeles de nitrocelulosa. Así, nuestros experimentos aportan bases para la identificación de proteínas presentes en la superficie de los espermatozoides que podrían ser las que muestran una fuerte capacidad de unión a la ZP *in vivo*.

Se ha sugerido que la proacrosina participa en la unión ovocito espermatozoide en el cerdo (Töpfer-Petersen y Henschen, 1988), pero no ha sido posible mostrar que la proacrosina este involucrada en la adhesión ovocito-espermatozoide por espermatozoides ya sea recién eyaculados y/o capacitados. Ovocitos incubados con altas concentraciones de proacrosina o suspensiones de ovocitos-espermatozoides en incubación con altas concentraciones de condroitín sulfato (que se une a la proacrosina), no tiene efecto sobre la unión del espermatozoide al ovocito (Patel y Urch, 1989). Algunos de estos experimentos fueron descritos en un trabajo de Peterson y Hunt (1989). Además, anticuerpos monoclonales antiproacrosina marcaron la superficie de espermatozoides recién eyaculados en observaciones hechas con microscopía de fluorescencia; sin embargo, cuando se usaron anticuerpos antiproacrosina/oro coloidal y microscopía electrónica, el contenido del acrosoma fue intensamente marcado, en cambio se observó una fluorescencia muy débil sobre la

membrana plasmática. Esta observación y los resultados de experimentos con ligandos competitivos sugieren que ningún tipo de proacrosina que pudiera estar presente sobre la superficie del espermatozoide es suficiente para participar en la unión de espermatozoides recién eyaculados a la ZP de ovocitos.

En otros trabajos con espermatozoides no capacitados; anticuerpos producidos contra APz separada por PAGE, localizaron a la proteína sobre la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y de manera menos marcada en el flagelo (Peterson y cols., 1991). Esta observación es consistente con las observaciones hechas por nosotros, en las que se observa una fluorescencia homogénea en toda la cabeza del espermatozoide y que después de 4 h de capacitación tal fluorescencia se intensifica particularmente en el borde apical de la cabeza. Se ha postulado, sobre una base de análisis estructural de membranas de la cabeza de espermatozoides de cerdo, que la reacción acrosomal es iniciada precisamente en el borde apical de la cabeza (Peterson y cols., 1987), de modo que cuando los espermatozoides han pasado por el proceso de reacción acrosomal, la proteína aquí estudiada ya no se encuentra en el borde apical, aunque se mantiene una débil fluorescencia en el resto de la cabeza del espermatozoide. El hecho de que la proteína esté más concentrada en el borde apical, así como su localización afectada por la capacitación o por la unión a la ZP de ovocitos madurados, requiere de estudios posteriores. Adicionalmente, es prioritario describir la secuencia primaria de nuestra proteína para saber si se trata de la acrosina o de la APz, además de precisar su localización por microscopía electrónica.

CONCLUSIONES

La proteína espermática porcina de 55 kDa aislada y purificada por nosotros conservó la "afinidad" bioquímica por la ZP de ovocitos madurados *in vitro*.

La "afinidad" de la proteína espermática por la ZP de ovocitos demostrada en este trabajo pone de manifiesto su relevancia biológica de esta proteína en la unión ovocito-espermatozoide.

Existe especificidad entre la proteína espermática y su ligando en la ZP de ovocitos madurados in vitro, al no presentarse bloqueo de la unión entre gametos por alguna otra proteína del espermatozoide.

El reconocimiento entre la proteína espermática de 55 kDa y su ligando en la ZP es saturable, lo que permite ubicar a esta proteína como un buen candidato a receptor en el espermatozoide para la ZP.

La localización de la proteína en el borde apical de la cabeza del espermatozoide, así como el momento en la que ésta se observa (después de la capacitación), parece adecuada para el reconocimiento en el proceso de la fertilización.

ANEXOS

Solución TALP-Hepes (Betancourt y cols., 1993)

Usada para el lavado, dilución y capacitación de espermatozoides.

Componente	PM	mg/100 ml	mM final
KCl	74.55	23	3.1
NaCl	58.44	584	100
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	137.99	4	0.29
HEPES	238.30	238	10
NaHCO ₃	84.01	210	25
Lactato de sodio	60%	0.308 ml	21.6
Rojo Fenol	-----	1	-----
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	31	2.10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	30	1.5

Aforar a 100 ml con agua destilada y desionizada.

Observaciones:

1. Adicionar CaCl₂·H₂O y MgCl₂·6H₂O al final.
2. Ajustar pH a 7.4 con NaOH o HCl.
3. Ajustar osmolaridad a 290 - 300 mOsm/kg con NaCl.
4. Esterilizar por filtración, con filtro de 0.22 mm.
5. Suplementar el día de uso:

Piruvato de sodio	1 mM (40 µl del stock/ml de sol.)
BSA (fracción V)	6 mg/ml
Gentamicina	10mg/ml (1 µl del stock/ml de sol.)

6. Esterilizar por filtración.

Nota: Es suficiente preparar 2 ml de medio suplementado por experimento.

Solución TALP
(Betancourt y cols., 1993)
Usado para fertilización

Componente	PM	mg/50 ml	mM final
KCl	74.55	12.8	3.2
NaCl	58.44	333	114
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	137.99	2.8	0.4
NaHCO ₃	84.01	105.2	25
Lactato de sodio	60%	0.071 ml	10
Rojo Fenol	-----	0.5	-----
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	15	2.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	5	0.5

Aforar a 50 ml con agua destilada y desionizada.

Observaciones:

1. Adicionar CaCl₂·H₂O y MgCl₂·6H₂O al final.
2. Ajustar pH a 7.4 con NaOH o HCl.
3. Ajustar osmolaridad a 280 - 300 mOsm/kg con NaCl.
4. Esterilizar por filtración con filtro de 0.22 mm.
5. Suplementar el día de uso con:

Piruvato de sodio	0.25 mM (10 µl del stock/ml)
BSA (libre de ác. grasos)	6 mg/ml
Gentamicina	10 mg/ml (1 µl del stock/ml)

6. Esterilizar por filtración.

Nota: Es suficiente con 2 ml por experimento.

Medio de maduración.
(Betancourt y cols., 1993)

Componente	ml/100 ml
Medio 199	90
Suero fetal de ternera (FCS) inactivado a 56 °C, 1/2 h	10

Observaciones:

1. Ajustar pH a 7.4 con NaOH o HCl.
2. Ajustar la osmolaridad a 280 - 290 mOsm/kg con NaCl.
3. Esterilizar por filtración con filtro de 0.22 mm.
4. Suplementar el día de uso con:

Glucosa	1 mg/ml
Piruvato de Sodio	0.25 mM (10 µl del stock/ml)
LH	0.023 unidades
FSH	0.02 unidades
Gentamicina	50 mg/ml (1µl del stock/ml)

5. Esterilizar por filtración con filtro de 0.22 mm y adicionar:

Estradiol	1 mg/ml (1µl del stock/ml)
-----------	----------------------------

Nota: Es suficiente preparar 2 ml por experimento.

Soluciones

Solución salina:

NaCl al 0.157 M en agua desionizada (9 g en 1000 ml de agua desionizada).

Estradiol:

17 β OH-estradiol 1 mg/ml en etanol. Almacenar en congelación.

Piruvato de sodio 25 mM:

27.5 mg/10 ml de solución salina.

Gentamicina:

10 mg/ml en solución salina. Almacenar en refrigeración.

Fijador de Carnoy:

Metanol - ácido acético en proporción 3:1. Preparar el día de uso.

Orceña acética:

Disolver 1g de orceña en 55 ml de ácido acético glacial. Calentar a ebullición durante 7 - 10 min. Dejar enfriar y añadir 55 ml de agua destilada. Filtrar antes de usar.

LH y FSH:

Se puede emplear *Pergonal*[®] (SERONO, MÉXICO) (contiene LH y FSH para uso humano de 70 UI/ml).

Preparación de aceite de parafina para FIV

1. Se depositan 300 ml de aceite de parafina (SIGMA) en un embudo de separación estéril.
2. Se agregan 300 ml de agua desionizada estéril.
3. Se agita suavemente para mezclar las dos fases, y se cubre con papel aluminio. Se deja reposar toda la noche.
4. Se extrae la fase acuosa por completo. Esta es la primera extracción.
5. Se añade 300 ml de agua desionizada estéril y se repiten los pasos 3 y 4. Esta es la segunda extracción.
6. Se retira la fase acuosa y se añade una cantidad igual de solución salina estéril. Se repiten los pasos 3 y 4. Esta es la tercera extracción.
7. Se retira por completo la solución salina y se transfiere a frascos ámbar estériles.
8. Se agrega un volumen igual de solución salina estéril y se deja equilibrar a temperatura ambiente por lo menos por 24 horas antes de usarse.

Nota: Es importante almacenar el aceite con la solución salina en frascos ámbar y cubiertos con papel aluminio para evitar las reacciones de auto-oxidación del aceite.

Solución de Sustrato para prueba enzimática de ELISA

Preparar inmediatamente antes de su uso:

(a) Acido cítrico 0.05 M y pH 4 (0.2626 g en 25 ml de H₂O)

(b) ABTS 40 mM (caduca 1 año en frasco ámbar y en refrigeración)

(c) H₂O₂ 0.05 M (52 ml de solución al 30% llevados a 1 litro; caduca en 6 meses en refrigeración)

Mezclar:

25 ml de (a) + 150 µl de (b) + 125 µl de (c) (solución de sustrato)

222877

BIBLIOGRAFÍA

Aitken, R.J., Richardson, D.W., (1982), *Properties of intact and univalent (Fab) antibodies raised against isolated solubilized mouse zonae pellucidae*, J. Reprod. Fertil., 66:327-334.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., (1994), *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, Inc., New York, G-19.

Aoki, N., Ujita, M., Kuroda, H., Urabe, M., Noda, A., Adachil, T., Nakamura, R., Matsuda, T., (1994), *Immunologically cross-reactive 57 kDa and 53 kDa glycoprotein antigens of bovine milk fat globule membrane: isoforms with different N-linked chains and differential glycosilation at early stages of lactation*, Biochem. Biophys. Acta, 1200:227-234.

Berger, T., (1990), *Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm*, Theriogenology, 33:689-695.

Berger, T., Nitta, B.J., Horton, M.B., Ducolomb, Y., Betancourt, M., (1998), *Sperm ligands for the oocyte plasma membrane*, En preparación.

Betancourt, M., Fierro, R. Ambriz, D., (1993), *In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro*, Theriogenology, 40:1155-1160.

Bonilla, E., Amador, A., Betancourt, M., (1994), *In vitro capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine*. Med. Sci. Res., 22:725-726.

Bonilla, E., Velasco, R., Casas, E., Ducolomb, Y., Betancourt, M., (1996), *Inhibition of pig sperm acrosome reaction by a decapacitation factor from pig seminal plasma*. Med. Sci. Res., 24:75-77.

Bunch, D.O., Saling, P.M., (1991), *Generation of a mouse sperm membrane fraction with zona receptor activity.*, Biol. of Reprod., 44:672-680.

Calvete, J.J., Sanz, L., Dostàlovà, Z., Töpfer-Petersen, E., (1995), *Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding*, *Fertilität*, 11:35-40.

Capkovà, J., Peknicovà, J., (1997), *Binding of boar spermatozoa to porcine oocytes: effect of low molecular weight 17 kDa protein*, *Mol. Reprod. Dev.*, 46:168-175.

Dostàlovà, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., (1994), *Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa*, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1200:48-54.

Dostàlovà, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., (1995), *Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida-binding characteristics*, *European Journal of Biochemistry*, 230:329-336.

Dubova-Mihailova, M., Komori, S., Kameda, K., Tsuji, Y., Koyama, K., Isojima, S., (1994), *Identification and characterization of a 27 kDa acrosome protein of human sperm defined by a monoclonal antibody with fertilization-blocking effect.*, *J. Reprod. Immunol.*, 26:97-110.

Dunbar, B.S., Dudkiewicz, A.B., Bundman, D.S., (1985), *Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin*, *Biol. Reprod.*, 32:619-630.

Durr, R., Shur, B., Roth, S., (1977), *Sperm-associated sialyltransferase activity.*, *Nature*, 265:547-548.

Enblin, M., Calvete, J.J., Thole, H.H., Sierralta, W.A., Adermann, K., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., (1995), *Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN*, *Biol. Chem.*, 376:733-738.

Gerton, G.L., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L., (1982), *Gel eluter for recovery of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis*, *Anal. Biochem.*, 126:116-121.

Hardy, D.M., Garbers, D.L., (1994), *Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg*, *Journal of Biol. Chem.*, 269:19000-19004.

- Hartmann, J.F., Hutchison, L.F., (1974), *Nature of pre-penetration contact interactions between hamster gametes in vitro*, J. Reprod. Fert., 36:49-57.
- Hartmann, J.F., Hutchison, L.F., (1980), *Nature and fate of factors released during early contact interactions between hamster sperm and egg prior to fertilization.*, Develop. Biol., 78:380-393.
- Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., (1981), *Microheterogeneity in the glycoproteins of the zona pellucida is due to the carbohydrate moiety*, J. Cell Biol., 91, 177a.
- Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., (1987), *On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes*, Dev. Biol., 121:478-488.
- Hedrick, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M., (1989), *Structure-function properties of the sperm enzyme acrosin*, American Chemical Society, 215-229.
- Hunnicut, G.R., Primakoff, P., Myles, D.G., (1996), *Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: One activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding.*, Biol. of Reprod., 55:80-86.
- Kuzmenko, Y.S., Bochkov, V.N., Philippova, M.P., Tkachuk, V.A. y Resink, T.J., (1994), *Characterization of an atypical lipoprotein-binding protein in human aortic media membranes by ligand blotting*, J Biochem., 303:281-287.
- Laemmli, U.K., (1970), *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄*, Nature, 227:680-685.
- Longo, F.K., Yanagimachi, R., (1993), *Detection of sperm-egg fusion*. In: Methods in Enzymology, 221:249-260.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., (1951), *Protein measurement with the folin phenol reagent*, J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Myles, D.G., Primakoff, P., (1997), *Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg.*, Biol. of Reprod. 56:320-327.

Ocrant, I., Fay, C., Pham, H. y Rosenfeld, R., (1992), *Not all insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) are detectable by Western ligand blotting: case studies of PC12 pheochromocytoma and rat anterior pituitary IGFBPs and proteolyzed IGFBP-3*, Endocrinology, 131:221-227.

O'Rand, M.G., Matthews, J.E., Welch, J.E., Fisher, S.J., (1985), *Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots*, J. Exp. Zool., 235:423-428.

Patel, H.M., Urch, U.A., (1989), *Charcterization of carbohydrate binding of the lectin-protease, boar sperm proacrosin*, J. Cell. Biol., 109:250.

Peterson, R.N., Russell, L.D., Hunt, N.P., (1984), *Evidence for specific binding of uncapacitated boar spermatozoa to zonae pellucidae in vitro*, J. Exp. Zool., 231:137-147.

Peterson, R.N., Gillott, M., Hunt, W.P., Russell, L.D., (1987), *Organization of the boar spermatozoan plasma membrane: Evidence for separate domains (subdomains) of integral membrane proteins in the plasma membrane overlying the principal segment*, J. Cell Sci., 88:343-349.

Peterson, R.N., Hunt, W.P., (1989), *Identification, isolation and properties of a plasma membrane protein involved in the adhesion of boar sperm to the porcine zona pellucida*. Gamete Res. 23:103-118.

Peterson, R.N., Campbell, W.P., Hunt, W.P., Bozzola, J.J., (1991), *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins*, Mol. Reprod. and Develop., 28:260-271.

Polakoski, K.L., Parrish, R.F., (1977), *Boar Proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm*, J. Biol. Chem., 252:1888-1894.

Primakoff, P., Hyatt, H., Myles, D.G., (1985), *A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida.*, J. Cell Biol., 101:2239-2244.

Russell, L.D., Montag, B., Hunt, W., Peterson, R.N., (1985), *Properties of boar sperm plasma membrane (PM): Proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents, and sensitivity to surface radiolabelling*, Gamete Res., 11:237-252.

Sacco, A.G., Subramanian, M.G., Yurewicz, E.C., (1984), *Association of sperm receptor activity with a purified pig zona antigen (PPZP)*, J. Reprod. Immunol., 6:89-103.

Sacco, A.G., Yurewicz, E.C., Subramanian, M.G., Matzat, P.D., (1989), *Porcine zona pellucida: Association of sperm receptor activity with the α -glycoprotein component of the $M_r=55,000$ family*, Biol. of Reprod., 41:523-532.

Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H. J., Töpfer-Petersen, E., (1993), *Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization*, Mol. Reprod. Dev., 35:37-43.

Shur, B.D., Hall, N.G., (1982), *Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation.*, J. Cell Biol., 95:567-573.

Stambaugh, R., Brackett, B.G., Mastroianni, L., (1969), *Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors*, Biol. Reprod., 1:223-227.

Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Sanz, L., Sinowatz, F., (1995), *Carbohydrate-andheparin-binding proteins in mammalian fertilization*, Andrologia, 27:303-324.

Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., (1996), *Sperm-associated proteins candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins*, Journal of Reprod. and Fertil.Suppl., 50:55-61.

Töpfer-Petersen, E., Henschen, A., (1988), *Zona pellucida-binding and fucose-binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity.*, Hoppe-Seyler, B.C. 369:69.

Towbin, H., Staehelm, T., Gordon, J., (1979), *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354.

Tulsiani, D.R.P., Skudlarek, M.D., Orgebin-Crist, M.C., (1990), *Human sperm plasma membranes possess alpha-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity.*, Biol. Reprod., 42:843-858.

Urch, U.A., Wardrip, N.A., Hedrick, J.L., (1985a), *Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin*, J. Exp. Zool., 233:479-483.

Urch, U.A., Wardrip, N.A., Hedrick, J.L., (1985b), *Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: The nature of the hydrolysis products*, J. Exp. Zool., 236:239-243.

Veselský, L., Jonáková, V., Sanz, M.L., Töpfer-Petersen, E., Cechová, D., (1992), *Binding of a 15 kDa glycoprotein from spermatozoa of boars to surface of zona pellucida and cumulus oophorus cells.*, J. Reprod. Fert., 96:593-602.

Wardrip, N.J., Hedrick, J.L., (1985), *Pig zona pellucida 25K and 65K glycoproteins are derived from hidrolisis and reduction of the 90K family*, J. Cell. Biol., 101, 378a.

Ward, C.R., Kopf, G.S., (1993), *Molecular events mediating sperm activation*, Dev. Biol., 158:9-34.

Wassarmann, P.M., (1989), *La fecundación en los mamíferos*, Investigación y Ciencia, 149:48-55.

Yanagimachi, R., (1981), *Mechanisms of fertilization in mammals. En: Fertilization and embrionic development in vitro*, Mastroianni, L., Jr., Biggers, J.D. Eds. Plenum Press, New York, 81-182.

222877

Yanagimachi, R., (1994), *Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction*, 1:193-245.

Yurewicz, E.C., Pack, B.A., Sacco, A. G., (1991), *Isolation, composition and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55 K glycoproteins*, Mol. Reprod. Devel., 30:126-134.

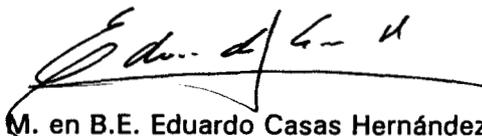
Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M., Williams, W.L., (1971), *Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors*, J. Reprod. Fert., 25:387-392.

Zayas, H., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Casas, E., Córdova, A., Betancourt, M., (1995), *Affinity of pig oocyte zona pellucida peptides for sperm proteins*. Med. Sci. Res. 23: 831-832.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente Tesis el día 21 de Mayo de 1998.



Dr. José Miguel Betancourt Rule



M. en B.E. Eduardo Casas Hernández



M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz