

## Tesis de Posgrado

# Estudios de la función biológica de la proteína Epidimaria "DE" en los distintos procesos involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito

Cohen, Débora Juana

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Cohen, Débora Juana. (1997). Estudios de la función biológica de la proteína Epidimaria "DE" en los distintos procesos involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2918\\_Cohen.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2918_Cohen.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cohen, Débora Juana. "Estudios de la función biológica de la proteína Epidimaria "DE" en los distintos procesos involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2918\\_Cohen.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2918_Cohen.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios de la Función Biológica de la  
Proteína Epididimaria "DE" en los Distintos  
Procesos Involucrados en la Interacción  
Espermatozoide-Ovocito

Autora: Lic. Débora Juana Cohen

Directora: Dra. Patricia S. Cuasnicú

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
(Area Cs. Biológicas)

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

BUENOS AIRES, 1997

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

Sciences School

Studies on the Biological Role of Epididymal  
Protein "DE" in the Different Processes  
Involved in Sperm-Egg Interaction

Author: Lic. Débora Juana Cohen

Director: Dra. Patricia S. Cuasnicú

Thesis presented to obtain the Ph.D. degree

INSTITUTE OF BIOLOGY AND EXPERIMENTAL MEDICINE

BUENOS AIRES, 1997

## RESUMEN

En el presente trabajo se han estudiado distintos aspectos relacionados con la participación de la proteína epididimaria DE en el proceso de interacción de gametas. En primer lugar, se estudió el tipo de asociación de DE a la membrana del espermatozoide. Los resultados mostraron que esta proteína se une con dos afinidades distintas existiendo una población "débilmente unida" que se libera del espermatozoide durante la capacitación y otra "fuertemente unida" que permanece asociada y participa en la interacción con la zona pellucida y en el proceso de fusión de gametas. La secuenciación de un péptido interno de DE indicó la existencia de una proteína homóloga en ratón, la cual participa en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito tanto en esta especie como en el sistema heterólogo ratón-rata. La participación de DE en el proceso de fusión de membranas a través de un mecanismo alternativo al previamente propuesto, indica la coexistencia de más de un mecanismo molecular en el proceso de fusión y brinda las primeras evidencias sobre los mecanismos involucrados en el proceso de fusión cruzada entre especies. Por último, los resultados indicando que la aparición de sitios complementarios para DE en el oolema otorga fusogenicidad al ovocito durante la ovogénesis, estarían brindando importante información sobre los mecanismos por los cuales el ovocito adquiere su capacidad de fusionarse con el espermatozoide.

Palabras clave: espermatozoide, ovocito, interacción de gametas, proteínas epididimarias, fertilización, ovogénesis, fusión espermatozoide-ovocito

## **ABSTRACT**

In the present work we studied different aspects related to the participation of the epididymal protein DE during sperm-egg interaction. First, we studied the association of DE to the sperm plasma membrane. Results indicated the existence of two populations of DE: one "loosely" bound and released during sperm capacitation, and another one "tightly" bound, which remains on the sperm and participates in sperm-zona interaction and sperm-egg fusion. The sequentiation of a tryptic peptide of DE indicated the existence of a mouse homologue protein, that participates in both mouse-mouse and mouse-rat sperm-egg fusion. The participation of DE in the membrane fusion process through a mechanism alternative to the previously described, indicates the co-existence of different molecular mechanisms in gamete fusion and provides the first evidence on the mechanism involved in fusion between two different species. Finally, results indicate that the appearance of DE binding sites on the oocyte surface mediates the development of fusogenicity during oogenesis, providing important information on the molecular mechanisms by which the oocyte acquires its ability to fuse with a spermatozoa.

**Keywords:** sperm, egg, sperm-egg interaction, epididymal proteins, fertilization, oogenesis, sperm-egg fusion.

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Cuasnicú por aceptar el desafío de mi formación científica, por estimular permanentemente mi trabajo así como también por la confianza que depositó en mí. Quiero agradecerle especialmente sus enseñanzas y, sobre todo, por acompañar y estimular mi desarrollo individual.

A Diego Ellerman, por ser tan buen compañero de trabajo y de viajes.

A María José Munuce por los millones de horas que pasamos sentadas cada una frente a su lupa pipeteando "lo jovocitos".

A Leonora Rochwerger, Daniela Conesa y Silvina Pérez Martínez por su gran colaboración y compañerismo en las primeras etapas de esta tesis.

A Mariela Urrutia, por su colaboración en los estudios de fertilización cruzada.

A Verónica Brantua, Mauro Morgenfeld y German Szapiro que se bancaron estoicamente todas mis "enseñanzas".

A los Dres. Jorge Tezón, Lino Baraño, Sully Tessone, Mónica Vazquez y Juan Carlos Calvo por estar siempre dispuestos a contestar mis preguntas.

A todos los integrantes del laboratorio 15: Pata Delcourt, Pato Miranda, Clarisa Marín, Adriano Brandelli, Pablo Visconti y Guadalupe Añón Vazquez por ser tan buenos compañeros, por sus consejos y cooperación y por permitir que el trabajo diario se lleve a cabo en un clima de solidaridad y amistad permanente.

A Paula Stein, Liliana Daín, Alejandro Colman Lerner, Guillermo Lanuza, María Laura Fischman y Patricia Saragüeta por ser excelentes compañeros en el trabajo diario.

A todos los que alguna vez me acompañaron a inyectar ratitas sin importar la hora o el día.

A Marcelo Lamami por la enorme paciencia que me tuvo en la elaboración del material fotográfico que se presenta en esta tesis.

A todos y cada uno de los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental por haberme facilitado los elementos y la colaboración necesarias para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos Gabi, Martín, Tano, Vanina, Andy y Anabella por ser tan buenos amigos. Y un agradecimiento especial a mis "sobris del alma" Lucía y Alina.

A mis hermanos, Verónica y Marcos, por su comprensión y por haberme brindado tanto, durante tantos años y a mi sobrinita Melina que siendo tan chiquita nos demostró que sólo luchando se puede salir a flote.

A Jefferson, por su amor y comprensión, por compartir su vida conmigo. Por nuestro futuro.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres por su apoyo en cada una de mis decisiones, por su amor y su confianza.



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CEP	Fluido del cauda epididimario
CGP	Células germinales primordiales
cyt B	Citocalasina B
DMSO	Di-metil sulfóxido
DSS	Disuccinimidil-suberato
DTT	Ditiotreitol
E.S.	Error standard
esp.	Espermatozoide
FITC	Isocianato de fluoresceína
GalTase	$\beta$ 1,4-galactosyltransferasa
hCG	Gonadotropina coriónica humana
IIF	Inmunofluorescencia indirecta
PBS	Buffer fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMSG	Gonadotropina de suero de yegua preñada
PVA	Polivinilalcohol
RFM	Medio de fertilización de rata
SCAN	Suero de cabra normal
SCN	Suero de conejo normal
TCh	Medio de fertilización descrito por Toyoda y Chang
VG	Vesícula germinal
ZP	Zona pellucida

# INDICE

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>2</b>
<b>1.Ciclo de vida de las células germinales .....</b>	<b>2</b>
<b>2. El ovocito .....</b>	<b>3</b>
2.1 Ovogénesis .....	3
2.1.1.Crecimiento del ovocito.....	5
2.1.2. Maduración del ovocito.....	9
2.2 Estructura general del ovocito ovulado.....	11
<b>3. El espermatozoide .....</b>	<b>14</b>
3.1 Estructura de la cabeza: .....	15
3.2 Estructura de la cola .....	20
3.3 Dominios de la membrana plasmática.....	21
<b>4. Maduración epididimaria .....</b>	<b>23</b>
<b>5. Capacitación del espermatozoide.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Reacción acrosomal.....</b>	<b>31</b>
6.1 Significado biológico de la reacción acrosomal .....	31
6.2 Detección de la reacción acrosomal.....	33
6.3 Inductores de la reacción acrosomal .....	34
<b>7. Hiperactivación de los espermatozoides .....</b>	<b>36</b>
<b>8. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito. ....</b>	<b>37</b>
<b>9. Penetración a través del cumulus oophorus.....</b>	<b>38</b>
<b>10. Unión a la zona pellucida .....</b>	<b>39</b>
<b>11. Penetración de la zona pellucida.....</b>	<b>42</b>
<b>12. Fusión del espermatozoide con el ovocito.....</b>	<b>43</b>
12.1 Unión espermatozoide-ovocito .....	43
12.2 Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito .....	44
12.3 Detección de la ocurrencia de la fusión .....	47
12.4 Especificidad de especie en la fusión.....	47
12.5 Consecuencias de la fusión.....	48
<b>13. Moléculas involucradas en el proceso de fusión.....</b>	<b>50</b>
13.1 Moléculas involucradas en la fusión de membranas durante la infección viral .....	50
13.2 Moléculas involucradas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.....	52
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>64</b>
<b>1. Animales .....</b>	<b>64</b>
<b>2. Proteína DE.....</b>	<b>64</b>
<b>3. Anticuerpo anti-DE .....</b>	<b>65</b>
<b>4. Obtención de espermatozoides.....</b>	<b>65</b>
4.1 Espermatozoides epididimarios.....	65

4.2 Espermatozoides testiculares.....	65
<b>5. Evaluación de motilidad de los espermatozoides.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Extracción de proteínas del espermatozoide .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Separación electroforética de las muestras.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Tranferencia a nitrocelulosa .....</b>	<b>67</b>
<b>9. Western blot .....</b>	<b>68</b>
<b>10. Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de espermatozoides.....</b>	<b>68</b>
<b>11. Inmunoprecipitación .....</b>	<b>69</b>
<b>12. Unión covalente (“cross-linking”).....</b>	<b>70</b>
<b>13. Capacitación <i>in vitro</i> de los espermatozoides.....</b>	<b>70</b>
13.1 Espermatozoides de rata.....	70
13.2 Espermatozoides de ratón .....	71
<b>14. Enzimoimmunoensayo (ELISA) .....</b>	<b>71</b>
<b>15. Obtención de fluido epididimario .....</b>	<b>72</b>
<b>16. Ensayo de decapitación.....</b>	<b>72</b>
<b>17. Ensayo de fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos de rata intactos.....</b>	<b>73</b>
17.1 Medios.....	73
17.2 Estimulación de las hembras.....	73
17.3 Obtención de espermatozoides y coincubación de las gametas .....	74
<b>18. Obtención de zonas pellucidas .....</b>	<b>75</b>
18.1 Mecánicamente, a partir de ovocitos ovulados.....	75
18.2 Separación en gradientes de Percoll .....	75
18.3 Filtración a través de mallas de poro decreciente.....	76
<b>19. Tratamiento con zona pellucida.....</b>	<b>77</b>
19.1 Incubación de los espermatozoides con las zonas pellucidas solubilizadas .....	77
19.2 Desarrollo de un sistema de IIF para un número pequeño de espermatozoides.....	77
<b>20. Secuenciación de la Proteína DE.....</b>	<b>78</b>
<b>21. Preparación de citosoles de testículo y epidídimo de distintas especies .....</b>	<b>78</b>
<b>22. Obtención de ovocitos sin zona.....</b>	<b>79</b>
22.1 Ovocitos de rata .....	79
22.2 Ovocitos de ratón .....	79
<b>23. Obtención de ovocitos inmaduros.....</b>	<b>80</b>
<b>24. Sistema de inseminación intrauterina.....</b>	<b>81</b>
<b>25. Recuperación de ovocitos fertilizados y embriones .....</b>	<b>81</b>
<b>26. Ensayo de fusión <i>in vitro</i>.....</b>	<b>82</b>
26.1 Ensayo de penetración: .....	82
26.2 Técnica de transferencia de colorante Hoechst 33342:.....	83
<b>27. Ensayos de unión al oolema.....</b>	<b>84</b>
<b>28. Inmunofluorescencia indirecta de ovocitos y embriones .....</b>	<b>84</b>
<b>29. Tratamiento con azida y citocalacina B.....</b>	<b>85</b>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>PARTE I - INTERACCION DE LA PROTEINA “DE” CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE .....</b>	<b>87</b>
<b>L1. Tipo de asociación de la proteína DE a la membrana plasmática del espermatozoide.....</b>	<b>87</b>
<b>L2 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de la población de DE “fuertemente unida” en el espermatozoide. ....</b>	<b>89</b>
<b>L3 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de DE en el espermatozoide inmaduro. ....</b>	<b>101</b>
<b>L4 Relación entre el tipo de unión de DE a la membrana del espermatozoide y su comportamiento durante la capacitación. ....</b>	<b>101</b>
<b>L5 Función biológica de las distintas poblaciones de DE .....</b>	<b>107</b>
<b>I.5.1 Función biológica de la población “débilmente unida” .....</b>	<b>107</b>
<b>I.5.2 Función biológica de la población “fuertemente unida” .....</b>	<b>112</b>
<b>I.5.2.1 Establecimiento de las condiciones para el ensayo de fertilización in vitro de ovocitos de rata intactos.....</b>	<b>112</b>
<b>I.5.2.2 Efecto del agregado de anti-DE sobre la penetrabilidad de ovocitos de rata intactos.....</b>	<b>116</b>
<b>I.5.2.3 Efecto de la zona pellucida solubilizada sobre la redistribución de DE.....</b>	<b>116</b>
<b>PARTE II - ESTUDIO DE LA FUNCION BIOLOGICA DE LA PROTEINA HOMOLOGA A “DE” EN EL RATON.....</b>	<b>123</b>
<b>II.1 Secuenciación y análisis de la secuencia de la proteína “DE” .....</b>	<b>123</b>
<b>II.2 Presencia de DE en espermatozoides de ratón y otras especies de mamíferos .....</b>	<b>127</b>
<b>II.3 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de DE en espermatozoides de ratón .....</b>	<b>135</b>
<b>II.4 Participación de DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en el ratón.....</b>	<b>135</b>
<b>II.5 Localización de los sitios de unión para DE en el ovocito de ratón .....</b>	<b>140</b>
<b>II.6 Participación de DE en la fusión cruzada entre espermatozoides de ratón y ovocitos de rata sin zona pellucida. ....</b>	<b>143</b>
<b>PARTE III - PARTICIPACION DE LOS SITIOS DE UNION PARA “DE” EN LA ADQUISICION DE FUSIBILIDAD DEL OOLEMA.....</b>	<b>147</b>
<b>III.1 Comportamiento de los sitios para DE durante la ovogénesis .....</b>	<b>147</b>
<b>III.1.1 Presencia y localización de los sitios de unión para DE durante el crecimiento y la maduración.....</b>	<b>147</b>
<b>III.1.2 Fusogenicidad de la membrana plasmática del ovocito durante el crecimiento y la maduración.....</b>	<b>152</b>
<b>III.1.3 Efecto del agregado de proteína DE sobre la fusibilidad de ovocitos en crecimiento.....</b>	<b>160</b>
<b>III.2 Requerimientos energéticos y de citoesqueleto de la agregación de los sitios de unión para DE.....</b>	<b>163</b>
<b>III.3 Destino de los sitios para DE luego de la fertilización.....</b>	<b>165</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>210</b>

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La fertilización es el proceso por el cual las gametas femenina y masculina se unen para formar la progenie que posee características genéticas únicas, diferentes a las de sus padres.

Desde el punto de vista de sus genomas, ambas gametas son iguales. Sin embargo su ciclo de vida y comportamiento son distintos. Ambos tipos de gametas se producen a partir de células diploides las cuales pueden ser observadas en estadios embrionarios muy tempranos, previos a la formación de las gónadas (Byskov, 1982). Estas células, a las que se denomina células germinales primordiales (CGP), son la única fuente de gametas en el adulto. Originalmente se localizan en el endodermo del saco vitelino y migran desde su posición original hasta el sitio de desarrollo gonadal. Durante esta migración las CGPs se dividen activamente, aumentando más de mil veces su número.

Hasta aquí los eventos son independientes del sexo del embrión, pero a partir de la colonización de los esbozos gonadales, comienzan las diferencias según el embrión sea masculino o femenino. Si el embrión es masculino, se desarrollan cordones celulares que rodean a las células germinales, las cuales se diferencian a espermatogonias y por división meiótica darán origen a los **espermatozoides**. Este proceso se denomina espermatogénesis. En los embriones femeninos, en cambio, las células germinales diferenciadas en ovogonias no permanecen confinadas en cordones celulares y sufren el proceso meiótico denominado ovogénesis, para dar origen a las gametas femeninas, los **ovocitos**.

### 1.Ciclo de vida de las células germinales

El ciclo de vida de las células germinales es diferente según se trate del sexo masculino o femenino (Figura 1). En los machos, las divisiones meióticas no

comienzan hasta un período cercano a la pubertad. Una vez alcanzada la pubertad, los espermatozoides se producen en forma ininterrumpida durante toda la vida del individuo. Por lo tanto, la cantidad de espermatozoides producida durante la vida de un macho es ilimitada.

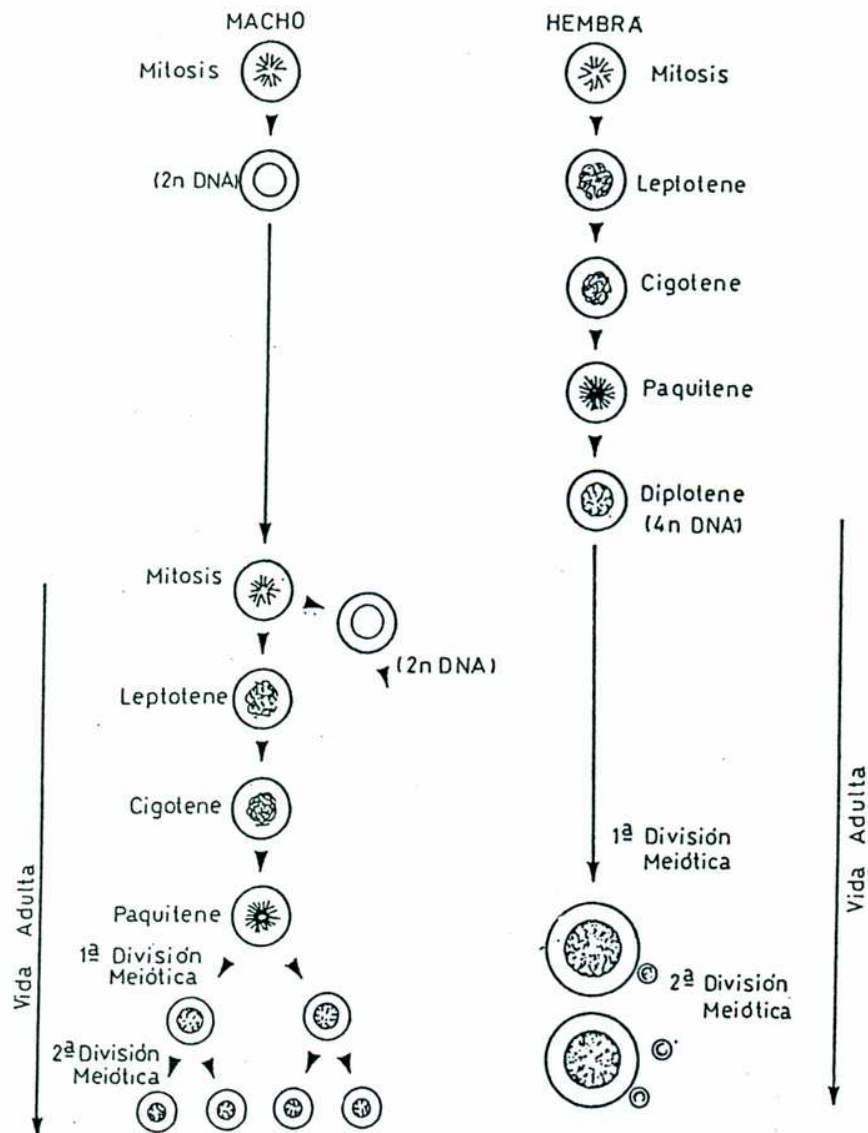
En las hembras, por el contrario, la meiosis comienza muy temprano, generalmente en la vida embrionaria, o en algunas especies como el hámster y el gato en la etapa perinatal (Siracusa *et al.*, 1985). La meiosis avanza hasta el estadio de diplotene y en este estadio se produce un arresto meiótico. Con el advenimiento de la pubertad, y el inicio de los ciclos reproductivos, algunos ovocitos como así también los folículos que los rodean, sufren una serie de cambios entre los que se incluye el reinicio de la meiosis. Ésta vuelve a arrestarse en los ovocitos que han alcanzado la metafase II, y es en este estadio en que se produce la ovulación. La meiosis sólo se completa si el ovocito es fertilizado (Wassarman, 1994). Por lo tanto, en las hembras, las ovogonias poseen un tiempo de vida muy limitado, que no va más allá del período cercano al nacimiento. Así, la producción de ovocitos tiene un límite máximo, establecido por el número de divisiones mitóticas que sufrieron las células germinales antes de comenzar la meiosis. Considerando además, el hecho de que gran parte de los folículos ováricos sufren atresia que lleva a la degeneración del ovocito, la cantidad de ovocitos disponibles resulta muy limitada, sobre todo si se la compara con la producción en el macho.

## **2. El ovocito**

Como se mencionó anteriormente, los ovocitos ovulados se producen mediante un proceso meiótico que transcurre en el ovario denominado ovogénesis.

### **2.1 Ovogénesis**

La ovogénesis puede dividirse en dos etapas: la etapa de crecimiento del ovocito, que transcurre mientras la meiosis está detenida en diplotene y la etapa



**Figura I. Ciclos de vida de las células germinales masculinas y femeninas.**

Las células germinales de ambos sexos se dividen mitóticamente hasta el momento cercano a la diferenciación gonadal. A partir de ese momento, durante la vida fetal, todas las células germinales femeninas entran en meiosis. Las células germinales masculinas mantienen una población que se divide mitóticamente, a partir de las cuales se generarán las células meióticas durante toda la vida adulta del individuo.



de maduración que consiste en el reinicio de la meiosis hasta su nueva detención en metafase II. Si bien el comienzo de la etapa de crecimiento requiere de gonadotrofinas, el desarrollo posterior de la misma es independiente de hormonas (Baker, 1982). El ovario de una hembra, ya sea prepúber o sexualmente madura, contiene en todo momento un 10 % de ovocitos en crecimiento. La maduración, en cambio, requiere de un pico de gonadotrofinas. En cada ciclo aquellos ovocitos que hayan completado la etapa de crecimiento sincronizadamente con el pico de hormonas podrán reiniciar la meiosis, aquellos que lo completen en otro momento degeneran por un proceso apoptótico denominado atresia.

### 2.1.1. Crecimiento del ovocito

El ovocito de mamífero posee un diámetro aproximado de 70 - 120  $\mu\text{m}$  según la especie (Austin, 1961). Si bien su tamaño es relativamente pequeño en comparación a los ovocitos de muchos grupos no mamíferos, el mismo resulta extraordinariamente grande en relación al tamaño de las células somáticas. Este aumento de aproximadamente 300 veces el volumen de una célula somática ocurre mientras el proceso meiótico se encuentra arrestado en la etapa de diplotene. Esta etapa se caracteriza por una enorme actividad metabólica y sintética (Wassarman, 1983), la cual se refleja en un marcado cambio en la ultraestructura del ovocito. Entre estos cambios se incluye la remodelación de estructuras ya existentes y la aparición de algunas organelas nuevas que participan en distintos eventos de la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, tales como los gránulos corticales y la zona pellucida (ZP) (Blanchette, 1961; Adams y Hertig, 1964; Weakley, 1966; Wassarman *et al.*, 1978). Algunos de los cambios que acompañan el crecimiento del ovocito ocurren a nivel de:

- Núcleo: si bien durante la etapa de crecimiento el núcleo o **vesícula germinal (VG)** duplica su diámetro (Chouinard, 1975; Wassarman *et al.*, 1978), el paralelo crecimiento del ovocito resulta en un marcado cambio en

la relación de volumen citoplasma:núcleo, aumentando de 8:1 en ovocitos pequeños a 64:1 en ovocitos que han completado su crecimiento.

- **Nucleolo:** la VG de los ovocitos en crecimiento contiene un único nucleolo grande o, dos nucleolos más pequeños. Durante el crecimiento, los nucleolos aumentan de tamaño y sufren cambios progresivos en la estructura fina de los mismos indicativos de un período de intensa síntesis de ARN ribosomal (Chouinard, 1971; Hartung y Stahl, 1978).
- **Mitocondrias:** el crecimiento del ovocito está acompañado no sólo por un aumento en el número de mitocondrias presentes, sino también por marcados cambios en la ultraestructura de las mismas (Stern *et al.*, 1971; Wassarman *et al.*, 1978). Los ovocitos pequeños poseen mitocondrias elongadas con numerosas crestas orientadas transversalmente. Durante el crecimiento se acumulan mitocondrias con formas más redondeadas u ovaladas con crestas de aspecto columnar.
- **Aparato de Golgi:** al igual que las mitocondrias, el aparato de Golgi sufre grandes cambios ultraestructurales indicativos de una alta actividad secretoria (Wassarman *et al.*, 1978). Durante los primeros estadios del crecimiento, las cisternas presentan un aspecto achatado y a medida que el proceso avanza, las mismas adoptan una apariencia vacuolar y están rodeadas de una gran cantidad de vesículas secretorias.
- **Ribosomas:** paralelamente a los cambios en el nucleolo, en el citoplasma de los ovocitos en crecimiento se acumula una gran cantidad de ARN ribosomal (García *et al.*, 1979). Sin embargo, la densidad de ribosomas disminuye enormemente. El número de ribosomas presentes en polisomas aumenta durante el crecimiento, lo cual es consistente con los cambios en la velocidad de síntesis de proteínas que se dan durante esta etapa.

- Membrana plasmática u oolema: durante la etapa de crecimiento aparecen las microvellosidades características de la membrana plasmática del ovocito. Estas están distribuidas uniformemente en toda la superficie del ovocito (Ebensperger y Barros, 1984). Ha sido descrito que la membrana plasmática de los ovocitos de hámster y de ratón adquieren la capacidad de fusionarse con el espermatozoide durante la etapa de crecimiento (Zuccotti *et al.*, 1991; Zuccotti *et al.*, 1994). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual dicha capacidad es adquirida.

Tal como se mencionó anteriormente aparecen en el ovocito en crecimiento estructuras nuevas como lo son los gránulos corticales y la zona pellucida.

- Gránulos corticales: los gránulos corticales son pequeñas organelas esféricas, rodeadas de membrana que se localizan en la región cortical del ovocito maduro (Gulyas, 1980; Ducibella *et al.*, 1988; Ducibella *et al.*, 1994). Estos gránulos se fusionan con la membrana del ovocito luego de la fertilización, liberan su contenido mayormente compuesto por proteasas, participando así en el mecanismo de prevención de polispermia. La aparición de los gránulos corticales está asociada a la expansión del aparato de Golgi. Distintos estudios morfológicos indican que existen poblaciones heterogéneas de gránulos corticales con respecto a su contenido, que podría estar reflejando una heterogeneidad funcional de los gránulos o simplemente diferentes estados de maduración de los mismos. Recientemente, ha sido descrita una proteína de gránulos corticales de 75 kDa (p75) que es sintetizada por los ovocitos en crecimiento (Pierce *et al.*, 1990; Pierce *et al.*, 1992). Su caracterización podría aumentar el conocimiento de la biosíntesis de gránulos corticales durante esta etapa.
- Zona pellucida: la ZP es una matriz extracelular glicoproteica relativamente gruesa que rodea al ovocito y que aparece durante la etapa de crecimiento, aumentando su espesor a medida que los ovocitos aumentan de diámetro

(Chiquoine, 1960; Kang, 1974; Haddad y Nagai, 1977). La aparición de material de la ZP alrededor del ovocito coincide con el inicio del crecimiento del mismo. La ZP participa en diversas etapas del proceso de fertilización tales como la unión del espermatozoide al ovocito, la inducción de la reacción acrosomal, los mecanismos de prevención de polispermia y, una vez que ha comenzado el desarrollo embrionario temprano, en el mantenimiento de los blastómeros unidos hasta el momento de la eclosión e implantación (Wassarman, 1983). La ZP está formada por 3 o 4 tipos de glicoproteínas que han sido identificadas y caracterizadas en varias especies (ratón: Bleil y Wassarman, 1980; porcino: Dunbar *et al.*, 1980; rata: Araki *et al.*, 1992; equino: Miller *et al.*, 1992; conejo: Lee *et al.*, 1993; bovino: Noguchi *et al.*, 1994; humano: Bercegeay *et al.*, 1995; mono: Martinez *et al.*, 1996). Si bien durante muchos años hubo controversias acerca del origen de las proteínas de la ZP, ha sido demostrado por estudios de inmunohistoquímica e hibridización *in situ* que las proteínas que componen la ZP son sintetizadas y secretadas, exclusivamente, por el ovocito en crecimiento (Philpott *et al.*, 1987; Roller *et al.*, 1989). En los primeros estadios del crecimiento, la ZP aparece como "parches" de filamentos finos entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean. A medida que el ovocito crece, estos "parches" se van uniendo hasta rodear por completo al ovocito. Sin embargo, el contacto entre el ovocito en crecimiento y la capa más interna de células foliculares continua a través de uniones tipo "gap" formadas entre la membrana del ovocito y extensiones de las células foliculares que atraviesan la ZP (Anderson y Albertini, 1976; Gilula *et al.*, 1978). Estas uniones tendrían importancia en el mantenimiento de las funciones nutricias y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito (Wassarman, 1994).

Durante esta etapa los ovocitos adquieren también la capacidad de reiniciar la meiosis, es decir adquieren competencia meiótica. Esto se aplica tanto a ovocitos crecidos *in vivo* como *in vitro*. En ratón, los ovocitos con un diámetro

menor a 60  $\mu\text{m}$  permanecen arrestados en diplotene aún al ser incubados en condiciones que favorezcan la reiniciación de la meiosis (De Smedt *et al.*, 1994), indicando que los ovocitos deben superar un tamaño crítico para poder reasumir la meiosis.

### 2.1.2. Maduración del ovocito

En cada ciclo estral y previo a la ovulación, los ovocitos que han completado su crecimiento en ese momento pueden reiniciar la meiosis. Estos cambios a nivel genómico son acompañados por una serie de cambios a nivel citoplasmático. El proceso de maduración puede ser dividido en las siguientes etapas: ruptura de la VG, condensación de cromosomas, formación del huso correspondiente a la metafase I, emisión del primer corpúsculo polar, y formación del huso correspondiente a la metafase II (Wassarman, 1994) que, como ya se mencionó, es el estadio en el que se produce la ovulación en la mayoría de los mamíferos. La progresión más allá de la metafase II (que implica la separación de las cromátidas y emisión del segundo corpúsculo polar), sólo ocurre si el ovocito es fertilizado. La reasunción de la meiosis hasta metafase II ocurre *in vivo* luego del pico preovulatorio de FSH y LH o, *in vitro*, por la liberación del ovocito del folículo que lo contiene y su incubación en un medio apropiado (Baker, 1982; Wassarman, 1994).

*Ruptura de la VG:* Este proceso comienza con una suave ondulación de la envoltura nuclear que podría estar relacionada con la condensación de los cromosomas. A partir de ese momento comienza la desaparición de los poros nucleares que culmina con la completa desaparición de la envoltura nuclear. La membrana que constituía dicha envoltura, pasa a formar parte del retículo endoplásmico y podría cumplir algún papel en la formación de los pronúcleos luego de la fertilización. El nucleolo desaparece inmediatamente después de entrar en contacto con el citoplasma. Esta constituye la única etapa del proceso de maduración que puede ser detectada por simple observación de los ovocitos por lo que es utilizada como parámetro del inicio del proceso de maduración.

*Condensación de los cromosomas:* En los ovocitos en estadio de VG los cromosomas presentan un aspecto de cepillo o "lampbrush", indicativo de una alta tasa de transcripción, que desaparece durante la etapa de condensación. Cuando esta etapa está casi completa, los cromosomas bivalentes se encuentran asociados a los restos de envoltura nuclear. Luego, los cromosomas se distribuyen en el centro del ovocito perdiendo su contacto con la envoltura nuclear.

*Formación del huso meiótico I:* Mientras transcurren las dos etapas anteriores, aparecen en el citoplasma los cinetocoros y otras estructuras organizadoras de microtúbulos. Los microtúbulos se extienden hacia la VG rota (Calarco *et al.*, 1972). Aparece entonces el huso meiótico que crece progresivamente. Uno de los polos del huso está localizado cerca de la corteza del ovocito. El huso está rodeado de un área densa formado principalmente por mitocondrias y vacuolas, mientras que los gránulos corticales están excluidos de esta región. A medida que la meiosis prosigue hacia anafase, los bivalentes se mueven hacia los lados opuestos del huso meiótico y el huso rota 90°. Esta rotación involucraría a los microfilamentos de actina (Wassarman, 1994).

*Emisión del primer corpúsculo polar.* Durante la progresión de la anafase y la telofase se forma en el ovocito una protuberancia que se convertirá luego en el primer corpúsculo polar. Durante la telofase, se forma alrededor de la región central del huso un anillo membranoso, vacuolar y basofílico comenzando así la separación del corpúsculo (Szöllösi *et al.*, 1972; Calarco *et al.*, 1972). Además de los cromosomas, el corpúsculo polar posee una variedad de organelas que incluye mitocondrias, ribosomas y gránulos corticales (Zamboni, 1970). Si bien en algunas especies el primer corpúsculo polar puede dividirse, en la mayoría de los casos el huso meiótico no se forma, por lo que el corpúsculo puede desaparecer en forma temprana (rata) o permanecer sin dividirse (conejo, hámster) (Austin, 1982). La meiosis prosigue hasta metafase II, estadio en el cual vuelve a arrestarse.

Como se mencionó anteriormente, durante la etapa de crecimiento el ovocito está comunicado con las células foliculares o del cúmulus por uniones tipo "gap". Si se inyecta colorante en algunas células del folículo éste se transfiere entre las células del cúmulus y el ovocito, indicando que las células están acopladas iónica y metabólicamente (Gilula *et al.*, 1978; Racowsky y Satterlie, 1985). Sin embargo, durante el proceso de maduración, existe una disminución en el número de uniones tipo "gap" que, en la mayoría de las especies, desaparecen por completo en el momento de la ovulación (Larsen *et al.*, 1986). En las especies en que esto ocurre las células del cúmulus externas y las de la corona radiata (la capa de células más interna, en contacto directo con la ZP) son morfológicamente indistinguibles entre sí. En cambio, en las especies en que las uniones "gap" persisten en los ovocitos ovulados (como en el conejo), la corona radiata es fácilmente distinguible del resto de las células (Dickman, 1963). Las células del cúmulus comienzan a secretar ácido hialurónico produciéndose el fenómeno de expansión o mucificación del cúmulus (Eppig, 1982).

## **2.2 Estructura general del ovocito ovulado**

Luego de los procesos de crecimiento y maduración que se dan dentro del folículo ovárico, el ovocito maduro es ovulado y transportado al oviducto, donde ocurrirá la fertilización (Harper, 1994). La estructura del ovocito de mamífero ovulado se muestra en la Figura II. El citoplasma del ovocito u **ooplasma**, se encuentra delimitado por la membrana plasmática u **oolema**. El ooplasma contiene las organelas previamente descritas (ver Crecimiento del ovocito) como así también el huso meiótico. La región en la cual se localiza el huso es deficiente en organelas y rica en microfilamentos de actina (Ducibella, 1991). Más aún, la membrana plasmática que recubre el huso meiótico no posee microvellosidades. Por lo tanto, el ovocito ovulado es una célula polarizada.

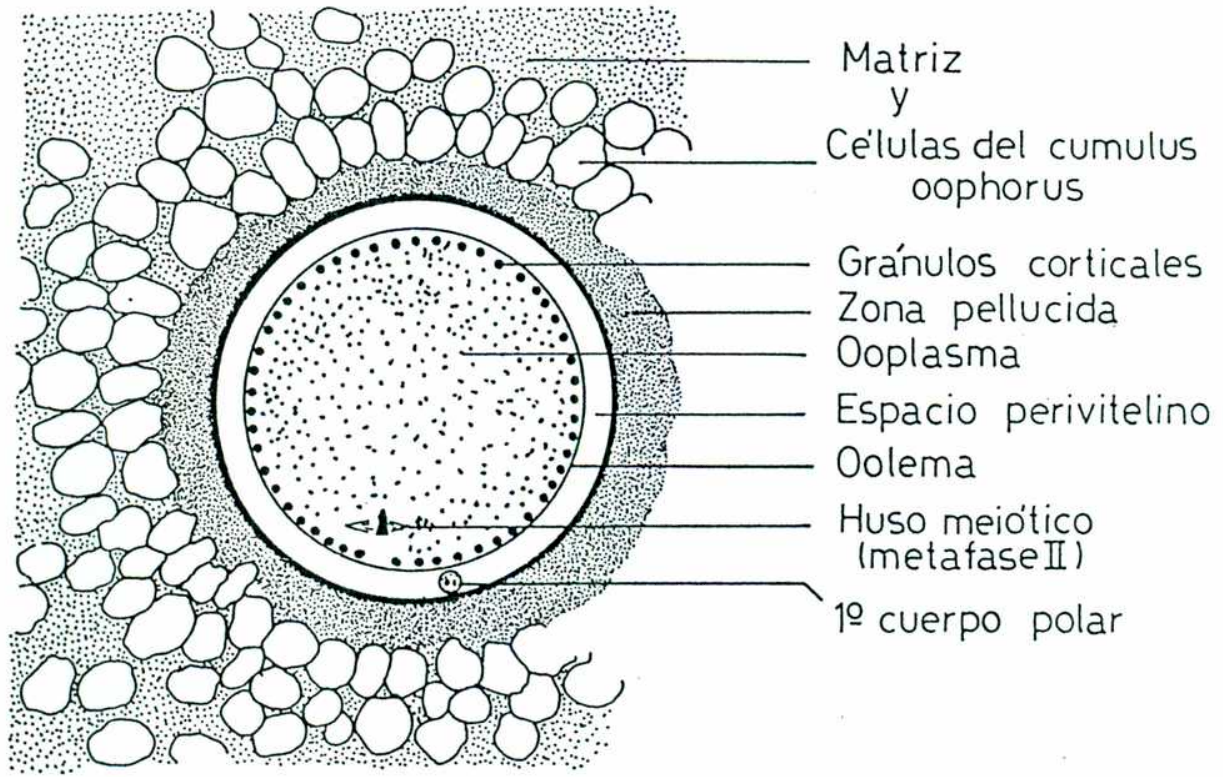


Figura II. Diagrama de la estructura general de un ovocito ovulado de mamífero.



Rodeando al ovocito se encuentra la ZP. Ésta es permeable a macromoléculas grandes y pequeños virus y consiste fundamentalmente en proteínas y carbohidratos, variando la proporción de cada uno de estos componentes según las especies. La solubilidad de la zona en condiciones variables de pH, concentración iónica, temperatura, y en presencia de detergentes y urea, permitió establecer un modelo en el cual los componentes glicoproteicos se encuentran organizados como complejos supramoleculares unidos por fuerzas no covalentes (Wassarman, 1994). Como se mencionó anteriormente, distintas familias de glicoproteínas han sido identificadas como componentes de la ZP de ovocitos de diversas especies. En el ratón, una de las especies en que la ZP ha sido mayormente estudiada, se han identificado 3 glicoproteínas, ZP1, ZP2 y ZP3, con pesos moleculares respectivos de 200.000, 120.000 y 83.000 (Bleil y Wassarman, 1980). Las glicoproteínas de la ZP están organizadas de una forma muy específica. La ZP está compuesta por filamentos largos interconectados entre sí que son polímeros de ZP3 y ZP2 (Greve y Wassarman, 1985; Wassarman y Mortillo, 1991). Los dímeros de ZP2-ZP3 están localizados aproximadamente 140 Å uno del otro, por lo que esta periodicidad estructural es visible en microscopías electrónicas de ZP solubilizada (Wassarman *et al.*, 1996). Estos filamentos están conectados entre sí por ZP1, creando una matriz tridimensional. Por lo tanto, adicionalmente a sus otras funciones, cada glicoproteína de la ZP juega un papel importante en el ensamblado de la misma.

Entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito se encuentra un espacio lleno de fluido, el espacio perivitelino. En la etapa previa a la ocurrencia de la primera división meiótica este espacio es virtual, pero con la emisión de cada corpúsculo polar se libera fluido que llena este espacio.

Rodeando al ovocito con su ZP se encuentra un grupo de células de origen folicular, más específicamente derivadas de las células de la granulosa y que en conjunto forman el *cumulus oophorus*. Dado que, aunque sin uniones intercelulares, el cumulus persiste aún luego de la fertilización en la mayoría de

los mamíferos, se cree que el mismo tendría una función en la etapa post-ovulatoria distinta a la función nutricia de la etapa pre-ovulatoria. Una posible función sería la de permitir una eficaz captura del ovocito por parte de las trompas o, tal vez, debido a la disposición radial de las células, la de guiar al espermatozoide hacia el ovocito (Austin, 1982). Cabe mencionar que ha sido demostrado que el fluido folicular que se arrastra entre las células del cúmulus durante la ovulación, posee diversos factores que favorecerían la interacción espermatozoide-ovocito (Ralt *et al.*, 1991).

El período posterior a la ovulación, durante el cual el ovocito es capaz de fusionarse con un espermatozoide y dar origen a un embrión normal, es lo que se conoce con el nombre de vida fértil del ovocito. En general, los ovocitos permanecen fértiles por un período de 24 hs luego de la ovulación (vaca, oveja, cerdo, hombre). Sin embargo en algunos casos este período no sobrepasa las 12 hs post-ovulatorias (conejo, rata, hámster, ratón) (Austin, 1970). Si el tiempo transcurrido entre la ovulación y la fertilización es mayor que la vida fértil del ovocito, el desarrollo embrionario puede iniciarse, pero generalmente resulta anormal y de duración limitada (Austin, 1982).

### **3. El espermatozoide**

Como ha sido mencionado, el espermatozoide es el producto final de la meiosis en el macho. Los espermatozoides de las distintas especies varían mucho con respecto al tamaño. Los del hombre, conejo y la mayoría de los animales domésticos miden alrededor de 50  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que los de los roedores son mucho más largos, midiendo entre 150 y 250  $\mu\text{m}$  (Setchell, 1982).

Típicamente, la gameta masculina posee dos componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola. A pesar de que estas dos estructuras están presentes en todos los mamíferos, existe una gran variación de forma y tamaño entre los espermatozoides de distintas especies (Yanagimachi, 1981). En la

mayoría de las especies (ej. humano, conejo, cobayo, toro), la cabeza de los espermatozoides posee forma espatulada mientras que los roedores poseen en general, cabeza con forma falciforme.

En la Figura III se muestra un esquema de un espermatozoide de mamífero. La cabeza contiene al núcleo y una estructura denominada acrosoma que posee las enzimas necesarias para atravesar las envolturas que rodean al ovocito y fertilizarlo. La cola, por su parte, contiene la maquinaria y fuentes energéticas necesarias para otorgarle motilidad al espermatozoide.

### **3.1 Estructura de la cabeza:**

La Figura IV muestra un diagrama de un corte sagital de la cabeza de un espermatozoide típico de mamífero. La cabeza está ocupada principalmente por las dos estructuras anteriormente mencionadas: el núcleo y el acrosoma. Existen también pequeñas cantidades de citoplasma y componentes del citoesqueleto, que se localizan en el pequeño espacio entre el acrosoma y el núcleo y por debajo de la membrana plasmática.

El núcleo consiste en una masa de ADN altamente condensada en asociación con proteínas pequeñas, básicas, ricas en cisteínas y argininas, denominadas "protaminas" (Bellvé y O'Brien, 1983). Estas protaminas son producto de la expresión del genoma haploide, ya que el ARN mensajero codificante para las mismas se sintetiza en las espermatidas (Hecht *et al.*, 1986). El complejo altamente condensado ADN-protaminas, se encuentra estabilizado por la presencia de puentes disulfuro entre las protaminas (Setchell, 1982).

El núcleo está rodeado por una envoltura nuclear atípica. La mayor parte de la misma carece de poros nucleares, y la distancia entre las dos membranas que la forman es mucho más pequeña que la existente en las células somáticas. Sin embargo, en la región más caudal, existen gran cantidad de poros y la distancia

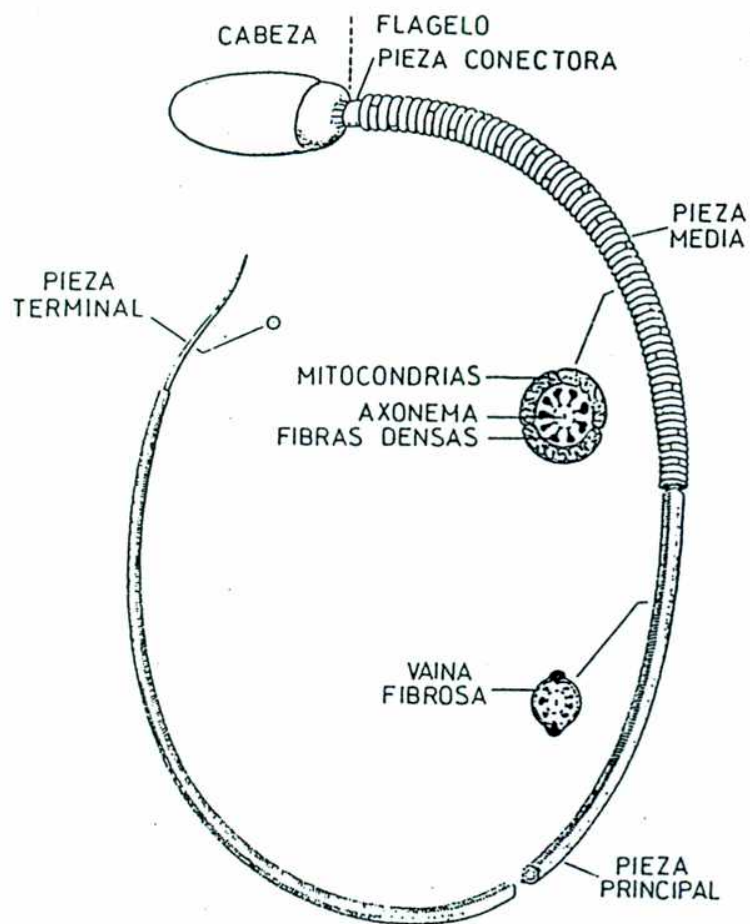
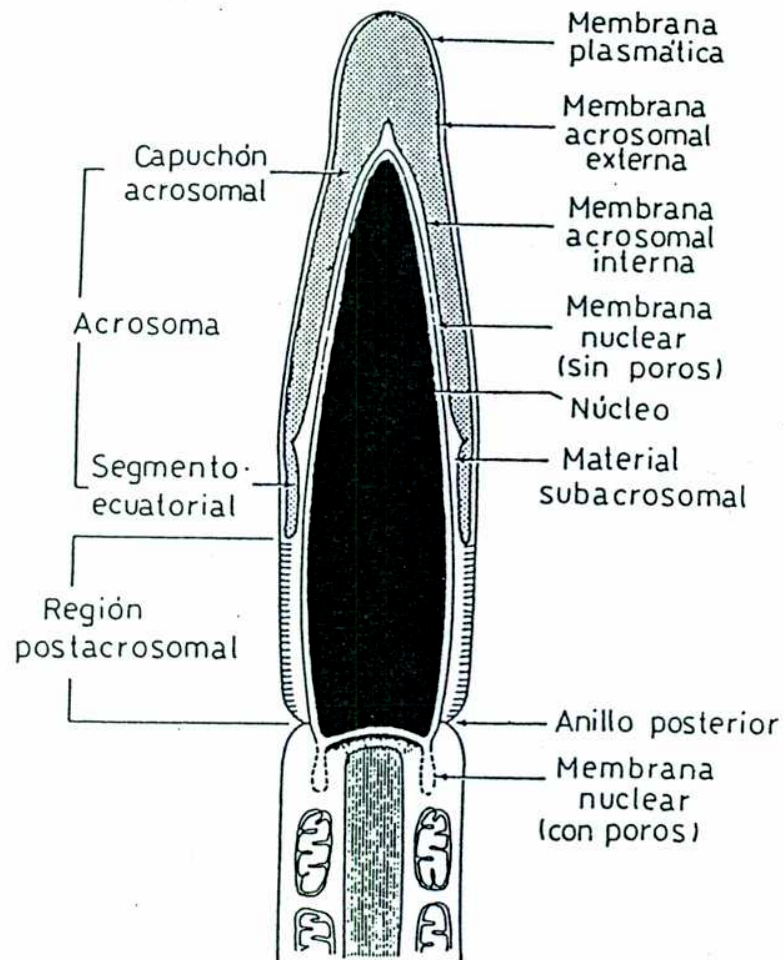


Figura III. Esquema de un espermatozoide típico de mamífero

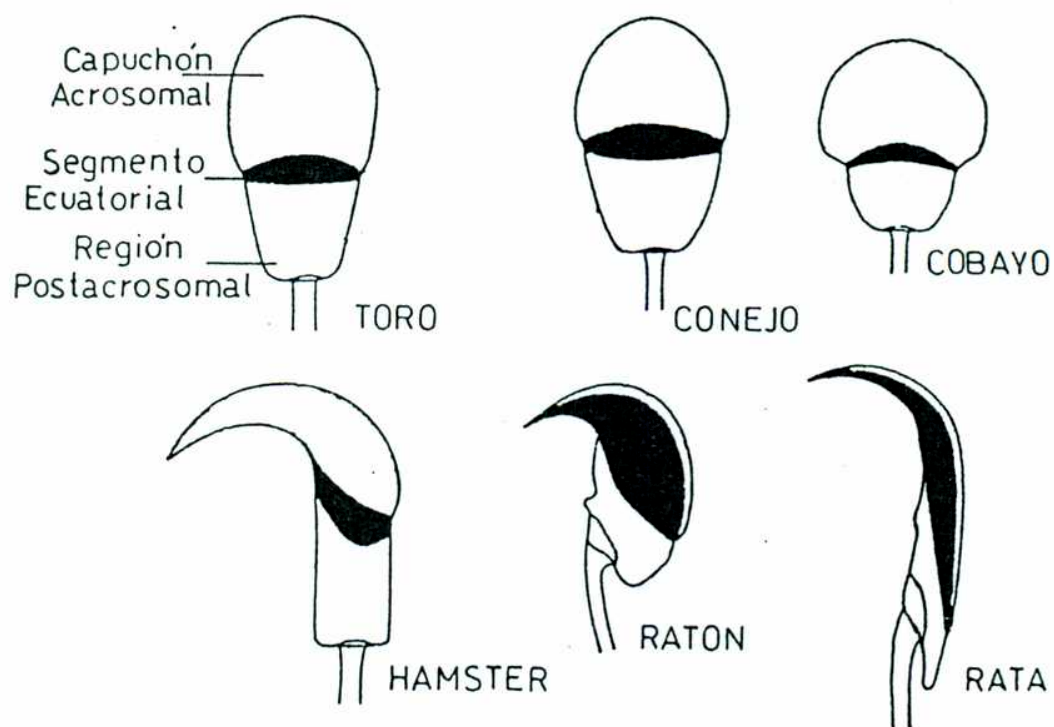


**Figura IV. Diagrama de un corte sagital de la cabeza de un espermatozoide de mamífero**

entre ambas membranas es similar a la existente en otros tipos celulares (Friend y Fawcett, 1974).

El acrosoma se origina en la espermatίδα a partir del aparato de Golgi y consiste en una estructura rodeada de membrana que contiene un conjunto de enzimas necesarias para la penetración del ovocito (este punto se discutirá más adelante). El acrosoma se localiza en el extremo anterior de la cabeza, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática. Debido a que el núcleo se inserta profundamente en el acrosoma, la membrana plasmática de éste queda dispuesta en dos partes: una parte situada inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa, y otra rodeando a la región anterior de la envoltura nuclear, la membrana acrosomal interna. Entre ambas se encuentra el contenido acrosomal. Si bien tanto la membrana acrosomal externa como la interna constituyen una única membrana, ambas poseen características diferentes. Por ejemplo, la membrana acrosomal interna del ratón y el conejo resulta, a diferencia de la externa, sumamente resistente a la disrupción química y física, incluyendo tratamientos con detergentes no iónicos y sonicación (Rahi *et al.*, 1983; Huang y Yanagimachi, 1985).

El acrosoma consiste de dos segmentos: el capuchón acrosomal (también llamado acrosoma anterior) y el segmento ecuatorial. La distribución y tamaño relativo del capuchón acrosomal y segmento ecuatorial varían según las especies (Yanagimachi, 1981). En la Figura V se observan las diferencias en los tamaños relativos de ambas estructuras tanto en espermatozoides con cabeza espatulada como falciforme. El término "segmento ecuatorial" resulta apropiado para espermatozoides cuyas cabezas poseen formas espatuladas ya que, en estos casos, la región mencionada se encuentra formando una banda sobre el área ecuatorial de la cabeza. Sin embargo, en espermatozoides con cabezas falciformes, el segmento ecuatorial cubre la mayor parte de la superficie lateral de la cabeza (Phillips, 1977; Yanagimachi, 1981).



**Figura V. Diagramas ilustrando las distintas formas que presenta la cabeza de espermatozoides de distintas especies como así también el tamaño relativo y relación topográfica entre el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial.**

El acrosoma ha sido descrito como un lisosoma especializado ya que contiene enzimas encontradas en lisosomas primarios típicos (Allison y Hartree, 1970; Hartree, 1975). A su vez, contiene como componentes mayoritarios dos enzimas exclusivas del espermatozoide, como lo son la hialuronidasa y la acrosina. La acrosina es una serin-proteasa similar a la tripsina. La hialuronidasa presente en el espermatozoide es distinta a la lisosomal, y al igual que la acrosina, sería una isozima específica de células espermatogénicas (Goldberg, 1977). La presencia de estas dos enzimas en la matriz acrosomal ha sido demostrada (Yanagimachi, 1994). Estudios posteriores mostraron la presencia de acrosina en la membrana acrosomal interna (Capote *et al.*, 1989) y de hialuronidasa en la membrana plasmática del espermatozoide (Lin *et al.*, 1994; Overstreet *et al.*, 1995; Cherr *et al.*, 1996).

En la cabeza del espermatozoide se encuentran también estructuras de citoesqueleto, que se distribuyen en dos regiones: el citoesqueleto subacrosomal o perforatorium, localizado entre el acrosoma y el núcleo, el cual está compuesto principalmente por material denso (Bellvé y O'Brien, 1983) y su desarrollo es más prominente en espermatozoides con forma falciforme, y el citoesqueleto postacrosomal, que se localiza entre el núcleo y la membrana plasmática de la región postacrosomal del espermatozoide, el cual está compuesto por filamentos ordenados (Koehler, 1970; Courtens *et al.*, 1976; Fouquet *et al.*, 1992).

### **3.2 Estructura de la cola**

Como se ha mencionado previamente, la cola del espermatozoide, provee la motilidad necesaria para que la gameta masculina llegue hasta la superficie del ovocito y penetre sus envolturas. Los segmentos que componen el flagelo son: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Figura III). La pieza conectora une el aparato motriz de la cola al núcleo. En el centro de la cola, desde la pieza conectora hasta el extremo, se encuentra el



axonema, el cual posee la misma organización que las cilias y flagelos presentes en células animales y vegetales. El mismo consiste de dos microtúbulos centrales rodeados de nueve pares de microtúbulos periféricos (Linck, 1979). Rodeando al axonema se encuentran nueve fibras densas (Kim *et al.*, 1995), cada una de las cuales corre paralela a uno de los nueve pares de microtúbulos periféricos. En toda la pieza media, rodeando en forma de hélice a las fibras densas, se disponen las mitocondrias. El número de giros que forman las mitocondrias, así como el largo de la pieza media varían entre especies (Phillips, 1977). La pieza principal se caracteriza por ser el segmento más largo del flagelo. Esta región no contiene mitocondrias y posee en cambio una estructura de naturaleza proteica denominada vaina fibrosa, la cual se dispone inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, rodeando al axonema y a las fibras densas. Por su parte, la pieza terminal sólo consiste en los microtúbulos del axonema, rodeados por la membrana plasmática.

### **3.3 Dominios de la membrana plasmática**

Una característica única de los espermatozoides es que su membrana plasmática se encuentra subdividida en dominios de límites claramente definidos que difieren en su composición y función. Estas diferencias fueron evidenciadas por la utilización de distintas técnicas como microscopía electrónica (Yanagimachi, 1972), criofractura (Friend y Fawcett, 1974; Suzuki y Nagano, 1980; Suzuki, 1981), marcación de los espermatozoides con lectinas (Nicolson *et al.*, 1972; Koehler, 1981) y anticuerpos mono y policlonales (Gaunt *et al.*, 1983; Primakoff y Myles, 1983; Villaroya y Scholler, 1987). Las diferencias de organización y composición entre regiones permitieron establecer el concepto de que la membrana plasmática del espermatozoide es un mosaico de dominios restringidos que reflejan funciones especializadas de los componentes citoplasmáticos y de superficie del espermatozoide (Eddy y O'Brien, 1994). Es así que se han identificado antígenos específicos de las células espermáticas (Tung y Fritz, 1978; Feutcher *et al.*, 1981; Gaunt *et al.*, 1983; Primakoff y Myles,

1983; Villaroya y Scholler, 1987) o bien compartidos con otros tipos celulares (antígeno H-Y, (Koo *et al.*, 1973); antígeno embrionario F9, (Fellous *et al.*, 1974); galactosiltransferasa, (Lopez *et al.*, 1985)), los cuales se encuentran restringidos a dominios únicos de la membrana plasmática.

Los dominios principales de la membrana de la cabeza son: a) el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial, ambos cubriendo las regiones correspondientes del acrosoma, y b) la región postacrosomal cubriendo la región de la cabeza posterior al acrosoma. El anillo posterior, situado entre la cabeza y la cola, formaría un sello entre los compartimentos citoplasmáticos de estas dos regiones (Eddy y O'Brien, 1994). La membrana de la cola se divide en los dominios correspondientes a la pieza media y cola posterior.

Si bien no se conocen los mecanismos responsables del establecimiento de los dominios, es sumamente probable que los mismos se establezcan durante la espermiogénesis, proceso por el cual la espermatida se diferencia en espermatozoide (Cowan y Myles, 1993). Entre los elementos involucrados en este proceso, el citoesqueleto jugaría un papel de importancia ya que se asociaría a través de proteínas intermediarias a proteínas transmembrana, las cuales, a su vez, definirían los límites y contenidos de los diferentes dominios (Eddy y O'Brien, 1994). Por otro lado, las células de Sertoli, a través de sus uniones especializadas con las espermatidas, podrían favorecer la generación de la forma de la cabeza o el mantenimiento de la polaridad necesaria para la formación de los dominios (Russell, 1980).

El hecho de que un antígeno se encuentre restringido dentro de un dominio no implica necesariamente que el mismo se vea impedido de difundir dentro del dominio en que se encuentra. Es así que, por ejemplo, el antígeno de cobayo PT-1 posee libre difusión en la región distal de la cola pero se encuentra prevenido de migrar hacia la pieza media (Myles *et al.*, 1984). En la rata se han descrito dos antígenos presentes en toda la cola que muestran agrupamiento

inducido por anticuerpo, pero sin que éstos migren a la cabeza (Gaunt *et al.*, 1983). Finalmente, cabe destacar que no todos los componentes de la membrana se encuentran restringidos en su migración entre dominios. Utilizando la técnica de recuperación de fluorescencia luego del blanqueo por luz ("photobleaching"), se observó un libre intercambio de un análogo lipídico por difusión lateral entre la membrana plasmática de la cabeza y la pieza media, y entre la pieza media y la región distal de la cola (Wolf y Voglmayr, 1983).

#### **4. Maduración epididimaria**

Cuando son liberados del testículo, los espermatozoides son células altamente diferenciadas. Sin embargo, no tienen aún capacidad de moverse progresivamente o de interactuar con el ovocito. Dichas capacidades son adquiridas durante un proceso de maduración que ocurre a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo (Bedford, 1979; Austin, 1985).

El epidídimo es un conducto único, largo y muy replegado, que cubre el borde posterior del testículo. Convencionalmente, y si bien no existen límites anatómicos definidos, el epidídimo se divide en tres regiones: caput (cabeza), corpus (cuerpo) y cauda (cola), siendo a su vez divididas cada una de ellas en proximal y distal. La región del epidídimo en la cual los espermatozoides adquieren capacidad de fertilizar al ovocito varía según la especie. Adicionalmente, existiría una cierta variabilidad entre los espermatozoides de una misma región del epidídimo, por lo que distintos espermatozoides de una misma región presentan distinta capacidad de fertilizar al ovocito. Por lo tanto, se define como la región del epidídimo en la que se adquiere capacidad fertilizante a aquella en que al menos algunos espermatozoides presentan capacidad de fertilizar al ovocito. En ciertas especies, como el jabalí, aparecen algunos espermatozoides fértiles en el caput, mientras que en otras, como la rata, dicha capacidad aparece en el segmento distal del corpus (Dacheux y Paquignon, 1980). Si bien se observa capacidad de fertilizar al ovocito en

espermatozoides provenientes de regiones proximales, es generalmente aceptado que en el cauda epididimario de todas las especies, la gran mayoría de los espermatozoides poseen capacidad fertilizante (Yanagimachi, 1994).

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Blaquier *et al.*, 1973; Dyson y Orgebin-Crist, 1973) y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento de la tasa de glucólisis y del consumo de oxígeno. Pero sin lugar a dudas, la mayor parte de los cambios ocurren a nivel de la membrana plasmática. Esto resulta lógico teniendo en cuenta que la maduración epididimaria trae como consecuencia la adquisición de capacidad del espermatozoide de interactuar con el ovocito, interacción que ocurre a través de la superficie de ambas gametas.

Se han caracterizado, en gran parte, los cambios moleculares y bioquímicos responsables de las alteraciones de las propiedades de la membrana plasmática de los espermatozoides. Entre los mismos se incluyen alteraciones en la carga de superficie, en las propiedades de unión de lectinas, en la distribución de partículas intramembranas, en el contenido lipídico, en los carbohidratos de superficie y en la composición proteica y glicoproteica (Eddy y O'Brien, 1994). Estos cambios surgen como consecuencia de adición de nuevos componentes a la membrana del espermatozoide y de pérdida, desenmascaramiento y/o modificación de componentes preexistentes. Es generalmente aceptado que todos los cambios producidos durante esta etapa de maduración son tendientes a estabilizar la membrana del espermatozoide.

Mediante la utilización de distintas estrategias experimentales se ha estudiado la síntesis y secreción de glicoproteínas de origen epididimario, como así también su adsorción o integración a diferentes dominios de la membrana

plasmática del espermatozoide. Así, se han detectado nuevos componentes de la membrana del espermatozoide por marcación vectorial de espermatozoides provenientes de distintas regiones del epidídimo (Jones *et al.*, 1981; Olson y Danzo, 1981; Brown *et al.*, 1983; Zaheb y Orr, 1984). Se han estudiado los cambios en la composición proteica de espermatozoides de distintas regiones del epidídimo por electroforesis en geles de poliacrilamida en ratón (Cornwall *et al.*, 1990; Jimenez *et al.*, 1992) rata (Jones *et al.*, 1983; Kaur *et al.*, 1991), carnero (Voglmayr *et al.*, 1983), toro (Vierula y Rajaniemi, 1980), conejo (Nicolson *et al.*, 1979), jabalí (Russell *et al.*, 1980), chimpancé (Young *et al.*, 1985) y humanos (Ross *et al.*, 1990). También se han detectado cambios en la composición de superficie utilizando estrategias de inmunodetección tanto con anticuerpos mono como policlonales en distintas especies (rata: Cameo y Blaquier, 1976; Olson y Hamilton, 1978; Lea *et al.*, 1978; Kohane *et al.*, 1980; Wong y Tsang, 1982; Rifkin y Olson, 1985; Vreeburg *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1994; Eccleston *et al.*, 1994; Siiteri y Hamilton, 1995; ratón: Rankin *et al.*, 1992; Vierula *et al.*, 1995; conejo: Moore, 1980; hámster: Gonzalez Echeverria *et al.*, 1982; Bérubé *et al.*, 1996; humano: Tezon *et al.*, 1985; Boué *et al.*, 1996).

Si bien los cambios en la composición proteica de los espermatozoides durante la maduración epididimaria han sido ampliamente estudiados, es poca la información acerca de la función biológica de las proteínas epididimarias. En este sentido, la participación de estas proteínas en la adquisición de la capacidad fertilizante que ocurre durante el proceso de maduración ha sido demostrada a través del aumento de dicha capacidad fertilizante obtenido por el agregado de proteínas epididimarias a espermatozoides inmaduros (Orgebin-Crist y Fournier-Delpech, 1982; Gonzalez Echeverria *et al.*, 1984; Cuasnicu *et al.*, 1984a,c; Moore y Hartman, 1986; Jean *et al.*, 1995), como así también por el efecto inhibitorio de anticuerpos específicos contra dichas proteínas sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides maduros (Moore, 1981; Cuasnicu *et al.*, 1984b; Cuasnicú *et al.*, 1990).

Es importante aclarar que la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter "potencial", ya que los espermatozoides maduros, como así también los espermatozoides eyaculados, deben permanecer en el tracto femenino durante cierto período para poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración y, finalmente, penetrar al ovocito. Es durante este lapso en el que los espermatozoides sufren una serie de cambios fisiológicos que, en su conjunto, se denominan **capacitación** (Chang, 1952; Austin, 1952).

### **5. Capacitación del espermatozoide**

A pesar de haber transcurrido casi 40 años desde el descubrimiento de la capacitación, no ha sido posible aún comprender los mecanismos moleculares íntimos involucrados en este proceso. Sin embargo, existen numerosas evidencias indicando que la remoción y alteración de sustancias adsorbidas o integradas a la membrana plasmática durante la maduración y/o eyaculación, constituirían una parte esencial de dicho proceso (Austin, 1985). Si bien durante la capacitación ocurren cambios químicos y estructurales en el espermatozoide, ésta es considerada como un proceso que, en general lleva al aumento de la fluidez y la desestabilización de la membrana del espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

El proceso de capacitación puede ser llevado a cabo *in vitro* en medios químicamente definidos (Toyoda *et al.*, 1971), por lo cual el análisis de los mecanismos responsables de la capacitación se ha visto enormemente simplificado. Sin embargo, algunos autores sugieren tener muy en cuenta que naturalmente la capacitación ocurre en el tracto femenino, el cual se encuentra bajo influencia hormonal y nerviosa (sistema autónomo). Por lo tanto, si bien el producto final es el mismo, los mecanismos involucrados en la capacitación *in vivo* e *in vitro* podrían ser distintos (Yanagimachi, 1994). Otros autores postulan que el proceso de capacitación podría ocurrir como el desplazamiento de un

equilibrio (Oliphant *et al.*, 1985). La capacitación ocurriría cuando los espermatozoides se encuentran en un medio que favorece la disociación en masa. *In vivo*, esto tendría lugar cuando los espermatozoides pasan de un medio muy rico en factores estabilizantes, tal como el tracto masculino, a un medio desprovisto de los mismos, como lo es el tracto femenino. *In vitro*, esto se mimetizaría por la alta dilución de los espermatozoides en el medio de incubación. Los distintos tiempos de capacitación para las distintas especies podrían explicarse, según estos mismos autores, en base a las diferentes afinidades de los factores mencionados a la membrana de los espermatozoides.

El sitio preciso donde comienza y termina la capacitación en el tracto de la hembra varía según la especie. En las especies donde el semen es depositado en el útero durante el coito (cerdo, caballo, perro y varios roedores), los espermatozoides completarían la capacitación en el primer segmento del oviducto, donde serían almacenados hasta el momento de la fertilización. En las especies en las que los espermatozoides son depositados en la vagina durante el coito (bovino, ovino y primates), la capacitación comienza mientras los espermatozoides atraviesan el moco cervical y no es claro aún donde se completa. De acuerdo a los resultados obtenidos por distintos grupos (Adams y Chang, 1962; Bedford, 1969; Overstreet *et al.*, 1978; Bedford, 1983) resulta probable que, en estos casos, los espermatozoides se capaciten parcialmente en el útero, y luego completen su capacitación en el oviducto.

Bedford (1967) sugiere que los espermatozoides se capacitan más eficientemente si atraviesan el útero y el oviducto. Sin embargo, distintas evidencias sugieren que la capacitación no es específica de órgano (Rowland, 1957; McDonald y Sampson, 1957; Adams y Chang, 1962). Los espermatozoides incubados en localizaciones ectópicas como el colon, vejiga, vesícula seminal, o cámara anterior del ojo pueden comenzar la capacitación, aunque no logran completarla (Noyes *et al.*, 1958; Hamner y Sojka, 1967), lo cual sugirió en un principio que el tracto genital de la hembra poseía factores

específicos que favorecían la capacitación. En este sentido, el "potencial capacitante" del tracto femenino depende en gran medida de la situación endócrina de la hembra. Es así que ha sido demostrada una inhibición del potencial capacitante del útero en el conejo (Chang, 1958; Bedford, 1970) y del oviducto en el hámster (Viriyapanich y Bedford, 1981) en momentos del ciclo dominados por progesterona. Una segunda evidencia a favor de la influencia de factores específicos presentes en el tracto de la hembra sobre el proceso de capacitación, lo constituye el hecho de que el "potencial capacitante" sea diferente para cada región del tracto femenino, pudiendo observarse un sinergismo entre el útero y el oviducto (Adams y Chang, 1962).

Resulta interesante mencionar que la capacitación no es un fenómeno especie-específico ya que los espermatozoides y ovocitos de una especie pueden completar la fertilización en el tracto genital de una hembra de otra especie (Saling y Bedford, 1981). Por otro lado, utilizando estrategias experimentales similares, pudo determinarse que el tiempo de capacitación es específico de especie (Saling y Bedford, 1981). Al considerar el tiempo de capacitación, es importante destacar que, similarmente a lo que ocurre durante la maduración, todos los espermatozoides de una misma población sometidos a condiciones *in vitro* idénticas, no se capacitan al mismo tiempo (Bedford, 1983). El "tiempo de capacitación" es solamente una medida del momento en el cual algunos espermatozoides de una muestra adquieren capacidad de fertilizar un ovocito. Si bien *in vivo* estas variaciones podrían deberse a diferencias en la velocidad de transporte de los espermatozoides en el tracto femenino, *in vitro* la asincronía en la capacitación observada *in vitro* estaría indicando la existencia de variaciones individuales de los espermatozoides.

Tal como se mencionó anteriormente, los cambios más prominentes que ocurren durante la capacitación consisten en la alteración en la composición proteica de la membrana plasmática, ya sea por remoción o por modificación de sus componentes (Oliphant, 1976; Okabe *et al.*, 1986; Miller y Ax, 1990; Fraser



*et al.*, 1990). Si bien no se conoce en profundidad la naturaleza de las proteínas removidas durante la capacitación, se cree que debería tratarse de proteínas periféricas, ya que para la remoción de proteínas integrales de membrana se requerirían condiciones más drásticas que las que enfrentan los espermatozoides durante la capacitación (Yanagimachi, 1994). Entre los factores que se liberan del espermatozoide durante la capacitación se encuentran la proteína caltrina de 5-10 kDa (Coronel y Lardy, 1992), una proteína de 6.4 kDa que posee actividad de inhibidor de proteinasas (Boettger-Tong *et al.*, 1992), un antígeno de ratón de origen epididimario, SMA 4, el cual se localiza en la cola de los espermatozoides maduros, pero desaparece durante la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro* (Vernon *et al.*, 1982; Vernon *et al.*, 1985), y distintas proteínas sintetizadas en la vesícula seminal las cuales se postulan como estabilizadoras de la membrana, tales como el denominado "factor estabilizante del acrosoma", ASF, (Oliphant *et al.*, 1985) y la  $\alpha$ -lactalbúmina (Shur y Hall, 1982).

Las proteínas que son removidas podrían actuar entrecruzando a las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática, impidiendo su movimiento lateral dentro de la bicapa lipídica. Por lo tanto, su elución de la membrana, liberaría a las proteínas intrínsecas permitiendo su movimiento más allá del dominio en el cual se encontraban originalmente localizadas. De este modo podrían explicarse, en parte, los fenómenos de redistribución de componentes proteicos de la membrana que se han asociado con la capacitación, entre los que se incluye un antígeno de la cabeza del espermatozoide humano originalmente localizado en toda la región acrosomal y que se relocaliza a la región postacrosomal (Villaroya y Scholler, 1987), la proteína PH-20 de cobayo que migra de la región postacrosomal a la membrana acrosomal interna (Primakoff *et al.*, 1985), la galactosiltransferasa de ratón que migra de la región dorsal del acrosoma al segmento ecuatorial (Lopez y Shur, 1987), el antígeno 2B1 originalmente localizado en la cola del espermatozoide de rata, posteriormente localizado en la región acrosomal (Jones *et al.*, 1990) y la proteína epididimaria de rata DE

originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma que migra al segmento ecuatorial (Rochwerger y Cuasnicu, 1992).

La remoción de colesterol de la membrana del espermatozoide, constituye también un evento importante en el proceso de capacitación (Bearer y Friend, 1982; Suzuki y Yanagimachi, 1989), lo cual es razonable teniendo en cuenta el papel que cumple el colesterol en la regulación de la fluidez de membrana. La albúmina y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentes en el tracto femenino serían las encargadas de remover dicho colesterol (Davis *et al.*, 1979; Ravnik *et al.*, 1992; Ravnik *et al.*, 1993).

Recientemente se ha descrito una asociación entre la capacitación y el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina (Visconti *et al.*, 1995a,b). Sin embargo, no queda claro aún la naturaleza de las proteínas fosforiladas y, por otro lado, si estos cambios son causa o consecuencia del proceso de capacitación.

En 1957, Chang demostró que al incubar espermatozoides capacitados por un corto tiempo en plasma seminal, lograba la reversión de los mismos a un estado de "decapitación". Este estado de decapitación podía ser revertido al incubar los espermatozoides nuevamente bajo condiciones capacitantes. Por lo tanto, este trabajo permitió establecer la existencia de factores decapitantes en el plasma seminal, los cuales serían removidos durante la capacitación. Posteriormente, Weinman y Williams (1964), demostraron que el fluido epididimario también presenta actividad decapitante.

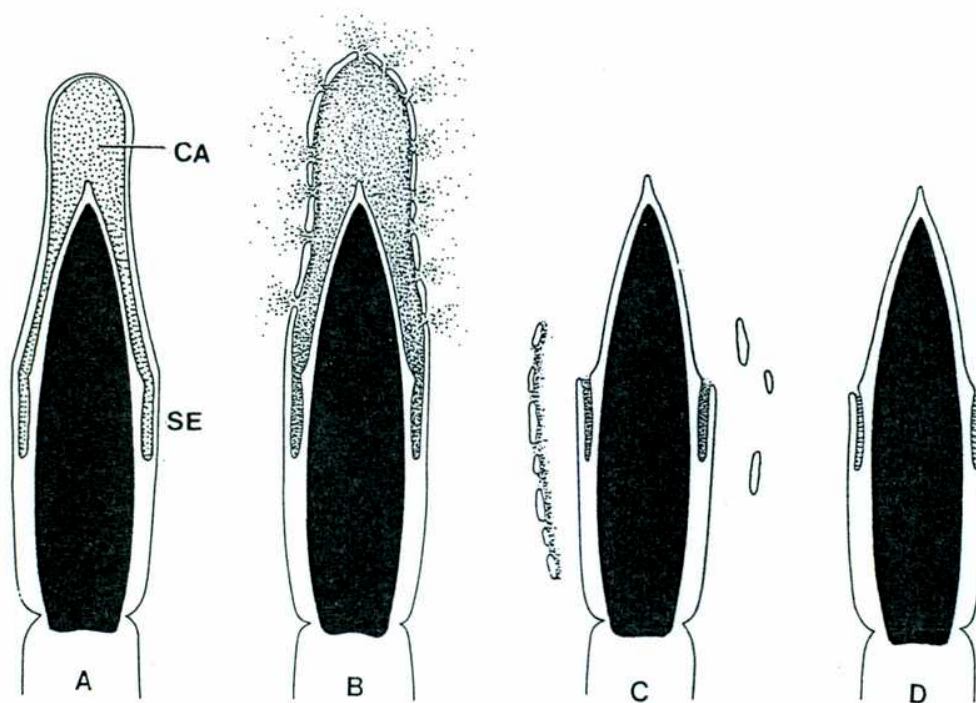
Las modificaciones que ocurren en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios a nivel tanto de la cabeza como de la cola del espermatozoide. En el primer caso, dichos cambios permiten que el espermatozoide pueda sufrir la denominada **reacción acrosomal**. Los cambios producidos en la membrana plasmática de la cola, por su parte, permiten al espermatozoide desarrollar el fenómeno de **hiperactivación**.

## 6. Reacción acrosomal

Para que el espermatozoide capacitado pueda penetrar al ovocito es necesaria la disrupción del acrosoma. A este proceso exocitótico se lo denomina **reacción acrosomal** (Figura VI). Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan, culminando con la vesiculación de la región acrosomal anterior o capuchón acrosomal y liberación de la mayor parte del contenido acrosomal. Las vesículas mixtas de membrana acrosomal externa y membrana plasmática se desprenden, fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del acrosoma o del capuchón acrosomal". La membrana acrosomal interna y la membrana plasmática que recubre el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión con el ovocito (Yanagimachi, 1994). Se denomina *intacto* a aquel acrosoma que no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, *modificado* a aquel que presenta alteraciones morfológicas tales como hinchamiento o rugosidades y *reaccionado* a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal.

### 6.1 Significado biológico de la reacción acrosomal

Dado que el acrosoma del espermatozoide de mamífero contiene abundante cantidad de hialuronidasa, se postuló a dicha enzima como la responsable de digerir la matriz del cumulus oophorus. La acrosina, por su parte, por tratarse de una proteasa, favorecería el pasaje del espermatozoide a través de la ZP. Aunque hasta el momento no existen evidencias que demuestren inequívocamente las funciones de estas enzimas, no caben dudas de que la ocurrencia de la reacción acrosomal resulta imprescindible para que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito (Yanagimachi, 1981).



**Figura VI. Diagramas mostrando la progresión de la reacción acrosomal.**

(A): Espermatozoide con el acrosoma intacto. (B): Aparición de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, y posterior vesiculización, permitiendo la liberación del contenido acrosomal. (C,D); La reacción se ha completado. Las vesículas se desprenden como consecuencia del avance del espermatozoide. (CA) capuchón acrosomal, (SE) segmento ecuatorial.

Es así que la reacción acrosomal cumpliría una doble función:

a) permitir la liberación o exposición de las enzimas acrosomales que, como ya se mencionó, ayudarían en el pasaje del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito;

b) permitir, mediante un mecanismo aún desconocido, un cambio fisiológico en el espermatozoide, como consecuencia del cual la membrana plasmática adquiere la capacidad de fusionarse con el oolema.

### **6.2 Detección de la reacción acrosomal**

La reacción acrosomal de espermatozoides de ciertas especies tales como el hámster y el cobayo puede ser detectada por microscopía óptica en espermatozoides móviles sin ningún tratamiento previo de los mismos (cobayo: 40x, (Yanagimachi, 1972); hámster: 400x, (Yanagimachi y Phillips, 1984)).

Debido a que los espermatozoides de muchas especies tales como ratón, humano, toro y rata presentan acrosomas muy pequeños, resulta difícil la evaluación directa de la ocurrencia de la reacción acrosomal. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes técnicas de tinción para la detección de la reacción acrosomal en espermatozoides fijados. Entre ellas se incluyen: antibióticos fluorescentes (Saling y Storey, 1979); colorantes específicos (Talbot y Chacon, 1980; Aarons *et al.*, 1992); uso de lectinas (Cross *et al.*, 1986; Cross y Watson, 1994); anticuerpos contra el contenido acrosomal (Wolf *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1987) y anticuerpos contra componentes de la membrana acrosomal (Topfer-Petersen *et al.*, 1987). Dado que la muerte del espermatozoide produce la liberación del capuchón acrosomal por un mecanismo que no involucra la vesiculización del mismo (reacción acrosomal falsa), la tinción para detectar el estado acrosomal, es acompañada por una tinción vital que permite distinguir espermatozoides vivos de muertos.

Cabe aclarar que, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, hasta el momento no se ha desarrollado ninguna técnica que permita evaluar por métodos ópticos la ocurrencia de la reacción acrosomal en espermatozoides de rata.

### **6.3 Inductores de la reacción acrosomal**

Las evidencias encontradas hasta el momento en distintas especies indican que la gran mayoría de los espermatozoides que nadan libremente en el fluido oviductal, presentan sus acrosomas intactos. Algunos espermatozoides que nadan a través del cúmulus pueden presentar un estadio inicial de la reacción acrosomal (Cummins y Yanagimachi, 1986). Estos resultados estarían indicando la naturaleza inductora tanto del cumulus oophorus como de la ZP. No existen dudas acerca de la capacidad de inducción de la reacción acrosomal por parte de la ZP *in vitro* (Florman y Storey, 1982; Uto *et al.*, 1988; Yoshimatsu y Yanagimachi, 1988). Inclusive, sus componentes solubilizados son eficientes inductores de la reacción acrosomal en todas las especies estudiadas hasta el momento (ratón: (Florman y Storey, 1982; Bleil y Wassarman, 1983); hámster: (Cherr *et al.*, 1986); bovino: (Florman y First, 1988); jabalí: (Berger *et al.*, 1988); conejo: (O'Rand y Fisher, 1987); humano: (Cross *et al.*, 1988)). Como ya ha sido mencionado, en el ratón, la ZP está compuesta por sólo tres tipos de glicoproteínas diferentes, llamadas ZP1, ZP2 y ZP3. Es ampliamente aceptado que la glicoproteína ZP3 sería el receptor para el espermatozoide en la ZP y sería responsable de la inducción de la reacción acrosomal inducida por ZP. La actividad de receptor sería ejercida por los residuos glicosílicos que se unirían a componente/s de la membrana del espermatozoide. Dado que existen varios sitios glicosílicos por cada cadena polipeptídica de ZP3, y teniendo en cuenta el aumento de fluidez de membrana que se produce en el espermatozoide durante la capacitación, la unión de los oligosacáridos de ZP3 a distintos sitios en el espermatozoide produciría la agregación de dichos sitios, la cual induciría la reacción acrosomal (Leyton y Saling, 1989). El hecho de que la incubación de

espermatozoides con distintos sacáridos unidos a BSA (neoglicoproteínas) produzca inducción de la reacción acrosomal mientras que los mismos azúcares libres no tengan efecto (Brandelli *et al.*, 1994), apoyan esta hipótesis.

En cuanto a la naturaleza inductora del cumulus oophorus, existen evidencias de que la progesterona que se encuentra en el fluido folicular que acompaña a las células del cúmulus, tiene la capacidad de inducir la reacción acrosomal (Parinaud *et al.*, 1992; Blackmore, 1993; Roldan *et al.*, 1994). Se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cumulus y la ZP sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr *et al.*, 1986). Por lo tanto, no existiría en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la reacción acrosomal. Resulta más probable que el espermatozoide capacitado se encontrara listo para sufrir la reacción acrosomal, y que su inducción se produjera a medida que avanza a través de concentraciones crecientes de factores estimulantes, durante su acercamiento al ovocito (Yanagimachi, 1994).

Cabe aclarar que la reacción acrosomal puede también ocurrir en ausencia total del ovocito y sus envolturas, a esta reacción se la denomina reacción acrosomal espontánea. La incidencia de la reacción acrosomal espontánea depende de varios factores, entre los que se incluyen la especie y cepa utilizadas (Olds-Clarke, 1990), la composición del medio (Yanagimachi, 1994), el tiempo de almacenamiento en el epidídimo (Bedford y Yanagimachi, 1992) y el tratamiento pre- y post-eyaculatorio (Alvarez *et al.*, 1988). Dado que la reacción acrosomal del espermatozoide fertilizante ocurre normalmente sobre la ZP o en las cercanías del ovocito, es generalmente aceptado que la reacción acrosomal espontánea es un evento no fisiológico. Si bien en ciertos aspectos esto es cierto, sobre todo teniendo en cuenta que en el ratón los espermatozoides reaccionados no pueden unirse a la ZP, los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal espontáneamente son capaces de fertilizar ovocitos sin ZP. A pesar de que el evento disparador de la reacción acrosomal en el caso de la

reacción inducida y la espontánea es diferente en cada caso, los mecanismos involucrados en los dos tipos de reacción parecerían ser de características similares ya que ambas presentan los mismos requerimientos.

Los mecanismos por los que se dispara la reacción acrosomal han sido intensivamente estudiados. Los espermatozoides de mamíferos comparten características comunes a otros tipos celulares en los mecanismos de transducción de señales. Los mecanismos propuestos por distintos autores incluyen la participación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, de proteínas G de distintos tipos que activarían tanto a la fosfolipasa C (PLC) que activaría la vía de los fosfoinosítidos y proteína quinasa C (PK-C), como a una adenilato ciclasa que aumentaría los niveles internos de cAMP activando una proteína quinasa A (PK-A) (Kopf y Gerton, 1990). Si bien existen controversias entre los distintos autores en cuanto a la importancia de cada uno de estos mediadores en la reacción acrosomal, es claro que la entrada de calcio extracelular es un paso esencial para su ocurrencia (Yanagimachi y Usui, 1974). El influjo de este ión dispararía eventos moleculares intracelulares tales como cambios en las concentraciones iónicas y/o en el estado de fosforilación de proteínas, que permitirían la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Yanagimachi, 1994). Green (1978) demostró que el ionóforo A23187, que provoca la entrada masiva de calcio a la célula, es capaz de inducir la reacción acrosomal.

## **7. Hiperactivación de los espermatozoides**

Durante el proceso de maduración, el espermatozoide adquiere motilidad progresiva. Sin embargo, este tipo de motilidad no sería suficiente para atravesar las distintas envolturas del ovocito. Como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides desarrollan una forma vigorosa y específica de motilidad descrita por primera vez en el hámster por Yanagimachi (1969) quien posteriormente la denominó hiperactivación (Yanagimachi, 1981). Este



tipo de motilidad proveería al espermatozoide de una gran fuerza propulsora que sería beneficiosa tanto para su migración dentro del oviducto como así también para su pasaje a través de las distintas envolturas que rodean del ovocito, especialmente la resistente ZP (Yanagimachi, 1981).

La motilidad hiperactivada en el hámster se caracteriza por una sucesión de períodos de motilidad progresiva y períodos en los que la cola se mueve en forma de latigazos y la cabeza traza la figura errática de un ocho. El patrón de movimiento y la frecuencia de batido de la cola del espermatozoide varía en las distintas especies (Cardullo y Baltz, 1991). No se conoce aún si la hiperactivación está limitada a ciertas especies o si se trata de un fenómeno general en los mamíferos. Sin embargo, el número de especies en las cuales se ha observado este fenómeno ha aumentado considerablemente durante los últimos años: hámster chino, ratón, rata, cobayo, conejo, delfín, perro, carnero, toro, cerdo, primates no humanos y humano (Yanagimachi, 1994 y referencias allí citadas). En las distintas especies se observan distintos patrones de motilidad hiperactivada. Es importante aclarar que el patrón de motilidad hiperactivada depende también de las características químicas del medio en el que se encuentran los espermatozoides (Katz *et al.*, 1989; Suarez *et al.*, 1991).

#### **8. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito.**

El resultado último de la larga serie de cambios que ocurren tanto durante la maduración en el epidídimo, como durante la capacitación en el tracto genital femenino, es la adquisición definitiva por parte del espermatozoide de capacidad para fertilizar al ovocito. Específicamente, esto implica que el espermatozoide debe desarrollar la capacidad de llegar al ovocito, penetrar las distintas envolturas que lo rodean tales como el cumulus oophorus y la ZP, y finalmente, fusionarse con el oolema para incorporarse al ooplasma.

## 9. Penetración a través del cumulus oophorus

Originalmente se aceptaba que para que un espermatozoide pudiera penetrar el cumulus era necesario que varios espermatozoides que hubieran sufridos la reacción acrosomal y, por lo tanto, que hubieran liberado sus enzimas acrosomales, nadaran previamente alrededor del mismo de forma tal de que la matriz del cumulus se dispersara. Esto podría ocurrir *in vitro*, pero no *in vivo* ya que, bajo condiciones naturales, son muy pocos los espermatozoides que se encuentran en las cercanías del ovocito durante la fertilización. Más aún, en el momento de la fertilización la relación espermatozoide:ovocito en el oviducto es 1:1 o menor (Cummins y Yanagimachi, 1982).

Austin (1960) demostró que los espermatozoides no capacitados pueden unirse a la superficie del cumulus, pero no llegan a penetrarlo, indicando que la capacitación sería necesaria para que los espermatozoides puedan atravesar el cumulus oophorus. Resulta interesante mencionar que los espermatozoides que han completado la reacción acrosomal tampoco son capaces de penetrar el cumulus (Talbot, 1985; Cummins y Yanagimachi, 1986). Por lo tanto, sólo aquellos espermatozoides capacitados con acrosomas intactos son capaces de penetrar el cúmulus.

Entonces, ¿como harían los espermatozoides capacitados para penetrar el cumulus? Una hipótesis postula que se produciría la liberación parcial de las enzimas acrosomales en forma previa a la vesiculización. Sin embargo, no existen aún evidencias inequívocas que favorezcan esta hipótesis (Nagae *et al.*, 1986). Otra hipótesis sugiere que los espermatozoides poseerían hialuronidasa asociada a la superficie de los mismos y que, sería esta enzima, la que ayudaría en el pasaje a través de las células del cúmulus (Talbot, 1985). En este sentido, ha sido recientemente descrito que PH-20, una proteína testicular presente en la superficie del espermatozoide de cobayo (Primakoff *et al.*, 1985), presenta actividad de hialuronidasa (Lin *et al.*, 1994).

Para avanzar dentro del cúmulus el espermatozoide requeriría también de una gran fuerza propulsora, la cual sería provista por la motilidad hiperactivada. Aparentemente, la alta viscosidad de la matriz del cúmulus impediría a los espermatozoides desarrollar el movimiento en forma de "látigo" típico, los cuales se moverían dentro del cúmulus en forma progresiva. De hecho, cuando estos espermatozoides salen del cúmulus, reasumen inmediatamente el movimiento "hiperactivado" típico (Katz *et al.*, 1989).

## 10. Unión a la zona pellucida

Los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la superficie de la zona pellucida en forma específica de especie (Hardy y Garbers, 1994; Bookbinder *et al.*, 1995). La existencia de una interacción entre componentes de superficie del espermatozoide y del ovocito involucrados en esta unión, fue postulada por primera vez por Gwatkin y Williams (1977). Desde entonces se han publicado numerosísimos trabajos dedicados a estudiar las moléculas que participan en dicha interacción (ver Yanagimachi, 1994).

La naturaleza de las moléculas de la zona responsables de la interacción con el espermatozoide ha sido estudiada con más detalle en el ratón. En esta especie, la ya mencionada proteína ZP3, es el receptor para el espermatozoide intacto o receptor primario y es la responsable por la especie especificidad de la interacción espermatozoide-ZP (Wassarman y Litscher, 1995). El hecho de que experimentos en los que se anuló la expresión de ZP3 por recombinación homóloga de su gen ("knock out"), resultaran en la producción de ovocitos sin ZP (Tong *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996) y en la infertilidad de las hembras (Liu *et al.*, 1996), indicaron la relevancia de ZP3 en la estructura y funcionalidad de la ZP. Como ya se mencionó, ZP3 es también responsable de la inducción de la reacción acrosomal inducida por zona.

A pesar de que se ha demostrado la participación de los oligosacáridos unidos a serina/treonina ("O-linked") de ZP3 en la unión del espermatozoide, como así también en la inducción de las señales para la ocurrencia de la reacción acrosomal, aún no se conoce la estructura de ZP3 esencial para su función. Algunas evidencias sugieren que tanto un residuo terminal galactosa (Gal) unidos en forma  $\alpha$  o  $\beta$  (Wassarman y Litscher, 1995) como un residuo terminal N-acetil-glucosamina (GlcNac) unido en  $\beta$  (Miller *et al.*, 1992) cumplirían un papel importante en esta interacción. Sin embargo, el hecho de que ratones deficientes en glicosiltransferasa, enzima que une residuos Gal terminales en posición  $\alpha$ , sean completamente fértiles muestran que los otros residuos mencionados serían críticos. La especie especificidad de la unión a ZP podría estar dada por diferencias estructurales en los oligosacáridos presentes en ZP3 (Wassarman *et al.*, 1996).

Numerosos grupos se han dedicado a la caracterización de los receptores para ZP en el espermatozoide, habiéndose identificado varios candidatos para dicha función receptora. Estos estudios han sido realizados principalmente en ratón. Entre estos candidatos se incluye a sp56, una proteína tipo lectina que se encuentra localizada en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de ratón y que reconoce residuos galactosa presentes en ZP3. El agregado de sp56 purificada bloquea la interacción espermatozoide-ZP (Bookbinder *et al.*, 1995). sp56 ha sido clonada y secuenciada y la presencia de dominios Sushi demuestra que pertenece a una superfamilia de proteínas involucradas en la interacción proteína-proteína. (Bleil y Wassarman, 1990; Cheng *et al.*, 1994; Bookbinder *et al.*, 1995). La proteína p95 es una forma única de la enzima glicolítica hexoquinasa, la cual es integral de membrana y se halla fosforilada en tirosina. Esta hexoquinasa es una proteína localizada en la cabeza y la cola del espermatozoide de ratón, que poseería actividad de tirosinquinasa activable por ZP (Leyton y Saling, 1989; Leyton *et al.*, 1992; Kalab *et al.*, 1994). La proteína  $\beta$ 1,4-galactosyltransferasa (GalTase), una

enzima asociada a la membrana plasmática del espermatozoide de ratón, localizada en la cabeza del espermatozoide y que reconoce residuos GlcNac terminales presentes en ZP3 (Miller *et al.*, 1992; Youakim *et al.*, 1994). Distintos anticuerpos contra GalTase inhiben la unión espermatozoide-ovocito (Shur y Neely, 1988). La sobreexpresión de GalTase en animales transgénicos produce espermatozoides que unen más ZP3 radiomarcada y que son hipersensibles a la inducción de la reacción acrosomal inducida por zona (Youakim *et al.*, 1994). PH-20, una proteína localizada en la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna del espermatozoide de cobayo. Como se mencionó anteriormente, PH-20 presenta actividad de hialuronidasa (Gmachl *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994), en un dominio distinto al de unión a la ZP (Hunnicuttt *et al.*, 1996). También son candidatos varias moléculas de bajo peso molecular presentes en espermatozoides de cerdo y denominadas spermadesinas (Calvete *et al.*, 1993) y el antígeno RSA de conejo (rabbit sperm autoantigen) (Richardson *et al.*, 1994). Se ha postulado también como candidato a receptor para la ZP tanto en hámster, cerdo como humano a la acrosina. En este caso, esta proteína debería localizarse en la membrana plasmática del espermatozoide (Topfer-Petersen y Henschen, 1988; Valdivia *et al.*, 1994).

Este gran número de candidatos para el receptor de ZP3 en el espermatozoide podría deberse, en el caso de que hubiera un único receptor para la ZP, a que se han utilizado distintas estrategias y distintas especies para su identificación (Wassarman, 1995). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que existan varios receptores y que la gran cantidad de candidatos represente una función redundante que asegure la ocurrencia de este evento crucial para la fertilización (Snell y White, 1996) o bien, de que la unión a ZP sea un evento en varias etapas que involucre a más de un receptor tal como ha sido demostrado para diversas moléculas de adhesión en células inmunes (Springer, 1994) y para ciertas proteínas que responden a ligandos solubles (Schlessinger *et al.*, 1995).

Una vez reaccionados, los espermatozoides se unen a la ZP a través de un segundo receptor, ZP2 o receptor secundario (Bleil y Wassarman, 1986; Wassarman, 1987).

### **11. Penetración de la zona pellucida**

Como ha sido mencionado, es imprescindible que los espermatozoides completen la reacción acrosomal atravesar la ZP. Durante este pasaje, para el cual resulta esencial que los espermatozoides posean una motilidad vigorosa (Gaddum-Rosse, 1985), los mismos pierden los componentes acrosomales excepto la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial.

Yanagimachi (1994) propone dos hipótesis que intentan explicar el mecanismo de penetración de la ZP. Una de ellas, hipótesis mecánica, sostiene que el espermatozoide se abriría paso a través de la zona en forma independiente de la actividad de las enzimas acrosomales. En este caso, la reacción acrosomal permitiría la exposición del perforatorium, una estructura rígida, que cortaría la zona y que conjuntamente con la motilidad hiperactivada presente en los espermatozoides, favorecerían la penetración de la ZP. La segunda hipótesis, hipótesis enzimática, sostiene que el pasaje a través de la ZP sería dependiente de la acción de enzimas liberadas con el contenido acrosomal o presentes en el espermatozoide. Esta teoría sostiene que la mayoría de las enzimas acrosomales serían liberadas sobre la superficie de la ZP (Saling, 1981; Shur y Hall, 1982). En particular, la acrosina provocaría la hidrólisis de la zona, induciendo así el "ablandamiento" de la misma (Urch *et al.*, 1985). Una proporción de la acrosina, y posiblemente otras enzimas acrosomales, permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de clivar las moléculas de la zona a la que el espermatozoide se halla unido, permitiendo así el avance a través de la misma. O'Rand y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis que involucraría ambos mecanismos. En primer lugar, la zona y el espermatozoide se unirían por una

unión de alta afinidad. Se produciría entonces la degradación de las moléculas de la zona participantes de esta interacción, liberando así a las proteínas del espermatozoide que estarían disponibles para interactuar con nuevas moléculas de la zona. En este punto jugaría un papel importante la motilidad, ya que si el espermatozoide no se moviera en forma progresiva, la probabilidad de encontrar nuevas moléculas para interactuar sería muy baja y la penetración no se produciría.

## **12. Fusión del espermatozoide con el ovocito**

La fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito constituyen un evento clave en el proceso de fertilización ya que es sólo luego de la ocurrencia de la fusión que un ovocito puede considerarse fertilizado.

Esta fusión ocurre luego de que el espermatozoide ha atravesado la ZP y el espacio perivitelino. La cabeza del espermatozoide se une a la membrana plasmática del ovocito y luego de un breve período, que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi y Phillips, 1980). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (Figura VII).

### **12.1 Unión espermatozoide-ovocito**

La unión y fusión de gametas constituyen dos eventos independientes ya que bajo ciertas condiciones los espermatozoides pueden unirse al oolema sin fusionarse. Sin embargo, está generalmente aceptado que la unión es un requisito para que ocurra la fusión (Myles, 1993). Se ha observado la ocurrencia de unión no conducente a fusión en el caso de espermatozoides con acrosoma intactos (Yanagimachi, 1988) y en ciertos casos de unión entre

espermatozoides y ovocitos sin zona de especies distintas (Yanagimachi y Phillips, 1984). Dado que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es necesaria para la ocurrencia de la fusión, pero no para de unión, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  los espermatozoides pueden unirse sin fusionarse (Yanagimachi, 1978).

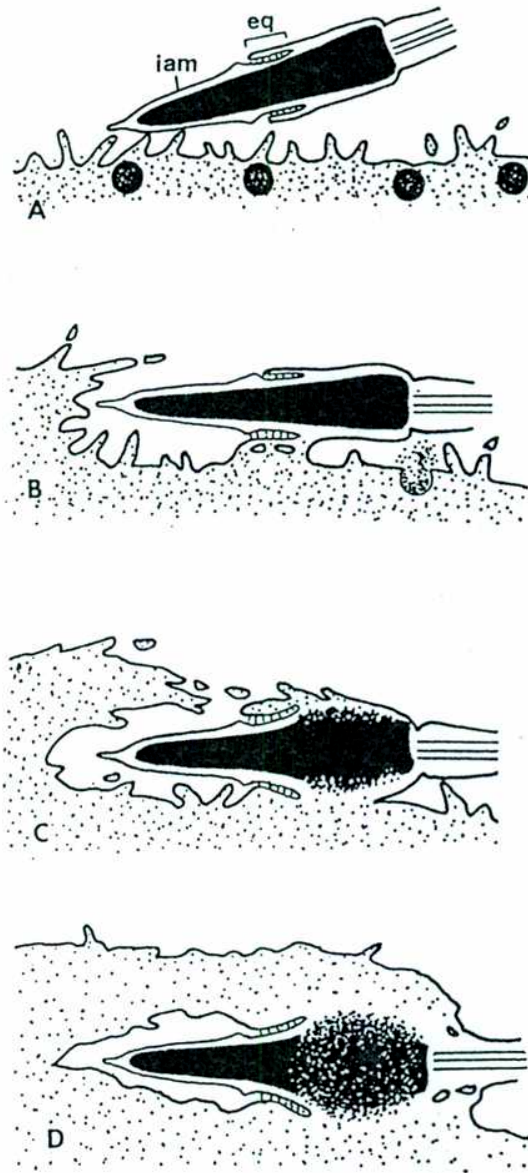
Myles (1993) propone que, teniendo en cuenta que los espermatozoides pueden unirse al oolema sin que ocurra la fusión, es posible que exista más de un mecanismo para el evento de unión, en los que se utilicen distintos tipos de proteínas. Algunos de estos mecanismos de unión podrían no ser conducentes a fusión. También es posible que se requieran varios eventos de unión sucesivos para que las membranas se fusionen y que los primeros eventos de unión puedan ocurrir aunque luego la fusión no ocurra.

La interpretación de los resultados obtenidos por distintos laboratorios con respecto a la etapa de unión puede resultar engorrosa debido a que la unión es generalmente evaluada luego de un período variable de coincubación de las gametas y de una serie de lavados realizados por pipeteo, con el fin de liberar los espermatozoides débilmente unidos al oolema. Este paso depende exclusivamente del operador (fuerza de pipeteo, número de lavados, etc.) provocando una gran variabilidad en los resultados obtenidos por distintos operadores. Por otro lado, si en el momento de evaluar la unión, la fusión ya ha ocurrido, ésta podría provocar alguna alteración de la membrana (ver Exocitosis de gránulos corticales) de forma tal que los espermatozoides no se unan de la misma manera que lo hacían previo a la fusión, provocando así la liberación de los espermatozoides unidos. Más aún, la ocurrencia de una unión no conducente a fusión podría estar enmascarando la ocurrencia de la unión conducente a fusión (Myles, 1993).

### ***12.2 Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito***

Las regiones de la membrana plasmática que inicialmente participan en la fusión son restringidas tanto en el espermatozoide como en el ovocito. En el





**Figura VII. Diagrama de las distintas etapas del proceso de fusión.**

A) La membrana del espermatozoide entra en contacto con el oolema; B) El segmento ecuatorial del espermatozoide se fusiona con el oolema; C) El espermatozoide es incorporado al oocito; D) Comienza la decondensación del núcleo del espermatozoide.

iam: Membrana acrosomal interna; eq: segmento ecuatorial.

caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial es la que primeramente se fusiona con el ovocito (Arts *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994). Excepcionalmente, en los casos en que durante la reacción acrosomal también se pierde el segmento ecuatorial (por ejemplo, luego de largas incubaciones en condiciones capacitantes), la fusión puede iniciarse por la región postacrosomal (Vigil, 1989). Es importante recalcar que el segmento ecuatorial sólo adquiere capacidad de fusionarse con el oolema una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal (Wolf *et al.*, 1976; Barros y Berrios, 1977; Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1994). Los espermatozoides intactos, independientemente de que se encuentren capacitados, no son capaces de fusionarse con el ovocito (Yanagimachi y Noda, 1970; Yanagimachi, 1981). La motilidad parecería no ser un requisito absoluto para la ocurrencia de la fusión, ya que ha sido demostrado que espermatozoides inmóviles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito (Yanagimachi, 1994).

En el caso del ovocito, tal como ha sido previamente mencionado, la superficie del mismo se encuentra polarizada y pueden distinguirse al menos dos regiones: la región que recubre el huso meiótico, que se halla libre de microvellosidades, y el resto de la membrana del ovocito, que presenta numerosas microvellosidades. Las proteínas presentes en la región libre de microvellosidades presentan una mayor movilidad respecto al resto del oolema (Wolf y Ziomek, 1983). La fusión raramente ocurre por esta región (Johnson *et al.*, 1975; Phillips y Shalgi, 1980; Shalgi y Phillips, 1980ab). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y libera por esta región luego de la fertilización y resultaría "peligroso" que el espermatozoide se fusione e incorpore allí ya que su presencia podría interferir con la correcta liberación del segundo corpúsculo, o bien, el mismo espermatozoide podría ser eliminado durante este proceso.

Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las microvellosidades son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford y Cooper, 1978).

### **12.3 Detección de la ocurrencia de la fusión**

En general, los ensayos de fusión espermatozoide-ovocito son llevados a cabo *in vitro*, utilizando para ello ovocitos sin ZP, con lo cual se evita la interferencia de la zona en la realización del ensayo y en la interpretación de los resultados (Yanagimachi, 1988).

Existen principalmente dos formas de evaluar la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito. El método más comunmente utilizado es la observación de la incorporación del espermatozoide al citoplasma del ovocito que constituye una evidencia indirecta pero inequívoca de que la fusión de membranas ha ocurrido. El otro método utilizado permite la evaluación de la fusión en sí y consiste en preteñir los ovocitos con un fluorocromo específico para ADN, como lo es el Hoechst 33342. Estos ovocitos son luego inseminados con espermatozoides no teñidos. Si ocurre la fusión, el fluorocromo entra al espermatozoide que se ha fusionado y tiñe su ADN, resultando en la aparición de una cabeza fluorescente en la superficie del ovocito. Los espermatozoides que no se han fusionados permanecen no fluorescentes (Hinkley *et al.*, 1986; Conover y Gwatkin, 1988).

### **12.4 Especificidad de especie en la fusión**

Debido a que el ovocito de hámster sin ZP puede ser penetrado por espermatozoides de todas las especies estudiadas hasta el momento (Yanagimachi, 1988), durante mucho tiempo se creyó que no existía especificidad de especie en el proceso de fusión. Sin embargo, actualmente es aceptado que, aunque menos restringida que la penetración de la ZP, existe especie especificidad en este proceso. Es así como los ovocitos de ratón sin ZP

pueden ser penetrados por espermatozoides de la misma especie (Yanagimachi, 1984) y los ovocitos de rata sin ZP pueden ser penetrados heterológicamente sólo por espermatozoides de ratón (Hanada y Chang, 1972). Inclusive, los mismos ovocitos de hámster sin zona poseen cierto grado de especificidad ya que al ser inseminados, en una misma cápsula, con iguales cantidades de espermatozoides provenientes de hámster, cobayo y humanos, el número de espermatozoides de hámster que se encuentra en cada ovocito siempre es mayor que el que se encuentra de las otras especies (Yanagimachi, 1981). Esta restricción varía dependiendo de la especie de la que provienen tanto los espermatozoides como los ovocitos, y la habilidad de fusionarse en una dirección no implica estrictamente la fusión cruzada inversa pueda ocurrir (Yanagimachi, 1988).

### **12.5 Consecuencias de la fusión**

Luego de la fusión con el espermatozoide, se inicia en el ovocito una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, o sea a la formación de un nuevo individuo. A este reinicio de la actividad del ovocito se lo denomina activación. Unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce en el ovocito un aumento transitorio de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Miyazaki *et al.*, 1986). Existen dos mecanismos posibles por los que el espermatozoide podría provocar este aumento en el ovocito. En el primero, la cadena de eventos que conllevan a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sería disparada por la unión de un ligando del espermatozoide a su receptor en el ovocito. Posiblemente se trate de alguna de las moléculas que participan en el proceso de fusión (Ohlendieck y Lennarz, 1995). En el otro mecanismo postulado, las reacciones serían iniciadas por un factor soluble que sería introducido en el ovocito por el espermatozoide durante la fusión (Yanagimachi, 1994). En este sentido, cabe mencionar que recientemente ha sido descripta una proteína del espermatozoide de ratón, oscilina, que cuando es inyectada en

ovocitos induce oscilaciones de  $Ca^{2+}$  similares a las observadas en presencia del espermatozoide (Parrington *et al.*, 1996).

Los indicadores más visibles de la activación son la exocitosis de los gránulos corticales y la reasunción de la meiosis.

*Exocitosis de los gránulos corticales:* Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales han sido exocitados (Yanagimachi, 1994). Su función es modificar la ZP, en lo que se denomina la reacción de zona, y el oolema de forma tal de prevenir la polispermia. Ha sido demostrado en varias especies que las proteasas liberadas de los gránulos corticales provocan la hidrólisis parcial de proteínas de la ZP (cerdo: Hatanaka *et al.*, 1992, humano: Shabanowitz y O'Rand, 1988). En el ratón, ZP2 (120 Kd) es hidrolizada, resultando en una proteína de 90 kDa a la que se denomina ZP2<sub>r</sub> (Moller y Wassarman, 1989). ZP3 también es modificada por el contenido de los gránulos corticales, pero en este caso se modifica el patrón de glicosilación de dicha proteína (Wassarman, 1987).

El oolema también es modificado. Dado que las membranas de los gránulos corticales se integran al oolema luego de su exocitosis (Cherr *et al.*, 1988), se postula que tanto su contenido como sus membranas juegan un papel importante en el establecimiento del bloqueo de polispermia a nivel de la membrana plasmática.

En algunas especies, como el hámster, humano y perro, la prevención de polispermia depende principalmente de la reacción de zona. En otras especies, como el conejo y el murciélago, el bloqueo depende principalmente de la modificación del oolema, por lo cual estos ovocitos presentan normalmente espermatozoides supernumerarios en el espacio perivitelino. Existe además un tercer grupo de especies, que incluye a la rata, ratón y cobayo, en el que el bloqueo de polispermia depende de ambos (Yanagimachi, 1994).

*Reasunción de la meiosis:* Una vez que se ha completado la meiosis y liberado el segundo corpúsculo polar, el complemento haploide resultante se transforma en el pronúcleo femenino. En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar la primera división meiótica.

### **13. Moléculas involucradas en el proceso de fusión**

#### ***13.1 Moléculas involucradas en la fusión de membranas durante la infección viral***

La fusión de membranas es un evento clave en diversos fenómenos celulares además de la fertilización tales como el transporte intracelular de vesículas, la endo y exocitosis, la miogénesis y la infección viral. Una conclusión generalizada entre los distintos grupos de investigación es que la fusión de membranas está mediada por proteínas (Zimmerberg *et al.*, 1993). Sin embargo, es muy poco lo que se sabe sobre las proteínas mediadoras en la mayoría de los sistemas. Dada su simplicidad, la infección viral ha resultado un modelo útil para el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de fusión de membranas y los primeros avances en el conocimiento de estos mecanismos se llevaron a cabo en este sistema.

Los virus animales están compuestos por una membrana y un espacio interno que contiene el genoma viral y las proteínas accesorias. La membrana viral, la cual generalmente posee una composición proteica simple, cumple tres funciones: participa en el ensamblaje de la partícula viral en la célula infectada, protege al genoma durante la etapa extracelular y es responsable de la introducción de la nucleocápside en el citoplasma de la célula huésped a través de un fenómeno de fusión (White *et al.*, 1983).

El evento de fusión virus-célula huésped puede ser dividido en las siguientes etapas: a) unión del virus a la superficie de la célula. Esta etapa sería necesaria para destruir las fuerzas repulsivas generadas entre las bicapas lipídicas interactuantes (Lucy y Ahkong, 1986), b) interacción de una proteína de fusión con la membrana blanco, c) ocurrencia de la unificación de las membranas (Hoekstra, 1990).

Tanto en el evento de unión como en la etapa de fusión participan moléculas de reconocimiento específicos de naturaleza proteica o glicoproteica (Burger y Verkleij, 1990). Si bien las diferentes proteínas virales estudiadas poseen una baja homología en su secuencia, todas comparten ciertas características que podrían ser relevantes para la ocurrencia de la fusión. En el caso de ciertos virus, se han descrito proteínas virales que contienen en distintas regiones de la misma molécula, tanto la actividad de unión a la membrana de la célula huésped como la de fusión, (Hoekstra, 1990). Tal sería la situación de la glicoproteína HA del virus de la influenza (White *et al.*, 1983). En este caso, la proteína interactuaría con residuos de ácido siálico presentes en la membrana de la célula huésped, mediando así la unión del virus. Una vez unida a la membrana de la célula huésped, la proteína HA sufre un cambio conformacional dependiente del pH, exponiendo una región hidrofóbica que se intercala en la membrana del huésped, determinando así el desencadenamiento de la fusión (Hoekstra, 1990). Otro ejemplo de una proteína que posee ambas funciones en la misma molécula lo constituye la glicoproteína gp120 del virus HIV. En este caso, la evidencia en favor de esta hipótesis fue obtenida mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epitopes de la misma proteína con los cuales fue posible inhibir alternativamente la actividad de unión o fusión (Healey *et al.*, 1990). Existe, sin embargo, otro grupo de virus, los paramyxovirus, entre los que se incluye el virus Sendai, en los que las actividades de unión y de fusión residen en moléculas distintas (Hoekstra, 1990). En este caso, la membrana viral posee las glicoproteínas HN y F. La glicoproteína HN es responsable de la unión del virus a la célula huésped a

través de residuos de ácido siálico presentes en la misma y de la ruptura posterior de dicha unión. Por su parte, la proteína F posee un péptido hidrofóbico conservado con respecto al presente en la proteína HA del virus de influenza, que participaría en la etapa de fusión (White *et al.*, 1983).

Zimmemberg y colaboradores (1993) sostienen que el conocimiento de la localización de las moléculas involucradas en fusión sería de importancia para el entendimiento de los mecanismos de fusión en general y postulan cuatro distribuciones hipotéticas para las proteínas que participen en el proceso de fusión, que se muestran en la Figura VIII. Las distribuciones propuestas requerirían la presencia de proteínas en ambas membranas las cuales podrían ser complementarias o idénticas, o bien, la presencia de proteínas ya sea en una u otra de las dos membranas que interactúan.

### ***13.2 Moléculas involucradas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito***

Si bien el proceso de fusión de gametas ha sido ampliamente caracterizado en sus aspectos estructurales, sólo en los últimos años se han realizado estudios tendientes a identificar las moléculas involucradas en esta interacción. La estrategia más comunmente utilizada consiste en estudiar si anticuerpos poli o monoclonales contra proteínas del espermatozoide son capaces de interferir con la ocurrencia de la fusión. Por lo tanto, si bien escasa, la mayor parte de la información disponible se refiere a moléculas del espermatozoide. La información es más limitada aún cuando se trata de las moléculas del ovocito involucradas en fusión.

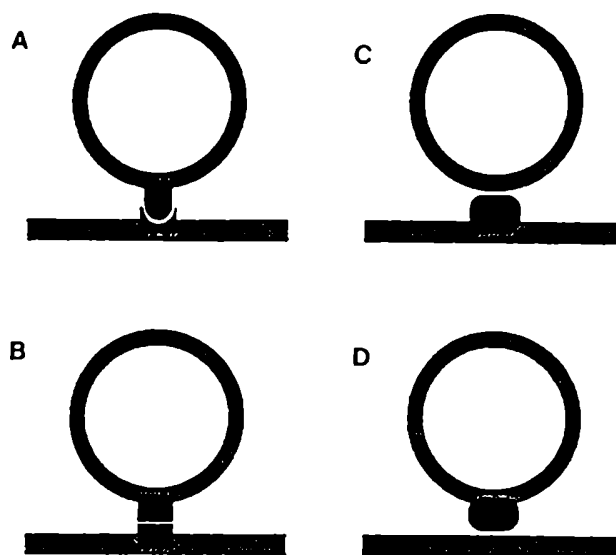
Saling y colaboradores (1985) mostraron que dos anticuerpos monoclonales (M29 y M37) son capaces de inhibir específicamente el proceso de fusión en el ratón. El anticuerpo M29 reconoce un antígeno de 40 kDa que se localiza en el segmento ecuatorial del espermatozoide. El antígeno reconocido por el anticuerpo M37 no ha sido identificado aún.



El anticuerpo monoclonal OBF13, dirigido contra espermatozoides de ratón, también produce una inhibición en el porcentaje de ovocitos fusionados (Okabe *et al.*, 1988). Si bien el antígeno reconocido por OBF13 no ha sido aún identificado, su localización ha sido extensamente estudiada. El anticuerpo no se une a espermatozoides epididimarios frescos, mientras que reconoce la región acrosomal de espermatozoides frescos permeabilizados (Kawai *et al.*, 1989) y toda la cabeza del espermatozoides reaccionados (Okabe *et al.*, 1987; Kawai *et al.*, 1989). Los autores postulan que el antígeno reconocido por OBF13 estaría localizado en el acrosoma de los espermatozoides intactos y queluego de la reacción acrosomal, podría migrar hacia la región postacrosomal.

Otro anticuerpo monoclonal dirigido, en este caso, contra espermatozoides humanos reaccionados, el anticuerpo MH61, produce una inhibición en el porcentaje de ovocitos de hámster sin zona penetrados por espermatozoides humanos (test de hámster) (Okabe *et al.*, 1990). MH61 reconoce una proteína de 43 kDa que se localiza en la región postacrosomal del espermatozoide reaccionado, mientras que no se une a espermatozoides frescos. Su secuenciación mostró que se trata de la proteína CD46, una proteína de adhesión (Okabe *et al.*, 1992).

Resultados similares se obtuvieron al utilizar el anticuerpo monoclonal PH-30 que inhibe el proceso de fusión y reconoce una proteína, a la que se denomina PH-30 o fertilina, que se localiza en la región postacrosomal del espermatozoide de cobayo (Primakoff *et al.*, 1987). Fertilina consiste de dos subunidades,  $\alpha$  (44kDa) y  $\beta$  (60kDa) (Blobel *et al.*, 1992). La subunidad  $\beta$  posee un motivo de desintegramina esencial para su función (Myles *et al.*, 1994), mientras que la subunidad  $\alpha$  posee un péptido hidrofóbico que podría intercalarse en la membrana del ovocito (Blobel *et al.*, 1992). Recientemente se ha demostrado la presencia de fertilina en espermatozoides de ratón (Evans *et al.*, 1995b) y su expresión en testículo de mono, humano y conejo (Hardy y Holland, 1996; Gupta *et al.*, 1996; Ramarao *et al.*, 1996).



**Figura VIII. Distribución hipotética de las proteínas involucradas en el proceso de fusión de membranas.**

Se requeriría la presencia de proteínas complementarias (A) o idénticas (B) en ambas membranas. (C) y (D): se requerirían proteínas ya sea en una u otra de las dos membranas que interactúan.

La existencia de componentes de la membrana del ovocito involucradas en el proceso de fusión fue sugerida por primera vez por Boldt y colaboradores (1989; 1988) quienes demostraron que el tratamiento de ovocitos de ratón con proteasas afecta la habilidad de dichos ovocitos de fusionarse con el espermatozoide. Estudios posteriores mostraron que una proteína de 94 kDa desaparece de los ovocitos tratados e, interesadamente, puede ser regenerada por los ovocitos luego de varias horas de terminado el tratamiento paralelamente a la recuperación de la capacidad de fusión de dichos ovocitos (Kellom *et al.*, 1992; Horvath *et al.*, 1993). La situación en el hámster parece ser distinta que en el ratón ya que el oolema del ovocito de hámster es muy resistente al tratamiento proteolítico (Hirao y Yanagimachi, 1978; Ponce *et al.*, 1993).

Bronson y Fusi (1990a,b) mostraron que el agregado de un péptido que contenía la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) a ovocitos de hámster sin zona afectaba la interacción con el espermatozoide, indicando la existencia de sitios de unión para RGD en la superficie del ovocito. Dado que muchas integrinas reconocen al péptido RGD, se sugirió que estos sitios de unión podrían ser integrinas. La presencia de distintos tipos de integrinas en el oolema fue demostrada por distintos grupos (Fusi *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1995a). Almeida y colaboradores (1995) sugirieron que estas integrinas podrían ser el receptor para el dominio de desintegrina presente en fertilina, sin embargo esto no ha sido aún demostrado.

OBJETIVOS

## OBJETIVOS

Uno de los principales componentes sintetizados y secretados en forma andrógeno-dependientes por el epidídimo de la rata, lo constituye la proteína DE (Cameo y Blaquier, 1976). El establecimiento de un método de purificación que permite la obtención de proteína DE con un 95 % de pureza (Garberi *et al.*, 1979; Garberi *et al.*, 1982) posibilitó su caracterización. DE está constituida por las proteínas D y E, las cuales se detectan como dos bandas claramente distinguibles en geles de poliacrilamida nativos. Sin embargo, D y E no pueden ser separadas por su solubilidad, peso molecular o carga, por lo que se las considera como una entidad única. La caracterización de DE mostró que se trata de una glicoproteína ácida ( $pI = 4.95 - 5.13$ ) de 37 kDa, que contiene un 10% de residuos glicosílicos constituidos por D-manosa, D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-neuramínico y D-glucosa (Garberi *et al.*, 1982). El desarrollo de un anticuerpo policlonal específico contra DE, al que se denomina anti-DE (Kohane *et al.*, 1983), permitió establecer, mediante la utilización de técnicas de inmunodetección, que DE es sintetizada en las regiones proximales del epidídimo y se asocia a la región dorsal del acrosoma de los espermatozoides durante el tránsito epididimario (Kohane *et al.*, 1980; Cameo *et al.*, 1986).

Cuando los espermatozoides son incubados bajo condiciones capacitantes tanto *in vivo* como *in vitro*, se produce la pérdida de una gran cantidad de proteína DE de los mismos (Kohane *et al.*, 1980). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que esta proteína actuara como un factor decapacitante. Por otro lado, experimentos *in vivo* en los cuales la exposición de espermatozoides provenientes del cauda epididimario a anti-DE previo a la inseminación uterina, produjo una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Cuasnicu *et al.*, 1984) sugirieron que la proteína DE podría participar además en el proceso de fertilización. Estudios posteriores de microscopía electrónica,

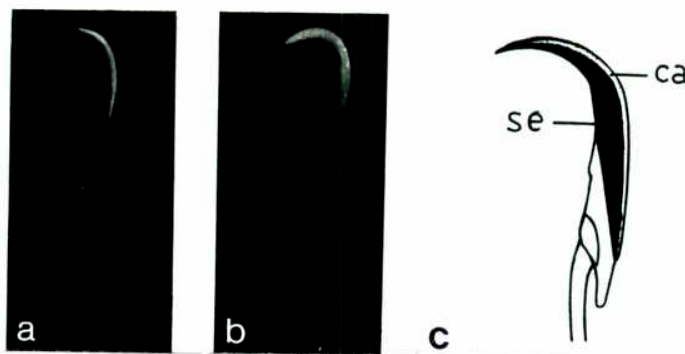
en los que se detectó la permanencia de DE en espermatozoides reaccionados (Cameo *et al.*, 1986), apoyaron esta posibilidad dado que sólo las proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación y/o reacción acrosomal pueden estar involucradas en la interacción con el ovocito.

La relevancia de esta proteína para la fertilidad de los animales fue estudiada a través de la inmunización activa de ratas machos y hembras con proteína DE pura. Los resultados indicaron que luego de la inmunización se produce una inhibición completa o significativa de la fertilidad (Cuasnicú *et al.*, 1990) en animales de ambos sexos. Resultados recientes indican que dicha inhibición estaría mediada por la producción de anticuerpos específicos contra DE, los cuales entrarían al tracto reproductivo tanto de los machos como de las hembras y se asociarían a la superficie del espermatozoide y afectarían específicamente la interacción de gametas (Perez Martinez *et al.*, 1995).

Distintas evidencias sugieren que la proteína DE podría participar en la etapa de interacción con la zona pellucida. En primer lugar, la localización de DE sobre la región dorsal del acrosoma es consistente con su posible participación en la unión a ZP ya que, inicialmente, los espermatozoides se unen a la ZP a través de esta región de la cabeza. En segundo lugar, evidencias previas demuestran que la incubación de espermatozoides testiculares con una proteína epididimaria de rata con características similares a DE, incrementa su capacidad de interactuar con la ZP (Orgebin-Crist y Fournier-Delpech, 1982). Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que cuando se inseminaban hembras con espermatozoides expuestos a los sueros provenientes de ratas inmunizadas con proteína DE, se observaba una inhibición en el porcentaje de ovocitos penetrados. Dado que no se observó una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, estos resultados sugerían que los anticuerpos estarían interfiriendo con la unión y/o penetración de la ZP (Perez Martinez *et al.*, 1995). Sin embargo, la participación de DE en esta etapa no ha sido aún demostrada.

Distintos resultados indican que la proteína DE, originalmente localizada en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide, migra al segmento ecuatorial bajo condiciones capacitantes tanto *in vivo* como *in vitro* (figura IX; (Rochwerger y Cuasnicu, 1992)). Distintas evidencias indicaron que esta migración ocurriría concomitantemente con la ocurrencia de la reacción acrosomal. En primer lugar, la incubación de espermatozoides en presencia de un inductor de la reacción acrosomal como lo es el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 produjo un aumento en el porcentaje de espermatozoide con redistribución de DE (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Por otro lado, cuando los espermatozoides eran capacitados en ausencia de iones necesarios para la reacción acrosomal, tales como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{HCO}_3^-$ , se observó una disminución en dicho porcentaje (Cohen, 1992; Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Finalmente, cuando espermatozoides capacitados eran recuperados del fluido oviductal, los mismos presentaban a DE localizada en la región dorsal, mientras que los espermatozoides presentes en el espacio perivitelino, necesariamente reaccionados, presentaban a DE localizada en el segmento ecuatorial (Rochwerger y Cuasnicu, 1992).

Tal como ya ha sido mencionado, el segmento ecuatorial adquiere fusogenicidad sólo después de la ocurrencia de la reacción acrosomal. Ésto, conjuntamente con la relocalización de DE al segmento ecuatorial, región a través de la cual el espermatozoide se fusiona con el oolema, sugerían que DE podría estar involucrada en el proceso de fusión de gametas. Resultados previos mostrando que la exposición de espermatozoides capacitados a anti-DE produjo una inhibición significativa, y dependiente de la dilución de anticuerpo utilizada, en la penetración de ovocitos sin zona (Cuasnicú *et al.*, 1990), indicaron un papel específico para DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.



**Figura IX. Localización de la proteína DE en espermatozoides frescos y capacitados.**

(a) Un espermatozoide no capacitado, presentando marca fluorescente en la región dorsal del acrosoma; (b) Un espermatozoide capacitado, presentando marca fluorescente en la región correspondiente al segmento ecuatorial; (c) Diagrama de la cabeza del espermatozoide de rata mostrando los diferentes dominios que la forman. (ca) capuchón acrosomal, (se) segmento ecuatorial. Aumento: x 625.



Estudios posteriores mostraron que el agregado de proteína DE pura en el medio de coincubación de las gametas provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados. Estos resultados no sólo confirmaron la participación de DE el proceso de fusión sino que indicaron la presencia de sitios de unión para DE en la superficie del ovocito (Rochwerger *et al.*, 1992). La presencia y localización de dichos sitios se estudió por inmunofluorescencia indirecta sobre ovocitos preincubados con proteína DE, observándose una marcación, en forma de agregados de fluorescencia en toda la superficie del ovocito con excepción de una región no marcada a la que se denominó área negativa. Dicha área negativa resultó coincidente con la región de la membrana plasmática que recubre el huso meiótico, región por la cual la fusión raramente ocurre (Rochwerger *et al.*, 1992). Estos resultados constituyeron la primera evidencia de la existencia de sitios complementarios para una proteína específica del espermatozoide en el ovocito de mamífero.

El objetivo general del presente trabajo consistió en estudiar los mecanismos por los cuales la proteína DE participa en el proceso de interacción de gametas.

Para tal fin, y teniendo en cuenta que la capacitación constituye un proceso necesario para que el espermatozoide exprese su capacidad de interactuar con el ovocito, se propuso estudiar en primer lugar, la interacción de la proteína DE con la membrana del espermatozoide y la relación entre dicha interacción y el comportamiento de la proteína durante la capacitación (**Parte I**). A su vez se propuso realizar la secuenciación de la proteína DE, con el fin de estudiar la presencia de dominios que explicaran su función biológica, como así también establecer la existencia de proteínas homólogas a DE en otras especies de mamíferos (**Parte II**). Por último, y teniendo en cuenta que DE participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios localizados en

la superficie del ovocito, se propuso estudiar la participación de dichos sitios en la adquisición de la capacidad fusogénica del oolema (**Parte III**).

MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Animales

Los animales utilizados fueron:

-Ratas macho adultas (3-12 meses) y hembras tanto prepúberes (26-30 días) como adultas (3-6 meses) pertenecientes a la cepa Sprague Dawley.

-Ratones machos adultos (2-5 meses) y hembras prepúberes (30 días) y adultas (60-90 días) de la cepa BALB/C y de los híbridos F1 resultantes de la cruce de hembras de la cepa C57BL/6J con machos de la cepa BALB/C ((C57BL/6J xBALB/C)F1) o de la cepa CBA ((C57BL/6xCBA)F1).

En todos los casos los animales se mantuvieron a una temperatura de 22-24°C y en presencia de alimento y agua *ad libitum*. El régimen de luz:oscuridad fue de 12 hs:12 hs.

### 2. Proteína DE

La proteína DE utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descrito por Garberi y colaboradores (1979; 1982). Brevemente, la purificación incluye la precipitación del citosol epididimario con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , seguido de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-cellulosa, una cromatografía en Sephadex G-100 y un paso final de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). Cuando este material es sometido a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectan las bandas correspondientes a DE.

### **3. Anticuerpo anti-DE**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el anticuerpo anti-DE: anticuerpo policlonal (fracción IgG), dirigido contra las bandas la proteína DE, y desarrollado en conejo (Kohane *et al.*, 1983).

### **4. Obtención de espermatozoides**

#### **4.1 Espermatozoides epididimarios**

Con la finalidad de obtener espermatozoides epididimarios de animales de las distintas especies utilizadas, los animales adultos fueron anestesiados, y cada epidídimo expuesto a través de un corte efectuado en la región escrotal. Los mismos se limpiaron de grasa y sangre, manteniéndose permanentemente humedecidos con solución fisiológica. Para la delimitación de las distintas regiones del epidídimo de rata, se utilizó la delimitación propuesta por Fournier-Delpech y colaboradores (1984).

Dado que los espermatozoides del caput epididimario no poseen motilidad progresiva, los mismos fueron obtenidos realizando diversos cortes en el segmento correspondiente, el cual fue luego colocado en una cápsula de 3.5 cm de diámetro (Falcon) conteniendo 500 µl de PBS previamente calentado a 37°C.

Los espermatozoides del cauda epididimario se obtuvieron por punción del túbulo correspondiente a dicha región (túbulo de mayor diámetro). La masa de espermatozoides así obtenida fue colocada en una cápsula de 3.5 cm de diámetro conteniendo 1 ml de PBS previamente calentado.

#### **4.2 Espermatozoides testiculares**

Para la obtención de espermatozoides testiculares, los testículos de ratas adultas fueron cortados de forma tal de exponer los túbulos seminíferos. Los mismos fueron sumergidos y retirados repetidas veces en una cápsula

conteniendo 1 ml de PBS precalentado. Los espermatozoides liberados fueron luego centrifugados y resuspendidos en medio fresco.

### **5. Evaluación de motilidad de los espermatozoides**

Con el fin de evaluar la motilidad de los espermatozoides, alícuotas de 10  $\mu$ l de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C. Sobre los mismos fue colocado un cubreobjetos mantenido también a la temperatura mencionada. El porcentaje de motilidad se evaluó por microscopía óptica utilizando un aumento de 400 x. En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación.

### **6. Extracción de proteínas del espermatozoide**

Las suspensiones de espermatozoides provenientes de la región del caput o del cauda de epidídimos de rata o del cauda epididimario de ratón, fueron lavados tres veces por centrifugación y resuspensión en PBS con PMSF (0.2 mM). Los distintos espermatozoides fueron extraídos con 2M NaCl durante 30 min. Terminado el tratamiento, la suspensión fue centrifugada a 13000 xg durante 10 min. y el sobrenadante dializado contra agua deionizada y liofilizado.

Para la extracción de la población no removible con alta fuerza iónica, espermatozoides tratados como se describió en el párrafo anterior, fueron luego incubados con los distintos tratamientos entre los que se incluyen: 1% Tritón X-100 en PBS, Glicina 50 mM (pH 3), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mM (pH 11), cloruro de guanidinio 6M, urea 8M, ditiotreitól (DTT) 100 mM o PBS, durante 30 min. con agitación. Terminadas las distintas incubaciones, las suspensiones fueron centrifugadas a 13000 xg durante 10 min. y los sobrenadantes dializados y liofilizados.

Posteriormente al tratamiento con DTT, los espermatozoides fueron extraídos con 1% Tritón X-100 en PBS con PMSF durante 30 min. La suspensión fue centrifugada y las proteínas extraídas dializadas y liofilizadas, como se describió en el párrafo anterior.

En todos los casos, luego de las extracciones, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF.

## **7. Separación electroforética de las muestras**

Para llevar a cabo la separación electroforética de las muestras obtenidas, se utilizaron geles de poliacrilamida nativos o con SDS al 7.5% o al 10%, de 1.5 mm de espesor preparados siguiendo la técnica descrita por Hames (1981) para los geles nativos y de Laemmli (1970) para los geles desnaturalizantes con SDS. Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra con o sin SDS con 10% glicerol y azul de bromofenol (BPB). La corrida se realizó utilizando una cuba Mighty Small II (Hoefer), bajo condiciones de corriente constante (20 mA por gel) a temperatura ambiente.

## **8. Tranferencia a nitrocelulosa**

Para la inmovilización de proteínas sobre nitrocelulosa se siguió la técnica descrita por Towbin y colaboradores (1979). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH = 8.3 por 30 min. Posteriormente, los mismos fueron colocados sobre las membranas de nitrocelulosa y sobre cada uno de ellos se dispuso un papel de filtro (Whatman nro. 3) y una esponja, ambos previamente humedecidos en el buffer antes mencionado.

Todo el dispositivo (esponja-filtro-gel-nitrocelulosa-filtro-esponja) fue inmovilizado entre dos placas de acrílico e introducido en un tanque conteniendo el buffer previamente descrito, orientando el gel hacia el ánodo.

La transferencia fue llevada a cabo durante toda la noche a 4°C, utilizando voltaje constante de 35 V.

## **9. Western blot**

Para la detección inmunológica de la proteína DE, los sitios remanentes en las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueados con una solución 20 mg/ml de leche en polvo descremada en PBS 0.02% Tween 20 (PBST), seguida de una incubación con anti-DE 1:200 en solución de bloqueo. Luego se realizaron 3 lavados en PBST. Las membranas fueron posteriormente incubadas con anti-IgG de conejo acoplado a biotina, 1:500 en solución de bloqueo. Finalizada la incubación se repitió el procedimiento de lavado. Las membranas fueron luego incubadas con una solución de extravidina-peroxidasa 1:1000 en una solución 1 mg/ml de BSA en PBS y nuevamente lavadas con PBST. Con el fin de eliminar el Tween 20, se realizó un lavado adicional con Tris 0.1 M, pH 7.5. Por último, se realizó la reacción de revelado con el sustrato diaminobencidina (DAB) (DAB 50 µg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% en Tris 0.1 M pH 7.5). La reacción se detuvo con un exceso de agua. Todas las incubaciones fueron realizadas por un período de 60 min. a temperatura ambiente, con agitación.

## **10. Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de espermatozoides**

Los espermatozoides fueron fijados por agregado de un volumen de p-formaldehído 2% durante 10 min y lavados tres veces con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA. Los espermatozoides fijados fueron extendidos sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina 0.1 mg/ml. Las muestras fueron bloqueadas con suero de cabra normal (SCAN) 5% en PBS, por un período de 30 min. a 37°C, seguida por una incubación con anti-DE (1:100 en SCAN 1% en PBS) durante 16 hs a 4°C. Posteriormente, fueron realizados tres lavados con PBS y las muestras incubadas con anti-IgG de conejo acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) (1:100 en PBS), 30 min. a 37°C. Terminada la incubación



las muestras fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS y montadas con glicerol 90% y el cubreobjetos sellado con esmalte. Los preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot) bajo un aumento de 1125x.

En el caso de los espermatozoides epididimarios de ratón, hámster, cobayo, conejo como así también de los espermatozoides eyaculados de bovino, ovino y humano el procedimiento fue similar, salvo que el anticuerpo anti-DE fue utilizado en una dilución 1:50.

## **11. Inmunoprecipitación**

Este procedimiento consta de tres etapas 1) lisado de las células, 2) formación del complejo inmune y 3) purificación del complejo inmune.

Las células fueron lisadas con buffer de lisis (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris, pH:8) durante 30 min. en hielo. Luego las mismas fueron centrifugadas a 10000 xg a 4°C por 10 min. y 300 µl del sobrenadante incubados con las distintas concentraciones de anti-DE o SCN (suero de conejo normal) en hielo durante 1 h. Para separar el complejo inmune se agregaron 30 µl de SAC (*S.aureus* Cowan I, Sigma) 10% durante 30 min. en hielo. Se centrifugó a 10000 xg por 1 min. y el sobrenadante fue descartado. El pellet fue lavado 3 veces con buffer de lisis y preparado para ser separado electroforéticamente.

En el caso en que se estudió la especificidad de la banda detectada, los espermatozoides fueron incubados con cloruro de guanidinio 6M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH=11, DTT 100 mM, Glicina 50 mM (pH = 3) o NaCl 2M tal como se describiera anteriormente y centrifugados a 10000 xg. Los pellets correspondientes a los espermatozoides fueron lisados y luego sometidos a la inmunoprecipitación con anti-DE. Por otro lado, la presencia de DE en los sobrenadantes obtenidos fue analizada por electroforesis en geles nativos 7.5% y Western blot, tal como se describiera anteriormente.

## **12. Unión covalente (“cross-linking”)**

Los espermatozoides recuperados del testículo o del cauda epididimario fueron lavados 3 veces con PBS y luego incubados durante 15 min. con disuccinimyl suberato (DSS, Pierce) 0.1 mM en DMSO en hielo. Luego se agregó Tris 1M (pH = 7.4) hasta una concentración final de 167 mM y EDTA 1 mM hasta una concentración final de 0.16 mM y se incubó 5 min. en hielo. Posteriormente, los espermatozoides fueron lavados tres veces con PBS luego de lo cual fue realizada la inmunoprecipitación, tal como se describió anteriormente.

## **13. Capacitación *in vitro* de los espermatozoides**

### ***13.1 Espermatozoides de rata***

El medio utilizado para la recuperación y capacitación de los espermatozoides de rata corresponde al medio de fertilización de rata, RFM, descrito por Kaplan y Kraicer (1978). Los epidídimos fueron obtenidos tal como se mencionó anteriormente. Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides móviles del cauda se efectuó un sistema de selección que consiste en una modificación de la técnica descrita por Shalgi y colaboradores (1981). Para ello, un tubo cónico conteniendo los espermatozoides cubiertos de 2 ml de RFM fue incubado por un período de 15 min. a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir que los espermatozoides móviles asciendan hacia la superficie libre (“swim up”). Sólo fueron utilizadas aquellas suspensiones que, al cabo del período mencionado, presentaran una concentración mayor a  $5 \times 10^6$  esp/ml en los 100 µl superiores de la misma. En caso contrario, se procedió a preparar una nueva suspensión proveniente de un nuevo animal. La concentración de espermatozoides se determinó mediante la utilización de un hemocitómetro.

La capacitación fue realizada en placas de cultivo de 24 hoyos (Costar) conteniendo 400 µl de RFM cubiertos por 300 µl de aceite de parafina por hoyo (Sigma), previamente equilibrados durante 1 h en el incubador con gaseo

automático (Forma Scientific). En cada hoyo de capacitación se sembró un volumen de espermatozoides tal que la concentración final resultara entre 0.5 y  $1 \times 10^6$  esp/ml. La capacitación se llevó a cabo continuando la incubación en las mismas condiciones de temperatura y  $\text{CO}_2$ , por un período de 5 hs.

### **13.2 Espermatozoides de ratón**

Para la obtención y capacitación de espermatozoides de ratón se utilizó el medio descrito por Fraser y Drury (1975) suplementado con 3% BSA. Los epidídimos fueron obtenidos y limpiados como se mencionó anteriormente, y los espermatozoides obtenidos por punción de los túbulos del cauda epididimario. Posteriormente, se realizó una suspensión de los espermatozoides obtenidos en una gota de 200  $\mu\text{l}$  de medio bajo aceite de parafina. La motilidad y la concentración de espermatozoides fueron evaluadas tal como se describió anteriormente. La capacitación fue llevada cabo en gotas de 200  $\mu\text{l}$  de medio bajo aceite de parafina. En cada gota se sembró una alícuota de la suspensión original de forma tal que la concentración final resultara de  $10^6$  esp/ml. La capacitación se llevó a cabo continuando la incubación por un período de 90 min. a  $37^\circ\text{C}$  en estufa con gaseo automático.

## **14. Enzimoimmunoensayo (ELISA)**

Los espermatozoides frescos y capacitados sometidos a los distintos tratamientos fueron sembrados en los hoyos (Nunc-Immuno Plate F96) a una concentración de  $10^6$  esp./ml y centrifugados en las placas correspondientes durante 10 min. a 2000 r.p.m. Luego las células se fijaron con glutaraldehído 2 % durante 10 min. Las placas fueron lavadas tres veces con una solución de PBS conteniendo Tween 20, 0.05% (PBS-T20). Los sitios remanentes en las placas fueron bloqueados con PBS conteniendo leche descremada 20 mg/ml, durante 1 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, las mismas fueron incubadas durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con 100  $\mu\text{l}$  de anti-DE 1:250 en PBS-BSA 0.1%.

Finalizada la incubación, las placas fueron lavadas, e incubadas con 100  $\mu$ l de anti-IgG de conejo biotinilado (1:500 en PBS-BSA 0.1%, 0.05% Tween 20), durante 1 h a 37°C. Luego de repetirse los lavados, las placas fueron incubadas con 100  $\mu$ l de Extravidina-fosfatasa alcalina (Sigma, 1:1000 en PBS-BSA 1%, 0.05% T-20), a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, luego de 3 lavados con PBS-T20 se agregaron 100  $\mu$ l de p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml (Sigma 104) en buffer de DEA (Dietanolamina 10%,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0.5 mM, pH= 9,8). La medición se realizó en un lector de ELISA (7520 Microplate Reader, Cambridge Technology, Inc.) a una longitud de onda de 405 nm.

### **15. Obtención de fluido epididimario**

Los epidídimos de ratas machos adultos fueron obtenidos como se describió anteriormente y colocados en una gota de 200  $\mu$ l de RFM sin albúmina, bajo aceite de parafina. Los túbulos fueron expuestos por ruptura de la cápsula y punzados en distintos sitios. La liberación del contenido de dichos túbulos fue favorecida por presión de los epidídimos con una espátula. La suspensión obtenida fue luego centrifugada a 2500 xg y los espermatozoides, descartados. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado y el fluido epididimario (sobrenadante) fue guardado a -20°C hasta el día del experimento. La cantidad de proteínas presentes en el fluido epididimario fue determinada por el método de Lowry (1951), obteniéndose una concentración promedio de 7.5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **16. Ensayo de decapitación**

Los espermatozoides obtenidos de la región del cauda epididimario fueron incubados bajo condiciones capacitantes en medio RFM en presencia de distintas concentraciones de fluido epididimario (30 - 300  $\mu$ g/ml) o de proteína DE (50 - 100  $\mu$ g/ml). Al cabo de 5 hs. los espermatozoide fueron recuperados y la ocurrencia de la capacitación evaluada tanto por la ocurrencia de la reacción acrosomal como así también por la capacidad de fusión de dichos

espermatozoides. El porcentaje de reacción acrosomal se midió a través de la migración de DE al segmento ecuatorial. Para ello, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a IIF tal como fuera descrito anteriormente. Para la evaluación de la capacidad de fusión de los espermatozoides tratados, se utilizó el ensayo de penetración el cual será descrito más adelante (Ver Ensayo de penetración).

## **17. Ensayo de fertilización *in vitro* de ovocitos de rata intactos**

### **17.1 Medios**

Los medios utilizados correspondieron al medio de fertilización de rata (RFM) descrito por Kaplan y Kraicer (1978) y al medio descrito por Toyoda y Chang (Tch, Toyoda y Chang, 1974). En todos los casos los medios fueron preparados el día anterior al experimento y equilibrados en estufa gaseada por 16 hs.

### **17.2 Estimulación de las hembras**

Para la estimulación de las hembras prepúberes utilizadas en estos ensayos se utilizaron tres esquemas distintos:

a) Las hembras fueron estimuladas siguiendo el método descrito por Walton y colaboradores (1983). En este caso las hembras prepúberes de más de 60 g fueron inyectadas intraperitonealmente con 5 UI de suero de yegua preñada (PMSG, Sigma) entre 2 y 3 hs luego de iniciado el período luminoso del día -3 previo a la realización del experimento (día 0). No se administró gonadotrofina coriónica humana (hCG), produciéndose en este caso, un pico endógeno de LH. Las hembras fueron sacrificadas entre 69 y 71 hs luego de la administración de PMSG.

b) Las hembras fueron estimuladas utilizando un método que correspondió a una modificación del método descrito anteriormente: Las hembras prepúberes fueron inyectadas con 5 UI de PMSG, tal como se describiera en el párrafo

anterior, y luego de 52 hs. inyectadas con 15 UI de hCG (Sigma). Las hembras fueron sacrificadas 15 a 17 hs. luego de la administración de hCG.

c) Las ratas hembras prepúberes fueron superovuladas mediante la administración intraperitoneal de 20 UI de PMSG, seguida por una de 15 UI de hCG 48 a 60 hs más tarde. Las hembras fueron sacrificadas 12 a 15 hs luego de la administración de hCG.

En todos los casos las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y los oviductos de cada hembra colocados en forma separada en 2.5 ml de medio equilibrado. Las ampullas fueron punzadas y los cúmulos de ovocitos lavados por pasaje a través de dos cápsulas conteniendo 2.5 ml de medio fresco y colocados en gotas de 50  $\mu$ l de medio bajo aceite.

### **17.3 Obtención de espermatozoides y coincubación de las gametas**

Para la obtención de espermatozoides, machos adultos fueron sacrificados por dislocación cervical y el epidídimo y el *vas deferens* recuperados. Luego de ser cuidadosamente limpiados de sangre y tejido adiposo, la cola del epidídimo fue decapsulada utilizando para ello dos pinzas de disección nro. 5 y la sección del túbulo epididimario más próximo a la salida del *vas deferens* fue desenrollada. Posteriormente el túbulo epididimario expuesto y el *vas deferens* fueron comprimidos con una pinza en una gota de 600  $\mu$ l de medio bajo aceite, y los espermatozoides liberados incubados por 5 min. para permitir su dispersión. La concentración fue ajustada a  $1.25 \times 10^6$  esp/ml y un volumen de 40  $\mu$ l de dicha suspensión fue agregado a las gotas previamente preparadas conteniendo los ovocitos (concentración final  $1.25 \times 10^5$  esp./ml).

Las gametas se coincubaron a 37°C, en estufa gaseada, durante 24 hs., al cabo de las cuales se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados. Se consideraron penetrados a aquellos ovocitos que presentaran uno o más espermatozoides incorporados al citoplasma.

En el caso en que se evaluó el efecto del agregado de anti-DE sobre la fertilización *in vitro*, las gametas fueron incubadas en presencia de anti-DE o SCN a una dilución 1:50.

## **18. Obtención de zonas pellucidas**

Para la obtención de zonas pellucidas de rata fueron ensayados tres métodos de separación:

### ***18.1 Mecánicamente, a partir de ovocitos ovulados***

Hembras prepúberes fueron superovuladas por inyección de 20 UI de PMSG seguida de 25 UI de hCG, recuperándose los ovocitos de la región de la ampulla oviductal (Ver Obtención de ovocitos). Dichos ovocitos fueron liberados de células del cumulus oophorus y pipeteados individualmente 1 o 2 veces utilizando una pipeta de diámetro ligeramente menor al de la zona pellucida. El ovocito roto fue rápidamente removido y las zonas recuperadas y lavadas mediante pasaje por varias gotas de medio fresco. Dicho medio (medio ZPM) consistió en una solución de PBS conteniendo 1 mg/ml PVP, 0.1  $\mu$ M PMSF y 2% citrato de sodio; el medio fue esterilizado por filtración y mantenido a 4 °C hasta el día del experimento.

### ***18.2 Separación en gradientes de Percoll***

Las zonas fueron purificadas a partir del tejido ovárico disgregado mecánicamente, mediante la separación del mismo en gradientes de Percoll, siguiendo la técnica descrita por Bleil y Wassarman (1986). El homogenato fue centrifugado a 13000xg durante 15 min. y el pellet fue resuspendido en 1.58 ml de medio Dunbar. (NaCl 130 mM; PO<sub>4</sub>Na 10 mM y citrato de sodio 11 mM) y agregado a 3.55 ml de Percoll (70% en medio Dunbar). El volumen total fue centrifugado a 31000xg durante 45 min. a 4 °C. Se tomaron fracciones del gradiente de 200  $\mu$ l, se las centrifugó 15 min. a 13000xg y se evaluó qué

fracción contenía las zonas, dicha fracción fue recuperada, y contabilizado el número de zonas obtenidas.

### ***18.3 Filtración a través de mallas de poro decreciente***

La técnica utilizada consistió en una modificación de la descrita por Oikawa y colaboradores (1988) para la obtención de zonas pellucidas de hámster a partir de ovarios.

Los ovarios utilizados fueron extraídos de hembras adultas o prepúberes superovuladas y mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día del ensayo. Los ovarios fueron disgregados mecánicamente contra una malla de nylon de  $212\ \mu\text{m}$ . La malla fue continuamente lavada con medio ZPM. Posteriormente, el eluido obtenido fue filtrado a través de una malla de  $48\ \mu\text{m}$ . En este caso las zonas quedaron retenidas en la malla, eluyéndose las células contaminantes (células de la granulosa y glóbulos rojos). El filtro conteniendo las zonas fue transferido a un vaso de precipitado, y lavado con medio ZPM de modo que las zonas se desprendieran del mismo. Finalmente, se contabilizó el número de zonas recuperadas.

Las zonas obtenidas por cualquiera de los tres métodos descritos, fueron solubilizadas por tratamiento ácido (pH 2.5). Luego de 30 min., fue realizada una centrifugación a  $2000\ \text{xg}$  durante 10 min. con la finalidad de descartar en el precipitado todo el material particulado que estuviera presente. El sobrenadante obtenido fue dializado y liofilizado. El día del experimento las zonas liofilizadas fueron resuspendidas en RFM a una concentración de 20 o 40 zonas/ $\mu\text{l}$  según el experimento.



## **19. Tratamiento con zona pellucida**

### ***19.1 Incubación de los espermatozoides con las zonas pellucidas solubilizadas***

Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes por un período de 3 hs., luego del cual, 10  $\mu$ l de dicha suspensión fueron transferidos a tubos Eppendorf conteniendo el mismo volumen de zonas. Como control se utilizó medio ZPM sometido al mismo procedimiento que las zonas pellucidas (acidificación, diálisis y liofilización).

Luego de la incubación (los tiempos y concentraciones utilizadas variaron según el experimento), los espermatozoides fueron fijados para ser luego sometidos a la técnica de IIF.

### ***19.2 Desarrollo de un sistema de IIF para un número pequeño de espermatozoides***

Dado que la cantidad de zonas disponibles resultaba un factor limitante para la realización de estos ensayos, se trató de utilizar el menor volumen posible de la solución de zonas pellucidas. Para ello, la incubación debió realizarse en un volumen final pequeño que implicaba la utilización de un volumen pequeño de espermatozoides. El bajo número de espermatozoides disponibles, sumado al hecho de que, a diferencia de lo que ocurre con los espermatozoides frescos, los espermatozoides capacitados se desprenden fácilmente de los portaobjetos, nos llevó a establecer un sistema que permitiera realizar la técnica de IIF sobre un número reducido de espermatozoides.

Así, siguiendo la metodología descrita por Morales y Cross (1987), se procedió a adsorber a distintos tipos de membranas pequeñas alícuotas de espermatozoides fijados, mediante el empleo de un dispositivo manifold operado por vacío. Las membranas ensayadas fueron HA 0.45  $\mu$ m (Millipore); nitrocelulosa 0.45  $\mu$ m (Sigma) y policarbonato 0.4  $\mu$ m (Nucleopore), las cuales

fueron previamente embebidas en una solución 5% de BSA en PBS. Una vez concluida la adsorción, las membranas fueron sometidas a la técnica de IIF por pasajes sucesivos a través de los vidrios de reloj conteniendo las distintas soluciones de anticuerpos y de lavado. Entre todas las membranas ensayadas, la membrana de policarbonato resultó la más adecuada.

## **20. Secuenciación de la Proteína DE**

La proteína DE purificada fue corrida electroforéticamente en geles de poliácridamida nativos (10%, 0.75 mm de espesor), teñidos con azul de Coomassie y la banda correspondiente fue cuidadosamente recortada del gel. La proteína fue degradada por tratamiento con tripsina y los péptidos obtenidos separados por HPLC. Los péptidos obtenidos fueron secuenciados por ciclos repetidos de la reacción de degradación de Edman (Matsudaira, 1990). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Keck Foundation, University of Yale, U.S.A.

Para el análisis de la secuencia obtenida se utilizaron los programas MOTIFS (GCG de la Universidad de Wisconsin) y BLAST (NCBI).

## **21. Preparación de citosoles de testículo y epidídimo de distintas especies**

Para la preparación de citosol de testículo y epidídimo de rata, ratón y hámster, dichos órganos fueron extraídos de animales sacrificados por dislocación cervical, e inmediatamente colocados en hielo. Los mismos fueron disgregados en frío, hasta obtener una preparación homogénea. Posteriormente, fueron agregados 1.5 volúmenes de una solución Tris 50 mM, pH 7.4 conteniendo 0.2 mM de PMSF, completándose la homogeneización mediante la utilización de un homogeneizador Polytron. Finalmente, la preparación resultante fue centrifugada durante 20 min. a 10000 xg y el sobrenadante fue centrifugado durante 60 min. a 105.000 xg y a una temperatura de 4°C, obteniéndose en el

sobrenadante la fracción correspondiente al citosol de cada una de las especies. Las fracciones obtenidas se dializaron contra 100 volúmenes de una solución de Tris 50 mM, pH 6.8. La concentración proteica de las muestras se determinó mediante la técnica descrita por Lowry y colaboradores (1951).

## **22. Obtención de ovocitos sin zona**

### **22.1 Ovocitos de rata**

Las ratas hembras prepúberes fueron superovuladas mediante la administración de 20 UI de PMSG, seguida por una de 25 UI de hCG 48 a 60 hs más tarde, tal como se describiera anteriormente. Doce a 15 hs luego de la administración de hCG, las hembras fueron sacrificadas, sus oviductos recuperados y los cúmulos de ovocitos obtenidos mediante una punción en la región de la ampulla. Dichos cúmulos fueron incubados con hialuronidasa 0.1%, durante 5 min. a 37°C con el fin de liberar las células del cúmulus y aquellos ovocitos libres de células lavados mediante 5-6 pasajes sucesivos por gotas de medio fresco. Los ovocitos sin zona pellucida se obtuvieron por tratamiento de los ovocitos intactos con una solución de Tyrode ácida (pH 2.5) (Nicolson *et al.*, 1975) durante 5 a 15 segundos y posterior lavado a través de 5-6 gotas de RFM fresco.

### **22.2 Ovocitos de ratón**

Con el fin de establecer las condiciones óptimas para obtener un alto número de ovocitos de ratón de buena calidad provenientes de ratones hembras superovuladas, se probaron distintas cepas de ratones (BALB/C y hembras híbridas (C57BL/6xCBA) y (C57BL/6xBALB/C)), cantidades de hormonas (2.5 y 10 UI de PMSG y hCG) y horarios de administración de las mismas. De acuerdo a los resultados obtenidos el esquema utilizado fue: hembras (C57BL/6xCBA)F1 adultas fueron superovuladas mediante la inyección de 5 UI de PMSG (administradas luego de la mitad del período luminoso y antes de que comience

el período de oscuridad), seguida por una de 5 UI de hCG 48 hs más tarde. Doce a 15 hs luego de la administración de hCG, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical, sus oviductos recuperados y los ovocitos libres de células del cúmulus y zona pellucida obtenidos de la misma manera que los anteriormente descritos para los ovocitos de rata. En este caso todos los tratamientos y lavados fueron realizados bajo aceite mineral.

### **23. Obtención de ovocitos inmaduros**

Los ovocitos de rata en crecimiento y en estadio de vesícula germinal (VG) fueron obtenidos de ovarios de hembras prepúberes no estimuladas, siguiendo la técnica descrita por Zuccotti y colaboradores (1991). Brevemente, los ovarios fueron limpiados de grasa y sangre, cortados en trozos pequeños e incubados a 37°C con agitación en 2 ml de RFM libre de BSA y conteniendo 2.5 mg/ml de colagenasa (tipo II; 440 CD U/mg, Sigma) y 400 U/ml de DNAsa (tipo Y; 580 Kunitz U/mg, Sigma). Luego de 30 min. se agregó BSA hasta una concentración de 1%, luego de lo cual la suspensión fue filtrada a través de una malla de 212  $\mu\text{m}$  con el fin de eliminar los restos del tejido ovárico. El filtrado fue centrifugado 2 min. a 190 xg y el pellet resuspendido en 2 ml de RFM conteniendo 2.4 mM de EGTA. Al cabo de 3 min., los ovocitos fueron nuevamente centrifugados y el pellet resuspendido en 2 ml de RFM. Los ovocitos fueron agitados vigorosamente durante 2 min. recuperándose ovocitos de distintos diámetros libres de células del cúmulus y de zona pellucida.

Con el fin de obtener ovocitos en distintos estadios de maduración (el diámetro de un ovocito de rata que ha completado su crecimiento es de 80  $\mu\text{m}$ ), las hembras fueron estimuladas con PMSG y hCG, como se describiera en la sección Obtención de ovocitos de rata, y sacrificadas 3, 6, 9 ó 11 hs luego de la inyección de hCG. Los ovocitos fueron obtenidos de los ovarios por punción de los folículos ováricos más desarrollados. El cúmulus fue liberado por tratamiento durante 2 min. con agitación con citrato de sodio 2%. Los ovocitos liberados del

cúmulus fueron tratados con Tyrode ácido, tal como se describió anteriormente, con el fin de solubilizar la zona pellucida.

Para examinar el estadio meiótico correspondiente a cada grupo, ovocitos en distintos estadios de crecimiento y maduración fueron incubados en 500  $\mu$ l de una solución 1  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 (Sigma) preparada en medio de capacitación. Luego de 15 min., los ovocitos fueron lavados exhaustivamente, fijados por 10 min. con 2% p-formaldehído en PBS, y examinados en un microscopio de epifluorescencia equipado con luz de mercurio (Zeiss).

#### **24. Sistema de inseminación intrauterina**

Con el fin de llevar a cabo las inseminaciones *in vivo*, las hembras fueron superovuladas utilizando el esquema descrito anteriormente (Ver la sección Obtención de ovocitos de rata) y, 10 hs post-hCG, fueron anestesiadas y sus úteros expuestos a través de una incisión medio-ventral. En forma paralela, se preparó una suspensión de espermatozoides provenientes de la región del cauda epididimario en medio RFM a 37°C, con una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  esp/ml.

Los espermatozoides fueron inyectados en un volumen de 0.1 - 0.2 ml dentro de la porción distal de cada cuerno uterino, siendo utilizada con esta finalidad una jeringa de tuberculina de 1 ml acoplada a una aguja n°25. Con el fin de evitar la pérdida de los espermatozoides inseminados, se efectuaron ligaduras en la base de los cuernos uterinos.

#### **25. Recuperación de ovocitos fertilizados y embriones**

Para la recuperación de ovocitos fertilizados y embriones de dos células de rata, las hembras previamente inseminadas fueron sacrificadas tras un período de 12 hs a partir de la inseminación para la obtención de ovocitos fertilizados y

de 36 hs para los embriones de 2 células. Los oviductos fueron extraídos con el fin de recuperar los ovocitos y embriones. Dicha recuperación fue realizada por perfusión del oviducto a través del ostium con medio RFM, utilizando para ello una aguja n°30 (Hamilton). Posteriormente, los ovocitos y embriones recuperados fueron examinados bajo microscopio (400 x) con el fin de evaluar la presencia de un espermatozoide en su citoplasma, luego de lo cual fueron recuperados y la zona pellucida removida por tratamiento con Tyrode ácido, tal como se describiera anteriormente.

## **26. Ensayo de fusión *in vitro***

La ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito fue evaluada por el ensayo de penetración o por la técnica de transferencia de colorante Hoescht 33342.

### **26.1 Ensayo de penetración:**

Los ovocitos de rata y ratón sin zona pellucida obtenidos como se describió anteriormente fueron incubados durante 20-30 min. en una gota de 100 µl de medio de fertilización correspondiente (aproximadamente 20 ovocitos/gota) mantenida a 37°C bajo aceite. Los espermatozoides previamente capacitados *in vitro* fueron agregados en una concentración final de 0.5 - 2.0 x 10<sup>5</sup> esp/ml y la incubación continuada, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, por un período de 3 hs para el caso de ovocitos inseminados con espermatozoides de rata, y de 8 hs para el caso de ovocitos inseminados con espermatozoides de ratón.

Al cabo del correspondiente período, los ovocitos fueron lavados en medio fresco con el fin de remover los espermatozoides débilmente unidos y examinados bajo microscopio de contraste de fase, con un aumento de 400x. En el caso de los ovocitos de rata se clasificaron como "penetrados o fertilizados" a aquellos que presentaron cabeza del espermatozoide incorporada al citoplasma (con o sin dispersión de la misma) o presencia de dos pronúcleos y cola del

espermatozoide en el citoplasma. En el caso de ovocitos de ratón se consideraron "penetrados" a aquellos que presentaron dos o más pronúcleos.

En los casos en que se evaluó la ocurrencia de fertilización cruzada de ovocitos de rata con espermatozoides de ratón, dichos ovocitos fueron incubados en el medio de capacitación correspondiente a espermatozoides de ratón, evaluándose luego la ocurrencia de la fusión a las 8 hs luego de comenzada la coincubación de las gametas.

En los casos en que se evaluó el efecto del agregado de proteína DE sobre la penetrabilidad de los ovocitos, los mismos fueron incubados por un período de 30 min. en gotas de medio de fertilización conteniendo las distintas concentraciones ensayadas, luego de lo cual, fueron expuestos a espermatozoides capacitados y, al cabo de un período de 3 hs (rata) u 8 hs. (ratón) de coincubación, examinados al microscopio para evaluación del porcentaje de penetración. En paralelo, los ovocitos fueron incubados de la misma manera con una proteína control (ovoalbúmina, Sigma)

### ***26.2 Técnica de transferencia de colorante Hoechst 33342:***

Para ello los ovocitos de rata sin zona pellucida fueron incubados durante 15 min., en 500  $\mu$ l de medio de fertilización conteniendo 1  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342. Posteriormente, fueron realizados 3 lavados de 30 min. cada uno en 700  $\mu$ l de medio fresco. Una vez completados los lavados, los ovocitos fueron colocados en gotas de 100  $\mu$ l de medio (aproximadamente 20 ovocitos/gota) e inseminados con espermatozoides capacitados continuándose la coincubación de las gametas por un período de 1 hora. Todos los pasos anteriores fueron realizados bajo aceite mineral y a 37°C en estufa con gaseo automático. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados con el fin de liberar los espermatozoides débilmente unidos, fijados con p-formaldehído 2% durante 10 min., montados y observados a 400x en un microscopio de epifluorescencia con luz de mercurio para la evaluación del porcentaje de ovocitos fusionados y el

número de espermatozoides fusionados por ovocito. Se consideraron fusionados a aquellos ovocitos que presentaron al menos un espermatozoides con cabeza fluorescente.

En los casos en que se evaluó el efecto del agregado de proteína DE sobre la fusogenicidad de los ovocitos, los mismos fueron pretratados con Hoechst 33342, lavados e incubados por un período de 30 min. en gotas de 100  $\mu$ l de RFM conteniendo 200  $\mu$ g/ml de proteína DE, luego de lo cual, fueron expuestos a espermatozoides capacitados y, al cabo de 1 h de coincubación, fijados y examinados al microscopio, tal como se describiera anteriormente.

## **27. Ensayos de unión al oolema**

Los ovocitos sin zona pellucida fueron incubados durante 20-30 min. en una gota de 100  $\mu$ l de medio de capacitación mantenida a 37°C bajo aceite. Los espermatozoides previamente capacitados fueron agregados en una concentración final de 0.5 - 2.0 x 10<sup>5</sup> esp/ml y la incubación continuada, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, por un período de 30 min.

Al cabo de dicho período, los ovocitos fueron lavados en medio fresco para remover los espermatozoides débilmente unidos, fijados con glutaraldehído 4% en PBS y examinados bajo microscopio de contraste de fase (500x), evaluándose tanto el porcentaje de ovocitos que presentan espermatozoides unidos como el número de espermatozoides unidos por ovocito.

## **28. Inmunofluorescencia indirecta de ovocitos y embriones**

Los ovocitos de rata y ratón como así también los ovocitos fertilizados y embriones de dos células de rata fueron incubados en gotas conteniendo 200  $\mu$ g/ml de DE u ovoalbúmina (proteína control) durante 30 min., fijados en p-formaldehído 2% durante 45 min., lavados por pasaje a través de varias gotas



de PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA (PBS-BSA 4) e incubados con solución de bloqueo, SCAN 5% en PBS-BSA 4 durante 30 min. a 37°C. Seguidamente, fueron incubados con anti-DE 1:50 en SCAN 1% en PBS-BSA 4, 2hs a 37°C. Posteriormente, fueron lavados con PBS-BSA 4 al que se agregó 0.1% Tween 20 (PBST-BSA 4) e incubados con anti-IgG FITC (Sigma) 1:50 en PBST-BSA 4, durante 30 min. a 37°C. Luego de un nuevo lavado, se procedió al montaje de los ovocitos y embriones en portaobjetos con glicerol 90%. Los mismos fueron cubiertos con cubreobjetos a los que se les había colocado una gota de vaselina:parafina (9:1) en cada esquina. La observación de los ovocitos y embriones montados fue realizada en un microscopio (Nikon Optiphot) equipado con óptica para epifluorescencia, bajo un aumento 500x.

## **29. Tratamiento con azida y citocalacina B**

En el caso de los ovocitos tratados con citocalasina B (cyt B), se partió de una solución 1 mg/ml de cyt B en dimetilsulfóxido (DMSO), llevando a una concentración final 20 µg/ml en RFM. Como control, los ovocitos fueron incubados en RFM conteniendo un volumen igual de DMSO. Los ovocitos de rata sin zona fueron preincubados en una gota de 100 µl conteniendo cyt B por un período de 20 min., luego del cual la proteína DE fue agregada a dichas gotas continuándose la incubación en presencia de ambas sustancias por 30 min. Concluida la incubación, los ovocitos fueron fijados con p-formaldehído 2% durante 45 min. y sometidos a la técnica de IIF.

Ovocitos sin zona fueron incubados por 20 min. en presencia de 5mM azida sódica y tal como se describiera anteriormente para cyt B, la proteína DE (200 µg/ml) fue agregada y la incubación continuada por 30 min. en presencia de azida. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF.

RESULTADOS

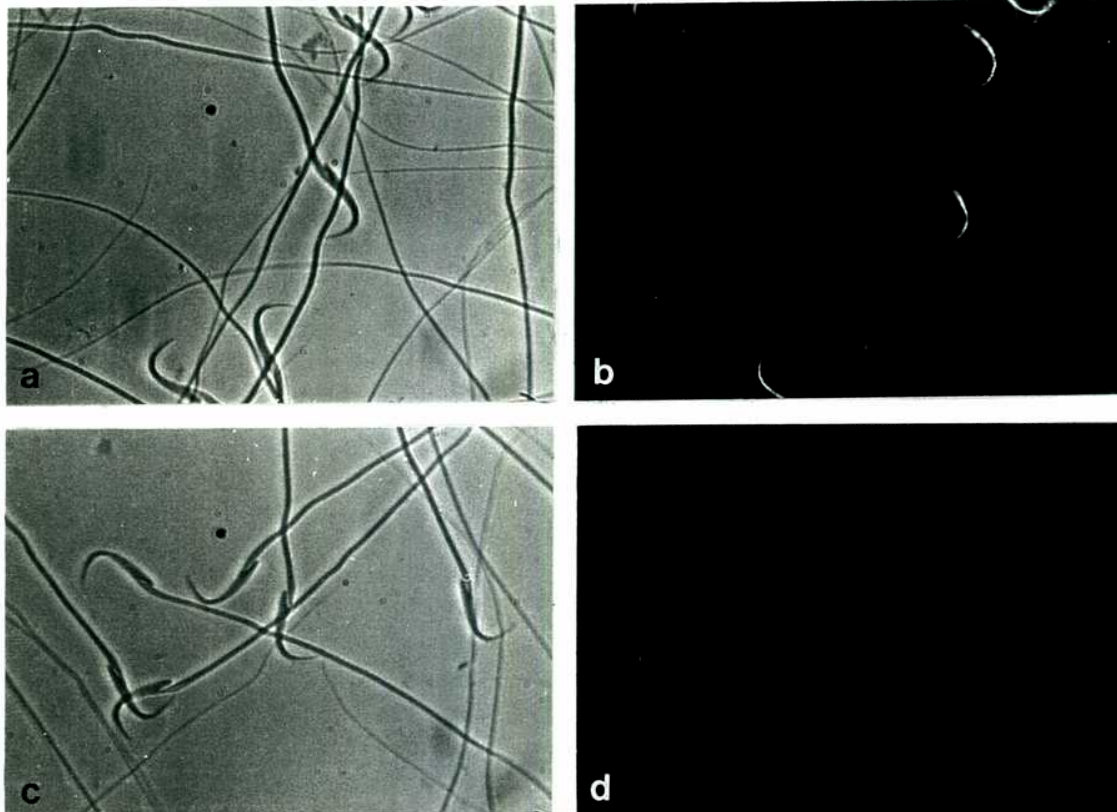
## **RESULTADOS**

### **PARTE I - INTERACCION DE LA PROTEINA "DE" CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE**

#### **I.1. Tipo de asociación de la proteína DE a la membrana plasmática del espermatozoide.**

Tal como se mencionó en la Introducción, la proteína DE se asocia a la cabeza de los espermatozoides a medida que los mismos descienden por el epidídimo. De acuerdo a los estudios realizados por Kohane y colaboradores (1980), el tratamiento de espermatozoides no capacitados con medios de creciente fuerza iónica producía la pérdida de una gran cantidad de proteína DE de la superficie de los mismos. Sin embargo, cierta proporción de la proteína permanecía asociada. Dado que en los estudios mencionados la concentración máxima de NaCl ensayada fue 0.4 M, existía la posibilidad de que la fuerza iónica utilizada en aquellos estudios no hubiera sido suficiente para extraer toda la proteína de la superficie de los espermatozoides. Con el fin de evaluar esta posibilidad, los espermatozoides fueron tratados con 2 M NaCl y luego sometidos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados indicaron que aún luego del tratamiento con 2 M NaCl fue posible detectar DE en la superficie del espermatozoide (Figura 1). Dicha proteína remanente, la cual se localizaba en la región dorsal del acrosoma, pudo ser extraída completamente por tratamiento de los espermatozoides con Tritón X-100 tal como lo indica la ausencia de marcación observada por IIF en los espermatozoides así tratados (Figura 1).

A su vez, los extractos proteicos correspondientes a los tratamientos con 2M NaCl y Tritón X-100 fueron separados electroforéticamente y la presencia de DE



**Figura 1. Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides tratados secuencialmente con 2 M NaCl y Tritón X-100**

Los espermatozoides fueron tratados, fijados y sometidos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IIF) utilizando anti-DE como primer anticuerpo. **a** y **b**) microfotografías de contraste de fase e IIF de espermatozoides tratados con 2 M NaCl. Nótese que los espermatozoides muestran marca fluorescente en la región dorsal del acrosoma. **c** y **d**) microfotografía de contraste de fase e IIF de espermatozoides tratados con Tritón X-100 luego del tratamiento salino. Nótese la ausencia de marca fluorescente. (625 x).

analizada por Western blot. Los resultados se muestran en la Figura 2 e indicaron que si bien gran parte de la proteína DE podía ser extraída con alta fuerza iónica, existía una población de DE extraíble con Tritón X-100 aún luego de dicho tratamiento salino.

Estos resultados confirmaban que en el espermatozoide de rata existirían dos poblaciones de proteína DE: una población "débilmente unida" que correspondería a aquella extraíble con fuerza iónica, y una segunda población "fuertemente unida", la cual permanecería unida a la superficie de los espermatozoides aún luego de este tratamiento salino.

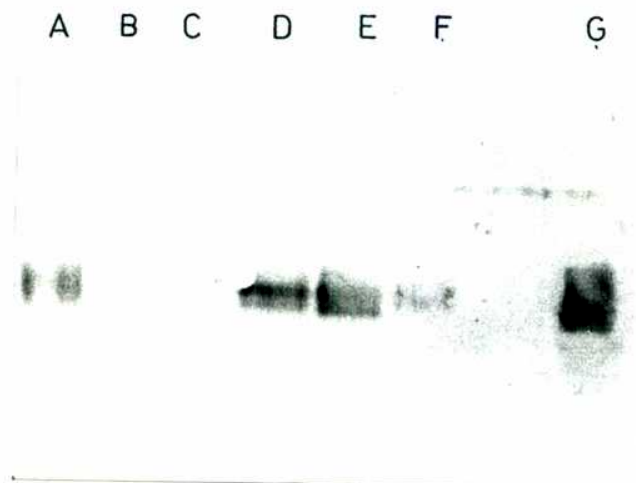
## **1.2 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de la población de DE "fuertemente unida" en el espermatozoide.**

Con el fin de estudiar el tipo de interacción de la proteína "fuertemente unida" con la membrana del espermatozoide, se evaluó el efecto de distintos tratamientos sobre la permanencia de dicha población de DE en el espermatozoide. Para ello, espermatozoides maduros previamente extraídos con 2 M NaCl, fueron tratados con bajo (3) y alto (11) pH, con cloruro de guanidinio y con urea. Con el fin de estudiar si existían puentes disulfuros involucrados en la unión de DE a la membrana, los espermatozoides fueron incubados con 100 mM ditioneitol (DTT). Como control, una alícuota de espermatozoides fue tratada en paralelo con PBS o con Tritón X-100. Los distintos extractos fueron separados por electroforesis y la presencia de DE revelada por Western blot. Los resultados se muestran en la Figura 3 donde se observa la presencia de una banda correspondiente a DE en los extractos provenientes del tratamiento con Tritón X-100, pH 11, cloruro de guanidinio y urea, y la ausencia de banda de DE en el caso del tratamiento con pH 3 o PBS. Con el fin de establecer si los tratamientos que habían provocado la liberación de DE de la membrana del espermatozoide, lo hacían en forma completa, los



**Figura 2. Efecto del tratamiento con alta fuerza iónica y Tritón X-100 sobre la asociación de DE a la membrana del espermatozoide .**

Espermatozoides frescos fueron extraídos secuencialmente con 2 M NaCl (A) y 1% Tritón X-100 (B). Los distintos extractos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida nativos (10 %) y la presencia de DE revelada por Western blot utilizando anti-DE como primer anticuerpo. En forma paralela se corrió proteína DE purificada (C).



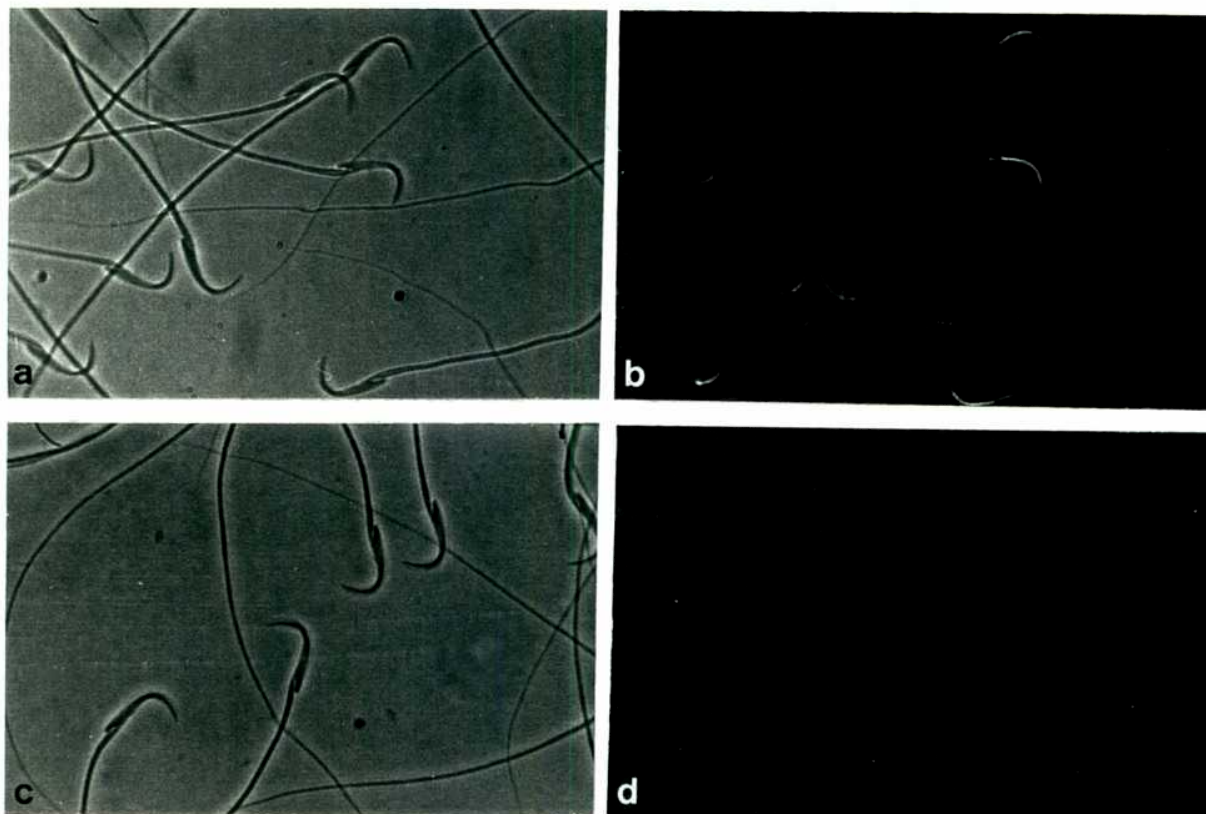
**Figura 3. Permanencia de DE sobre el espermatozoide luego de los distintos tratamientos.**

Espermatozoides previamente extraídos con 2 M NaCl, fueron luego tratados con: 1% Tritón X-100 (A), PBS (B), 50 mM glicina pH = 3 (C), 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH = 11 (D), 6 M Cl de guanidinio (E) u 8 M urea (F). Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida nativos (7.5 %), utilizando proteína DE pura como control (G). Luego de la separación electroforética, las muestras fueron transferidas a nitrocelulosa y reveladas por Western blot utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

espermatozoides extraídos fueron luego sometidos a IIF. Los resultados mostraron que en todos los casos la remoción de DE fue total, tal como lo indica la ausencia de marcación fluorescente en dichos espermatozoides. La Figura 4 muestra, como ejemplo, espermatozoides luego del tratamiento con cloruro de guanidinio.

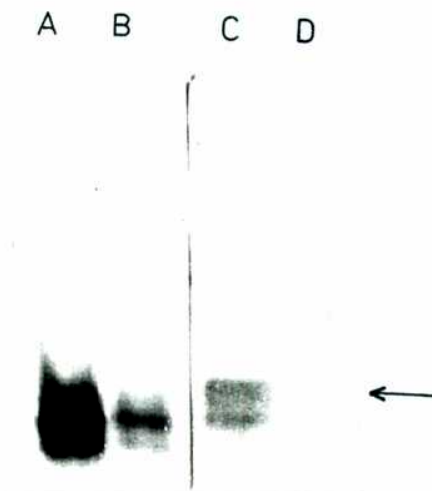
Los resultados obtenidos para el tratamiento con DTT se muestran en la Figura 5 e indicaron que el tratamiento con DTT permitió extraer proteína DE de la membrana plasmática del espermatozoide. Con el fin de determinar si la extracción de DE fue total, los espermatozoides fueron luego incubados con Tritón X-100 y los extractos analizados por Western blot. Los resultados obtenidos indicaron que la remoción fue completa ya que no se observó la presencia de DE en dichos extractos (Figura 5, calle C). En este sentido, es importante mencionar que la proteína extraída de los espermatozoides por tratamiento con DTT presenta un desplazamiento en su movilidad electroforética comparada con la proteína extraída por otros tratamientos (Figura 5). Estos resultados indicarían que existen puentes disulfuros involucrados de algún modo en la interacción de DE con la membrana del espermatozoide. Una posibilidad consistía en que la proteína DE estuviera unida por puentes disulfuro a algún componente de la membrana del espermatozoide, por lo que el tratamiento con DTT estaría reduciendo dicho/s puente/s. Otro mecanismo posible consistía en que la proteína DE no estuviera covalentemente unida a la membrana y que el DTT estuviera produciendo un cambio conformacional en DE que la liberara de su sitio de unión. Con el fin de determinar si el tratamiento con DTT era capaz de producir alguna alteración en la proteína por ruptura de puentes disulfuro intramoleculares, una muestra de proteína DE pura fue incubada con DTT (100 mM) y analizada por electroforesis en geles nativos y Western blot. Tal como puede observarse en la Figura 6 el tratamiento con DTT produjo un retardamiento en la movilidad de DE sugiriendo que





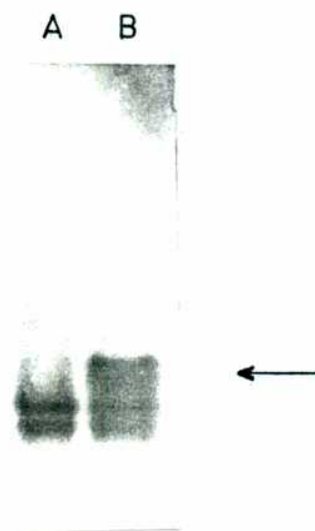
**Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides tratados con cloruro de guanidinio.**

Los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF, utilizando anti-DE como primer anticuerpo. **a y b)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides previo al tratamiento con cloruro de guanidinio. Nótese la marcación fluorescente en la región dorsal del acrosoma. **c y d )** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides luego del tratamiento con cloruro de guanidinio. Nótese la ausencia de marcación fluorescente. (625 x)



**Figura 5. Efecto del ditioneitol (DTT) sobre la unión de la proteína DE a la membrana plasmática del espermatozoide.**

Las muestras de proteínas extraídas de espermatozoides frescos en forma secuencial con 2 M NaCl (A), seguido de 1% Tritón X-100 (B) o 100 mM DTT (C), como así también de las proteínas extraídas con Tritón X-100 luego del tratamiento con DTT (D), fueron separadas por electroforesis en geles nativos (7.5%) y la presencia de DE evaluada por Western blot utilizando anti-DE.



**Figura 6. Efecto del tratamiento con DTT sobre la proteína DE purificada.**

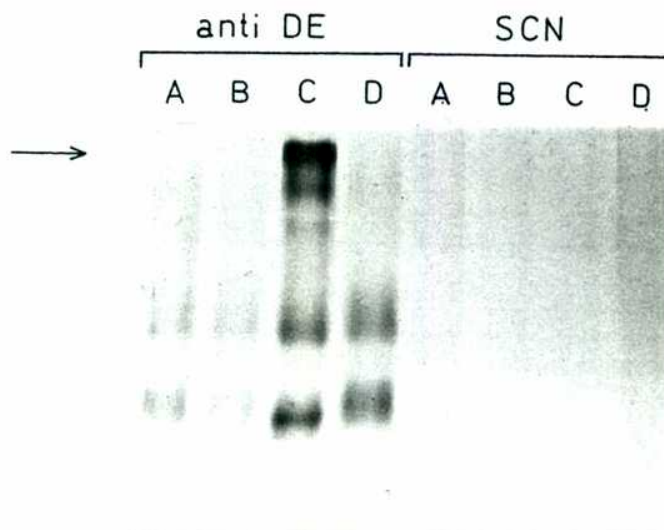
Proteína DE purificada (A) y proteína DE purificada y tratada con DTT (B) fueron sometidas a separación electroforética en geles nativos (10 %), transferidas a nitrocelulosa y reveladas por Western blot utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

La flecha indica la banda adicional observada al tratar la proteína DE con DTT.

este tratamiento sería capaz de inducir un cambio conformacional en la proteína.

Estos resultados, conjuntamente con el hecho de que otros tratamientos, que no rompen puentes disulfuros tales como el cloruro de guanidinio, la urea y el alto pH, produzcan la liberación de DE del espermatozoide, sugerían que DE se asociaría no covalentemente a la membrana plasmática del espermatozoide. El siguiente paso consistió en estudiar la posible existencia de un componente de membrana al que se uniría DE. En ninguno de los extractos analizados previamente había sido posible detectar una banda de alto peso molecular que pudiera corresponder al complejo de DE y su sitio receptor en el espermatozoide. Por lo tanto, se decidió realizar la inmunoprecipitación de un lisado de espermatozoides con anti-DE como una primera aproximación, ya que esta técnica permite aumentar la proporción del antígeno específico en la muestra a analizar. Con el fin de establecer la concentración óptima de anticuerpo a utilizar, el lisado de espermatozoides fue enfrentado a distintas concentraciones de anti-DE, precipitado y revelado por Western blot. Como control, el lisado fue incubado con iguales concentraciones de suero de conejo normal (SCN). Los resultados se muestran en la Figura 7 e indican que a una dilución 1:100 de anticuerpo se observa una banda de alto peso molecular en los lisados inmunoprecipitados con anti-DE.

Con el fin de evaluar la especificidad de la banda identificada, se estudió su presencia en lisados de espermatozoides a los que se les había extraído previamente la población de DE "fuertemente unida" mediante la utilización de cloruro de guanidinio, pH=11 o DTT. Si la banda fuera específica, la misma no debería ser detectada en estos lisados, mientras que debería observarse en los lisados provenientes de espermatozoides tratados con PBS, pH=3 o 2 M NaCl, los cuales no liberan esta población de DE del espermatozoide. Posteriormente, los espermatozoides sometidos a los distintos tratamientos fueron lisados,

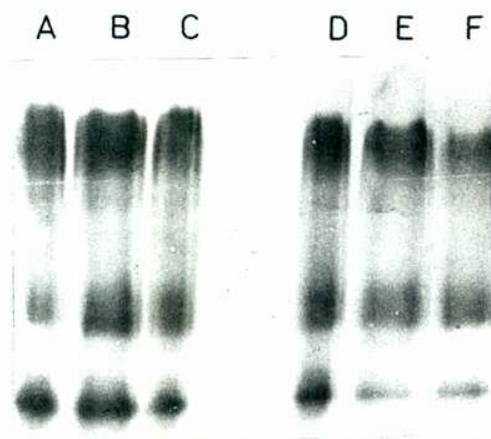


**Figura 7. Inmunoprecipitación de un lisado de espermatozoides utilizando anti-DE.**

El lisado de espermatozoides obtenido por tratamiento con Nonidet P-40 fue enfrentado a distintas diluciones de anti-DE o suero de conejo normal (SCN): 1:600 (A), 1:300 (B), 1:100 (C) o 1:60 (D). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron luego separadas por electroforesis en geles con SDS (7.5%) y reveladas por Western Blot. Obsérvese que en la calle correspondiente a la dilución 1:100 de anti-DE se observa una banda de alto peso molecular (flecha) que no se observa con SCN.

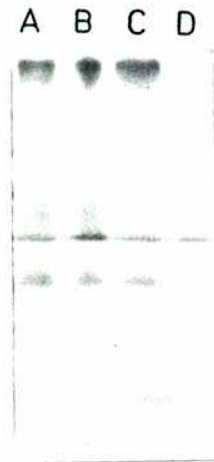
realizándose la inmunoprecipitación con anti-DE (1:100). Los resultados se muestran en la Figura 8 e indican que en todos los lisados fue posible observar la banda de alto peso molecular previamente identificada. Con el fin de evaluar si la presencia de dicha banda se debía a que los tratamientos con cloruro de guanidinio, pH=11 y DTT no hubieran sido efectivos en la remoción total de DE, los extractos de los espermatozoides tratados y luego sometidos a inmunoprecipitación, fueron separados por electroforesis y la presencia de DE evaluada por Western blot. En todos los casos fue posible detectar la presencia de proteína DE en dichos extractos.

Dado que, tal como se mencionara anteriormente, la unión de DE a la membrana del espermatozoide podría no ser covalente, existía la posibilidad de que la ausencia de una banda específica se debiera a que la proteína DE se liberase de su sitio de unión durante algún paso de la preparación de las muestras que incluye el agregado de SDS y calentamiento a 100 °C. Por lo tanto, se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación en lisados de espermatozoides previamente tratados con un agente que produce uniones covalentes ("cross-linker"). Para ello, los espermatozoides frescos fueron incubados con 0.1 mM disuccinimidil suberato (DSS) y luego lisados e inmunoprecipitados. Como control se utilizaron espermatozoides previamente tratados con DTT y espermatozoides testiculares (los cuales no poseen proteína DE), que fueron también sometidos al tratamiento de entrecruzamiento. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 9, las bandas observadas en espermatozoides no tratados fueron también detectadas en espermatozoides que no poseían proteína DE. En su conjunto, los métodos utilizados no permitieron la identificación del complejo DE-receptor en la membrana del espermatozoide.



**Figura 8. Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de una banda de alto peso molecular inmunoprecipitada con anti-DE.**

Espermatozoides frescos fueron tratados con bajo pH (A), 2M NaCl (B), PBS (C), alto pH (D), cloruro de guanidinio (E), y DTT (F). Posteriormente, se obtuvo un lisado de dichos espermatozoides por tratamiento con Nonidet P-40. Cada lisado fue inmunoprecipitado con anti-DE (1:100) y las muestras separadas por electroforesis en geles con SDS (7.5%) y reveladas por Western blot. Nótese que en todas las calles se observan las bandas previamente identificadas (Figura 7).



**Figura 9. Efecto del entrecruzamiento ("cross-linking") sobre la presencia de una banda de alto peso molecular inmunoprecipitada con anti-DE.**

Espermatozoides testiculares (A) y epididimarios ya sea tratados con DTT (B) o PBS (C) fueron incubados con DSS ("cross-linker") y luego inmunoprecipitados con anti-DE. (D) espermatozoides tratados como en (B) pero inmunoprecipitados con SCN.



### **1.3 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de DE en el espermatozoide inmaduro.**

Como se mencionó anteriormente la proteína DE se une al espermatozoide a medida que estos transitan por el epidídimo. Resultaba de interés, por lo tanto, estudiar si las dos poblaciones de DE se asociaban simultáneamente al espermatozoide o si lo hacían en forma secuencial. Para ello, espermatozoides inmaduros recuperados del caput epididimario, fueron tratados con 2 M NaCl y luego con Tritón X-100. Los extractos fueron separados electroforéticamente y la presencia de DE analizada por Western blot. Los resultados se muestran en la Figura 10 e indican que el tratamiento con 2 M NaCl fue incapaz de remover proteína DE de espermatozoides inmaduros. En forma paralela los espermatozoides tratados fueron luego sometidos a IIF. Los resultados muestran que la totalidad de los espermatozoides extraídos con alta fuerza iónica presentaron marca fluorescentes (Figura 11), indicando que dichos espermatozoides presentan DE “fuertemente unida”. El tratamiento posterior con Tritón X-100 liberó la proteína de la membrana plasmática de dichos espermatozoides (Figura 10).

Estos resultados estarían sugiriendo que en el primer segmento epididimario, es decir en el caput, los espermatozoides sólo presentarían DE fuertemente asociada a su membrana, y que la población “débilmente unida” observada en los espermatozoides maduros, se asociaría a medida que los mismos avanzan en el epidídimo.

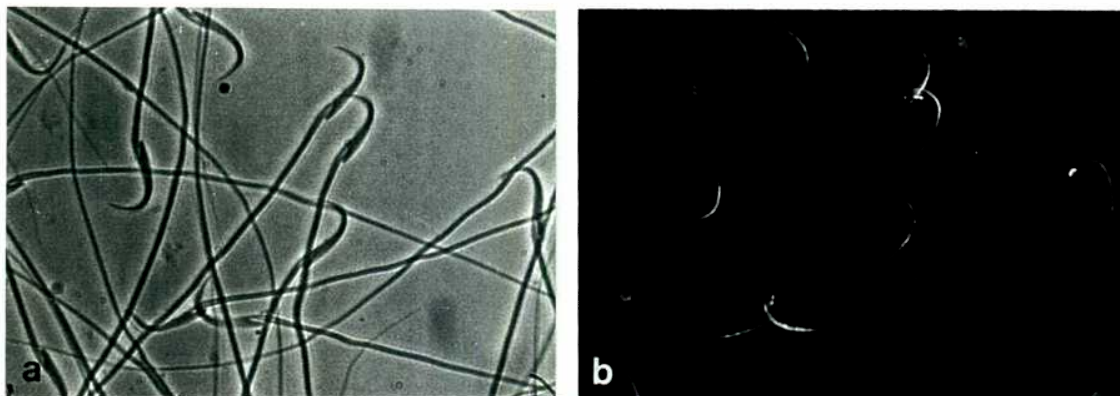
### **1.4 Relación entre el tipo de unión de DE a la membrana del espermatozoide y su comportamiento durante la capacitación.**

Hasta aquí los resultados indicaban la existencia en el espermatozoide de rata de dos poblaciones de DE de acuerdo a su tipo de interacción con la



**Figura 10. Permanencia de DE sobre espermatozoides inmaduros luego del tratamiento con alta fuerza iónica.**

Espermatozoides provenientes del caput epididimario fueron extraídos con 2M NaCl (B) y luego con 1% Tritón X-100 (C). Los extractos fueron dializados, liofilizados y luego separados por electroforesis en geles nativos (10%), transferidos a nitrocelulosa y revelados por Western blot. (A) proteína DE pura utilizada como control.



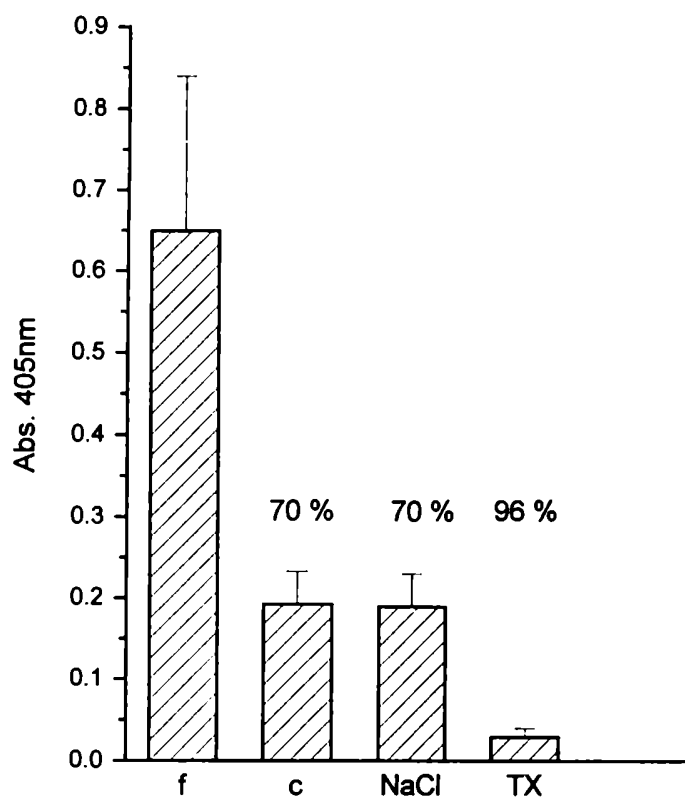
**Figura 11. Microfotografía de contraste de fase (a) e IIF (b) de espermatozoides inmaduros luego del tratamiento con 2 M NaCl.**

Espermatozoides recuperados del caput epididimario fueron extraídos con 2M NaCl, fijados y sometidos a la técnica de IIF. Nótese que los espermatozoides muestran marca fluorescente en la región dorsal del acrosoma.

membrana. Por otro lado, ha sido descrito que durante el proceso de capacitación se produce una pérdida importante de DE del espermatozoide (Kohane *et al.*, 1980), mientras que la proteína que permanece asociada, se redistribuye y participa en el proceso de fusión (Cameo *et al.*, 1986; Rochwerger *et al.*, 1992). De esta forma quedan entonces definidas también dos poblaciones de DE de acuerdo a su comportamiento durante el proceso de capacitación.

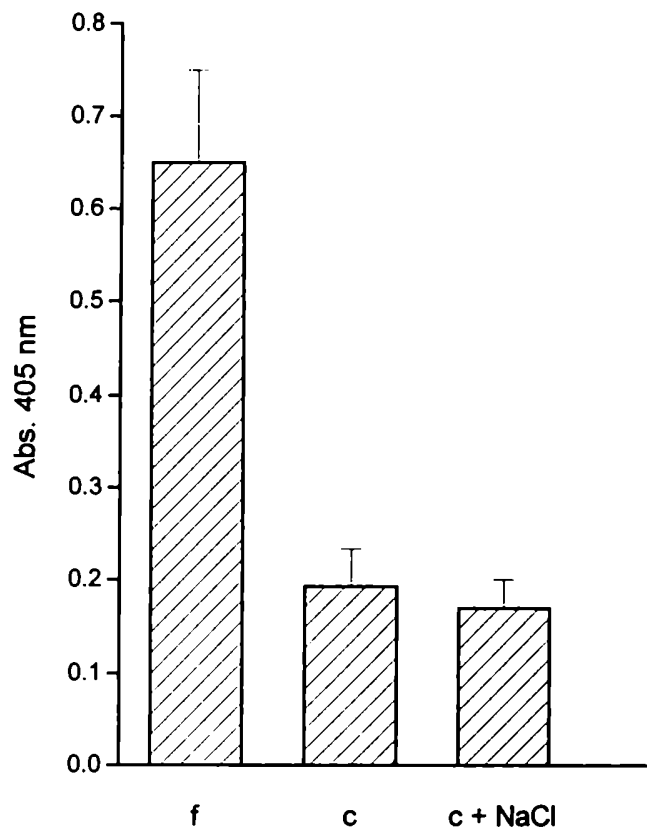
El paso siguiente consistió en estudiar si existía una correspondencia entre las poblaciones de DE de acuerdo a su tipo de asociación a la membrana y comportamiento durante el proceso de capacitación. Dado que está generalmente aceptado que serían las proteínas de recubrimiento, asociadas débilmente a la membrana del espermatozoides, las que se liberan durante la capacitación (Yanagimachi, 1994), estudiamos en primer lugar, si la población de DE que se libera durante la capacitación correspondía a la población "débilmente unida". Con el fin de evaluar esta posibilidad, espermatozoides frescos fueron tratados con 2 M NaCl o incubados bajo condiciones capacitantes por un período de 5 hs. La cantidad de proteína remanente luego de estos tratamientos se midió por la técnica de ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 12 e indican que tanto el tratamiento salino como la capacitación provocaron la liberación de cantidades similares de proteína DE de los espermatozoides (~70%). En forma paralela, se midió la cantidad de proteína DE presente en espermatozoides frescos tratados con Tritón X-100. De los resultados obtenidos se calculó que dicho tratamiento provoca la liberación del 96% de la proteína DE (Figura 12). Si la proteína "débilmente unida" es la que se libera durante la capacitación, el tratamiento salino no sería capaz de liberar proteína DE de espermatozoides previamente capacitados.

Para evaluar esta posibilidad, los espermatozoides fueron capacitados por un período de 5 hs y luego tratados con 2M NaCl. La cantidad de proteína remanente en los espermatozoides fue analizada por la técnica de ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 13 e indican que la cantidad de DE



**Figura 12. Cuantificación de la proteína DE remanente en espermatozoides sometidos a distintos tratamientos.**

Espermatozoides frescos (f) fueron tratados con 2 M NaCl (NaCl), incubados bajo condiciones capacitantes durante 5 hs (c) o tratados con Tritón X-100 (TX). La cantidad de proteína DE presente sobre los espermatozoides fue medida por la técnica de ELISA. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S. de 4 experimentos independientes.



**Figura 13. Cuantificación de la proteína DE remanente en espermatozoides capacitados y luego tratados con 2 M NaCl.**

Espermatozoides frescos (f) fueron incubados bajo condiciones capacitantes durante 5 hs (c) y luego tratados con 2 M NaCl (c + NaCl). La cantidad de proteína DE presente sobre los espermatozoides fue medida por la técnica de ELISA. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S. de 4 experimentos independientes.

presente en espermatozoides capacitados y luego tratados con NaCl es estadísticamente igual a la observada en espermatozoides solamente capacitados. Estos resultados confirmaban que la proteína que se libera durante la capacitación correspondería a la población "débilmente unida" y sugerían que la población "fuertemente unida" sería la que permanece unida a la superficie del espermatozoide luego de la capacitación y migra al segmento ecuatorial.

Con el fin de establecer si la población "fuertemente unida" era capaz de migrar al segmento ecuatorial, los espermatozoides fueron tratados con 2 M NaCl, de forma tal de eliminar la población "débilmente unida", capacitados durante 5 hs y sometidos a IIF. Como control se utilizaron espermatozoides capacitados que no habían recibido al tratamiento salino previo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 donde puede observarse que luego del tratamiento salino, el 91 % de los espermatozoides capacitados presentaban redistribución de DE. Estos resultados indicaron que, efectivamente, la población de DE "fuertemente unida" era capaz de redistribuirse al segmento ecuatorial.

## **1.5 Función biológica de las distintas poblaciones de DE**

### ***1.5.1 Función biológica de la población "débilmente unida"***

Dado que la población "débilmente unida" de DE se libera del espermatozoide durante la capacitación, existía la posibilidad de que esta población de DE cumpliera algún papel como factor decapacitante, manteniendo las membranas estabilizadas e impidiendo la ocurrencia del proceso de capacitación.

Con el fin de evaluar esta posibilidad, espermatozoides maduros fueron capacitados en presencia de distintas concentraciones de proteína DE evaluándose luego la ocurrencia de la capacitación. Como control se utilizaron espermatozoides incubados con fluido del cauda epididimario (CEP), el cual posee una ya demostrada actividad decapacitante (Bavister *et al.*, 1978).

**Tabla 1. Efecto de la capacitación sobre la localización de la proteína DE “fuertemente unida”**

Tratamiento	% de esp. con marca	
	dorsal	segmento ecuatorial
NaCl 2 M, RFM 0 hs.	94	6
NaCl 2 M, RFM 5 hs.	7	91
RFM 5hs.	45	53

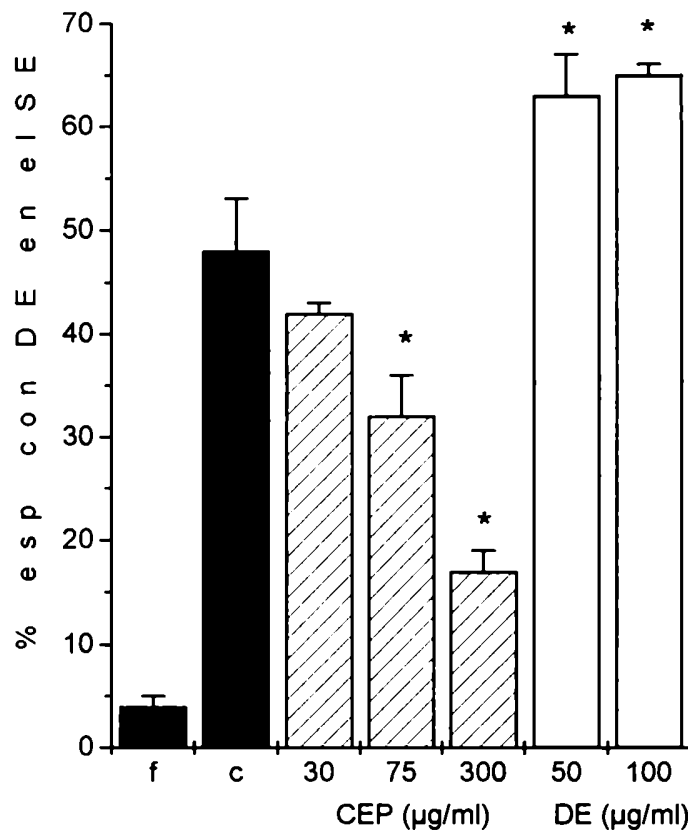
Los espermatozoides (esp.) fueron tratados con 2 M NaCl, incubados bajo condiciones capacitantes y sometidos a la técnica de IIF. Como control se utilizaron espermatozoides capacitados que no habían sido sometidos al tratamiento salino previo. Los resultados representan la media de 3 experimentos.



La ocurrencia de la capacitación fue evaluada a través de la ocurrencia de la reacción acrosomal y de la capacidad de los espermatozoides de fusionarse con ovocitos sin ZP. Dado que hasta el momento no ha sido descrito ningún método para la detección de la reacción acrosomal en la rata, este parámetro fue medido indirectamente a través del porcentaje de células que presentaban redistribución de la proteína DE al segmento ecuatorial, la cual ocurre como consecuencia de la reacción acrosomal (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). La ocurrencia de la fusión de gametas fue medida utilizando la técnica de penetración de ovocitos.

Los resultados se muestran en la Figura 14 y en la Tabla 2 e indican que CEP produjo una disminución tanto en el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE como así también en el porcentaje de ovocitos penetrados. En el primer caso la inhibición fue significativa a partir de una concentración de 75  $\mu\text{g/ml}$  y dependiente de la concentración utilizada. En el caso en que se midió la penetración de ovocitos, dicha inhibición fue total a una concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Por su parte, el agregado de DE durante la capacitación no sólo no produjo una disminución en el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE, sino que produjo un aumento significativo en dicho porcentaje con respecto a los espermatozoides control ( $p < 0.05$ ), el cual no dependió de la concentración de DE utilizada (Figura 14). El porcentaje de ovocitos penetrados por espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de DE resultó ser 0% (Tabla 2) a pesar de que, como se mencionó anteriormente, dichos espermatozoides presentaban altos porcentajes de reacción acrosomal (65%). En todos los casos se observó aglutinación de los espermatozoides en presencia de DE.



**Figura 14. Efecto de la presencia de DE durante la capacitación sobre la ocurrencia de la redistribución de DE al segmento ecuatorial (reacción acrosomal).**

Los espermatozoides fueron capacitados en ausencia (■) o presencia de distintas concentraciones de proteína DE (□) o fluido epididimario CEP (▨) durante 5 hs. La ocurrencia de la reacción acrosomal se evaluó por inmunofluorescencia indirecta como la capacidad de la proteína DE de migrar al segmento ecuatorial.

f: espermatozoides no capacitados; c: espermatozoides capacitados; SE: segmento ecuatorial; \*  $p < 0.001$  vs c;  $n = 4$

**Tabla 2. Efecto de la presencia de DE durante la capacitación sobre la capacidad de fusión de los espermatozoides.**

Tratamiento de los espermatozoides	Nro. de ovocitos	% ovocitos penetrados
Control	24	60 ± 2
CEP (75 µg/ml)	16	37 ± 2 *
CEP (300 µg/ml)	16	0 **
DE (50 µg/ml)	32	0 **
DE (100 µg/ml)	34	0 **

Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes en ausencia (control) o presencia de fluido epididimario (CEP) o proteína DE pura durante 5 hs. Ovocitos sin ZP fueron inseminados con espermatozoides provenientes de los distintos tratamientos, evaluándose a las 3 hs. el porcentaje de ovocitos penetrados. Los resultados representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes.

\* p < 0.01 vs. control, \*\* p < 0.001 vs. control.

### ***1.5.2 Función biológica de la población “fuertemente unida”***

Había sido previamente establecido que la población que permanece en el espermatozoide luego de la capacitación, y que de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponde a la población “fuertemente unida”, migra al segmento ecuatorial y participa en el proceso de fusión (Rochwerger *et al.*, 1992; Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Sin embargo, diversas evidencias tales como la correlación entre la asociación de DE al espermatozoide y la adquisición de capacidad de unión a la ZP durante la maduración epididimaria (Kohane *et al.*, 1980) y su localización en la región dorsal del acrosoma (Rochwerger y Cuasnicu, 1992), sugerían que la proteína DE podría estar además involucrada en la etapa previa de interacción con la ZP. Por lo tanto, resultaba interesante estudiar la participación de la población que permanece en el espermatozoide luego de la capacitación (“fuertemente unida”) en la etapa de unión a ZP.

#### **1.5.2.1 Establecimiento de las condiciones para el ensayo de fertilización in vitro de ovocitos de rata intactos**

Para evaluar esta posibilidad, resultaba necesaria la utilización del ensayo de fertilización de ovocitos intactos. Sin embargo, si bien se habían realizado numerosos intentos, nuestro laboratorio no disponía de este ensayo, el cual ha sido desarrollado hasta el momento por muy pocos laboratorios en el mundo. Por lo tanto, se propuso intentar, una vez más, el desarrollo de dicha técnica.

Teniendo en cuenta la posible existencia de problemas en la metodología utilizada en intentos previos, se ensayaron diversas variables, entre las que se incluyeron:

a) el medio de incubación: se ensayó la fertilización en dos medios descritos en la literatura para la rata: Toyoda & Chang (TCh) y el medio de fertilización de rata (RFM). A su vez el medio TCh fue preparado con agua de distintas calidades (filtrada, tridestilada y para cultivo de embriones).

b) el tipo de aceite de parafina: se utilizaron aceites con distintas densidades (liviano y pesado).

c) origen de los espermatozoides: se utilizaron tanto espermatozoides epididimarios obtenidos por punción de los túbulos de mayor diámetro, como espermatozoides recuperados del epidídimo y de la primera sección del vas *deferens*, por compresión del túbulo.

d) esquemas de estimulación de las hembras: las hembras fueron estimuladas por la administración de 20 UI de PMSG seguida de la administración de 15 UI de hCG 48 hs. después. Otro esquema utilizado fue el descrito por Walton y Armstrong (1983), en el que se inyectan 5 UI de PMSG y no se administra hCG (en este caso existiría un pico endógeno de LH). Así mismo, se probó una combinación de ambos esquemas en que se administraron 5 UI de PMSG y, posteriormente 15 UI de hCG. En todos los casos los ovocitos fueron recuperados del oviducto y puestos a fertilizar en presencia de las células del cúmulus.

e) tratamiento de los ovocitos: los ovocitos recuperados de cada una de las hembras fueron juntados y luego repartidos en los distintas gotas de fertilización, o bien, fueron obtenidos de las distintas hembras e incubados en forma separada.

Los resultados se resumen en la Tabla 3 y Figura 15. De todas las condiciones ensayadas, las únicas que permitieron obtener porcentajes de penetración entre 20 y 100 % (promedio 52%) fueron:

- Medio de TCh preparado con agua filtrada
- Espermatozoides recuperados por compresión del túbulo epididimario y parte del vas *deferens*

**Tabla 3. Efecto de las distintas condiciones experimentales ensayadas sobre la fertilización *in vitro* de rata.**

Medio	Agua	Superovulación		Esperm	Aceite	n. ovoc.	% P (rango)
		PMSG	hCG				
RFM	fil	5	15	e/vd	H	21	0
	fil	5	15	e	H	25	0
TCh	EC	5	15	e/vd	H	28	0
	trid.	5	15	e/vd	H	11	0
	fil.	20	15	e	H	12	0
	fil.	20	15	e/vd	H	8	12 (0-25)
	fil.	5	15	e	H	25	2 (0-12)
	fil.	5	15	e/vd	H	131	6 (0-30)
	fil.	5	15	e/vd	L	18	0
	fil.	5		e/vd	H	106	52 (20-100)

Superovulación: esquema de superovulación utilizado

Esperm.: sitio de recuperación de los espermatozoides

n. ovoc: número de ovocitos

%P: porcentaje de ovocitos penetrados

RFM: Medio de fertilización de rata

TCh: Medio de Toyoda y Chang

Fil: Agua de 18Ω filtrada

EC: Agua para cultivo de embriones (Sigma)

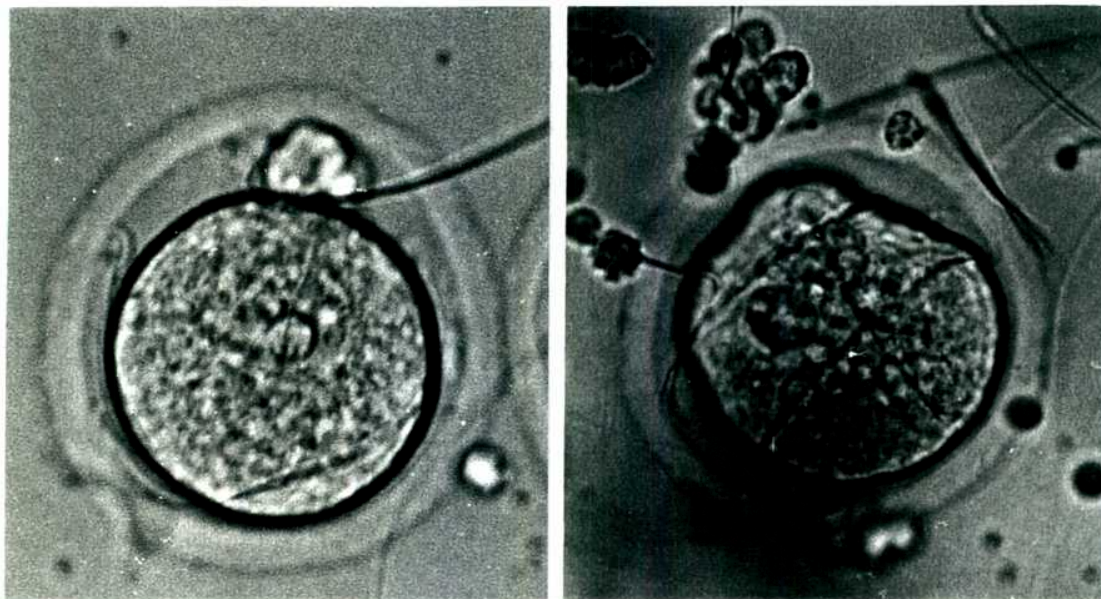
tri: Agua tridestilada.

e: espermatozoides recuperados de epidídimo

e/vd: espermatozoides recuperados de epidídimo y *vas deferens*

H: aceite de parafina pesado

L: aceite de parafina liviano.



**Figura 15. Microscopía de fase de ovocitos de rata intactos fertilizados *in vitro* (400x).**

Los ovocitos recuperados de hembras prepúberes estimuladas siguiendo el procedimiento descrito por Walton y Armstrong (1983), fueron inseminados con espermatozoides recuperados del epidídimo y *vas deferens* y evaluados 24 hs. luego de comenzada la coincubación.

- Ovocitos recuperados de cada hembra en forma separada luego de la estimulación descrita por Walton y Armstrong (1983).

#### 1.5.2.2 Efecto del agregado de anti-DE sobre la penetrabilidad de ovocitos de rata intactos

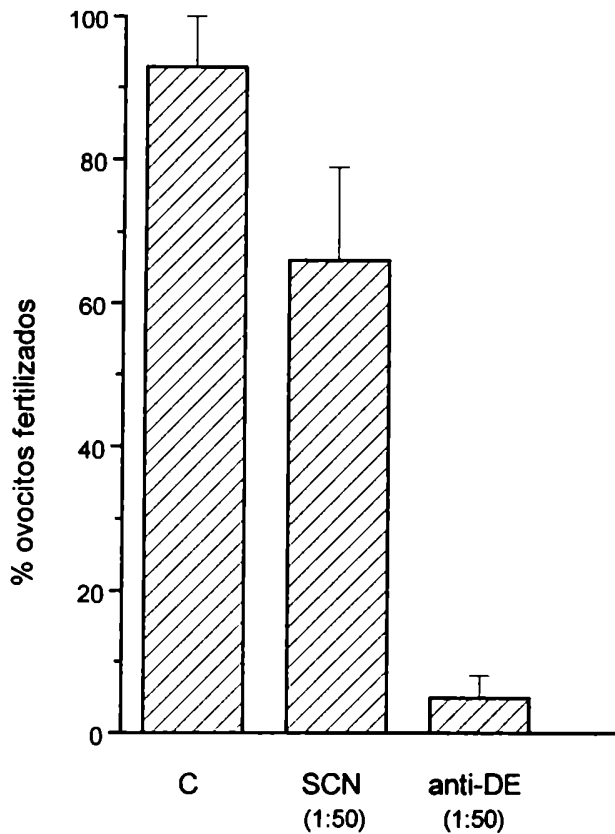
Habiendo establecido las condiciones para evaluar fertilización con ovocitos intactos, el siguiente paso consistió en investigar si el agregado de anticuerpo anti-DE era capaz de producir inhibición de la fertilización. Para ello, ovocitos intactos fueron incubados con espermatozoides en presencia de anti-DE o suero de conejo normal (1:50) y el porcentaje de ovocitos fertilizados evaluado luego de 24 hs.

Los resultados se presentan en la Figura 16 y muestran que el anticuerpo anti-DE produjo una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de ovocitos fertilizados respecto a los controles. La inhibición observada no se debió a un efecto deletéreo del anticuerpo anti-DE sobre los espermatozoides, ya que no se observó aglutinación de los mismos en presencia de anti-DE como así tampoco disminución de su motilidad respecto de los espermatozoides control. En ningún caso se observó acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, por lo cual la inhibición observada se debería a un efecto de anti-DE sobre la etapa de unión a ZP y no a un efecto sobre la etapa de fusión (Cuasnicú *et al.*, 1990).

#### 1.5.2.3 Efecto de la zona pellucida solubilizada sobre la redistribución de DE

Dado que, tal como se mencionara en la Introducción, la zona pellucida tanto en forma intacta como solubilizada es inductora de la reacción acrosomal en todas las especies en las que se ha ensayado, resultaba de interés estudiar si una vez que el espermatozoide se ha unido a la zona pellucida, ésta es capaz de inducir la redistribución al segmento ecuatorial de la población de DE "fuertemente unida".





**Figura 16. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre el porcentaje de ovocitos intactos fertilizados.**

Los ovocitos de rata intactos fueron inseminados con espermatozoides provenientes del epidídimo y *vas deferens* en medio solo (C) o en presencia de suero de conejo normal (SCN) o anti-DE. A las 24 hs. se evaluó el porcentaje de ovocitos con fertilizados. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S. de 3 experimentos independientes.

En primer lugar fue necesario desarrollar un sistema que permitiera la obtención de zonas pellucidas de rata en gran cantidad. Para ello, se comparó la eficiencia de recuperación de tres métodos diferentes. Primeramente, se ensayó la obtención mecánica de zonas a partir de ovocitos ovulados. En este caso, si bien la preparación de zonas se encontraba libre de contaminación con otros materiales celulares, lo laborioso de la técnica (superovulación de hembras prepúberes, recuperación de ovocitos de la ampulla, liberación de las células del cúmulus y pipeteo individual de los ovocitos para obtener las zonas pellucidas) no justificaba su empleo. Por lo tanto, se ensayaron dos técnicas de obtención a partir de tejido ovárico tales como la obtención por gradiente de Percoll y por filtración en mallas de poro decreciente que permiten el procesamiento de un gran número de ovarios en forma simultánea. Los resultados se presentan en la Tabla 4 e indican que por la técnica de filtración se obtiene un número mayor de ZP por ovario respecto de la técnica de purificación en gradiente de Percoll. Cuando la técnica de filtración por mallas se utilizó con ovarios provenientes de hembras prepúberes el número de zonas recuperadas por ovario fue menor que el obtenido previamente con ovarios de hembras adultas. Sin embargo, debido a la gran cantidad de ovarios de hembras prepúberes disponible en nuestro laboratorio, éstos fueron también utilizados para los procedimientos de purificación.

Una vez establecida la técnica de purificación de zonas pellucidas de rata, se procedió a evaluar el efecto de su agregado en forma solubilizada, sobre el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Para ello, espermatozoides previamente capacitados por un período de 3 hs. fueron incubados con distintas concentraciones de zona pellucida solubilizada (2 a 20 ZP/ $\mu$ l; 175 a 17,5 espermatozoides/ ZP) por un período de una hora, luego de lo cual los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. Como control se utilizó el medio de extracción de zonas (medio ZPM) sometido al mismo tratamiento empleado para la obtención de zonas pellucidas (acidificación, diálisis y liofilización). Los resultados se muestran en la Figura 17

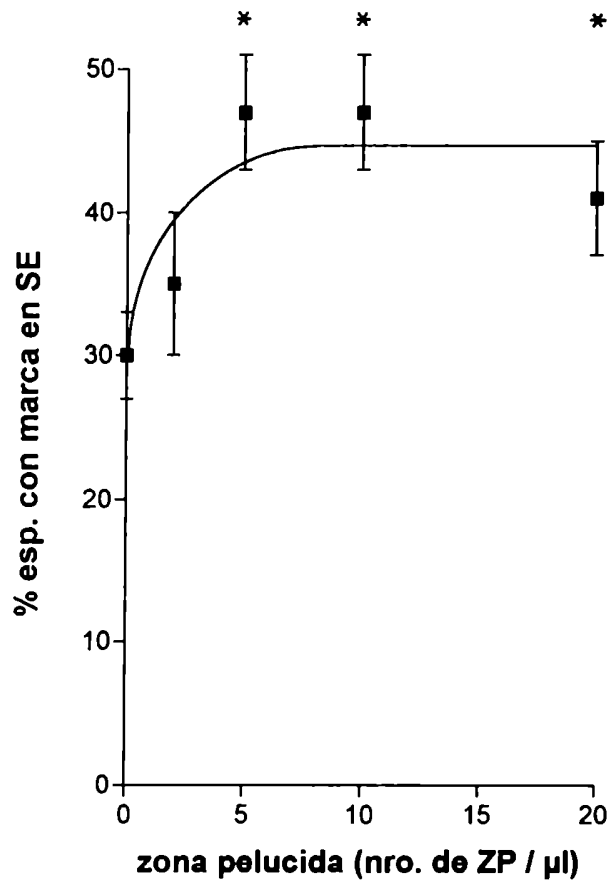
**Tabla 4. Rendimiento de distintas técnicas de obtención de zona pellucida**

Procedimiento	Fuente utilizada	nro. de experimentos	nro. de zonas/ovario
a-Mecánicamente	Ovocitos ovulados	3	20 - 30
b-Gradiente de Percoll	Ovarios de hembras adultas	3	40 - 50
c-Filtración	Ovarios de hembras adultas	3	60 - 80
d-Filtración	Ovarios de hembras prepúberes superovuladas	5	40 - 50

Los ovocitos ovulados (a) fueron obtenidos de los oviductos de hembras prepúberes superovuladas. Los ovarios de hembras adultas (b y c) o prepúberes superovuladas (d) fueron disgregados mecánicamente y sometidos a los distintos procedimientos de purificación de zonas pellucidas.

e indican que el agregado de zona pellucida solubilizada provoca un aumento en el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Dicho aumento resultó ser significativo respecto del control a una concentración de 5 ZP/ $\mu$ l, no modificándose por el empleo de concentraciones mayores.

Con el objeto de estudiar la cinética de dicho efecto, los espermatozoides fueron capacitados por un período de 3 hs., expuestos a medio conteniendo 5 ZP/ $\mu$ l y, a distintos tiempos de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 min.), los mismos fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. Al igual que en los experimentos anteriores, como control se utilizaron espermatozoides incubados con medio sometido al tratamiento empleado para la obtención de las zonas. Los resultados se muestran en la Figura 18 e indican que el agregado de 5 ZP/ $\mu$ l provoca un rápido aumento sobre el porcentaje de células con redistribución, alcanzándose un valor máximo de inducción al cabo de los 15 min., el cual no fue modificado durante las posteriores 2 hs. de incubación. Estos resultados en su conjunto estarían indicando que la ZP solubilizada es capaz de inducir en forma rápida la redistribución de DE al segmento ecuatorial.

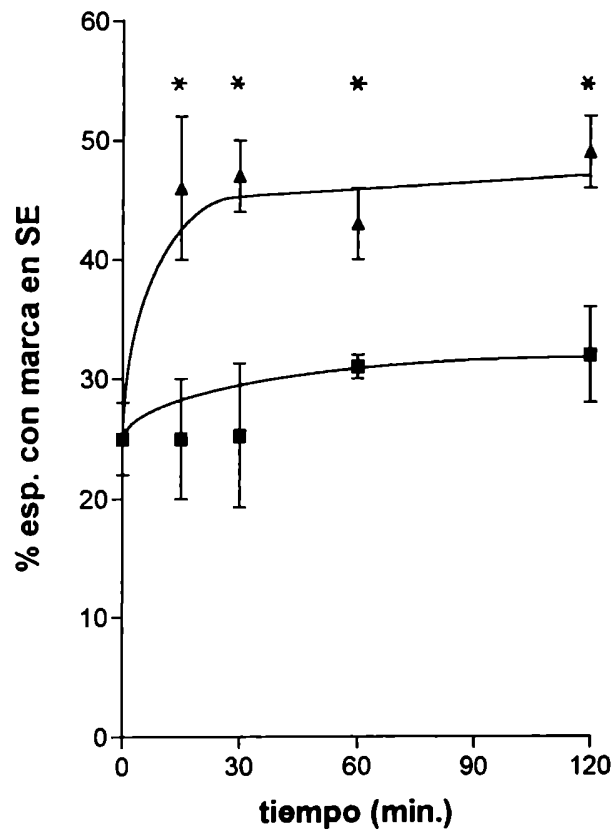


**Figura 17. Efecto de zona pelucida sobre la redistribución de DE.**

Espermatozoides capacitados por un período de 3 hs. fueron incubados durante 1 h con distintas concentraciones de zona pelucida solubilizada, recuperados, fijados y sometidos a la técnica de IIF.

Los valores representan la media  $\pm$  E.S. de 5 experimentos independientes.

\*  $p < 0.001$  vs control (0 ZP/ $\mu$ l).



**Figura 18. Cinética del efecto de la zona pellucida sobre la redistribución de DE.**

Espermatozoides capacitados por un período de 3 hs fueron incubados con zona pellucida (5 ZP/μl) (▲) o con medio (■), retirados a los distintos tiempos, fijados y sometidos a la técnica de IIF. Se consideró tiempo cero al tiempo de agregado de las zonas pellucidas.

Los valores representan la media ± E.S. de 6 experimentos independientes.

\*  $p < 0.001$  vs tiempo 0 y vs valor control (0 ZP/μl) respectivamente.

## PARTE II - ESTUDIO DE LA FUNCION BIOLÓGICA DE LA PROTEINA HOMOLOGA A “DE” EN EL RATON

### II.1 Secuenciación y análisis de la secuencia de la proteína “DE”.

Si bien se han estudiado diversos aspectos del comportamiento y función biológica de la proteína DE, su secuencia era aún desconocida. Por lo tanto, se realizó la secuenciación aminoacídica de la proteína DE de rata y el análisis de la secuencia obtenida, con el objeto de identificar dominios funcionales en la proteína que se relacionen con su función biológica como así también establecer homologías con otras proteínas conocidas.

Con el fin de obtener proteína DE de calidad adecuada para secuenciar, se realizó una corrida electroforética de DE pura (95% de pureza) procediéndose luego a recortar la banda correspondiente. La misma fue directamente secuenciada por el método de degradación de Edman. Los resultados de dicha secuenciación indicaron que el aminoácido N-terminal se encontraba bloqueado, razón por la cual se procedió a obtener péptidos internos de la proteína por digestión *in situ* con tripsina y separación de los péptidos obtenidos por HPLC, lo cual fue realizado en colaboración con la Fundación Keck de la Universidad de Yale (Ver Materiales y Métodos). De los 13 fragmentos obtenidos, dos de ellos, denominados péptidos 56 y 83, fueron elegidos para secuenciar debido a que la masa obtenida en ambos casos era suficiente para el paso siguiente.

Cuando el péptido 83 fue sometido a secuenciación no se obtuvo ningún resultado debido a que el aminoácido N-terminal se encontraba bloqueado. Por su parte, el péptido 56 dio una secuencia de 13 aminoácidos que se muestra en la Figura 19. Este péptido presentó un 100 % de homología con las proteínas epididimarias de rata AEG (acidic epididymal glycoprotein) (Charest *et al.*, 1988)

MALMLVLLFL    AAVLPPSLLQ    DTTDEWDRDL    ENLSTTKLSV  
 QEEIINKHNQ    LRRTVSPSGS    DLLRVEWDHD    AYVNAQKWAN  
 RCIYNHSPLQ    HRTTTLKCGE    NLFMANYPAS    WSSVIQDWYD  
 ESLDFVFGFG    PKKVGKVGH    YTQVWNSTF    LVACGVAECP  
 DQPLKYFYVC    HYCPGGNYVG    RLYSPYTEGE    PCDSCPGNCE  
 DGLCTNSCEY    EDNYSNCGDL    KKMVSCDDPL    LKEGCRASCF  
 CEDKIH

**Figura 19.** Secuencia completa de la proteína AEG/DE. Subrayado se muestra el péptido 83. En rojo se muestra el péptido secuenciado. En verde se muestran las cisteínas.



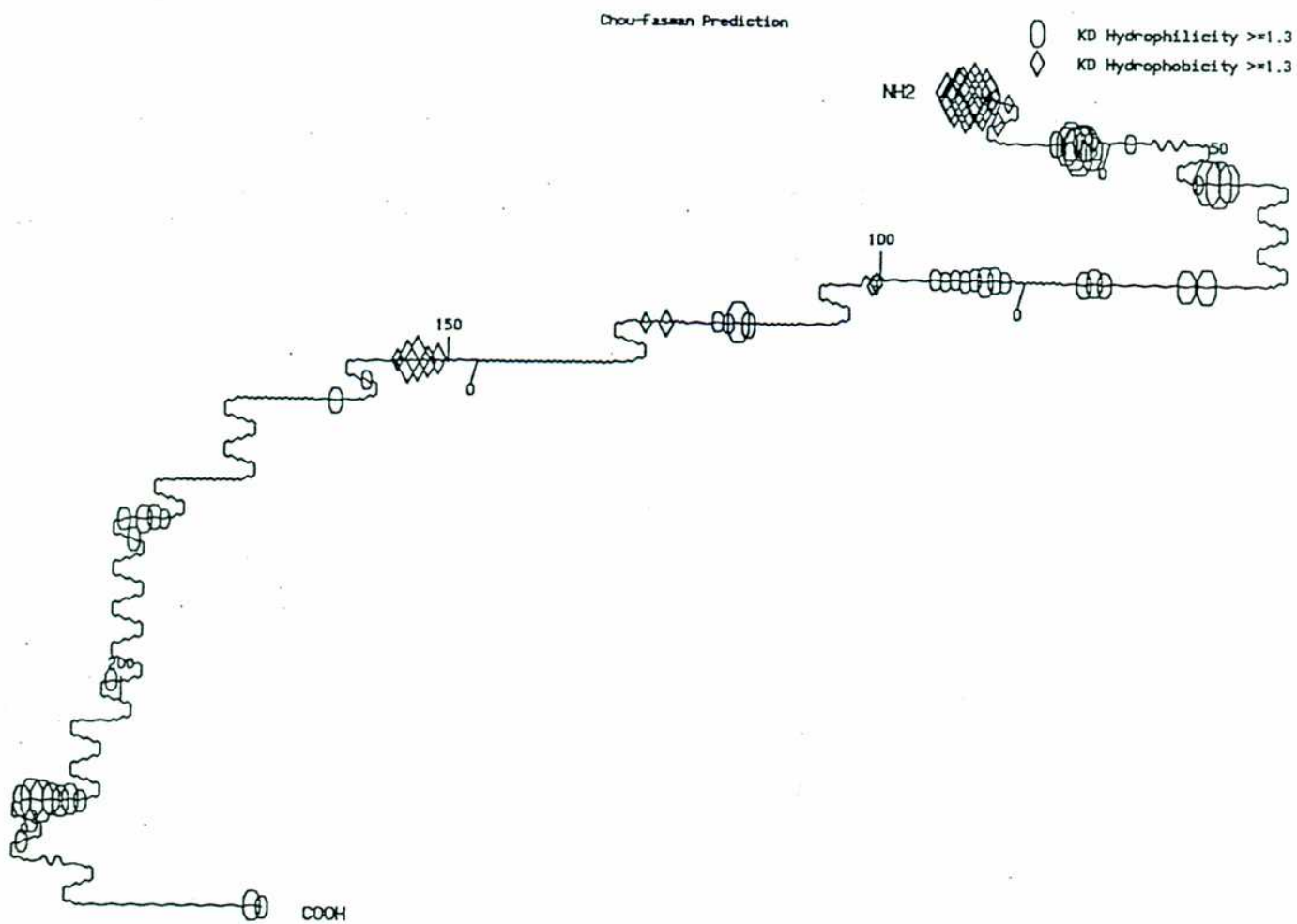
y DE (Brooks *et al.*, 1986). Esta última, así denominada por los autores debido a que la misma presentaba características bioquímicas similares a la proteína DE originalmente descrita por Cameo y Blaquier (1976). La secuencia completa de AEG/DE se muestra en la Figura 19. El análisis de esta secuencia muestra que existe un sitio de corte para tripsina previo al residuo 1 del péptido secuenciado, lo cual significa que la digestión trípica de AEG/DE produciría el péptido obtenido.

El análisis de AEG/DE muestra que el aminoácido N-terminal de la proteína en la cual el péptido señal ha sido removido, correspondería a una glutamina, la cual frecuentemente se cicla y, por lo tanto, bloquea el extremo para la secuenciación. Asumiendo que el extremo N-terminal estuviera bloqueado, la masa del primer fragmento trípico para AEG/DE sería de 2151.23. La masa obtenida para el péptido 83 fue de 2156.1, por lo que el péptido 83 correspondería al fragmento de aminoácidos 1-18 de la proteína AEG/DE madura (Figura 19).

El análisis de la proteína DE realizado mediante el programa MOTIFS, que analiza dominios relacionados con la estructura primaria de proteínas, mostró que DE no presenta ningún dominio conocido. Sin embargo, posee un alto contenido de cisteínas: 16 cisteínas totales, 14 de las cuales se encuentran en el extremo C-terminal (Figura 19).

El análisis de hidrofobicidad realizado muestra que no existen en DE regiones hidrofóbicas de suficiente longitud que justifiquen que se inserte en la bicapa lipídica (Figura 20).

El análisis de la secuencia utilizando el programa BLAST, mostró que DE presenta homología con una proteína epididimaria de ratón descrita por dos grupos distintos a la que denominaron AEG1 y CRISP1 (proteína secretoria y rica en cisteínas 1) (Mizuki y Kasahara, 1992; Haendler *et al.*, 1993). Así mismo, DE presenta homología con una proteína testicular descrita en ratón (TPX-1



**Figura 20.** Análisis de hidrofobicidad de la proteína DE realizado utilizando el programa MOTIFS. Los rombos representan aminoácidos hidrofóbicos y los óvalos, hidrofílicos.

(Kasahara *et al.*, 1989) o CRISP2 (Haendler *et al.*, 1993)), humano (Kasahara *et al.*, 1989) y cobayo (Foster y Gerton, 1996), y con AEG2/CRISP3, una proteína producida en la glándula salival de ratón (Mizuki y Kasahara, 1992; Haendler *et al.*, 1993). DE presenta también homología con helothermina, una proteína de la saliva de la lagartija *H. horrendum horrendum* que es un inhibidor de los receptores rianodínicos presentes en las membranas de los reservorios intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Morrissette *et al.*, 1995). Las 16 cisteínas presentes en DE están conservadas en estas proteínas, por lo que han sido agrupadas en una familia de proteínas que recibió el nombre de familia CRISP. En la Tabla 5 se resumen las homologías existentes entre los distintos miembros de la familia CRISP.

Así mismo, DE presenta una homología menor, pero aún significativa, con proteínas de veneno de avispas (Dol m V) (Fang *et al.*, 1988), con proteínas relacionadas a la patogénesis en plantas (Muradov *et al.*, 1993) y con las proteínas específicas del cuerpo frutal del basidomicete *Schizophyllum commune* (Schuren *et al.*, 1993). Estas proteínas no conservan la región rica en cisteínas.

## **II.2 Presencia de DE en espermatozoides de ratón y otras especies de mamíferos**

Tal como se mencionó anteriormente, la proteína DE de rata participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios localizados en la región fusogénica de la superficie del ovocito (Rochwerger *et al.*, 1992). Estos resultados constituyeron la primera evidencia sobre la existencia de sitios complementarios para una proteína específica del espermatozoide que participa en el proceso de fusión. Dado que el análisis de la secuencia obtenida para DE indicaba la existencia de una proteína epididimaria de ratón con 70% de

**Tabla 5. Homología entre las distintas proteínas pertenecientes a la familia CRISP**

Proteína	% homología con				
	AEG1/ CRISP1	AEG2/ CRISP3	rTpx-1/ CRISP2	hTPX1	helothermina
DE/AEG	69.7	62.5	55.8	55	46.7
AEG1/CRISP1		78.1	55	58.7	45.8
AEG2/CRISP3			48.1	50.2	42.9
rTpx-1/CRISP2				70.7	47.1
hTPX1					51.3

homología con DE, resultaba interesante estudiar si esta proteína participaba en el proceso de fusión.

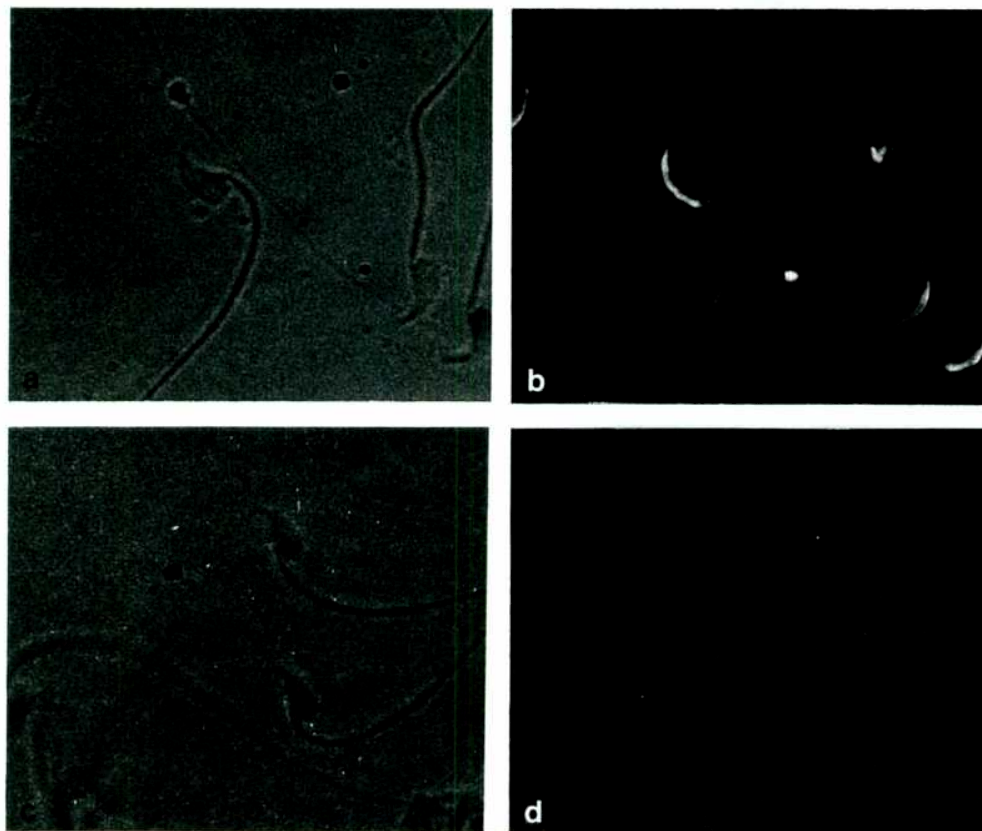
Para ello, se estudió en primer lugar la localización de la proteína DE en los espermatozoides de ratón. Para tal fin, espermatozoides frescos de ratón fueron sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Como control, se utilizaron espermatozoides de distintas especies tales como hámster, toro, carnero, cobayo, humano y conejo. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6 e indican que los espermatozoides de ratón presentaban marca fluorescente, localizada en la región dorsal de la cabeza (Figura 21). Así mismo, se observó que los espermatozoides de hámster mostraban marca fluorescente en la región acrosomal (Figura 22), mientras que los espermatozoides del resto de las especies estudiadas no presentaban marcación (Figura 23).

Con el fin de investigar si la marca observada en espermatozoides de ratón y hámster, correspondía al homólogo de DE, se estudió por la técnica de Western blot la presencia de DE en citosol epididimario, testicular y extractos totales (Tritón X-100) de espermatozoides de dichas especies. Para ello, las muestras fueron separadas por electroforesis y reveladas utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Los resultados (Figura 24) indicaron la existencia de una banda del mismo peso molecular que DE en el citosol epididimario y en el extracto proteico de espermatozoide de ratón, y su ausencia en citosol testicular. Para el caso de hámster, no se detectó ninguna banda ni en el citosol epididimario ni en el testicular, como así tampoco en el extracto de espermatozoides, tanto cuando las muestras fueron analizadas en geles con SDS (Figura 24) como en geles nativos. Estos resultados estarían indicando que la marcación observada por IIF podría deberse a una reacción inespecífica del anticuerpo.

**Tabla 6. Presencia de DE en espermatozoides de distintas especies.**

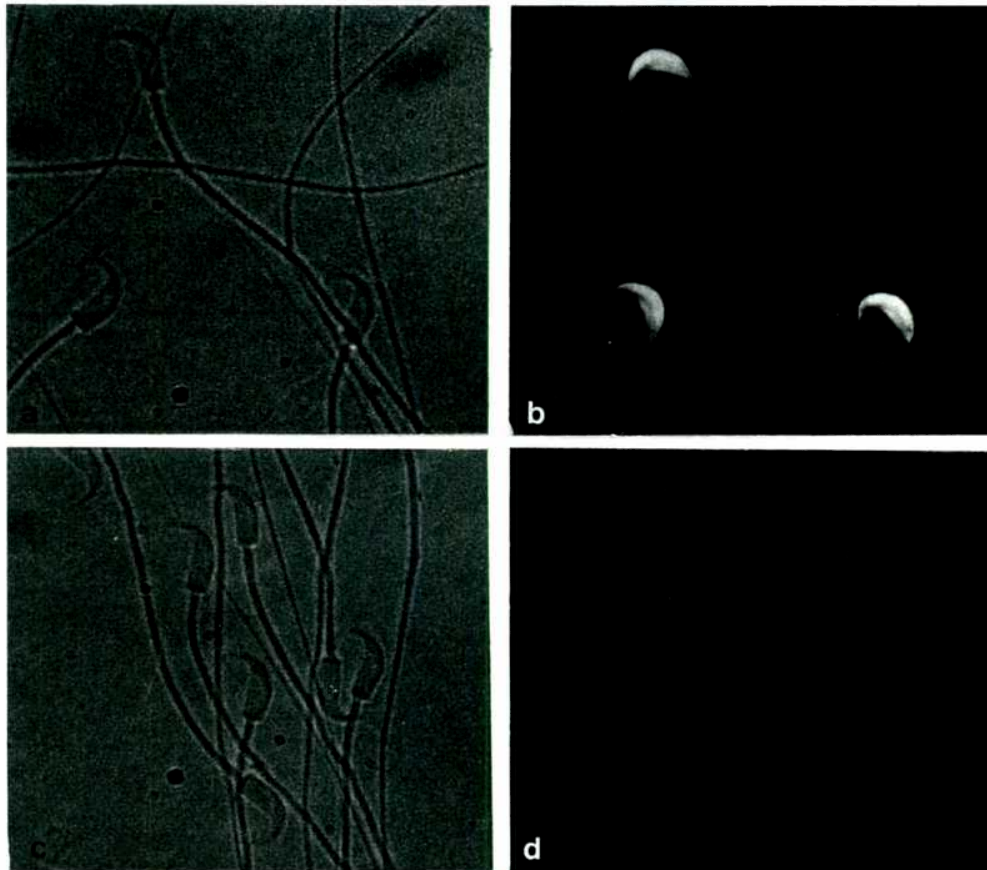
Espermatozoides	Marca fluorescente
Ratón	sí
Hámster	sí
Cobayo	no
Conejo	no
Bovino	no
Ovino	no
Humano	no

Espermatozoides epididimarios de ratón, hámster, cobayo y bovino como así también espermatozoides eyaculados de bovino, ovino y humano fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo.



**Figura 21. Localización de la marca fluorescente detectada en espermatozoides de ratón.**

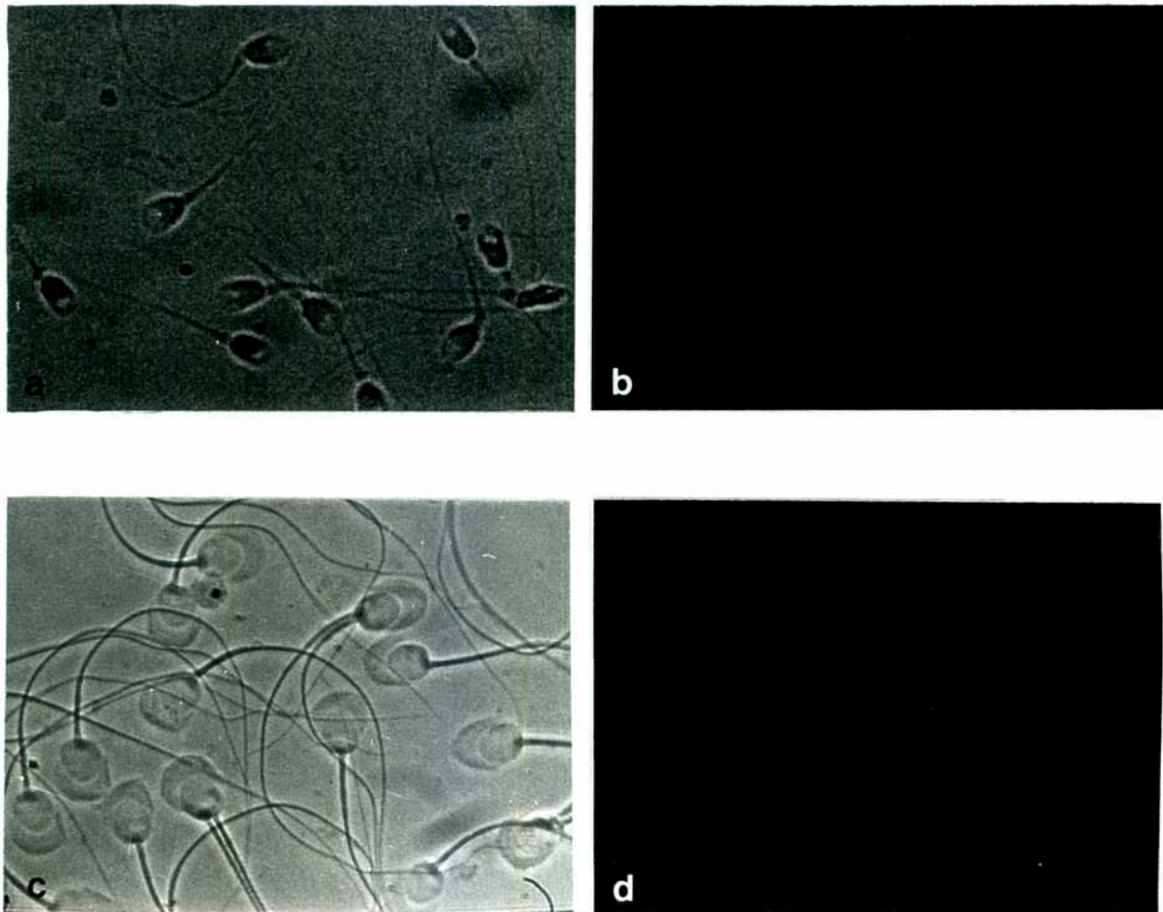
Espermatozoides frescos de ratón fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. **a y b)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides incubados con anti-DE. Nótese la marcación en la región dorsal del acrosoma. **c y d)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides incubados con suero de conejo normal (SCN). (650 x)



**Figura 22. Localización de la marca fluorescente detectada en espermatozoides de hámster.**

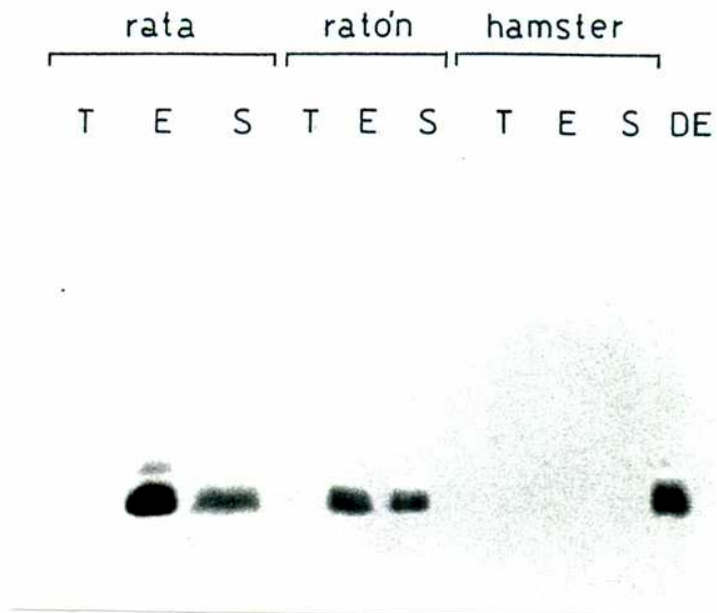
Espermatozoides frescos de hámster fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. **a y b)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides incubados con anti-DE. Nótese la marcación en la región acrosomal. **c y d)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides incubados con suero de conejo normal (SCN). (650 x)





**Figura 23. Inmunofluorescencia de espermatozoides humanos y de cobayo.**

Espermatozoides eyaculados de humano y espermatozoides epididimarios de cobayo fueron fijados y sometidos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-DE. **a y b)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides humanos. **c y d)** contraste de fase e inmunofluorescencia de espermatozoides de cobayo. Nótese la ausencia de marcación fluorescente.



**Figura 24. Presencia de DE en citosol testicular y epididimario de distintas especies.**

Citosol testicular y epididimario (30  $\mu$ g/calle), como así también proteínas extraídas por tratamiento con Tritón X-100 de espermatozoides de rata, ratón y hámster fueron separados por electroforesis en geles nativos (10%) y revelados por Western blot utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

### **II.3 Efecto de distintos tratamientos sobre la presencia de DE en espermatozoides de ratón**

Dado que los resultados obtenidos indicaban que el antígeno reconocido por IIF en el espermatozoide de ratón correspondería al homólogo a DE, resultaba interesante estudiar si esta proteína se asociaba al espermatozoide de ratón de forma similar a la observada en la rata.

Para tal fin, los espermatozoides de ratón fueron incubados con 2M NaCl y luego con Tritón X-100. Las proteínas extraídas por ambos métodos fueron separadas por electroforesis y la presencia de DE evaluada por Western blot. Los resultados se muestran en la Figura 25 donde se observa una banda correspondiente a DE tanto en el extracto de 2M NaCl como en el de Tritón X-100. Estos resultados estarían indicando que, al igual que en la rata, en el espermatozoide de ratón existirían dos poblaciones de DE: una "débilmente unida" extraíble con alta fuerza iónica y otra "fuertemente unida", que permanecería en el espermatozoide aún luego de dicho tratamiento. Dado que en la rata es la población "fuertemente unida" la que participa en el proceso de fusión, estos resultados estaban sugiriendo que la proteína DE de ratón podría también estar involucrada en el proceso de fertilización.

### **II.4 Participación de DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en el ratón**

El paso siguiente consistió, por lo tanto, en estudiar la participación de esta proteína en el proceso de fusión homóloga en el ratón.

En primer lugar debimos establecer el criterio de fertilización a utilizar. La presencia de la cola del espermatozoide incorporada al ooplasma es una evidencia inequívoca de que la fusión ha ocurrido. Si bien este es uno de los

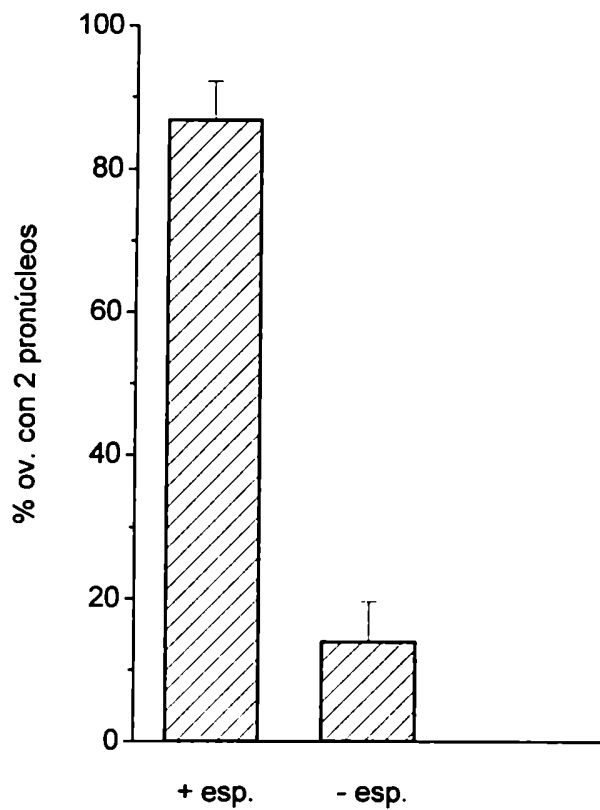


**Figura 25. Efecto del tratamiento con alta fuerza iónica y Tritón X-100 sobre la asociación de DE a la membrana del espermatozoide de ratón.**

Espermatozoides de ratón frescos fueron extraídos secuencialmente con 2 M NaCl (A) y 1% Tritón X-100 (B). Cada uno de los extractos fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (10 %) y la presencia de DE revelada por Western blot utilizando anti-DE como primer anticuerpo. (C) corresponde a proteína DE pura utilizada como control.

criterios de elección para la evaluación de la fusión espermatozoide-ovocito, en el caso del ratón no es posible detectar la cola del espermatozoide en el citoplasma. Por lo tanto, la presencia de dos o más pronúcleos en el citoplasma es comunmente utilizada como criterio de fertilización en esta especie (Lacham y Trounson, 1991). Con el fin de descartar que, en nuestro caso, los pronúcleos observados se debieran a la activación espontánea de los ovocitos de ratón durante el período de incubación, se evaluó la presencia de pronúcleos en ovocitos incubados sin espermatozoides durante un período igual al empleado para ovocitos inseminados. Los resultados se muestran en la Figura 26 donde se observa que, en ausencia de espermatozoides, el 14 % de los ovocitos presentaban pronúcleos comparado con el 90 % obtenido en presencia de espermatozoides. Estos resultados estaban indicando que existe un bajo porcentaje de ovocitos de ratón que se activan espontáneamente por lo que la presencia de dos pronúcleos fue utilizado como criterio de fertilización.

Habiendo validado el criterio de fusión a utilizar, se procedió a estudiar el efecto del agregado de DE sobre la fusión espermatozoide-ovocito de ratón. Para ello, ovocitos sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados en medio solo o en presencia de distintas concentraciones de proteína DE u ovoalbúmina (control) evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados. La premisa experimental para estos ensayos fue que en el caso de que existieran sitios de unión para DE en la superficie del ovocito de ratón, la proteína DE debería unirse a dichos sitios e inhibir la ocurrencia de la fusión. Los resultados se muestran en la Figura 27 e indican que la presencia de DE durante la coincubación de las gametas, produjo una disminución en el porcentaje de ovocitos penetrados. Dicha inhibición resultó dependiente de la concentración utilizada, siendo significativa a partir de una concentración de DE de 50  $\mu\text{g/ml}$  y máxima a 200  $\mu\text{g/ml}$  (inhibición del 70%,  $p < 0.001$ ), concentración a la cual la presencia de ovoalbúmina (proteína control) no produjo ningún efecto.

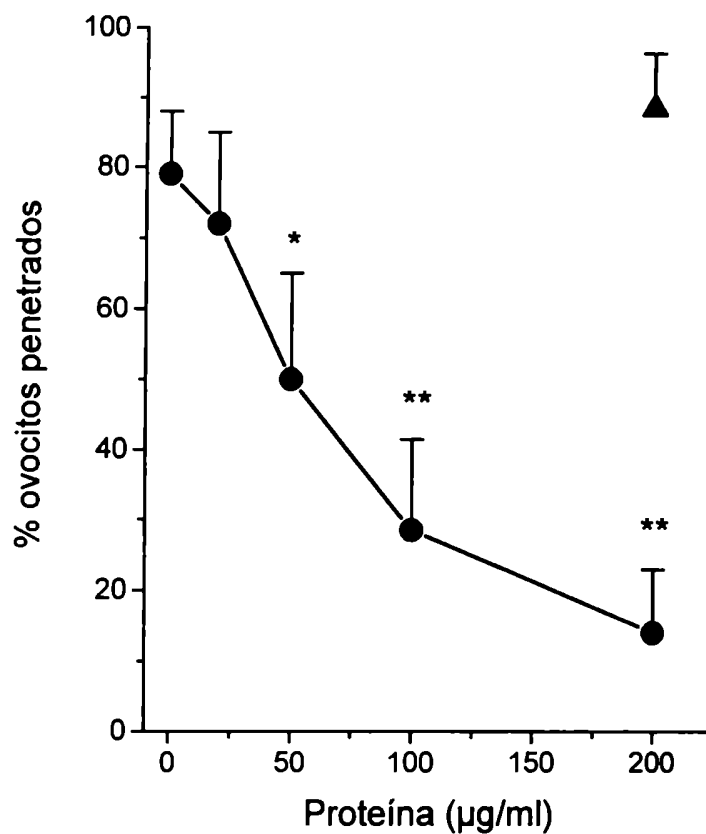


**Figura 26. Activación espontánea de los ovocitos de ratón sin zona pellucida.**

Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados en presencia (+ esp.) o ausencia (- esp.) de espermatozoides y luego de 8 hs. se evaluó el porcentaje de ovocitos que presentaban 2 pronúcleos.

Los resultados representan la media  $\pm$  E.S. de 4 experimentos independientes.

\*  $p < 0.001$



**Figura 27. Efecto del agregado de DE sobre la fusión espermatozoide-ovocito en ratón.**

Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de DE (•) u ovoalbúmina (▲) y luego inseminados con espermatozoides capacitados. A las 8 hs. se evaluó el porcentaje de ovocitos con 2 o más pronúcleos. Los resultados representan las medias  $\pm$  E.S. de 4 experimentos independientes.

\*  $p < 0.05$  vs 0  $\mu\text{g/ml}$  (control), \*\*  $p < 0.01$  vs 0  $\mu\text{g/ml}$  (control).

Durante la coincubación de las gametas no se observó aglutinación de los espermatozoides o modificación en el porcentaje de motilidad con respecto al control, por lo que podría descartarse que la inhibición observada en presencia de DE se debiera a un efecto deletéreo de esta proteína sobre los espermatozoides de ratón.

Dado que el proceso de fusión es precedido por la etapa de unión de las gametas, se estudió si la inhibición observada en presencia de DE se debía a un efecto de la proteína sobre la primera etapa de unión. Para ello, los ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados con DE e inseminados con espermatozoides de ratón capacitados, evaluándose a los 30 min. tanto el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos como el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los resultados se muestran en la Tabla 7 e indican que no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos. Estos resultados indicaban que la inhibición observada no se debería a un efecto de DE en la etapa de unión sino a un efecto sobre la etapa de fusión en sí, tal como lo observado en el sistema de rata (Rochwerger *et al.*, 1992).

## **II.5 Localización de los sitios de unión para DE en el ovocito de ratón**

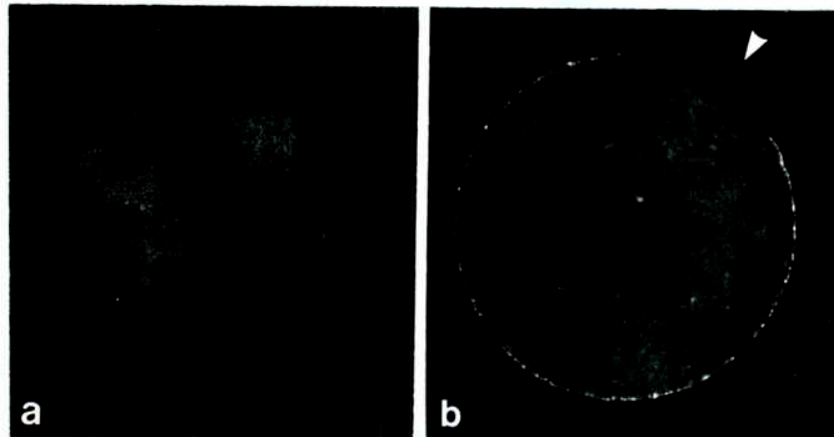
En conjunto, las evidencias obtenidas indicaban no sólo la participación de DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en el ratón sino también la existencia de sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito de esta especie. Con el fin de estudiar la localización de dichos sitios, ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados con proteína DE u ovoalbúmina (control), fijados y luego sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Mientras que en ninguno de los ovocitos incubados con proteína control se observó fluorescencia, la totalidad de los ovocitos incubados con DE presentaron marca fluorescente (Figura 28). Dicha marca, al igual que lo observado en ovocitos de rata, se localizó en forma de agregados en toda la



**Tabla 7. Efecto del agregado de DE sobre la unión espermatozoide-ovocito en ratón.**

Tratamiento	No. de ovocitos	% de ovocitos con esp. unidos	No. de esp. unidos/ ovocito
Control	46	97 ± 3	13 ± 2
Ovoalbúmina	48	100	13 ± 1
DE	42	100	12 ± 3

Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados en presencia de DE u ovoalbúmina (200 µg/ml) y luego inseminados con espermatozoides (esp.) capacitados. A los 30 min. se evaluó el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los resultados representan las medias ± E.S. de 4 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 28. Localización de sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito de ratón.**

**a-** Ovocito sin ZP incubado con proteína control (ovoalbúmina, 200  $\mu\text{g/ml}$ ), fijado y sometido a la técnica de IIF. Nótese la ausencia de fluorescencia en la superficie del ovocito.

**b-** Ovocito sin ZP incubado con proteína DE (200  $\mu\text{g/ml}$ ), fijado y sometido a IIF. Nótese la marcación fluorescente en forma de agregados y la presencia de un área no marcada (flecha).

En todos los casos los ovocitos fueron examinados en un microscopio de fluorescencia con un aumento de x 250.

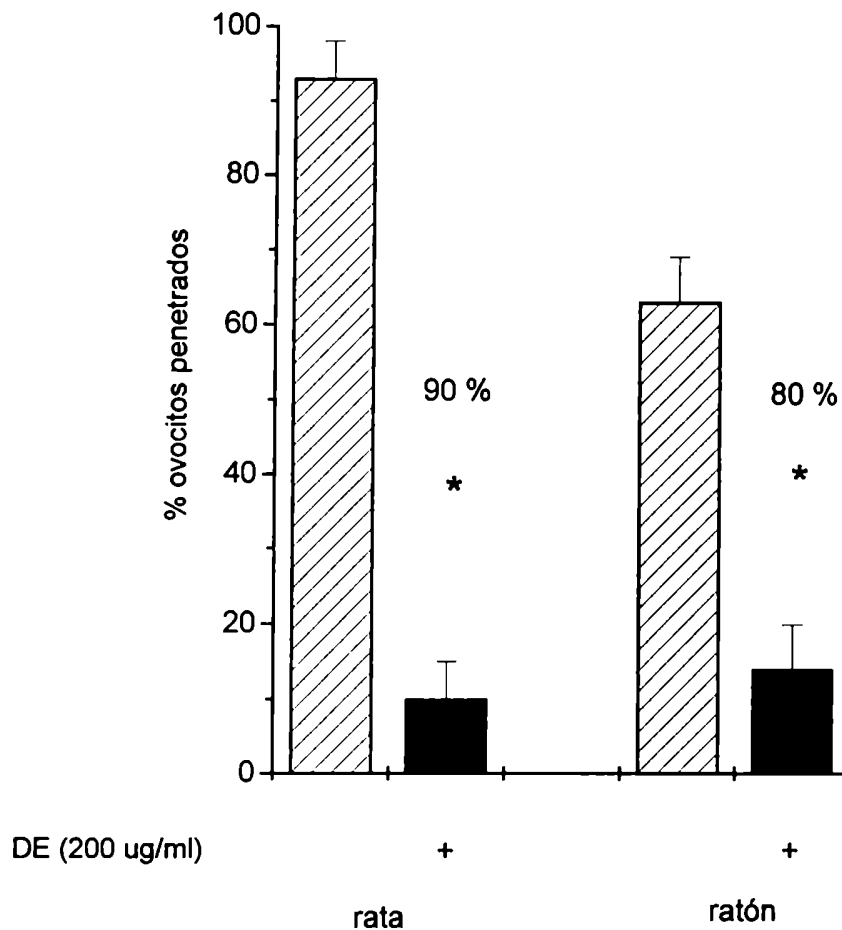
superficie del ovocito con excepción de un área sin fluorescencia, el área negativa. Por lo tanto, en el ratón al igual que en la rata, los sitios de unión para DE estarían localizados en la región fusogénica del ovocito.



## **II.6 Participación de DE en la fusión cruzada entre espermatozoides de ratón y ovocitos de rata sin zona pellucida.**

Los resultados obtenidos hasta aquí indicaban que la proteína DE de ratón estaría involucrada en el proceso de fusión de gametas en esa especie. Teniendo en cuenta que los ovocitos de rata presentan sitios de unión para DE como así también que pueden ser penetrados en forma heteróloga por espermatozoides de ratón (Hanada y Chang, 1972), resultaba interesante estudiar si la proteína DE de ratón estaba involucrada en dicho proceso de fusión cruzada. Para ello, ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados con espermatozoides de ratón capacitados en presencia de 200 µg/ml de proteína DE y el porcentaje de ovocitos penetrados evaluado al cabo de 8 hs de coincubación. En paralelo, se realizaron como control ensayos de fusión en presencia de DE en el sistema homólogo de rata. Los resultados indicaron que en presencia de una proteína control (ovoalbúmina), el 65% de los ovocitos de rata sin zona podía ser penetrado por espermatozoides de ratón. Sin embargo, la presencia de DE durante la coincubación de las gametas produjo una inhibición significativa (14 % vs. 63%,  $p < 0.001$ ) en el porcentaje de ovocitos penetrados (Figura 29). Los resultados indican que la inhibición observada en el sistema heterólogo rata-ratón (78%) es comparable a la hallada en el sistema homólogo rata-rata (90%).

Cuando se estudió el efecto de DE la etapa de unión, los resultados indicaron que en presencia de DE no se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados con respecto al control (ovoalbúmina) (Tabla 8)

indicando que la inhibición observada se debería a un efecto de DE sobre la etapa de fusión.



**Figura 29. Efecto del agregado de proteína DE sobre la fertilización cruzada rata-ratón.** Ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados en presencia de ovoalbúmina (200 µg/ ml) (  ) o de DE (200 µg/ ml) (  ) con espermatozoides capacitados de rata y de ratón, evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados.

Los resultados representan la media  $\pm$  E.S. de 6 experimentos independientes

\*  $p < 0.001$  vs. control (ovoalbúmina)

**Tabla 8. Efecto del agregado de DE sobre la unión rata-ratón**

Tratamiento	nro. de ovocitos	% de ovocitos con esp. unidos	No. de esp. unidos/ ovocito
Medio + OA (200 µg/ml)	65	97 ± 3	15 ± 3
Medio + DE (200 µg/ml)	68	93 ± 5	10 ± 2

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados en presencia de DE u ovoalbúmina (200 µg/ml) y luego inseminados con espermatozoides de ratón capacitados. A los 30 min. se evaluó el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los resultados representan las medias ± E.S. de 6 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

## **PARTE III - PARTICIPACION DE LOS SITIOS DE UNION PARA “DE” EN LA ADQUISICION DE FUSIBILIDAD DEL OOLEMA**

### **III.1 Comportamiento de los sitios para DE durante la ovogénesis**

Tal como se mencionó anteriormente, ha sido establecido que los sitios de unión para DE localizados en la región fusogénica tanto del ovocito de rata como de ratón, participan en el proceso de fusión de gametas. Con el fin de establecer en qué momento aparecen dichos sitios sobre la membrana plasmática del ovocito de rata se estudió su presencia y localización en las distintas etapas de la ovogénesis. En forma paralela se estudió la capacidad fusogénica de los ovocitos en los distintos estadios de desarrollo con el fin de establecer si existe una asociación entre la adquisición de dicha capacidad y la presencia de sitios para DE.

#### ***III.1.1 Presencia y localización de los sitios de unión para DE durante el crecimiento y la maduración.***

Las células del cúmulus de los ovocitos inmaduros se encuentran fuertemente asociadas al ovocito y entre sí por la presencia de prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan la ZP y establecen uniones tipo "gap" con la membrana plasmática del ovocito y con las células de la granulosa vecinas (Dekel *et al.*, 1978). Dado que esto dificulta enormemente la liberación de las células del cumulus de ovocitos inmaduros, uno de los pasos limitantes en este estudio fue la obtención de suficiente número de ovocitos inmaduros desnudos. Para obtener la cantidad de ovocitos que se presentan en este trabajo fue necesario utilizar en cada uno de los estudios realizados más de 30 hembras por horario estudiado.

Con el fin de establecer el momento de la ovogénesis en el que aparecen los sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito, se recuperaron ovocitos en distintos estadios de crecimiento y maduración, los cuales fueron incubados con proteína DE, fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Como control, los ovocitos sin ZP fueron sometidos a dos tratamientos distintos a) incubados con proteína DE y luego sometidos a la IIF utilizando suero de conejo normal como primer anticuerpo, y b) incubados con una proteína control, como la ovoalbúmina, y luego expuestos a anti-DE. Los resultados muestran que, mientras que ninguno de los ovocitos incubados en condiciones control presentaron marca fluorescente, los ovocitos incubados con DE y anti-DE presentaron marcación. Los distintos patrones de fluorescencia correspondientes a cada grupo estudiado se muestran en la Tabla 9, donde se observa que mientras que ninguno de los ovocitos con un diámetro menor a 50  $\mu\text{m}$  presentó marca fluorescente (Figura 30a y b), los ovocitos en crecimiento con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$ , que incluye a los ovocitos que han completado su crecimiento (diámetro = 80  $\mu\text{m}$ ), presentaron marca fluorescente en toda la superficie (Figura 30c y d). Resulta interesante mencionar que en este caso, el 95% de los ovocitos con fluorescencia presentaban una marcación más uniforme en la superficie, la cual era claramente diferente de la marcación en forma de agregados previamente observada en ovocitos ovulados (Tabla 9).

Los ovocitos recuperados entre 3 y 11 hs luego de la administración de hCG, es decir a distintos horarios luego de comenzada la maduración, presentaron porcentajes decrecientes de marcación fluorescente "uniforme", con un paralelo aumento en el porcentaje de ovocitos con marcación en forma de agregados (Tabla 9). Así mismo, los ovocitos recuperados entre las 3 y las 9 hs post-hCG presentaban la marcación fluorescente en toda la superficie del ovocito (Figura 30e y f). Los ovocitos recuperados en horarios posteriores ya presentaban un área negativa (Figura 30g y h), similar a la previamente observada en ovocitos ovulados (Rochwerger *et al.*, 1992).



**Tabla 9. Presencia y distribución de los sitios de unión para DE durante el crecimiento y la maduración del ovocito.**

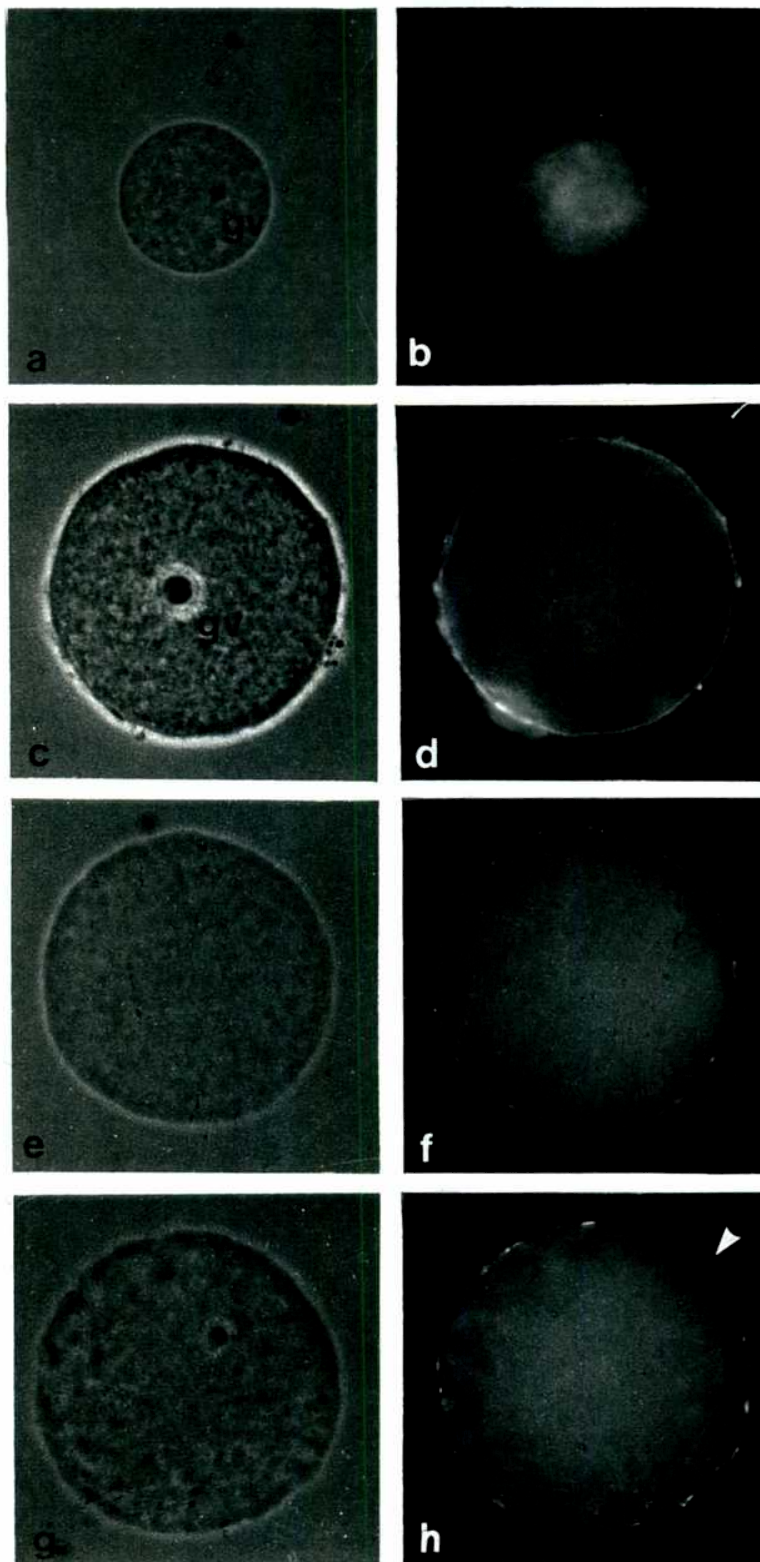
Estadio	No. de ovocitos	% de ovocitos con <sup>a</sup>		% de ovocitos en estadios de maduración <sup>b</sup>
		marcación uniforme	marcación en agregados	
Ov. en crecimiento <sup>c</sup> (diámetro < 50 µm)	29	0	0	100 VG
Ov. en crecimiento (diámetro > 50 µm)	75	95 ± 2	5 ± 2	100 VG
Ov. en maduración (hs. Post-hCG)				
3	32	65 ± 16	35 ± 16	69 VG
6	19	37 ± 12	63 ± 12	60 Met I
9	25	8 ± 6	92 ± 6	62 Met I-Telol
11	26	0	100 <sup>d</sup>	83 Ana I-Met II
12-15	105	0	100 <sup>d</sup>	100 Met II

<sup>a</sup> Los ovocitos fueron incubados con DE (200 µg/ml), fijados y sometidos a IIF usando anti-DE como primer anticuerpo. Los resultados representan la media ± E.S. de 4 experimentos independientes para los ovocitos en crecimiento y los ovocitos en maduración recuperados entre 3 y 11 hs post-hCG y de 8 experimentos independientes para los ovocitos recuperados entre 12-15 hs. Post-hCG.

<sup>b</sup> VG: vesícula germinal; Met I: metafase I; Ana I: anafase I; Telo I: Telofase I y Met II: metafase II.

<sup>c</sup> Diámetro del ovocito de rata que ha completado su crecimiento: 80 µm

<sup>d</sup> Los ovocitos presentaban área negativa.



**Figura 30. Localización de los sitios de unión para DE en la superficie de los ovocitos** (izquierda: contraste de fase, derecha: inmunofluorescencia indirecta).

Ovocitos sin ZP recuperados en los distintos estadios de crecimiento y maduración fueron incubados con proteína DE (200µg/ml), fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE **a-b**) Ovocito en crecimiento (diám.=40 µm). Nótese la ausencia de fluorescencia en la superficie del ovocito: **c-d**) Ovocito que ha completado su crecimiento con VG intacta (diám.=80 µm). Nótese la marcación "uniforme" en toda la superficie del ovocito; **e-f**) ovocito recuperado 6 hs.post- hCG. Nótese la marcación en forma de agregados (distinta a la observada en d) en toda la superficie del ovocito; **g-h**) ovocito recuperado 11hs. post- de hCG. Nótese la presencia de un área sin fluorescencia (área negativa, punta de flecha). gv : vesícula germinal. (X250).

Con el fin de establecer la relación entre los cambios en los patrones de fluorescencia observados y los cambios nucleares característicos de la maduración, se estudió el estadio meiótico en que se encontraban los ovocitos recuperados en los distintos horarios. Para ello, los ovocitos fueron recuperados en los mismos horarios utilizados anteriormente, y su estado meiótico determinado por tinción del ADN con el colorante Hoechst 33342. Los resultados se muestran en la última columna de la Tabla 9, donde se indican los estadios en que se encontraba la mayoría de los ovocitos analizados en cada horario.

### ***III.1.2 Fusogenicidad de la membrana plasmática del ovocito durante el crecimiento y la maduración.***

Con el fin de investigar si existía una asociación entre la aparición de los sitios de unión para DE sobre la superficie del ovocito y la adquisición de capacidad de fusión del oolema, se evaluó la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito en ovocitos recuperados en distintos estadios de crecimiento y maduración.

Si bien los ovocitos inmaduros en estadio de VG no poseen la habilidad de decondensar la cabeza del espermatozoide, ha sido descrito en el hámster, ratón y conejo que dichos ovocitos son capaces de incorporar la cabeza del espermatozoide al citoplasma (Iwamatsu y Chang, 1972; Berrios y Bedford, 1979; Cuasnicu y Bedford, 1991). Por lo tanto, para estos estudios se eligió el ensayo de penetración de ovocitos sin zona dado que la presencia en el citoplasma del ovocito de al menos una cabeza de espermatozoide incorporada o decondensada, es una evidencia inequívoca de que la fusión de gametas ha ocurrido. Para ello, los ovocitos fueron recuperados en los distintos estadios de crecimiento y maduración descritos anteriormente, liberados de las células del cumulus y la ZP, e inseminados con espermatozoides capacitados. Tres horas luego de iniciada la coincubación de las gametas, se evaluó el porcentaje de

ovocitos penetrados. Los resultados se muestran en la Tabla 10 e indican que ninguno de los ovocitos en crecimiento con un diámetro menor de 50  $\mu\text{m}$  fue penetrado. Los ovocitos con un diámetro mayor de 50  $\mu\text{m}$  presentaron un muy bajo porcentaje de penetración (1.8%), que correspondió a dos ovocitos que no presentaban VG en el momento de la observación de los mismos, mientras que los ovocitos recuperados entre 3 y 15 hs luego de la administración de hCG presentaron porcentajes crecientes de penetración (23-74%).

Si bien en los ovocitos en crecimiento nunca pudieron observarse cabezas incorporadas al citoplasma, en todos los casos se observaron espermatozoides fuertemente unidos al oolema que no eran removibles por intensivo pipeteo. Existía, por lo tanto, la posibilidad de que la fusión de las membranas hubiera ocurrido y que, para el caso de la rata, los ovocitos en crecimiento o con VG intacta no tuvieran la capacidad de incorporar la cabeza del espermatozoide. Para contestar esta pregunta resultaba necesario utilizar la técnica de transferencia de colorante con Hoechst 33342 dado que esta técnica permite visualizar el evento de fusión en sí.

Sin embargo, esta técnica de transferencia de colorante no ha sido descripta para el sistema de rata. Con el fin de establecer las condiciones experimentales que permitieran su utilización, los ovocitos sin ZP, fueron incubados con Hoechst 33342 1  $\mu\text{g/ml}$  durante distintos períodos de tiempo (30, 15 o 5 min.). Dado que la difusión pasiva del colorante a los espermatozoides no fusionados es uno de los puntos críticos de esta técnica, se ensayaron distintas condiciones de lavado y distintos tiempos de coincubación con espermatozoides. Como control se realizó el mismo procedimiento en medio de fertilización libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , ión necesario para la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito (Yanagimachi, 1978). Los resultados se muestran en la Tabla 11 e indican que al incubar los ovocitos 30 min. con Hoechst, independientemente de las condiciones de lavado de los ovocitos y del tiempo de coincubación de las gametas, se observa una transferencia inespecífica del

**Tabla 10. Penetrabilidad de ovocitos en distintos estadios de crecimiento y maduración**

Estadio	No. de ovocitos	% de ovocitos penetrados <sup>a</sup>
Ov. en crecimiento (diámetro < 50 µm)	41	0
Ov. en crecimiento (diámetro > 50 µm)	81	1.8 ± 1.5 *
Ov. en maduración (hs. Post-hCG)		
3	55	23.5 ± 10.6
6	48	19.7 ± 13.9
9	58	43.6 ± 8.7
12-15	230	74.8 ± 6.2

<sup>a</sup> Los resultados representan la media ± E.S. de 5 experimentos independientes para los ovocitos en crecimiento y los ovocitos en maduración recuperados entre 3 y 9 hs. post-hCG y de 10 experimentos independientes para los ovocitos recuperados 12-15 hs post-hCG.

\* Corresponde a dos ovocitos de diámetro = 80 µm, que habían sufrido la ruptura de la VG al momento de la observación.

**Tabla 11. Efecto de las distintas condiciones experimentales sobre la técnica de transferencia de colorante Hoechst 33342**

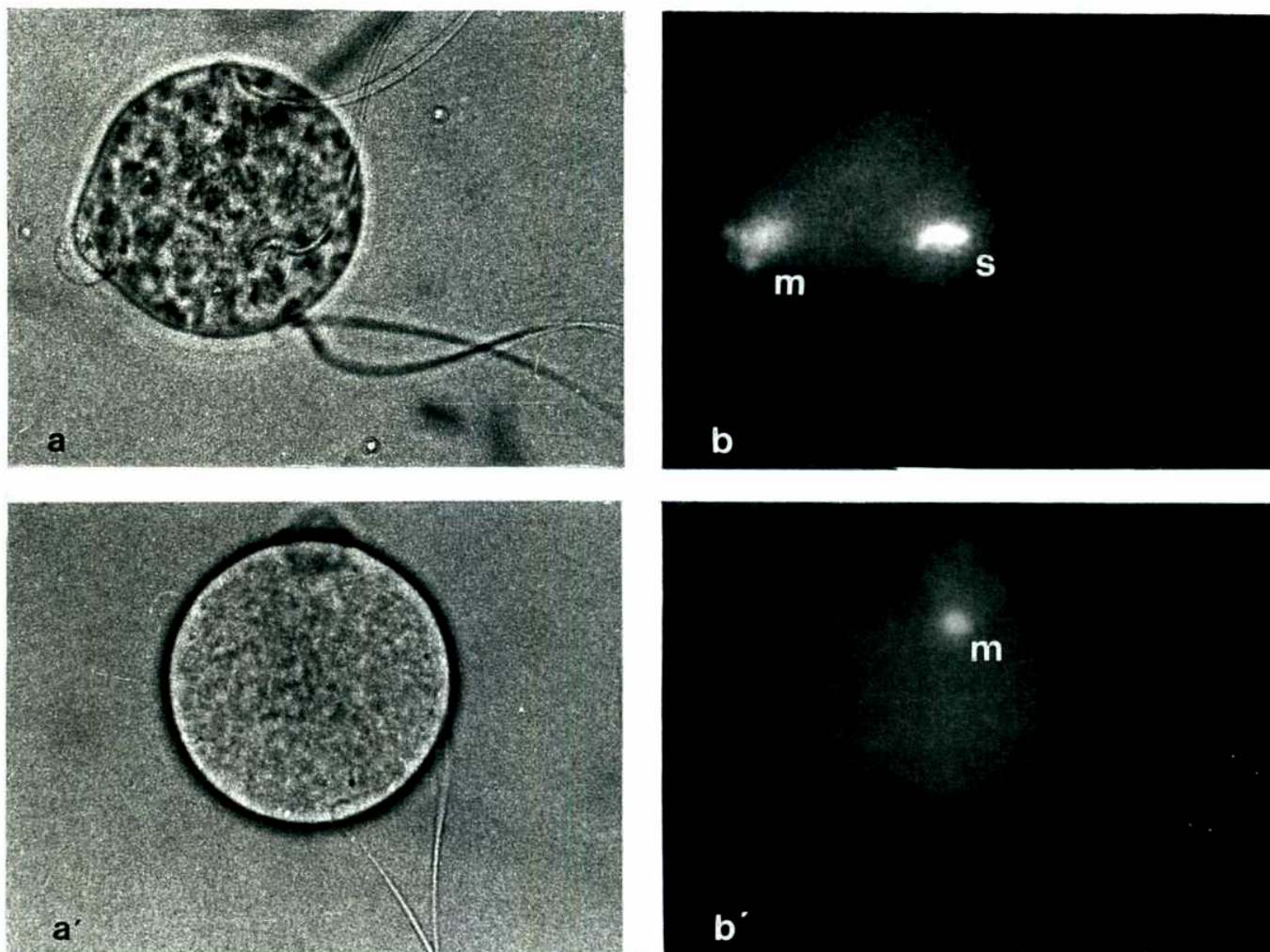
Incubación con Hoechst 33342 (1 µg/ml)					% ovocitos c/ esp. fluorescentes	
Tiempo	Volumen (µl)	Tiempo de lavado (vol.)	Tiempo de coincubación de gametas	no. de ovocitos	s/ Ca <sup>2+</sup>	c/ Ca <sup>2+</sup>
30 min	100	4 x 10 min (250)	90 min	37	100	100
		3 x 25 min (250)	60 min	24	100	100
15 min	100	3 x 25 min (250)	30 min	17	100	100
	500	3 x 25 min (700)	60 min 120 min	25 20	57 20	100 100
5 min	500	3 x 25 min (700)	30 min	16	0	0
			60 min	15	10	100
			120 min	17	25	100

colorante tal como lo indica el hecho de que el 100% de los ovocitos incubados en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  presentaron espermatozoides fluorescentes. Al disminuir el tiempo de incubación con el colorante, el porcentaje de ovocitos fusionados en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye. Las condiciones óptimas para la evaluación de la fusión espermatozoide-ovocito se obtuvieron al incubar los ovocitos durante 5 min. con 500  $\mu\text{l}$  de Hoechst 33342 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  los cuales fueron lavados 3 veces con 700  $\mu\text{l}$  de RFM fresco durante 25 min. cada lavado y, finalmente, incubados durante 60 min. con los espermatozoides capacitados (Figura 31). Una vez estandarizadas las condiciones de ensayo, se procedió a realizar los estudios propuestos.

Los ovocitos fueron recuperados en los mismos estadios de crecimiento y maduración descritos anteriormente, preincubados con Hoechst 33342 e inseminados con espermatozoides capacitados en medio de fertilización completo. Como se muestra en la Tabla 12, se observó que mientras los ovocitos en crecimiento con un diámetro menor a 50  $\mu\text{m}$  mostraron un muy bajo porcentaje de fusión (5%), comparable al porcentaje obtenido en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , un alto porcentaje (83%) de los ovocitos en crecimiento con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  poseían capacidad de fusión (Figura 32). Los ovocitos recuperados en los distintos estadios de maduración no presentaron diferencias significativas ni en el porcentaje de ovocitos fusionados ni en el número de espermatozoides fusionados por ovocito con respecto a los ovocitos de diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  (Tabla 12).

Dado que el proceso de fusión es precedido por la etapa de unión de las gametas, el aumento en la capacidad de fusión observada en los ovocitos con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  podía deberse a un aumento de la capacidad de dichos ovocitos de unir espermatozoides. Para evaluar esta posibilidad, los ovocitos en los distintos estadios de crecimiento y maduración fueron inseminados, estableciéndose posteriormente el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos por ovocito.





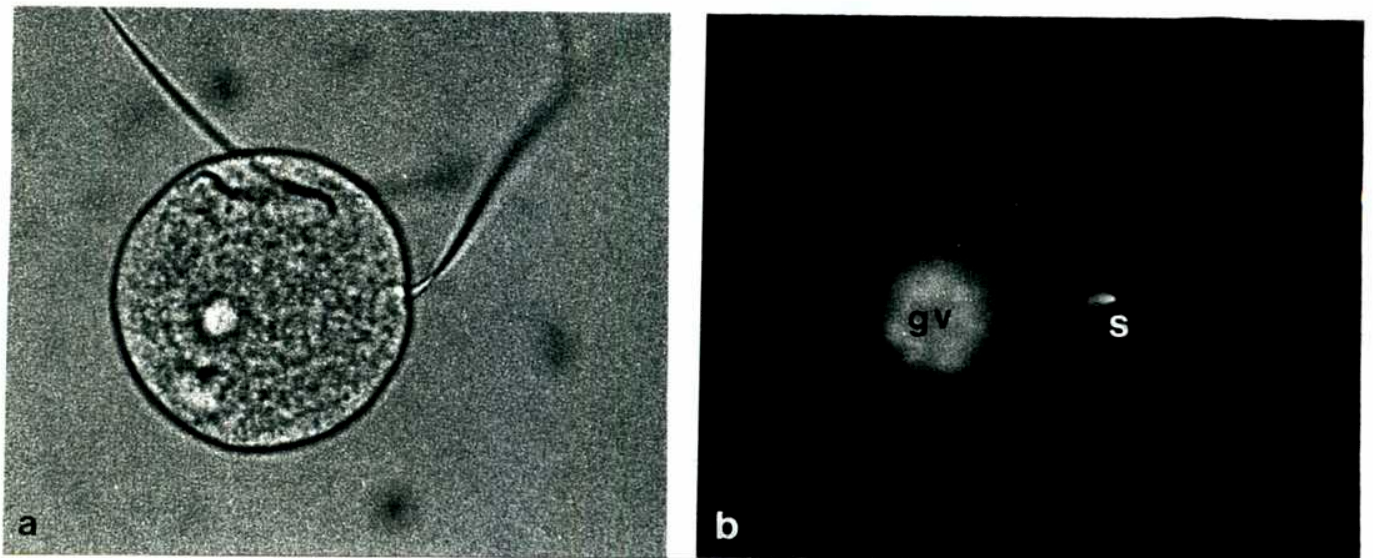
**Figura 31.** Microfotografías de contraste de fase (izquierda) y fluorescencias (derecha) de ovocitos maduros sin ZP inseminados con espermatozoides capacitados en medio completo (**a y b**) o en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  (**a' y b'**). Los ovocitos fueron incubados con Hoechst 33342, lavados previo a la inseminación y fijados 1 h luego de iniciada coincubación. Nótese la presencia de una cabeza fluorescente (s) en el ooplasm en el caso del medio completo, mientras que no se observa ninguna cabeza fluorescente en el medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ . m: cromosomas en Metafase II. Aumento: x400

**Tabla 12. Fusibilidad de la membrana plasmática de ovocitos en distintos estadios de crecimiento y maduración.**

Estadio	n. de ovocitos	% de ovocitos c/ esp. fusionados	no. de esp. fusionados/ovocito <sup>a</sup>
Ov. en crecimiento (diámetro < 50 µm)	24	5 ± 3	1.3 ± 0.4
Ov. en crecimiento (diámetro > 50 µm)	59	83 ± 7 *	4.4 ± 0.8
Ov. en maduración (hs. Post-hCG)			
3	21	82 ± 8 *	4.6 ± 2.1
6	26	93 ± 9 *	5.3 ± 2.8
9	24	90 ± 10*	3.1 ± 1.2
12-15	153	94 ± 2 *	2.3 ± 0.4

\* p<0.05 vs. ovocitos con diámetro menor 50 µm

<sup>a</sup> Los valores representan la media ± E.S. de 4 experimentos independientes para los ovocitos en crecimiento y los ovocitos en maduración recuperados entre 3 y 9 hs. post-hCG y de 8 experimentos independientes para los ovocitos recuperados 12-15 hs. post-hCG.



**Figura 32.** Microfotografías de contraste de fase (a) y fluorescencia (b) de ovocitos en crecimiento con diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  preincubados con Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e inseminados con espermatozoides capacitados. Luego de 1 h. de coincubación los ovocitos fueron fijados, montados y examinados en un microscopio equipado con epifluorescencia de luz de mercurio. Nótese la presencia de una cabeza de espermatozoide fluorescente (s) en el citoplasma del ovocito. (X400)

Los resultados se muestran en la Tabla 13 e indican que la adquisición de la capacidad de fusión observada en ovocitos con diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  no se debió a un aumento de la capacidad de unión de espermatozoides, ya que no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos, con respecto a los ovocitos con diámetro menor a 50  $\mu\text{m}$  (Tabla 13).

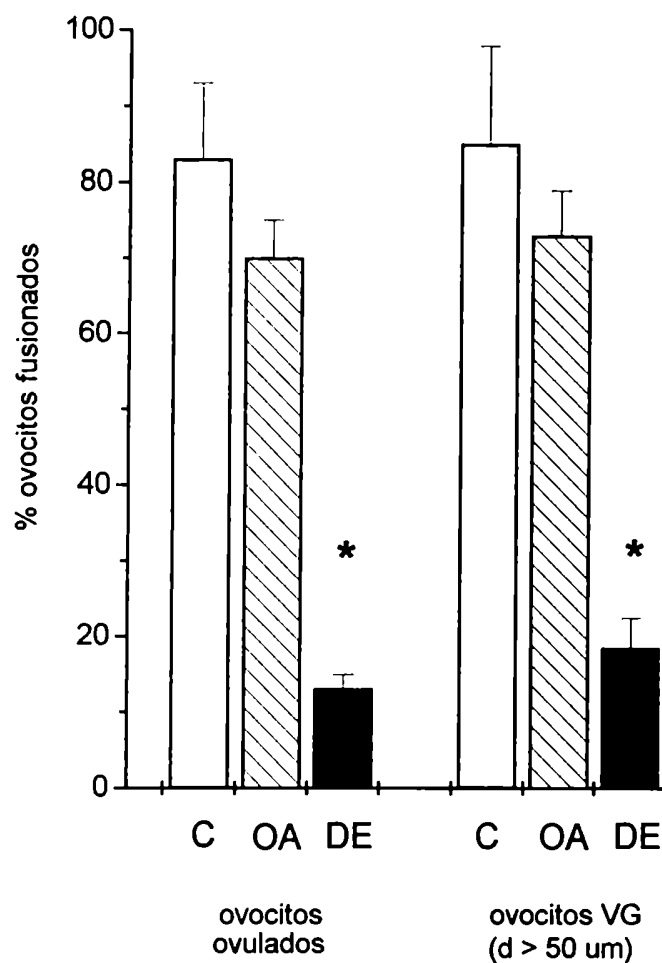
### ***III.1.3 Efecto del agregado de proteína DE sobre la fusibilidad de ovocitos en crecimiento.***

Los resultados descriptos anteriormente indicaban que la adquisición de capacidad de fusión en ovocitos de diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  ocurre concomitantemente con la aparición de los sitios de unión para DE durante la etapa de crecimiento. Si bien esto indicaba la existencia de una correlación temporal entre ambos fenómenos, quisimos estudiar si la adquisición de capacidad fusogénica observada se debía a la aparición de estos sitios en la superficie del ovocito. Para ello, se estudió si la presencia de proteína DE durante la coincubación de ovocitos con diámetro mayor de 50  $\mu\text{m}$  y espermatozoides capacitados, era capaz de inhibir la fusión. Para ello, ovocitos con diámetro mayor de 50  $\mu\text{m}$  como así también ovocitos ovulados fueron incubados con proteína DE e inseminados con espermatozoides capacitados. El porcentaje de ovocitos fusionados fue determinado por la técnica de transferencia de colorante de Hoechst 33342. Como control, los ovocitos fueron incubados en medio fresco o en presencia de una proteína control (ovoalbúmina). Los resultados se muestran en la Figura 33 e indican que la presencia de DE durante la coincubación de las gametas produjo una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el porcentaje de ovocitos fusionados comparado con los controles.

**Tabla 13. Capacidad de unión de la membrana plasmática de ovocitos en distintos estadios de crecimiento y maduración.**

Estadio	n. de ovocitos	% de ovocitos c/ esp. unidos <sup>a</sup>	no. de esp. unidos/ovocito <sup>a</sup>
Ov. en crecimiento (diámetro < 50 µm)	24	91 ± 6	8.4 ± 1.1
Ov. en crecimiento (diámetro > 50 µm)	59	97 ± 2	12.0 ± 2.0
Ov. en maduración (hs. Post-hCG)			
3	21	100	14.8 ± 3.5
6	26	100	14.7 ± 5.8
9	24	100	11.8 ± 5.0
12-15	153	97 ± 3	12.7 ± 1.7

<sup>a</sup> Los valores representan la media ± E.S. de 4 experimentos independientes para los ovocitos en crecimiento y los ovocitos en maduración recuperados entre 3 y 9 hs. post-hCG y de 8 experimentos independientes para los ovocitos recuperados 12-15 hs. post-hCG.



**Figura 33. Efecto del agregado de DE sobre la fusibilidad de ovocitos en crecimiento.**

Ovocitos con diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  como así también ovocitos ovulados (15 hs post-hCG) fueron preincubados con Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), incubados por 30 min. en medio sólo (□), o bien con 200  $\mu\text{g/ml}$  de ovoalbúmina (▨) o DE (■) e inseminados con espermatozoides capacitados. Luego de una hora de coincubación, los ovocitos fueron fijados, montados y examinados con un microscopio equipado con epifluorescencia de mercurio, evaluándose el porcentaje de ovocitos fusionados.

\*  $p < 0.001$ .

### **III.2 Requerimientos energéticos y de citoesqueleto de la agregación de los sitios de unión para DE.**

Como se ha descrito, durante la ovogénesis se observa un cambio en la localización de los sitios para DE en la superficie del ovocito. Los mismos presentan en los primeros estadios una distribución uniforme en toda la superficie, pasando luego a una distribución en agregados con un área negativa. Dado que la agregación de los sitios para DE es inducida por la presencia de DE, y teniendo en cuenta que en ciertos casos el citoesqueleto de actina puede estar involucrado en los procesos de movilización de componentes de membrana, resultaba interesante establecer si la integridad del citoesqueleto era necesaria para que ocurra la agregación de los sitios complementarios provocada por DE. Para ello, ovocitos ovulados sin ZP fueron incubados con citocalasina B (20 µg/ml en DMSO), que afecta la polimerización de los microfilamentos, incubados con DE y sometidos a la técnica de IIF. Como control, los ovocitos fueron tratados de igual forma con DMSO. Los resultados se muestran en la Tabla 14 e indican que el tratamiento con citocalasina B no modifica la capacidad de la proteína DE de provocar la agregación de los sitios complementarios sobre el oolema ni la presencia del área negativa, sugiriendo que en este caso, los microfilamentos de actina no estarían involucrados en el mantenimiento de la localización de los sitios para DE.

Con el objeto de estudiar si la agregación de los sitios de unión para DE era un proceso dependiente de energía, ovocitos ovulados sin zona fueron tratados con azida sódica (5 mM), un inhibidor de los procesos que requieren energía, antes y durante la incubación con proteína DE, y luego sometidos a la técnica de IIF. Los resultados se muestran en la Tabla 14 e indican que la incubación de los ovocitos con azida sódica no altera la distribución de los sitios para DE y que, por lo tanto, este proceso no dependería de energía.

**Tabla 14. Efecto de la citocalasina B y la azida sódica sobre la localización de los sitios de unión para DE**

Tratamiento	n. de ovocitos	Tipo de marcación
RFM	34	agregados
DMSO	31	agregados
Cyt. B	25	agregados
Azida sódica	41	agregados

Ovocitos ovulados sin ZP fueron preincubados con los distintos reactivos ensayados y luego incubados con DE (200 µg/ml) por 30 min. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE.

RFM: medio de incubación de los ovocitos sin agregados

DMSO: dimetilsulfóxido

Cyt B: citocalasina B (20 µg/ml en DMSO)

Azida sódica: 5 mM



### III.3 Destino de los sitios para DE luego de la fertilización

Una vez estudiada la aparición de los sitios para DE durante la ovogénesis y su participación en la adquisición de capacidad fertilizante, resultaba interesante estudiar el destino de dichos sitios luego de la fertilización. Para tal fin, se estudió la presencia y localización de los sitios de unión para DE en ovocitos fertilizados y embriones de dos células. En forma paralela, se estudió su capacidad fusogénica, con el fin de establecer si la pérdida de la capacidad de fusión que se da luego de la fertilización está asociada a alguna alteración de los sitios de unión para DE.

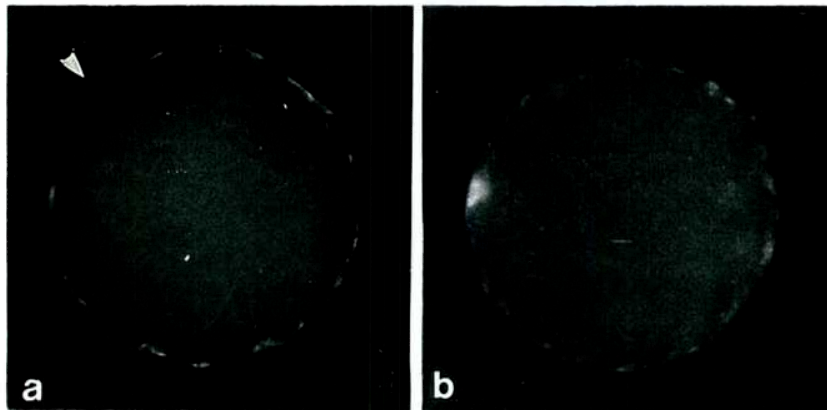
Los ovocitos fertilizados en estadio de dos pronúcleos y los embriones de dos células se obtuvieron de hembras prepúberes superovuladas e inseminadas *in vivo*, a distintos horarios luego de la ovulación. Luego de verificar la presencia de la cola de un espermatozoide incorporada al citoplasma, los ovocitos fertilizados en estadio de dos pronúcleos y los embriones de dos células fueron separados en dos grupos. Una mitad fue incubada con proteína DE y sometida a la técnica de IIF con anti-DE, mientras que la otra mitad fue inseminada con espermatozoides capacitados y la presencia de más de un espermatozoide incorporado al citoplasma evaluada a las 3 hs.

Los resultados de la presencia y localización de los sitios para DE se muestran en la Tabla 15 e indican que la totalidad de los ovocitos fertilizados presentaba marca fluorescente. Dicha marca se localizaba en forma de agregados en toda su superficie, no detectándose en ningún caso, la presencia del área negativa observada en los ovocitos ovulados (Figura 34). En el caso de los embriones de 2 células sólo el 47 % de los mismos presentaban marcación. De estos embriones marcados, el 6% de los mismos presentaba marca en forma de agregados mientras que el 94% restante presentaba marca uniforme.

**Tabla 15. Presencia y localización de los sitios de unión para DE en ovocitos fertilizados y embriones de dos células <sup>a</sup>**

Estadio	número	% de ovocitos/ embriones marcados	Area negativa
Ov. Ovulados	22	100	sí
Ov. Fertilizados	18	100	no
Embriones de 2 células.	38	47	no

<sup>a</sup> Ovocitos ovulados, ovocitos fertilizados y embriones de dos células fueron incubados por 30 min. con proteína DE pura, fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE.



**Figura 34. Inmunolocalización de los sitios de unión para DE en ovocitos fertilizados.** Ovocitos ovulados y ovocitos fertilizados fueron incubados por 30 min. con proteína DE (200  $\mu\text{g/ml}$ ), fijados y sometidos a la técnica de IIF con anti-DE. **a)** Ovocito ovulado. Nótese la marcación característica en forma de agregados y la presencia de un área negativa (punta de flecha). **b)** ovocito fertilizado. Nótese la presencia de marcación en forma de agregados sobre toda la superficie del ovocito. (X250)

Los resultados de los estudios de fertilización se muestran en la Tabla 16 donde se observa que los ovocitos fertilizados en estadio de dos pronúcleos presentaban un bajo porcentaje de re-fertilización comparado con el porcentaje obtenido con ovocitos ovulados, mientras que los embriones de dos células no presentaron evidencias de re-fertilización.

**Tabla 16. Penetrabilidad de ovocitos ovulados y embriones de dos células.**

Estadio	número	% de ovocitos/embriones fertilizados
Ov. Ovulados	30	85 ± 11
Ov. Fertilizados	18	20 ± 3
Embriones de 2 células	15	0

Ovocitos ovulados, ovocitos fertilizados y embriones de dos células fueron inseminados con espermatozoides capacitados evaluándose el porcentaje de ovocitos/embriones fertilizados al cabo de 3 hs. de coincubación. Los resultados representan la media ± E.S. de 3 experimentos independientes.

DISCUSSION

## DISCUSION

El objetivo general del presente trabajo consistió en estudiar los mecanismos por los que la proteína epididimaria DE participa en la interacción de gametas. Para ello, se estudió, en primer lugar, el tipo de asociación de la proteína DE a la membrana del espermatozoide, y la relación con su comportamiento durante la capacitación, proceso necesario para que el espermatozoide exprese la capacidad de interactuar con el ovocito.

De acuerdo a los estudios realizados por Kohane y colaboradores (1980), el tratamiento de espermatozoides frescos con medios de creciente fuerza iónica provocaba la pérdida de una gran cantidad de proteína DE de la superficie de los mismos. Sin embargo, cierta proporción de la proteína permanecía asociada a la superficie de los espermatozoides y no podía ser removida mediante este tratamiento. Dado que la concentración máxima de NaCl utilizada en estos estudios correspondió a 0.4 M existía la posibilidad de que la fuerza iónica utilizada en ese caso no hubiera sido suficiente como para provocar la liberación total de la proteína. Cuando evaluamos esta posibilidad aumentando la concentración salina hasta 2M NaCl, los resultados obtenidos indicaron la existencia de dos poblaciones de DE en la superficie del espermatozoide: una población "débilmente unida" al espermatozoide por uniones electrostáticas, tal como lo indica el hecho de que el 70% de la proteína pudo ser removida por tratamiento iónico, y una segunda población, "fuertemente unida", resistente al tratamiento salino, que pudo ser removida por tratamientos que permiten la extracción de proteínas integrales de membrana tales como el Tritón X-100, el alto pH (11), el cloruro de guanidinio y la urea. Resultados similares fueron obtenidos por Wong y Tsang (1982) quienes, estudiando una proteína epididimaria de rata con características físico-químicas similares a DE, demostraron, por análisis de Scatchard, la existencia de dos cinéticas de unión

de dicha proteína a la membrana de los espermatozoides: una de alta afinidad y baja capacidad, y otra de baja afinidad y alta capacidad.

Cuando se estudió el efecto del DTT, un agente que produce la ruptura de puentes disulfuro, sobre la permanencia de la población "fuertemente unida" sobre el espermatozoide, los resultados obtenidos mostraron que este tratamiento fue capaz de remover la totalidad de la proteína DE de la superficie del espermatozoide. Este resultado favorecía la posibilidad de que esta población de DE estuviera interactuando con algún componente de la membrana del espermatozoide a través de puentes disulfuro entre ambas moléculas. Sin embargo, el hecho de que otros tratamientos que no son capaces de romper uniones covalentes tales como el Tritón X-100, el alto pH, la urea o el cloruro de guanidinio también liberasen a la proteína del espermatozoide, sugirió que no habría puentes disulfuros intermoleculares involucrados en su interacción con la membrana del espermatozoide. Esta posibilidad es apoyada por resultados publicados recientemente indicando que la proteína recombinante CRISP1, el homólogo a DE en ratón, presentaría todas las cisteínas formando puentes disulfuro (Eberspaecher *et al.*, 1995), por lo cual esta proteína no poseería grupos sulfhidrilo libres para interactuar con otras moléculas.

De acuerdo a estas observaciones, una posible explicación para la remoción de DE por el DTT sería que la ruptura de puentes disulfuro intramoleculares provocara un cambio conformacional en DE que la liberara de la membrana. En este sentido, el desplazamiento observado en el patrón electroforético de la proteína DE pura tratada con DTT, favorece esta posibilidad.

Hasta aquí todos los resultados obtenidos apoyaban la hipótesis de que la proteína DE "fuertemente asociada" se uniría en forma no covalente a la membrana del espermatozoide. Esta asociación podría ocurrir ya sea por la unión de DE a algún componente preexistente de la membrana, o bien por la



inserción de DE en la bicapa lipídica. En este sentido cabe mencionar que el posterior análisis de la secuencia aminoacídica de DE indicó que ésta no poseería dominios hidrofóbicos de longitud suficiente como para insertarse en la bicapa lipídica. Con el fin de estudiar la posible existencia de un componente al que se uniera DE se realizaron una serie de experimentos que incluyeron la inmunoprecipitación con anti-DE de extractos totales de espermatozoides y la unión covalente de DE a la membrana del espermatozoide mediante un agente químico ("cross-linker"). Sin embargo, en ningún caso pudo detectarse alguna banda específica que correspondiera al complejo DE-receptor. Si bien estos resultados negativos podrían deberse a una imposibilidad técnica de detección de dicho complejo, no puede descartarse la posibilidad de que el componente al que se une DE no sea de origen proteico. En este sentido, cabe mencionar que se ha descrito la existencia de receptores no proteicos para proteínas del espermatozoides que cumplen un papel en fertilización. Un ejemplo de ello lo constituye el glicolípido SGG presente en el espermatozoide de ratón (Tanphaichitr *et al.*, 1990), el cual sería el receptor para la proteína SLIP1 que participaría en la etapa de unión a zona pellucida (Tanphaichitr *et al.*, 1992).

Con el fin de examinar el momento durante el tránsito epididimario en que se asocia cada una de las poblaciones de DE, espermatozoides del caput epididimario fueron sometidos a distintos procedimientos de extracción de proteínas. Luego de la extracción con 2 NaCl, se detectó por Western blot una suave banda de DE en el extracto, indicativa de que una muy baja cantidad de DE "débilmente unida" se hallaría asociada a la membrana de estos espermatozoides. Estos resultados fueron confirmados por estudios de IIF, en los que se observó que la totalidad de los espermatozoides sometidos al tratamiento salino presentaba marca fluorescente. Cuando dichos espermatozoides fueron luego incubados con Tritón X-100, la proteína remanente pudo ser completamente removida, tal como lo indica la presencia de una banda correspondiente a DE en las proteínas extraídas y analizadas por Western blot. Estos resultados estarían indicando que en primer término DE se

uniría fuertemente a la membrana del espermatozoide en el caput epididimario y luego lo haría en forma débil durante el tránsito epididimario. En este caso, el receptor putativo para la población de DE "fuertemente unida", ya debería estar presente en los espermatozoides del caput, por lo que debería ser de origen testicular.

Moore y colaboradores (1994), utilizando un anticuerpo monoclonal denominado 4E9, que reconoce a la proteína E del complejo DE de rata (Xu y Hamilton, 1992), mostraron que una gran proporción de dicho antígeno permanecía en el espermatozoide luego de distintos tratamientos que liberan proteínas periféricas, por lo que concluyen que la proteína E se encontraría solamente asociada en forma fuerte a la superficie del espermatozoide, comportándose como una proteína integral de membrana. Así mismo, Vreeburg y colaboradores (Vreeburg *et al.*, 1992) sostienen que una proteína de 32 kDa, que podría corresponder a DE, estaría fuertemente unida a la membrana del espermatozoide ya que sólo puede ser extraída de los mismos por tratamiento con Tritón X-100 o SDS. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la existencia de dos poblaciones de DE en el espermatozoide. Si bien la población "fuertemente unida" es minoritaria (30%), el considerar sólo una de las poblaciones presentes en el espermatozoide podría implicar una interpretación parcial de la función biológica de la proteína. En este sentido, las distintas evidencias obtenidas en este trabajo sugieren que existe una correspondencia entre las distintas poblaciones de DE y su comportamiento durante la capacitación (Kohane *et al.*, 1980). Teniendo en cuenta que serían las proteínas de recubrimiento, asociadas débilmente a la membrana del espermatozoides, las que se liberan durante la capacitación (Yanagimachi, 1994), se especuló que la proteína DE "débilmente unida" correspondería a la población liberada. Los resultados obtenidos por ELISA mostraron que la cantidad de proteína DE que se libera del espermatozoide durante la capacitación (~70 %) es similar a la que se libera por tratamiento con NaCl (~70 %), sugiriendo que podría tratarse de la misma población. Por otro lado, el

hecho de que no sea posible extraer proteína DE por tratamiento salino de espermatozoides previamente capacitados, estaría indicando que toda la población "débilmente unida" fue liberada durante el proceso de capacitación. La proteína que permanece luego de la capacitación y migra al segmento ecuatorial correspondería, por lo tanto, a la población "fuertemente unida". Esto lo demuestra el hecho de que espermatozoides frescos a los que se había previamente removido la proteína "débilmente unida" con NaCl y luego incubado bajo condiciones capacitantes, presentaban a la proteína DE en el segmento ecuatorial.

Resulta interesante destacar que el porcentaje de células con redistribución de DE luego del tratamiento salino, fue mayor que el observado en espermatozoides solamente sometidos al proceso de capacitación, sugiriendo que el mencionado tratamiento provocaría un aumento en la capacidad de los espermatozoides de sufrir la redistribución de DE. Esto podría atribuirse al hecho de que al someter a los espermatozoides a una alta fuerza iónica, se estuviera provocando un aumento en la velocidad de capacitación, por lo cual una mayor proporción de espermatozoides sería capaz de sufrir la reacción acrosomal y la consiguiente redistribución de DE.

De estos resultados en su conjunto, podría concluirse que la población de DE que se libera durante la capacitación correspondería a la "débilmente unida", mientras que la que persiste luego de la capacitación y migra al segmento ecuatorial correspondería a la población "fuertemente unida". Estos resultados serían consistentes, por un lado, con el hecho de que se ha postulado que las proteínas que se liberan durante la capacitación deberían corresponder a proteínas de recubrimiento (Yanagimachi, 1994), débilmente asociadas a la membrana del espermatozoide y, por otro lado, al hecho de que todas las proteínas descritas hasta el momento capaces de migrar entre los dominios de membrana en diversas especies, poseen características de proteínas intrínsecas, ya sea por su naturaleza hidrofóbica, o por su unión a componentes

de membrana (Lopez y Shur, 1987; Villaroya y Scholler, 1987; Phelps *et al.*, 1988; Topfer-Petersen *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990). En el caso de la proteína DE, la migración de la misma sería consecuencia de la migración de su receptor putativo.

El paso siguiente consistió en estudiar la función biológica de cada una de las poblaciones de DE, comenzando dichos estudios con la población "débilmente unida". Es sabido que algunos de los componentes liberados durante el proceso de capacitación son capaces de inhibir la ocurrencia de la reacción acrosomal y la capacidad fertilizante de espermatozoides previamente capacitados, incluso en espermatozoides de otras especies (Oliphant y Brackett, 1973; Oliphant, 1976; Saling y Storey, 1979; Fraser, 1984). Estos componentes son denominados "factores decapacitantes" y pueden ser aislados y agregados a espermatozoides capacitados, donde éstos vuelven a unirse a los espermatozoides llevándolos a un estado de decapacitación (Yanagimachi, 1994). Teniendo en cuenta que un alto porcentaje de la proteína DE está "débilmente unida" a la membrana del espermatozoide y que se libera durante la capacitación, existía la posibilidad de que esta población de DE actuara como factor decapacitante, estabilizando el acrosoma y previniendo la ocurrencia de una reacción acrosomal prematura. La ocurrencia de la capacitación se midió de dos formas diferentes: a) evaluando la ocurrencia de la reacción acrosomal y b) evaluando la capacidad de los espermatozoides de penetrar ovocitos sin ZP.

Dado que no ha sido descrito aún ningún método para la detección de la reacción acrosomal en el espermatozoide de rata, este parámetro fue medido indirectamente a través de la migración de DE al segmento ecuatorial, la cual ocurre como consecuencia de la reacción acrosomal (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Los resultados obtenidos mostraron que el agregado de proteína DE durante el proceso de capacitación no produjo una disminución en el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Más aún, se observó que, contrariamente a lo esperado para un factor decapacitante, el agregado de DE

produjo un aumento significativo en el porcentaje de células con DE en el segmento ecuatorial. Estos resultados indican que DE no actuaría estabilizando la membrana del espermatozoide e impidiendo la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Sin embargo, cuando se evaluó la ocurrencia de la capacitación en espermatozoides incubados con DE a través del ensayo de penetración de ovocitos sin zona pellucida, el porcentaje de ovocitos penetrados por estos espermatozoides fue 0% a pesar de que, como se mencionó anteriormente, los mismos presentaban altos porcentajes de reacción acrosomal. Si bien no puede descartarse la posibilidad de que DE estuviera inhibiendo algún fenómeno de la capacitación no relacionado directamente con la ocurrencia de la reacción acrosomal, la observación de un importante grado de aglutinación en los espermatozoides capacitados en presencia de DE parecería ser la principal razón de la inhibición encontrada. Si este fuera el caso, DE no estaría actuando como factor decapacitante, por lo que esta población de DE podría estar proporcionando una concentración alta de esta proteína en el entorno del espermatozoide de forma tal de impedir el desplazamiento del equilibrio de unión de la población de DE "fuertemente unida" asegurando así una cantidad constante de esta población en la superficie del espermatozoide.

Hasta aquí los resultados indicaban que la población de DE "fuertemente unida" permanecería sobre el espermatozoide luego de la capacitación y por ende sería la involucrada en el proceso de fusión de gametas (Rochwerger *et al.*, 1992). Sin embargo, diversas evidencias sugerían que DE podía participar también en la etapa de unión del espermatozoide a la zona pellucida. En primer lugar, la localización de DE sobre la región dorsal del acrosoma es consistente con su posible participación en la unión a ZP ya que, inicialmente, los espermatozoides se unen a la ZP a través de esta región de la cabeza. En segundo lugar, evidencias previas demuestran que la incubación de espermatozoides testiculares con una proteína epididimaria de rata con

características similares a DE, incrementa su capacidad de interactuar con la ZP (Orgebin-Crist y Fournier-Delpech, 1982). Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que cuando se inseminaban hembras con espermatozoides expuestos a sueros provenientes de ratas inmunizadas con proteína DE, se observaba una inhibición en el porcentaje de ovocitos penetrados. Dado que DE participa en la etapa de fusión el resultado esperado consistía en una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino. Sin embargo, el hecho de que no se observaran espermatozoides en el espacio perivitelino, sugería que los anticuerpos presentes en dichos sueros estarían interfiriendo con la unión y/o penetración de la ZP (Perez Martinez *et al.*, 1995). Por lo tanto, resultaba interesante estudiar si la población "fuertemente unida" de DE participaba en la etapa de unión a ZP.

El ensayo de elección para evaluar esta hipótesis era la fertilización *in vitro* de ovocitos de rata intactos, desarrollada exitosamente hasta el momento por sólo dos laboratorios en el mundo (Toyoda y Chang, 1974; Ben-Yosef *et al.*, 1993). Se habían realizado en nuestro laboratorio numerosos intentos tendientes a su desarrollo sin obtener resultados positivos. Por lo tanto, nos propusimos volver a intentar establecer las condiciones necesarias para llevar a cabo este ensayo. Teniendo en cuenta la metodología utilizada anteriormente, se ensayaron diversas condiciones que incluyeron modificaciones en la calidad del agua utilizada, en el medio de fertilización, método de estimulación ovárica y modo de obtención de los espermatozoides, que permitieron finalmente alcanzar resultados positivos.

De todas las condiciones ensayadas, la calidad del agua utilizada para la preparación de los medios, como así también la calidad de los ovocitos utilizados, parecieron ser críticas. La calidad del agua es un factor limitante en los ensayos de fertilización de diversas especies, incluyendo al humano, tal como lo indica el hecho de que se hayan desarrollado bioensayos para evaluar su calidad (Rinehart *et al.*, 1988; Bavister y Andrews, 1988). En cuanto a la

calidad de los ovocitos, el esquema de estimulación utilizado está basado en el descrito por Walton y colaboradores (1983). Estos autores muestran que la inyección de cantidades cada vez menores de PMSG produce una disminución en el número de ovocitos recuperados por hembra, con un aumento paralelo de la calidad de los ovocitos obtenidos. Es interesante mencionar que en un principio todos los ovocitos recuperados de las distintas hembras por este método, eran agrupados y luego divididos en los distintos tratamientos, obteniéndose porcentajes de fertilización promedio de 50%. Sin embargo, cuando los ovocitos de cada hembra eran incubados separadamente, observamos que este porcentaje era el resultado de una gran variabilidad entre las hembras, existiendo algunas en las que se obtenía entre 0 y 20% de ovocitos fertilizados y otras que presentaban un porcentaje de fertilización entre 80 y 100%. Dado que en el esquema de inducción de la ovulación utilizado no se inyecta hCG, la respuesta obtenida dependería en parte de la capacidad de respuesta de las hembras, ya que debe producirse un pico endógeno de LH. Por lo tanto, la variabilidad observada podría deberse a que pequeñas diferencias en el estado de maduración de las hembras podrían traducirse en importantes diferencias en la calidad de los ovocitos obtenidos.

Una vez establecidas las condiciones para la realización del ensayo de fertilización, se estudió el efecto del agregado de anticuerpo anti-DE sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los resultados obtenidos mostraron que en presencia del anticuerpo se produce una inhibición significativa del porcentaje de ovocitos fertilizados. Dado que se consideraron fertilizados a aquellos ovocitos que presentaban un espermatozoide incorporado al citoplasma y teniendo en cuenta que anti-DE produce una disminución en el porcentaje de ovocitos sin zona fusionados (Cuasnicú *et al.*, 1990), la inhibición observada en los ensayos con ovocitos intactos podría deberse al efecto inhibitorio de anti-DE sobre la fusión y no a un efecto en la etapa de interacción con la zona pellucida. Si este fuera el caso, los espermatozoides podrían unirse y atravesar la zona pellucida pero no podrían fusionarse, acumulándose en el espacio perivitelino.

Dado que en ningún caso se observaron espermatozoides en el espacio perivitelino, la inhibición en el porcentaje de ovocitos fertilizados observada se debería a un efecto de anti-DE sobre la primera etapa de interacción con la zona pellucida.

Tal como fuera mencionado en la Introducción, existen dos tipos de receptores para la zona pellucida: los receptores primarios, que involucran a aquellas moléculas que participan en la unión del espermatozoide intacto a ZP3 y los receptores secundarios, involucrados en la unión del espermatozoide reaccionado a ZP2. Los receptores primarios se localizarían en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado, específicamente en la región del capuchón acrosomal, mientras que los receptores secundarios estarían localizados, en la mayoría de las especies estudiadas, en la membrana acrosomal interna del espermatozoide reaccionado. Sin embargo, O'Rand y Fisher (1987) sugieren que en el conejo estos receptores estarían localizados en el margen anterior del segmento ecuatorial y la región postacrosomal del espermatozoide reaccionado. Dado que la proteína DE está presente en el segmento ecuatorial de los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal, no puede descartarse la posibilidad de que DE estuviera actuando en la etapa de unión a ZP como un receptor secundario. En este momento se están realizando en nuestro laboratorio los ensayos necesarios para evaluar esta posibilidad.

Como ha sido mencionado en la Introducción, la interacción espermatozoide-zona pellucida ha sido mayormente estudiada en el ratón. Es por esto que la mayoría de las moléculas del espermatozoides postuladas como candidatos a receptores de ZP han sido identificados en esta especie (Wassarman, 1995). En el caso de la rata, la información disponible es muy escasa. Se ha demostrado que la actividad de una isoforma de la enzima  $\alpha$ -D-manosidasa, específica de la membrana del espermatozoide, aumenta a lo largo del epidídimo en forma paralela al aumento en la capacidad de dichos espermatozoides de unirse a la



zona pellucida (Tulsiani *et al.*, 1991). Por otro lado, el tratamiento de los ovocitos intactos con  $\alpha$ -manosidasa produce una casi completa inhibición de la unión espermatozoide-zona pellucida (Shalgi *et al.*, 1986). Estos resultados han llevado a Tulsiani y colaboradores (1989) a proponer a la  $\alpha$ -D-manosidasa como posible receptor para la ZP en la rata. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo sobre la participación de DE en la etapa de unión a zona pellucida, constituirían una evidencia a favor de que distintas moléculas del espermatozoide de rata estarían involucradas en este proceso.

Dado que la zona pellucida es un inductor de la reacción acrosomal en todas las especies estudiadas hasta el momento, tanto en su forma intacta como solubilizada (ratón: (Florman y Storey, 1982; Bleil y Wassarman, 1983); hámster:(Cherr *et al.*, 1986); bovino: (Florman y First, 1988); jabalí: (Berger *et al.*, 1988); conejo: (O'Rand y Fisher, 1987); humano: (Cross *et al.*, 1988)), resultaba interesante estudiar si una vez que el espermatozoide se ha unido a la ZP, ésta era capaz de inducir la redistribución de DE al segmento ecuatorial.

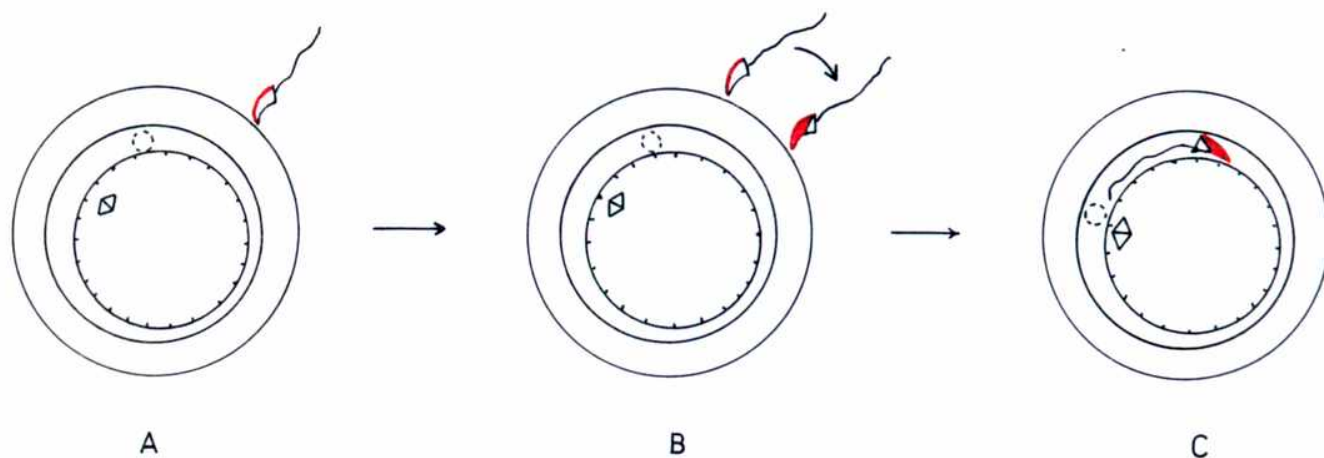
Para estudiar el efecto de la zona pellucida solubilizada sobre la redistribución de DE fue necesario, en primer lugar, desarrollar un sistema que permitiera obtener zonas pellucidas puras en cantidades adecuadas para los ensayos. Luego de probar diferentes metodologías, la técnica finalmente elegida por su rendimiento consistió en una modificación de la técnica de filtración del tejido ovárico por mallas de poro decreciente, utilizada para la obtención de zonas pellucidas de hámster (Oikawa *et al.*, 1988).

El efecto de las zonas solubilizadas sobre la redistribución de la proteína DE se estudió en espermatozoides capacitados por 3 hs. debido a que es éste el tiempo en el cual los espermatozoides se encuentran ya capacitados pero presentando el menor porcentaje de reacción acrosomal espontánea (Shalgi *et al.*, 1981). Los resultados indicaron que el agregado de zona pellucida solubilizada a espermatozoides capacitados provocó un aumento del 83 % en el

porcentaje de células con redistribución de DE. El efecto máximo ya se alcanza con una concentración de 5 ZP/ $\mu$ l. Este valor de inducción máximo obtenido es similar al hallado en las distintas especies antes mencionadas utilizando concentraciones similares de ZP (bovino: 100% (Florman y First, 1988), jabalí: 63% (Berger *et al.*, 1988), conejo: 100% (O'Rand y Fisher, 1987), ratón 120% (Bleil y Wassarman, 1986)). Por otro lado, estudios posteriores en los que se ensayaron distintos tiempos de incubación de los espermatozoides con la preparación de zonas mostraron que, al igual que lo que ocurre en el resto de las especies estudiadas, el efecto máximo se alcanza en los primeros 15 min. de incubación.

Estos resultados estarían indicando que una vez que el espermatozoide se une a la zona pellucida, ésta es capaz de inducir la redistribución de DE al segmento ecuatorial.

En su conjunto, los resultados obtenidos indicarían que la proteína DE remanente en los espermatozoides capacitados, que correspondería a la población "fuertemente unida" cumpliría una doble función que se esquematiza en la Figura I. Mientras la proteína DE "fuertemente unida" que permanece en los espermatozoides capacitados se localiza en la región dorsal del acrosoma, la misma participaría en la etapa de unión a zona pellucida (A). Una vez unidos, dichos espermatozoides sufrirían la reacción acrosomal inducida por la zona, con la concomitante migración de DE al segmento ecuatorial (B), localización en la cual participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios localizados en la superficie del ovocito (C). En este sentido, cabe mencionar que se ha postulado una doble función, según su localización, para la galactosiltransferasa, una proteína que se localiza en la región dorsal del acrosoma del espermatozoide de ratón y que es candidata como receptor para la zona pellucida en el espermatozoide de esta especie. La galactosiltransferasa migra al segmento ecuatorial como consecuencia de la reacción acrosomal, por lo que los autores postulan que participaría también en



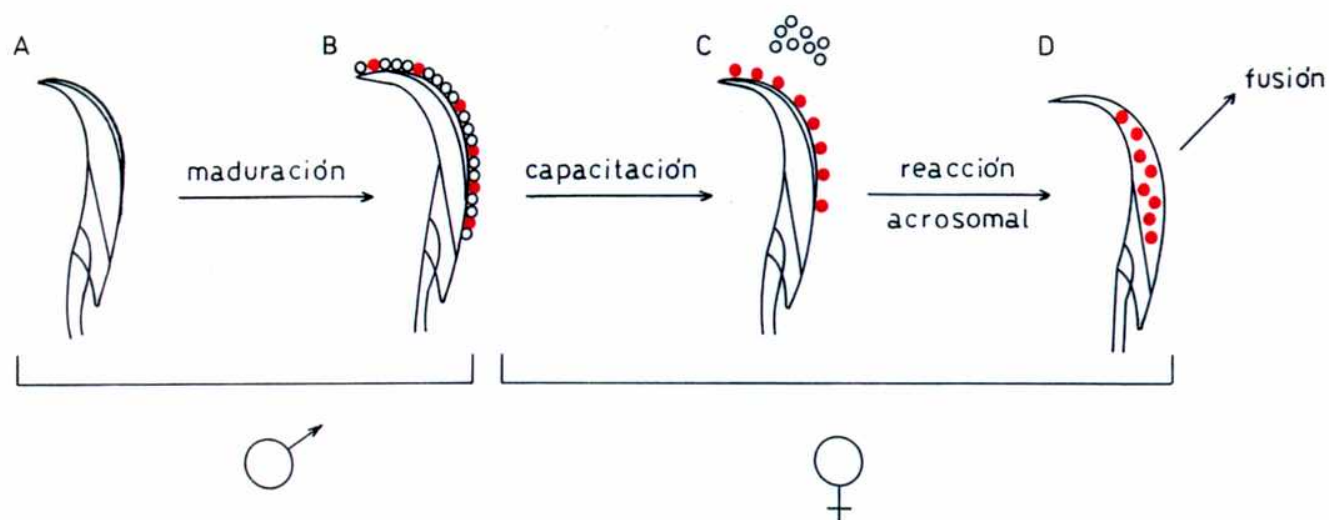
**Figura I. Modelo explicativo de la participación de DE en las distintas etapas de la interacción de gametas.**

(A) la proteína DE (-) presente en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide capacitado, participaría en la etapa de unión a ZP. (B) Una vez que el espermatozoide se ha unido a la ZP, la misma induciría la redistribución de DE al segmento ecuatorial. (C) La proteína DE localizada en el segmento ecuatorial participaría en el proceso de fusión de membranas.

la etapa de unión al oolema (Lopez y Shur, 1987). Sin embargo, esta posibilidad no ha sido aún demostrada. Teniendo en cuenta que en los espermatozoides no se produce la síntesis de proteínas, el hecho de que ciertas proteínas cumplan diversas funciones según su localización y el estado funcional del espermatozoide, podría constituir un mecanismo regulatorio de la utilización de las proteínas presentes en el espermatozoide en el momento de la interacción con el ovocito.

Los resultados obtenidos hasta aquí indican la existencia de una relación entre las dos poblaciones de DE presentes en el espermatozoide y su comportamiento durante la capacitación y reacción acrosomal. La secuencia de eventos más probable en que esto ocurriría, se presenta en la Figura II. Tal como se muestra en el esquema mencionado, los espermatozoides testiculares no poseen proteína DE (A). En el caput epididimario, la proteína se asociaría fuertemente al espermatozoide, y a medida que los mismos transitan por el epidídimo la proteína DE se uniría débilmente, detectándose ambas poblaciones de DE en el espermatozoide maduro (B). Una vez que los espermatozoides son depositados en el tracto femenino, y a medida que ocurre el proceso de capacitación, la población "débilmente unida" se liberaría (C), mientras que la población "fuertemente unida" permanecería en el espermatozoide luego de este proceso, participando en la unión a la ZP. La unión a la ZP induciría la migración de DE al segmento ecuatorial, localización en la que DE participa en el proceso de fusión (D).

Con el fin de estudiar dominios funcionales que pudieran estar relacionados con la actividad biológica de DE como así también establecer homologías con otras proteínas ya secuenciadas, el paso siguiente consistió en realizar la secuenciación de un péptido interno de nuestra proteína DE. El péptido secuenciado presentó 100% de homología con las proteínas AEG (acidic epididymal glycoprotein) y DE, previamente clonadas por los grupos de French



**Figura II. Modelo explicativo sobre el comportamiento de las dos poblaciones de DE durante los distintos procesos fisiológicos que sufre el espermatozoide.**

(A) los espermatozoides testiculares no poseen proteína DE. (B) La proteína DE se asociaría a los espermatozoides durante el tránsito epididimario con dos afinidades distintas: una población "débilmente unida" (o) y otra población "fuertemente unida" (•). (C) durante la capacitación la población "débilmente unida" se liberaría del espermatozoide y la población "fuertemente unida" remanente participaría en la unión a ZP. (D) Concomitantemente con la ocurrencia de la reacción acrosomal la proteína migra al segmento ecuatorial, localización en la que participa en el proceso de fusión.

(Charest *et al.*, 1988) y Brooks (Brooks *et al.*, 1986), respectivamente. Estos últimos mantuvieron el nombre DE dado que dado que asumieron que se trataba de nuestra proteína DE. La completa homología de este péptido de 13 aminoácidos, conjuntamente con varias características comunes tales como su origen epididimario, su naturaleza secretoria, su peso molecular (entre 32 y 37 kDa), la andrógeno-dependencia de su síntesis, y la perfecta correspondencia entre los péptidos trípticos obtenidos que no pudieron ser secuenciados y aquellos que se generarían por tratamiento enzimático de AEG/DE con tripsina, estarían confirmando que nuestra proteína DE correspondería a la misma entidad molecular que las previamente clonadas, como así también a la contraparte en la rata de la proteína clonada en ratón (Mizuki y Kasahara, 1992; Haendler *et al.*, 1993).

Tal como fue mencionado en la Introducción, la proteína DE fue originalmente descrita por Cameo y Blaquier hace veinte años (1976). Desde entonces otros laboratorios han descrito numerosas proteínas epididimarias de rata que podrían corresponder a DE. Estas proteínas recibieron distintas denominaciones tales como AEG (Lea *et al.*, 1978), 32kDa (Wong y Tsang, 1982), sialoprotein (Faye *et al.*, 1980), Protein IV (Jones *et al.*, 1980) o DE (Brooks y Higgins, 1980; Xu y Hamilton, 1992). Así mismo, una proteína de características similares también había sido identificada en el ratón (Rankin *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos muestran que varias de las proteínas descritas corresponderían a la misma molécula. En este punto es importante aclarar que nuestro laboratorio ha sido el único dedicado al estudio de su función biológica.

Tal como ya ha sido mencionado, el análisis de la secuencia aminoacídica indica que DE no posee dominios hidrofóbicos de longitud suficiente para que se inserte en la bicapa lipídica. Aunque no puede descartarse que el plegamiento de la proteína pueda formar un bolsillo hidrofóbico, los resultados

obtenidos indicarían que DE sería una proteína periférica unida a algún componente de la membrana del espermatozoide.

Dado que la proteína DE posee un alto número de cisteínas en el extremo C-terminal, ha sido incluida dentro de la familia de proteínas CRISP (Cystein Rich Secretory Proteins). Dentro de esta familia se incluyen proteínas encontradas en órganos reproductivos tales como el epidídimo (ratón: (Mizuki y Kasahara, 1992; Rankin *et al.*, 1992; Haendler *et al.*, 1993) y el testículo (ratón: (Kasahara *et al.*, 1989; Haendler *et al.*, 1993); humano: (Kratzschmar *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1989), cobayo: (Foster y Gerton, 1996)), y en plasma seminal de caballo (Calvete *et al.*, 1994), como así también proteínas que se detectan en órganos no reproductivos como las glándulas salivales de ratón (Mizuki y Kasahara, 1992; Haendler *et al.*, 1993), humano (Kratzschmar *et al.*, 1996) y de un tipo de lagartija (Morrissette *et al.*, 1995). En todos los miembros de esta familia las cisteínas se encuentran conservadas. El análisis de la organización estructural de uno de los genes pertenecientes a la familia CRISP, el gen *Tpx-1* que se expresa en testículo de ratón, mostró que existe un intrón más largo de lo usual (~17 Kb) que separa la región rica en cisteínas (exones 9 y 10) del resto de la proteína (Mizuki y Kasahara, 1992). Debido a ello se ha sugerido que esta región, que constituye un dominio separado (Eberspaecher *et al.*, 1995), habría sido adquirida por las proteínas ancestrales de DE y TPX1 y que, posiblemente, cumpliría un papel importante en la función de estas proteínas en el tracto reproductor masculino (Mizuki y Kasahara, 1992). El hecho de que la proteína AEG2/CRISP3 sintetizada sólo en las glándulas salivales (Mizuki y Kasahara, 1992; Haendler *et al.*, 1993), contenga un alto número de inserciones y deleciones en esta región, apoyaría esta hipótesis.

Teniendo en cuenta la existencia de una proteína con 70 % de homología en el ratón, resultaba interesante estudiar si esta proteína cumplía la misma función biológica que la DE de rata. En primer lugar se estudió la localización de dicha proteína en espermatozoides de ratón. Para tal fin, espermatozoides frescos

fueron sometidos a la técnica de IIF utilizando el anticuerpo contra la DE de rata (anti-DE). Dado que la presencia de proteínas epididimarias homólogas a DE no había sido aún descripta en otras especies, en forma paralela, se estudió la presencia de marca fluorescente en espermatozoides de distintas especies de mamíferos. Los resultados obtenidos mostraron que mientras los espermatozoides de ratón y de hámster presentaban marca fluorescente, los espermatozoides de todas las otras especies estudiadas (humano, conejo, bovino, ovino y cobayo) no presentaban marcación.

Los resultados negativos obtenidos en las otras especies estarían indicando la ausencia de proteínas homólogas a DE en dichas especies o, alternativamente, la incapacidad del anticuerpo utilizado de reconocer a las proteínas homólogas en estas especies. En este sentido, Brooks y colaboradores (1986) han descripto que un anticuerpo policlonal anti-DE, distinto al utilizado en nuestros estudios, es capaz de detectar una banda de peso molecular menor al de DE en citosol epididimario de cobayo, cuyos espermatozoides no presentaron marcación fluorescente al utilizar nuestro anticuerpo anti-DE. Estas evidencias no permiten descartar la posibilidad de que existan proteínas homólogas a DE en otras especies requiriéndose la utilización de otras estrategias para su identificación.

La marca fluorescente observada en los espermatozoides de ratón se localiza en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide, localización igual a la descripta para la proteína DE de rata (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). A su vez, la marcación observada en espermatozoides de hámster se localiza en la región acrosomal. Con el fin de confirmar que la marcación observada en los espermatozoides de estas especies se debía al reconocimiento del homólogo de DE, se estudió por Western blot si el antígeno reconocido correspondía a un antígeno epididimario. Para el caso del hámster, los resultados mostraron que el antígeno observado por IIF no era detectado por Western blot, ya que no se observaron bandas ni en los citosoles epididimario y testicular ni en un extracto



total de proteínas del espermatozoide cuando las muestras fueron separadas con SDS. Si bien este resultado podía atribuirse a una incapacidad de anti-DE de reconocer al antígeno desnaturalizado, el hecho de que tampoco se detectaran bandas al utilizar geles nativos estaría indicando que la marcación observada podría deberse a una reacción inespecífica del anticuerpo.

Por el contrario, los resultados obtenidos en el caso del ratón muestran que, efectivamente, el antígeno detectado sería de origen epididimario tal como lo indica la presencia de una banda en el citosol epididimario, no detectada en el citosol testicular de ratón. El peso molecular aparente obtenido para esta banda fue similar al de la proteína DE de rata (37 kDa), pero diferente del peso molecular previamente descrito para el homólogo en ratón (Rankin *et al.*, 1992). Estas diferencias podrían deberse a las distintas condiciones en que fueron determinados los pesos moleculares. En este sentido, es importante mencionar que para algunas proteínas epididimarias de rata han sido descritos distintos pesos moleculares: 37 kDa (Garberi *et al.*, 1979), 32 kDa (Wong y Tsang, 1982), 27-32 kDa (Brooks, 1982; Brooks, 1981), 26-32 (Kirchhoff *et al.*, 1994). Sin embargo, la secuenciación de algunas de estas proteínas mostró que se trata de la misma molécula (Brooks *et al.*, 1986; Charest *et al.*, 1988; Xu y Hamilton, 1992).

Cuando se estudió el tipo de asociación a la membrana plasmática de la proteína DE del espermatozoide de ratón, los resultados obtenidos mostraron que si bien una gran proporción de la proteína se liberaba por tratamiento salino, quedaba en el espermatozoide una población resistente a 2 M NaCl y extraíble con Tritón X-100. Rankin y colaboradores (1992), sugieren que la proteína MEP 7, proteína homóloga a DE en ratón, sería una proteína débilmente unida al espermatozoide a juzgar por la gran proporción de la misma que se libera del espermatozoide por incubación con medios de baja fuerza iónica. Si bien estos autores muestran que una pequeña proporción de la proteína sólo es removible por tratamiento con detergentes o SDS, los mismos

concluyen que MEP 7 sería principalmente una proteína de recubrimiento, débilmente unida a la superficie del espermatozoide.

Los resultados obtenidos para la proteína DE de rata, indican que sería la población "fuertemente unida" la que participa en la interacción con el ovocito. Por lo tanto, el hecho de que los espermatozoides de ratón también posean una población de DE "fuertemente unida", sugerían que esta proteína podría participar en el proceso de fertilización. Por lo tanto, se estudió su participación en la etapa de fusión de gametas.

El paso siguiente consistió en estudiar la participación de DE en el proceso de fusión homóloga en el ratón. Si bien la presencia de la cola del espermatozoide incorporada al citoplasma es un criterio inequívoco de que la fusión ha ocurrido, en el ratón la cola del espermatozoide no puede ser detectada en el ooplasma (Horvath *et al.*, 1993) utilizándose, en este caso, otros parámetros como criterios de fertilización tales como la formación de dos pronúcleos, la liberación del corpúsculo polar o la primera división meiótica. En nuestro caso, la formación de dos pronúcleos resultó ser un criterio confiable ya que sólo un bajo porcentaje de los ovocitos presentaban formación espontánea de pronúcleos en ausencia de espermatozoides.

Los resultados muestran que el agregado de DE reduce significativamente el porcentaje de ovocitos de ratón fertilizados en forma dependiente de la concentración de DE utilizada. En el sistema de rata se observa un efecto inhibitorio con una concentración de DE de 20 µg/ml (Rochwerger *et al.*, 1992), mientras que en ratón se requieren 50 µg/ml para obtener una inhibición significativa. Esta diferencia en la concentración de DE necesaria para observar efecto inhibitorio podría deberse al hecho de que en el sistema de ratón se ha utilizado la proteína DE de rata. Los resultados obtenidos muestran que similarmente a lo que ocurre en la rata (Rochwerger *et al.*, 1992), el efecto de DE no se debe a un efecto sobre la etapa de unión de gametas.

Estos resultados no sólo estaban indicando la participación de DE en el proceso de fusión de gametas de ratón, sino además la existencia de sitios de unión para DE en la superficie del ovocito de esta especie. Con el fin de estudiar la localización de dichos sitios, los ovocitos de ratón fueron incubados con proteína DE pura y sometidos luego a IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Los resultados indicaron que, similarmente a lo observado en ovocitos de rata, los sitios para DE se localizan en forma de agregados en toda la superficie del ovocito con excepción de una región sin fluorescencia (área negativa). De acuerdo a los resultados obtenidos en ovocitos de rata, este área negativa sería coincidente con la región de la membrana que recubre el huso meiótico (Rochwerger *et al.*, 1992), por lo que los sitios de unión para DE en el ovocito de ratón también estarían localizados en la región fusogénica del ovocito.

Los resultados obtenidos indicarían que la proteína DE de ratón se comportaría, durante el proceso de fusión, en forma similar a la proteína DE de rata.

Teniendo en cuenta que los ovocitos de rata presentan sitios de unión para DE como así también que pueden fusionarse con espermatozoides de ratón (Hanada y Chang, 1972), resultaba interesante estudiar si la proteína DE presente en los espermatozoides de ratón estaba involucrada en esta fusión cruzada. Los resultados obtenidos muestran que el agregado de proteína DE durante la coincubación de los ovocitos de rata y los espermatozoides de ratón capacitados produce una inhibición significativa en el porcentaje de ovocitos penetrados que resultó similar a la observada en presencia de DE en el sistema homólogo de rata (78 % vs. 90%).

Dado que el proceso de fusión es precedido por la etapa de unión de las gametas resultaba necesario determinar si el efecto inhibitorio del agregado de DE sobre la fusión, se debía a un efecto sobre la etapa de unión. Los resultados obtenidos muestran que el efecto inhibitorio de DE ocurriría sobre la etapa de

fusión en sí, ya que no se observaron diferencias ni en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos ni en el número de espermatozoides unidos por ovocito. Estos resultados estarían indicando que tanto los sitios de unión para DE presentes en la superficie del ovocito de rata como la proteína DE de ratón participan en el proceso de fusión cruzada entre ambas especies.

Si bien la ocurrencia de la fusión cruzada entre ovocitos sin zona pellucida y espermatozoides de distintas especies había sido previamente descrita (Yanagimachi, 1984), el mecanismo molecular por el cual este proceso ocurre no había sido aún estudiado. Una posible explicación para la penetración de un espermatozoide en un ovocito heterólogo podría ser la existencia de moléculas en común entre ambas especies que participen en el proceso de fusión (Myles, 1993). Por lo tanto, los resultados obtenidos estarían brindando, por primera vez, evidencias sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fusión entre gametas de distintas especies.

Resulta interesante mencionar el hecho de que la fusión cruzada recíproca, entre ovocitos de ratón sin zona y espermatozoides de rata, no ocurre (Hanada y Chang, 1972). Dado que la proteína DE de rata puede unirse a los ovocitos de ratón, existe la posibilidad de que las diferencias que pudieran existir entre otras moléculas involucradas en esta interacción, fueran críticas para la ocurrencia de esta fusión cruzada.

En este punto se estudió si, al igual que ocurre en el espermatozoide de rata, la proteína DE de ratón se relocalizaba al segmento ecuatorial. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados con marca fluorescente. En todos los casos, la marca observada era de localización dorsal. Esto podría deberse a que la proteína DE se pierda durante el proceso de capacitación y/o reacción acrosomal. Otra posibilidad consistiría en que, por un problema de detectabilidad, no hubiéramos podido observar la proteína localizada en el

segmento ecuatorial. Esta segunda posibilidad podría deberse a: a) el anticuerpo utilizado es contra la proteína DE de rata b) si al igual que en la rata, el 70 % de la proteína DE se liberara del espermatozoide durante el proceso de capacitación, la cantidad de proteína disponible luego de la capacitación para ser reconocida por anti-DE disminuiría con respecto a los espermatozoides frescos. c) El segmento ecuatorial del espermatozoide de ratón es muy grande y, por lo tanto, las pocas moléculas disponibles estarían dispersas en un área muy grande dificultándose así el fenómeno de amplificación de la señal de la IIF. d) la proteína DE de ratón podría sufrir modificaciones durante el proceso de capacitación que lleven a la imposibilidad de ser detectada por anti-DE. El hecho de haber observado que la proteína DE de ratón participa en el proceso de fusión en dicha especie y que existen sitios de unión para DE en ovocitos de ratón, sugieren que se trataría de un problema de detectabilidad.

Una de las proteínas que participa en el proceso de fusión es la proteína PH-30, ahora denominada fertilina (Myles, 1993). Su participación en el proceso de fusión fue originalmente descrita en cobayo (Primakoff *et al.*, 1987) y, en los últimos años, su mecanismo de acción fue ampliamente estudiado: se trata de una glicoproteína compuesta por una subunidad  $\alpha$  (44 kDa) y otra  $\beta$  (60 kDa) (Blobel *et al.*, 1992). La subunidad  $\alpha$  posee un péptido hidrofóbico de fusión y la subunidad  $\beta$  posee un dominio de desintegrina esencial para su función (Myles *et al.*, 1994). Dado que las desintegrinas son proteínas originalmente descritas en veneno de serpientes y que poseen un dominio de unión a integrinas (dominio de desintegrinas), el mecanismo propuesto por el cual fertilina participaría en el proceso de fusión sería la unión de su dominio de desintegrina con alguna integrina presente en el ovocito y posterior inserción del péptido de fusión en la bicapa lipídica. Si bien se han descrito varias integrinas en la membrana del ovocito (Fusi *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1995a), aún no se ha demostrado que alguna de éstas sea el receptor para fertilina. Dado que el análisis de la secuencia de la proteína DE, tanto de rata como de ratón, muestra que éstas no poseen ningún dominio de desintegrina,

esto estaría indicando la existencia de un mecanismo molecular de fusión de gametas nuevo y alternativo al previamente propuesto de desintegrinas-integrinas.

En este sentido, recientemente ha sido descrita la presencia de fertilina en espermatozoides de ratón y su participación en el proceso de fusión de gametas (Evans *et al.*, 1995b). Estos resultados, conjuntamente con los resultados obtenidos en el presente trabajo demostrando la participación de proteína DE en el proceso de fusión en el ratón constituyen la primera evidencia de la coexistencia de al menos dos mecanismos distintos en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.

De los resultados obtenidos tanto en este trabajo como en el que se estudió la participación de fertilina en el proceso de fusión en ratón (Evans *et al.*, 1995b), podría concluirse que los eventos en los que participan ambas moléculas no constituirían caminos alternativos para la fusión de membranas, sino que, por el contrario, ambos serían eventos esenciales, ya que el bloqueo de al menos uno de ellos impide la ocurrencia de todo el proceso de fusión. El hecho de que existan sitios de unión para DE en la superficie del ovocito y que el análisis de la secuencia de DE mostrara que ésta no posee regiones hidrofóbicas que conformen un péptido de fusión, indicaría que DE participa en un evento de unión conducente a fusión. Por otro lado, el hecho de que fertilina posea tanto un dominio de desintegrina como un péptido de fusión capaz de intercalarse en la membrana del ovocito iniciando la fusión en sí, permite especular que en la cadena de eventos de unión que preceden a la fusión de las membranas, DE participaría en un paso anterior al mediado por fertilina.

En este sentido, cabe recordar que el sistema de fusión de membranas virus-célula huésped también involucra un evento de unión conducente a fusión y un posterior proceso de fusión (Lucy y Ahkong, 1986; Hoekstra, 1990). En este caso, dada la simplicidad de la membrana viral, el número de moléculas

involucradas es muy bajo, habiendo sólo una (White *et al.*, 1983), o a lo sumo, dos proteínas virales involucradas (Hoekstra, 1990). En cambio, y de acuerdo a los resultados obtenidos, la fusión espermatozoide-ovocito involucraría sucesivos eventos de interacción de moléculas complementarias presentes en ambas membranas que permitirían la posterior fusión de las mismas.

El último paso del presente trabajo consistió en investigar distintos aspectos del comportamiento de los sitios complementarios para DE presentes en la superficie del ovocito de rata. Dado que es sabido que la capacidad fusogénica de los ovocitos es adquirida durante la ovogénesis (Zuccotti *et al.*, 1991; Barros y Munoz, 1973; Niwa y Chang, 1975), quisimos estudiar si los sitios de unión para DE estaban involucrados en la adquisición de dicha capacidad. Para ello, en primer lugar, se estudió la presencia y localización de los sitios para DE en la superficie del ovocito durante la ovogénesis. Los resultados obtenidos indican que el oolema adquiere la capacidad de unir proteína DE durante la etapa de crecimiento, dado que los ovocitos en VG con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  ya presentan marca fluorescente cuando son incubados con proteína DE pura. Resultó interesante el hecho de que estos ovocitos presentaban un patrón de fluorescencia más uniforme, distinto al previamente descrito para ovocitos ovulados (Rochwerger *et al.*, 1992). El porcentaje de ovocitos que presentaban esta marcación "uniforme" disminuyó gradualmente durante la maduración, a expensas de un aumento en el porcentaje de ovocitos con distribución de la fluorescencia en forma de agregados. Se había demostrado previamente que este patrón se debe a la capacidad de la proteína DE de inducir la agregación de los sitios de unión en el oolema (Rochwerger *et al.*, 1992). El aumento en el grado de agregación observado, podría deberse a un aumento en la movilidad lateral de los sitios de unión para DE durante la ovogénesis. En este sentido es importante mencionar el trabajo realizado por Wolf y Ziomek (1983), quienes mostraron que si bien en los ovocitos fertilizados existe un aumento en la capacidad de los receptores para Con A de ser agregados por sus ligandos con respecto a los ovocitos ovulados, la difusibilidad de dichos receptores no se

modifica con la fertilización. Por lo tanto, existe la posibilidad de que otros mecanismos que no requieran la difusión, sean un factor importante para la agregación de los sitios de unión para DE.

Mientras que los ovocitos en crecimiento como así también aquellos recuperados hasta 9 hs. luego de la administración de hCG presentaban marcación fluorescente en toda su superficie, los ovocitos recuperados en horarios posteriores mostraron el área sin fluorescencia característica de los ovocitos ovulados (Rochwerger *et al.*, 1992). De acuerdo a las observaciones realizadas, a las 6 hs. luego de la administración de hCG el 60% de los ovocitos se encuentran en el estadio de metafase I de la meiosis. Dado que en este estadio, los ovocitos ya presentan un área libre de microvellosidades (Odor y Renninger, 1960; Ebensperger y Barros, 1984) podría concluirse que la aparición del área libre de microvellosidades ocurre antes que la del área negativa. Esto apoya la idea de que el mosaico observado en la distribución de los sitios de unión para DE no sería el simple reflejo de un fenómeno de amplificación de la superficie por el plegamiento de la membrana al formar las microvellosidades. Teniendo en cuenta que el área negativa corresponde a la región de la membrana por la que la fusión raramente ocurre (Rochwerger *et al.*, 1992), la distribución de los sitios para DE parece reflejar la habilidad del ovocito de localizar sus componentes de membrana en regiones específicas. El desarrollo de esta habilidad parece ser esencial para el funcionamiento de la membrana plasmática en numerosos sistemas (Johnson *et al.*, 1981; Staehelin, 1974; McNutt y Weinstein, 1973).

En este sentido, los estudios realizados con azida y citocalasina B sobre ovocitos ovulados mostraron que ninguno de los dos tratamientos produjo algún cambio sobre el tipo de marca observada, indicando que tanto la exclusión de los sitios para DE de la región libre de microvellosidades como así también la capacidad de dichos sitios de agregarse en presencia de DE, sería independiente de energía y de polimerización de microfilamentos de actina.



Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Johnson y colaboradores en los cuales la incubación de ovocitos de ratón con estos reactivos no altera la marcación en forma de agregados provocada por exposición a la lectina Con A. Sin embargo, estos autores observan que bajo estas condiciones se produce una alteración en el tamaño del área negativa. Por lo tanto, los cambios de distribución observados para los sitios de unión para DE durante la ovogénesis, no se deberían a los cambios en la distribución de filamentos de actina en la corteza de los ovocitos inmaduros (Longo, 1985).

Con el fin de estudiar si la aparición de los sitios de unión para DE estaba relacionada con la adquisición de capacidad fusogénica de la membrana de los ovocitos, se estudió, paralelamente, la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito en ovocitos recuperados en distintos estadios de crecimiento y maduración. Los resultados indicaron que, al igual que lo observado por Niwa y Chang (1975), los ovocitos no eran penetrables hasta que alcanzaban los primeros estadios de maduración, lo cual podía estar indicando que los ovocitos en crecimiento no poseerían la habilidad de fusionarse con el espermatozoide. Sin embargo, la presencia de espermatozoides firmemente unidos a estos ovocitos en crecimiento, nos llevó a presumir que la fusión podría haber ocurrido. Para confirmar esta posibilidad, se desarrolló la técnica de transferencia de colorante Hoechst 33342 (Stewart-Savage y Bavister, 1988; Llanos *et al.*, 1993; Hinkley *et al.*, 1986) para ovocitos de rata, dado que esta técnica permite la detección de la fusión del oolema con la membrana del espermatozoide en el momento en que ésta ocurre. Los resultados obtenidos utilizando este método mostraron que los ovocitos en crecimiento con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$  eran capaces de fusionarse con el espermatozoide. La adquisición de la fusibilidad de membrana en estos ovocitos no se debió a un aumento en la capacidad de unión del oolema, dado que en los ovocitos con un diámetro menor a 50  $\mu\text{m}$ , que no mostraban capacidad de fusión, se observaron niveles altos tanto en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos como del número de espermatozoides unidos por ovocito. Estos resultados

están de acuerdo con trabajos previos en los que se demuestra que los ovocitos de hámster y ratón adquieren la capacidad de fusión durante la etapa de crecimiento (Zuccotti *et al.*, 1991; Zuccotti *et al.*, 1994).

Dado que los ovocitos en crecimiento ya poseen la capacidad de fusionarse con el espermatozoide, la falta de penetración observada en estos ovocitos podría estar reflejando una incapacidad de dichos ovocitos de incorporar al citoplasma la cabeza del espermatozoide. Por lo tanto, el ovocito de rata adquiriría la habilidad de fusionarse con la membrana del espermatozoide previo a la habilidad de incorporar su cabeza al ooplasma. Esta capacidad de ser penetrados estaría más específicamente relacionada con la ruptura de la VG ya que en ningún caso fueron observados ovocitos penetrados con VG intacta. Cabe recordar que el 2% de ovocitos penetrados observados en el estadio de crecimiento (diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$ , Tabla 10) correspondió a ovocitos en los que al momento de la observación no se les detectó la presencia de VG. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Barros y Muñoz (1973), quienes demuestran que para los ovocitos de hámster habría una relación entre la ruptura de la VG y la posibilidad del ovocito de provocar la decondensación de la cabeza del espermatozoide.

Resulta interesante destacar que en los experimentos de transferencia de colorante, se utilizaron como control ovocitos ovulados e inseminados con espermatozoides en presencia de DE. Al utilizar esta técnica se observó una inhibición del porcentaje de ovocitos fusionados (83 %) similar a la previamente descrita utilizando el método de penetración (91 %) (Rochwerger *et al.*, 1992), lo cual estaría confirmando que la inhibición observada originalmente no se debería a la participación de DE en algún evento posterior a la fusión tales como la incorporación o decondensación de la cabeza del espermatozoide.

Hasta aquí, los resultados obtenidos indicaban una correlación entre la adquisición de fusibilidad del oolema y la aparición de sitios de unión para DE

en la superficie del ovocito, siendo ambos detectables en ovocitos en crecimiento con un diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, ¿eran estos sitios responsables de la fusibilidad de la membrana del ovocito? Para responder esta pregunta, se evaluó la funcionalidad de los sitios de unión para DE coincubando ovocitos en crecimiento (diámetro mayor a 50  $\mu\text{m}$ ) y espermatozoides en presencia de proteína DE purificada. La inhibición obtenida en el porcentaje de ovocitos en crecimiento fusionados bajo estas condiciones, confirmaron que los sitios para DE estaban involucrados en la fusión de los ovocitos en crecimiento. El hecho de que los ovocitos en crecimiento que presentaban marcación uniforme también presentaran capacidad de fusión, estaba indicando que la presencia de los sitios de unión para DE, independientemente de su distribución en la superficie del ovocito (uniforme o en agregados), sería esencial para el proceso de fusión con el espermatozoide.

Está ampliamente aceptado que los ovocitos que han completado su crecimiento con VG intacta son capaces de fusionarse con el ovocito (Usui y Yanagimachi, 1976; Mahi y Yanagimachi, 1976; Niwa y Chang, 1975; Iwamatsu y Chang, 1972; Cuasnicu y Bedford, 1991). Sin embargo, hasta el presente aún no se conoce el mecanismo por el cual la membrana del ovocito adquiere dicha capacidad. Zuccotti y colaboradores (1991) observaron una correlación entre la habilidad del oolema de unir la lectina concanavalina A (Con A) y la fusibilidad en ovocitos de hámster, sugiriendo que la aparición de dichos sitios podía mediar la adquisición de capacidad de fusión. Sin embargo, el hecho de que al enmascarar los sitios para Con A no se previno la fusión espermatozoide-ovocito, descartó aquella posibilidad. En este sentido, nuestras observaciones indicando que la adquisición de fusogenicidad del ovocito de rata involucra la aparición de los sitios de unión para DE provee información novedosa sobre el mecanismo por el cual el ovocito de mamífero se hace competente para fusionarse con el espermatozoide durante la ovogénesis.

Una vez estudiada la aparición de los sitios para DE durante la ovogénesis y su participación en la adquisición de capacidad fertilizante, resultaba interesante estudiar el destino de dichos sitios luego de la fertilización. En forma paralela se estudió la capacidad de fusión de los ovocitos fertilizados y embriones de dos células. Los resultados obtenidos muestran que la totalidad de los ovocitos fertilizados en el estadio de dos pronúcleos presentan sitios para DE localizados en forma de agregados en toda la superficie del ovocito, no habiéndose detectado en ningún caso la presencia del área negativa característica de los ovocitos ovulados. Como ya ha sido mencionado, este área negativa corresponde a la región de la membrana que recubre el huso meiótico (Rochwerger *et al.*, 1992). Dado que esta región de la membrana pasa a formar la membrana del segundo corpúsculo polar, el cual se libera luego de la fertilización (Yanagimachi, 1994), era de esperar que el área negativa desapareciera en los ovocitos fertilizados.

Los sitios de unión para DE se disponen en forma de agregados en la superficie del ovocito fertilizado. Es sabido que luego de la fertilización se produce el agregado de nueva membrana al ovocito por la incorporación de la membrana del espermatozoide (Gaunt, 1983) y la liberación de los gránulos corticales (Gulyas, 1980). Los resultados obtenidos indican que, a pesar de ello, la capacidad de los sitios para DE de ser agregados por DE no se ve alterada en estos ovocitos. Estos resultados difieren de lo observado para los sitios que unen Con A en ovocitos de ratón, donde se observa que dichos componentes poseen una mayor capacidad de ser agregados por Con A en ovocitos fertilizados respecto a ovocitos no fertilizados (Johnson y Calarco, 1980; Johnson *et al.*, 1975). Esta diferencia podría deberse a que la Con A es un marcador general de proteínas (Wolf y Ziomek, 1983), por lo que el aumento de agregación observado podría ser la resultante del aumento de la movilidad de alguno/s de los distintos componentes reconocidos por esta lectina en la membrana. Mientras que, en el caso de la unión de DE a sus sitios, la

agregación observada se debe a la movilidad en la membrana de un sólo componente.

Cuando se examinó la presencia de sitios para DE en embriones de dos células, se observó que sólo el 50% de los mismos presentaban marca fluorescente en su superficie. En la mayoría de los embriones marcados, la fluorescencia se disponía en forma uniforme en toda la superficie de los blastómeros. En algunos casos se observaron embriones que presentaban un blastómero marcado y otro sin marca. La falta de marcación fluorescente en los embriones de dos células podría deberse a que luego de la primera división meiótica se produzca una importante pérdida de sitios para DE de la superficie o bien, que ocurra una modificación de dichos sitios que alteren su capacidad de unir proteína DE. En este sentido, la pérdida y modificación de componentes de membrana luego de la fertilización ha sido descrita por Boldt y colaboradores (1989) quienes demostraron que una proteína de 94 kDa involucrada en el proceso de fusión desaparece de los ovocitos luego de la fertilización.

Paralelamente, se estudió la capacidad fusogénica de los ovocitos fertilizados y embriones. Los resultados obtenidos indican que la membrana plasmática de los ovocitos de rata sufren una importante disminución de su capacidad de fusión luego de la fertilización, que se pierde totalmente en el estadio de dos células. La capacidad fusogénica de ovocitos fertilizados y embriones ha sido estudiada en otras especies. En el caso del ratón, existen controversias respecto al estadio en el cual los ovocitos/embriones pierden su capacidad de fusión. Horvath y colaboradores (1993), sugieren que los ovocitos de ratón en estadio de dos pronúcleos no se fusionan con espermatozoides cuando son reinseminados, mientras que Zuccotti y colaboradores (1994) sostienen que los mismos son fusogénicos hasta el estadio de dos células. A pesar de las diferencias, en ambos casos la pérdida de la capacidad de fusión se produciría en los estadios tempranos, en forma similar a la observada en la rata. Por otro lado, para el caso del hámster, Zuccotti y colaboradores (1991) muestran que

los embriones poseen una menor capacidad de fusión con respecto a los ovocitos ovulados, que se mantiene durante los primeros estadios embrionarios, perdiéndose por completo recién en el estadio de ocho células. El hecho de que en el hámster la reacción de zona sea el mecanismo primario para el bloqueo de polispermia, mientras que en la rata y el ratón tanto la reacción de zona como el bloqueo a nivel de membrana plasmática sean relevantes en dicho mecanismo (Yanagimachi, 1994), podría justificar las diferencias temporales observadas en la pérdida de capacidad de fusión en estas especies.

Al comparar los resultados de localización de sitios para DE y de capacidad de fusión se observa que la totalidad de los ovocitos fertilizados presentan sitios para DE, mientras que sólo el 20% de los mismos posee capacidad de fusión. Así mismo, si bien el 50% de los embriones de dos células presentan sitios para DE, en ningún caso se observaron embriones fusionados. En su conjunto, estos resultados estarían indicando que si bien se observan cambios en la presencia y localización de los sitios para DE durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, éstos no serían suficientes para justificar la abrupta caída en la capacidad de fusión de la membrana del ovocito luego de la fertilización de la cual se deduce que la modificación de otros componentes de membrana sería relevante para la pérdida de la capacidad fusogénica.

La marcación fluorescente observada en los ovocitos en presencia de DE es similar a la observada por otros autores en ovocitos de distintas especies incubados con Con A (Zuccotti *et al.*, 1991; Zuccotti *et al.*, 1994). En estos trabajos, los autores describen para ovocitos ovulados la presencia de una marcación en forma de agregados como así también la existencia de un área negativa. Como ya fue mencionado anteriormente, Zuccotti y colaboradores (1991), trabajando con ovocitos de hamster en distintos estadios de crecimiento y maduración, observaron que si bien la capacidad del oolema de unir Con A existe en ovocitos muy pequeños, ésta aumenta en proporción al tamaño del ovocito. Estos resultados, conjuntamente con nuestras observaciones,

sugerirían que la proteína DE podría estar actuando como una lectina, reconociendo oligosacáridos en el oolema. Si bien la naturaleza química de los sitios complementarios para DE debe ser estudiada, las numerosas evidencias de la existencia de proteínas y carbohidratos complementarios involucrados en el proceso de reconocimiento espermatozoide-ovocito (Glabe y Vacquier, 1978; Lopez *et al.*, 1985; O'Rand *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1988; Brandelli *et al.*, 1994) apoyarían esta hipótesis. Es labor de futuros estudios la identificación y aislamiento de los sitios de unión para DE.

Teniendo en cuenta que ha sido postulado que la activación del ovocito podría ser desencadenada por la unión de algún componente del espermatozoide a su receptor en el ovocito (Ohlendieck y Lennarz, 1995), existía la posibilidad de que la interacción de DE con su sitio de unión provocara la activación del ovocito. Tal como se mencionara en la Introducción, el proceso de activación consiste en el reinicio de la meiosis y en la activación de los mecanismos de bloqueo de la poliespermia. Estos procesos son mediados por un aumento del nivel de calcio intracelulares provocado por la liberación del mismo de los reservorios intracelulares. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que ovocitos incubados con proteína DE y luego lavados, presentan una capacidad de ser penetrados por espermatozoides similar a los ovocitos no tratados (Rochwerger *et al.*, 1992), indicando que, al menos en las condiciones ensayadas, la incubación con DE no desencadenaría los mecanismos de prevención de polispermia. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos recientemente y realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. K. Swann (St George's Hospital, Londres, Inglaterra) indican que el agregado de proteína DE a ovocitos de ratón no produciría ningún aumento en los niveles de calcio intracelulares. Estas evidencias sugerirían que la unión de DE a su sitio de unión no induciría la activación del ovocito. Tal como ha sido mostrado en los Resultados, la proteína DE presenta homología con la proteína helothermina, la cual es un inhibidor de los receptores rianodínicos presentes en la membrana de los reservorios intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Dado que la unión de un ligando a su

receptor puede desencadenar su internalización, no puede descartarse la posibilidad de que si DE se internalizara luego de la unión a su sitio complementario, cumpliera alguna función en la activación del ovocito regulando la liberación de calcio que se produce a través de los mencionados receptores.

Recientemente dos laboratorios independientes han descrito una proteína epididimaria humana a la que denominaron ARP y CRISP1, la cual presenta un 40% de homología con la proteína DE de rata (Kratzschmar *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1996). Hayashi y colaboradores (1996) muestran, mediante la utilización de un anticuerpo policlonal, que ARP es una glicoproteína, que se secreta al lumen epididimario y que se asocia a la región postacrosomal del espermatozoide humano eyaculado. Teniendo en cuenta la similitud en las características de ARP y DE como así también su homología, estos autores postulan un posible papel de ARP en el proceso de fusión. Kratzschmar y colaboradores (1996), por su parte, postulan que dado que gran cantidad de la proteína se libera de los espermatozoides por tratamiento con baja fuerza iónica, la proteína estaría asociada de una forma muy débil a la membrana del espermatozoide descartando así alguna función de esta proteína en el proceso de interacción de gametas. Dado que resultaba muy interesante establecer si ARP cumple la misma función biológica que DE, se inició una colaboración con el Dr. Kasahara (Universidad de Hokkaido, Japón), con el fin de realizar los ensayos necesarios para estudiar esta posibilidad.

El primer paso consistió evaluar el tipo de unión de ARP a los espermatozoides humanos. Para ello, los mismos fueron extraídos secuencialmente con NaCl y Tritón X-100. Los extractos fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra ARP. Los resultados obtenidos indicaron que, a diferencia de lo hallado por Kratzschmar y colaboradores, en los espermatozoides humanos existen dos poblaciones de ARP. Teniendo en cuenta que tanto en la rata como en el ratón, es la población de DE



“fuertemente unida” la que participaría en el proceso de fusión de gametas, el hecho de que exista una población de ARP “fuertemente unida” al espermatozoide humano, favorece la hipótesis de que ARP sea un homólogo funcional de DE. En este momento se están realizando en nuestro laboratorio los estudios necesarios para establecer tanto la participación de ARP en el proceso de fusión como así también la presencia complementarios para ARP en la membrana del ovocito humano.

En este sentido, han sido descrito distintos casos en que espermatozoides de pacientes infértiles son capaces de atravesar la zona pellucida en ensayos de fertilización *in vitro* y, sin embargo, son incapaces de fusionarse con el oolema (Tesarik y Thébault, 1993). Esta falla podría atribuirse a la ausencia o modificación de las moléculas que participan en dicho proceso. Por lo tanto, la identificación de las proteínas involucradas en el proceso de fusión de gametas en el humano, podría favorecer tanto el desarrollo de nuevos métodos que permitan el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad sin causa aparente como el desarrollo de métodos para la regulación de la fertilidad.

CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

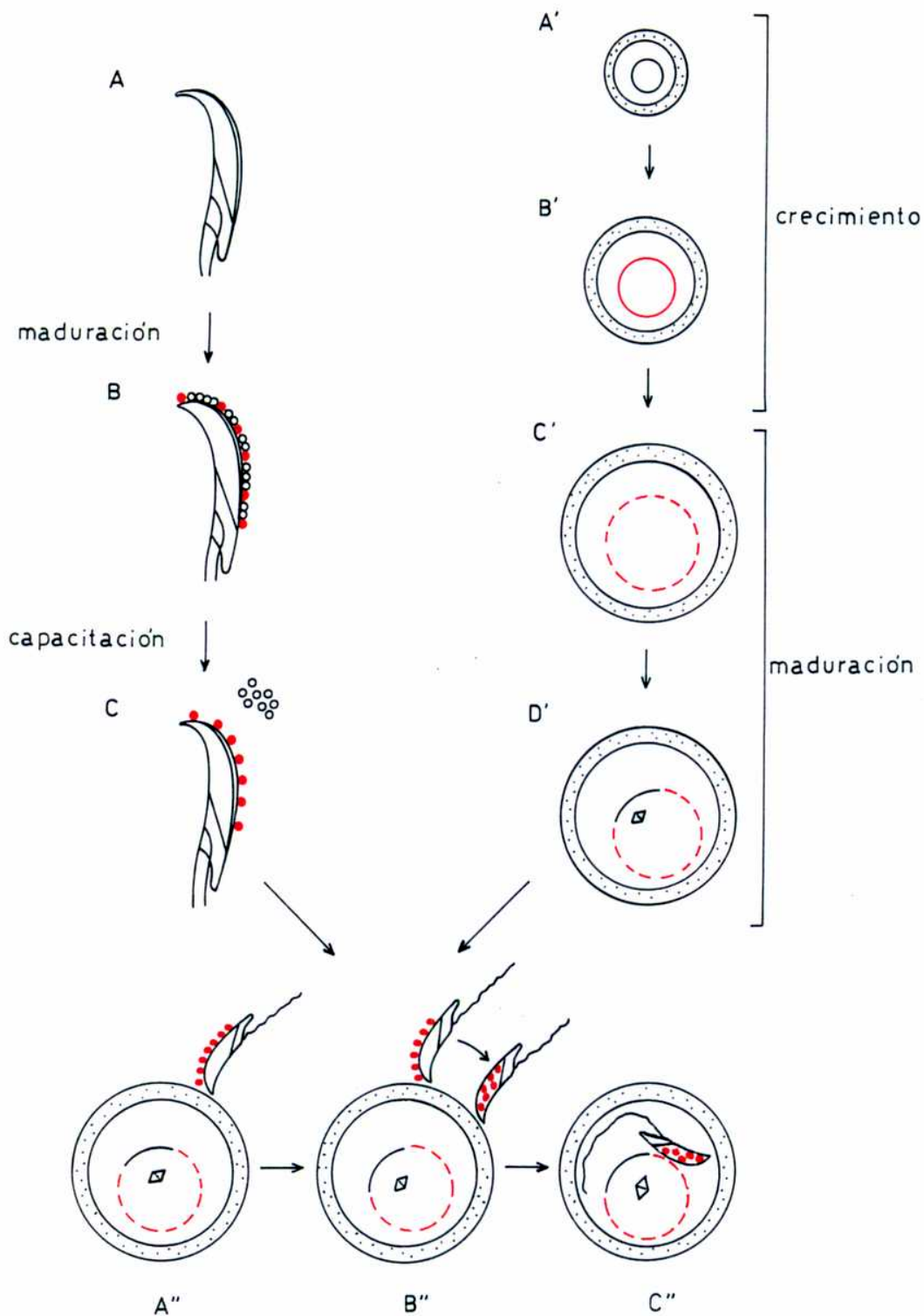
El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar los mecanismos que involucran la participación de DE en el proceso de interacción de gametas. El conjunto de los resultados obtenidos permite la elaboración del modelo que se muestra en la Figura III:

Tanto el espermatozoide como el ovocito sufren distintos procesos que los preparan para su posterior interacción. En el caso del espermatozoide, la proteína DE se asociaría a la cabeza de los espermatozoides (A) con dos afinidades distintas durante la maduración epididimaria (B). En el tracto femenino, y a medida que ocurre el proceso de capacitación, la población "débilmente unida" se liberaría de la superficie de los espermatozoides mientras que la población "fuertemente unida", sería la que permanece sobre el espermatozoide capacitado (C).

En el ovocito, por su parte, los sitios de unión para DE aparecerían durante la etapa de crecimiento (A', B'). Estos sitios presentan distintas distribuciones durante las distintas etapas de la ovogénesis (B', C') hasta alcanzar la distribución en forma de agregados observada en los ovocitos ovulados (D'). La aparición de dichos sitios estaría involucrada en la adquisición de la capacidad de fusión que ocurre durante la ovogénesis.

Cuando un espermatozoide capacitado se encuentra con el ovocito, la proteína DE "fuertemente unida" localizada en la región dorsal del acrosoma, participaría en la etapa de unión a ZP (A''). Una vez unidos, la ZP induciría la redistribución al segmento ecuatorial (B''), localización en la cual la proteína DE participaría en el proceso de fusión uniéndose a los sitios complementarios localizados en la superficie del ovocito (C'').

En resumen, los resultados aquí presentados constituyen un nuevo aporte hacia la comprensión de los mecanismos involucrados en uno de los procesos celulares esenciales como lo es la interacción entre un espermatozoide y un ovocito. Más aún, dado que los procesos de miogénesis, infección viral, tráfico de organelas y endo- y exocitosis también involucran un evento de fusión de membranas, la información obtenida en este trabajo podría contribuir a una mayor comprensión de muchos de los complejos procesos celulares citados anteriormente.



**Figura III. Modelo explicativo del comportamiento de DE en el espermatozoide y de sus sitios de unión en el ovocito durante las distintas etapas que conllevan a la interacción de gametas.**

(•) población de DE "fuertemente unida"; (o) población de DE "débilmente unida"; (- - -) sitios de unión para DE

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- Aarons, D., Battle, T., Boettger-Tong, H., y Poirier, G.R. (1992) Role of monoclonal antibody J-23 in inducing acrosome reactions in capacitated mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 96, 49-59.
- Adams, C.E. y Chang, M.C. (1962) Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.* 151, 159-165.
- Adams, E. y Hertig, A. (1964) Studies on guinea pig oocytes.1. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. *J. Cell Biol.* 21, 397-427.
- Allison, A.C. y Hartree, E.F. (1970) Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 21, 501-515.
- Almeida, E.A.C., Huovila, A.-P.J., Sutherland, A.E., Stephens, L.E., Calarco, P.G., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D.G., y White, J.M. (1995) Mouse egg integrin  $\alpha 6\beta 1$  functions as a sperm receptor. *Cell* 81, 1095-1104.
- Alvarez, N.J., Lee, M.A., Iozzo, R.V., Lopez, I., Touchstone, J.C., y Storey, B.T. (1988) Ethanol accelerates acrosome loss in human spermatozoa. *J. Androl.* 9, 357-366.
- Anderson, E. y Albertini, E. (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* 71, 680-686.
- Araki, Y., Orgebin-Crist, M.C., y Tulsiani, D.R.P. (1992) Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol. Reprod.* 46, 912-919.
- Arts, E.G.J.M., Kuiken, J., Jager, S., y Hoekstra, D. (1993) Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa—Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217, 1001-1009.
- Austin, C.R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326
- Austin, C.R. (1960) Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 3, 310-311.
- Austin, C.R. (1961) The mammalian egg. In: Edited by Thomas, C.C. Springfield Ill.
- Austin, C.R. (1970) Ageing and reproduction. Post-ovulatory deterioration of the egg. *J. Reprod. Fertil. (suppl.)* 12, 39-53.
- Austin, C.R. (1982) The egg. In: *Reproduction in Mammals*, 46-62. Edited by Austin, C.R. and Short, R.V. Cambridge University Press.
- Austin, C.R. (1985) Sperm maturation in the male and female genital tracts. In: *Biology of Fertilization, Vol.2*, 121-155. Edited by Metz, C.B. and Monroy, A. New York, Academic Press.
- Baker, T.S. (1982) Oogenesis and ovulation. In: *Reproduction in mammals*. 17-45. Edited by Austin, C.R. and Short, R.V. Cambridge, Cambridge University Press.

- Barros, C. y Berrios, M. (1977) Is the activated spermatozoa really capacitated? *J. Exp. Zool.* 201, 65-72.
- Barros, C. y Muñoz, G. (1973) Sperm-egg interaction in immature hamster oocytes. *J. Exp. Zool.* 186, 73-78.
- Bavister, B.D. (1989) A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. *Gam. Res.* 23, 139-158.
- Bavister, B.D. y Andrews, J.C. (1988) A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media. *J. in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 5, 67-75.
- Bavister, B.D., Rogers, B.J., y Yanagimachi, R. (1978) The effects of cauda epididymal plasma on the motility and acrosome reaction of hamster and guinea pig spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 19, 358-363.
- Bearer, E.L. y Friend, D.S. (1982) Modifications of anionic lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J. Cell Biol.* 92, 604-615.
- Bedford, J.M. (1967) Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 166, 271-282.
- Bedford, J.M. (1969) Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 2, 128-158.
- Bedford, J.M. (1970) Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 2, 128-158.
- Bedford, J.M. (1979) Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In: *The Spermatozoon*. 7-21. Edited by Fawcett, D.W. and Bedford, J.M. Baltimore, Urban and Schwarzenberg.
- Bedford, J.M. (1983) Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28, 108-120.
- Bedford, J.M. y Cooper, G.W. (1978) Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. In: *Membrane surface reviews (Membrane fusion)*. 65-125. Edited by Poste, G. and Nicolson, G.L. Amsterdam, North-Holland.
- Bedford, J.M. y Yanagimachi, R. (1992) Initiation of sperm motility after mating in the rat and hamster. *J. Androl.* 13, 444-449.
- Bellvé, A.R. y O'Brien, D.A. (1983) The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. In: *Mechanisms and control of animal fertilization*. 55-137. Edited by Hartman, J. New York, Academic Press.
- Ben-Yosef, D., Dekel, N., Phillips, D.M., y Shalgi, R. (1993) Fertilization and early development of rat oocytes induced to mature by forskolin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 96, 61-68.
- Bercegeay, S., Jean, M., Lucas, H., y Barriere, P. (1995) Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 355-359.
- Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., y Hedrick, J.L. (1988) Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.* 40, 525-530.



- Berrios, M. y Bedford, J.M. (1979) Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *J. Cell Sci.* 39, 1-12.
- Bérubé, B., Lefièvre, L., Coutu, L., y Sullivan, R. (1996) Regulation of the epididymal synthesis of P26h, a hamster sperm protein. *J. Androl.* 17, 104-110.
- Blackmore, P.F. (1993) Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate  $Ca^{2+}$  influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell. Signal.* 5, 531-538.
- Blanchette, E. (1961) A study of the fine structure of the rabbit primary oocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 349-363.
- Blaquier, J.A., Cameo, M.S., y Burgos, M.H. (1973) The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology* 90, 839-842.
- Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202.
- Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1983) Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317-324.
- Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1986) Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.* 102, 1363-1371.
- Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1990) Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5563-5567.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., y White, J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature.* 356, 248-252.
- Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B., Lee, T., y Poirier, G.R. (1992) Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding. *Biol. Reprod.* 47, 716-722.
- Boldt, J., Gunter, L.E., y Howe, A.M. (1989) Characterization of cell surface polypeptides of unfertilized, fertilized, and protease-treated zona-free mouse eggs. *Gam. Res.* 23, 91-101.
- Boldt, J., Howe, A.M., y Preble, J. (1988) Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biol. Reprod.* 39, 19-27.
- Bookbinder, L.H., Cheng, A., y Bleil, J.D. (1995) Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 269, 86-89.
- Boué, F., Blais, J., y Sullivan, R. (1996) Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54, 1009-1017.
- Brandelli, A., Miranda, P.V., y Tezon, J.G. (1994) Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: Possible role of *N*-acetylglucosaminidase. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1220, 299-304.
- Bronson, R.A. y Fusi, F.M. (1990a) Sperm-oolemmal interaction: role of Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion peptide. *Fertil. Steril.* 54, 527-529.

- Bronson, R.A. y Fusi, F.M. (1990b) Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* 43, 1019-1025.
- Brooks, D.E. (1981) Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol. Rev.* 61, 515-555.
- Brooks, D.E. (1982) Purification of rat epididymal proteins "D" and "E", demonstration of shared immunological determinants, and identification of regional synthesis and secretion. *Int. J. Androl.* 5, 513-524.
- Brooks, D.E. y Higgins, S.J. (1980) Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 59, 363-375.
- Brooks, D.E., Means, A.R., Wright, E.J., Singh, S.P., y Tiver, K.K. (1986) Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur. J. Biochem.* 161, 13-18.
- Brown, C.R., von Glós, K.I., y Jones, R. (1983) Changes in plasma membrane glycoproteins on rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Cell Biol.* 96, 256-264.
- Burger, K.N. y Verkleij, A.J. (1990) Membrane fusion. *Experientia* 46, 631-644.
- Byskov, A. (1982) Germ cells and fertilization. In: *Reproduction in Mammals*, 1-16. Edited by Austin, C.R. and Short, R.V. Cambridge, Cambridge University Press.
- Calarco, P.G., Donahue, R., y Szöllösi, D. (1972) Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* 10, 369-385.
- Calvete, J.J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E., y Topfer-Petersen, E. (1994) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 411-426.
- Calvete, J.J., Solís, D., Sanz, L., Díaz-Mauriño, T., Schäfer, W., Mann, K., y Töpfer-Petersen, E. (1993) Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur. J. Biochem.* 218, 719-725.
- Cameo, M.S. y Blaquier, J.A. (1976) Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocr.* 69, 317-324.
- Cameo, M.S., Gonzalez Echeverria, M.F., Blaquier, J.A., y Burgos, M.H. (1986) Immunochemical localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa: Its fate after induced acrosome reaction. *Gam. Res.* 15, 247-258.
- Capote, C., Perez, C., De Ioannes, A.E., y Barros, C. (1989) Papel de la acrosina en la fecundación. *Arch. Bio. Med. Exp.* 22, R239
- Cardullo, R.A. y Baltz, J.M. (1991) Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil. Cytoskeleton* 19, 180-188.
- Chang, M.C. (1952) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.
- Chang, M.C. (1957) A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 197, 258-259.

Chang, M.C. (1958) Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. *Endocrinology* 63, 619-623.

Charest, N.J., Joseph, D.R., Wilson, E.M., y French, F.S. (1988) Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence homology with metalloproteins. *Mol. Endo.* 2, 999-1004.

Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., y Bleil, J.D. (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: Characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J. Cell Biol.* 125, 867-878.

Cherr, G.N., Drobnis, E.Z., y Katz, D.F. (1988) Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.* 246, 81-93.

Cherr, G.N., Lambert, H., Meizel, S., y Katz, D.F. (1986) *In vitro* studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zona. *Dev. Biol.* 114, 119-131.

Cherr, G.N., Meyers, S.A., Yudin, A.I., Vandevoort, C.A., Myles, D.G., Primakoff, P., y Overstreet, J.W. (1996) The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: Identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev. Biol.* 175, 142-153.

Chiquoine, A. (1960) The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *Am. J. Anat.* 106, 149-170.

Chouinard, L. (1971) A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J. Cell Sci.* 9, 637-663.

Chouinard, L. (1975) A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J. Cell Sci.* 17, 589-615.

Cohen, D.J. (1992) Redistribución de una proteína del espermatozoide y su participación en el proceso de fusión con el ovocito. 1-69. (Seminario de Licenciatura, FCEN, UBA)

Conover, J.C. y Gwatkin, R.B.L. (1988) Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion. *J. Reprod. Fertil.* 82, 681-690.

Cornwall, G.A., Vreeburg, J.T.M., Holland, M.K., y Orgebin-Crist, M.C. (1990) Interactions of labeled epididymal secretory proteins with spermatozoa after injections of <sup>35</sup>S-methionine in the mouse. *Biol. Reprod.* 43, 121-129.

Coronel, C.E. y Lardy, H.A. (1992) Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 74-80.

Courtens, J.L., Courot, M., y Fléchon, J.E. (1976) The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 57, 54-64.

Cowan, A.E. y Myles, D.G. (1993) Biogenesis of surface domains during spermiogenesis in the guinea pig. *Dev. Biol.* 155, 124-133.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., y Hanson, F.W. (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gam. Res.* 15, 213-226.

- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., y Hanson, F.W. (1988) Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.* 38, 235-244.
- Cross, N.L. y Watson, S.K. (1994) Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology* 42, 89-98.
- Cuasnicu, P.S. y Bedford, J.M. (1991) Hamster oocyte penetrability during preovulatory maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 72-76.
- Cuasnicu, P.S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., y Blaquier, J.A. (1984a) Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 70, 541-547.
- Cuasnicu, P.S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., y Blaquier, J.A. (1984b) Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *J. Reprod. Fertil.* 72, 467-471.
- Cuasnicu, P.S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., Piñeiro, L., y Blaquier, J.A. (1984c) Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 71, 427-431.
- Cuasnicú, P.S., Conesa, D., y Rochwerger, L. (1990) Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. In: *Gamete interaction. Prospects for immunocontraception*. 143-153. Edited by Alexander, N.J., Griffin, D., Spieler, J.M., and Waites, G.M.H. New York, Wiley-Liss.
- Cummins, J.M. y Yanagimachi, R. (1982) Sperm-egg ratios and the site of acrosome reaction during *in vivo* fertilization in the hamster. *Gam. Res.* 5, 239-256.
- Cummins, J.M. y Yanagimachi, R. (1986) Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated *in vitro* in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gam. Res.* 15, 187-212.
- Dacheux, J.L. y Paquignon, M. (1980) Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 20, 1085-1099.
- Davis, B.K., Byrne, R., y Hangund, B. (1979) Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta* 558, 257-266.
- De Smedt, V., Crozet, N., y Gall, L. (1994) Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* 269, 128-139.
- Dekel, N., Kraicer, P.F., Phillips, D.M., Sanchez, R.S., y Segal, S.J. (1978) Cellular associations in the rat oocyte-cumulus cell complex: Morphology and ovulatory changes. *Gam. Res.* 1, 47-57.
- Dickman, Z. (1963) Denudation of the rabbit egg: time-sequence and mechanism. *Am. J. Anat.* 113, 603-608.
- Ducibella, T. (1991) Mammalian egg cortical granules and cortical reaction. In: *Elements of mammalian fertilization. Volume 1. Basic concepts*. 205-231. Edited by Wassarman, P.M. Boca Raton, Florida. CRC Press.
- Ducibella, T., Duffy, P., y Buetow, J. (1994) Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol. Reprod.* 50, 467-473.

- Ducibella, T., Rangarajan, S., y Anderson, E. (1988) The development of mouse oocyte cortical granules competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Dev. Biol.* 130, 789-792.
- Dunbar, B., Wardrip, N.J., y Hedrick, J.L. (1980) Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida of porcine oocytes. *Biochemistry* 19, 356-365.
- Dyson, A.L. y Orgebin-Crist, M.C. (1973) Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93, 391-395.
- Ebensperger, C. y Barros, C. (1984) Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. *Gam. Res.* 9, 387-397.
- Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschar, J., Haendler, B., Habenicht, U.F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W.D., y Donner, P. (1995) Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 157-172.
- Eccleston, E.D., White, T.W., Howard, J.B., y Hamilton, D.W. (1994) Characterization of a cell surface glycoprotein associated with maturation of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 110-119.
- Eddy, E.M. y O'Brien, D.A. (1994) The spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction*. 2nd Ed., 29-78. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. New York, Raven Press.
- Eppig, J.J. (1982) The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev. Biol.* 89, 268-272.
- Evans, J.P., Schultz, R.M., y Kopf, G.S. (1995a) Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 211-220.
- Evans, J.P., Schultz, R.M., y Kopf, G.S. (1995b) Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: Analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin)  $\beta$ . *J. Cell Sci.* 108, 3267-3278.
- Fang, K.S., Vitale, M., Fehlner, P., y King, T.P. (1988) cDNA cloning and primary structure of a white-face homot venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 247-265.
- Faye, J.C., Duguet, L., Mazzula, M., y Bayard, F. (1980) Purification, radioimmunoassay, and immunohistochemical localization of a glycoprotein produced by the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 23, 423-432.
- Fellous, M., Gachelin, G., Buc-Caron, M.H., Dubois, P., y Jacob, F. (1974) Similar location of an early embryonic antigen on mouse and human spermatozoa. *Dev. Biol.* 41, 331-337.
- Feutcher, F.A., Vernon, R.B., y Eddy, E.M. (1981) Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: Topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biol. Reprod.* 24, 1099-1110.
- Florman, H.M. y First, N.L. (1988) The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev. Biol.* 128, 453-463.
- Florman, H.M. y Storey, B.T. (1982) Mouse gamete interactions. The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Dev. Biol.* 91, 121-130.

Foster, J.A. y Gerton, G.L. (1996) Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 221-229.

Fouquet, J.-P., Valentin, A., y Kann, M.-L. (1992) Perinuclear cytoskeleton of acrosome-less spermatids in the blind sterile mutant mouse. *Tissue Cell* 24, 655-665.

Fournier-Delpech, S., Hamamah, S., Tananis-Anthony, C., Courot, M., y Orgebin-Crist, M.C. (1984) Hormonal regulation of zona-binding ability and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Gam. Res.* 9, 21-30.

Fraser, L.R. (1984) Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J. Reprod. Fertil.* 72, 373-384.

Fraser, L.R. y Drury, L.M. (1975) The relationship between sperm concentration and fertilization *in vitro* of mouse eggs. *Biol. Reprod.* 13, 513-518.

Fraser, L.R., Harrison, R.A.P., y Herod, J.E. (1990) Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 89, 135-148.

Friend, D.S. y Fawcett, D.W. (1974) Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 63, 641-664.

Fusi, F.M., Vignali, M., Busacca, M., y Bronson, R.A. (1992) Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 215-222.

Gaddum-Rosse, P. (1985) Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am. J. Anat.* 174, 347-356.

Garberi, J.C., Fontana, J.D., y Blaquier, J.A. (1982) Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int. J. Androl.* 5, 619-626.

Garberi, J.C., Kohane, A.C., Cameo, M.S., y Blaquier, J.A. (1979) Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 13, 73-82.

García, R., Pereyra-Alfonso, S., y Sotelo, J. (1979) Protein-synthesizing machinery in the growing oocyte of the cyclic mouse. *Differentiation (Berl)* 14, 101-106.

Gaunt, S. (1983) Spreading of the sperm surface antigen within the plasma membrane of the egg after fertilization in the rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 75, 257-270.

Gaunt, S., Brown, C.R., y Jones, R. (1983) Identification of mobile and fixed antigens on the plasma membrane of rat spermatozoa using monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 144, 275-284.

Gilula, N., Epstein, M., y Beers, W. (1978) Cell-to-cell communication and ovulation: A study of the cumulus cell-oocyte complex. *J. Cell Biol.* 78, 58-75.

Glabe, C.G. y Vacquier, V. (1978) Egg surface glycoprotein receptor for the sea urchin bindin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:881-885.

Gmachl, M., Sagan, S., Ketter, S., y Kreil, G. (1993) The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* 336, 545-548.

- Goldberg, E. (1977) Isozymes in testes and spermatozoa. In: *Current topics in Biochemical and Medical research*. 79-124. Edited by Ratazzi, M., Scandalios, J., and Whitt, G. New York, Alan R. Liss.
- Gonzalez Echeverria, F., Cuasnicu, P.S., y Blaquier, J.A. (1982) Identification of androgen-dependent glycoproteins in the hamster epididymis and their association with spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 64, 1-7.
- Gonzalez Echeverria, F., Cuasnicu, P.S., Piazza, A., Piñeiro, L., y Blaquier, J.A. (1984) Addition of an androgen-free epididymal extract increases the ability of immature hamster spermatozoa to fertilize in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 71, 433-437.
- Green, D.P.L. (1978) The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Sci.* 32, 137-151.
- Greve, J.M. y Wassarman, P.M. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 181, 253-264.
- Gulyas, B. (1980) Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.* 63, 357-392.
- Gupta, S.K., Alves, K., Palladino, L.O., Mark, G.E., y Hollis, G.F. (1996) Molecular cloning of the human fertilin  $\beta$  subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 318-326.
- Gwatkin, R.B.L. y Williams, D.T. (1977) Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fertil.* 49, 55-59.
- Haddad, A. y Nagai, E. (1977) Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. *Cell Tissue Res.* 177, 347-369.
- Haendler, B., Kratzschmar, J., Theuring, F., y Schleuning, W.D. (1993) Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 133, 192-198.
- Hames, B.D. (1981) An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel electrophoresis of proteins*. 1-86. Edited by Hames, B.D. and Rickwood, D. IRL Press.
- Hamner, C.E. y Sojka, N.J. (1967) Capacitation of rabbit spermatozoa: species specificity and organ specificity. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 124, 689-694.
- Hanada, A. y Chang, M.C. (1972) Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.* 6, 300-309.
- Hardy, C.M. y Holland, M.K. (1996) Cloning and expression of recombinant rabbit fertilin. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 107-116.
- Hardy, D.M. y Garbers, D.L. (1994) Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *J. Biol. Chem.* 269, 19000-19004.
- Harper, M.J.K. (1994) Gamete and zygote transport. In: *The physiology of Reproduction*. 2nd Ed., 123-188. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. New York, Raven Press.
- Hartree, E.F. (1975) The acrosome-lysosome relationship. *J. Reprod. Fertil.* 44, 125-126.

Hartung, M. y Stahl, A. (1978) Autoradiographic study of RNA synthesis during meiotic prophase in the human oocyte. *Cytogenet. Cell Genet.* 20, 51-58.

Hatanaka, Y., Nagai, T., Tobita, T., y Nakano, M. (1992) Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro.* *J. Reprod. Fertil.* 95, 431-440.

Hayashi, M., Fujimoto, S., Takano, H., Ushiki, T., Abe, K., Ishikura, H., Yoshida, M., Kirchhoff, C., Ishibashi, T., y Kasahara, M. (1996) Characterization of a human glycoprotein with potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEG1). *Genomics* 32, 367-374.

Healey, D., Dianda, L., Moore, J.P., McDougal, J.S., Moore, M.J., Estess, P., Buck, D., Kwong, P.D., Beverley, P.C., y Sattentau, Q.J. (1990) Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J. Exp. Med.* 172, 1233-1242.

Hecht, N.B., Bower, P.A., Waters, S.H., Yelick, P.C., y Distel, R.J. (1986) Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp. Cell Res.* 164, 183-190.

Hinkley, R.E., Wright, B.D., y Lynn, J.W. (1986) Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Dev. Biol.* 118, 148-154.

Hirao, Y. y Yanagimachi, R. (1978) Temperature-dependence of sperm-egg fusion and post-fusion events in hamster fertilization. *J. Exp. Zool.* 205, 433-438.

Hoekstra, D. (1990) Membrane fusion of enveloped viruses: Especially a matter of proteins. *J. Bioenergetics and Biomembranes* 22, 121-155.

Horvath, P.M., Kellom, T., Caulfield, J., y Boldt, J. (1993) Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 65-72.

Huang, T.T.F. y Yanagimachi, R. (1985) Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am. J. Anat.* 174, 249-268.

Hunnicutt, C.R., Primakoff, P., y 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. Reprod.* 55, 80-86.

Iwamatsu, T. y Chang, M.C. (1972) Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.* 31, 237-247.

Jean, M., Dacheux, J.L., Dacheux, F., Sagot, P., Lopes, P., y Barriere, P. (1995) Increased zona-binding ability after incubation of spermatozoa with proteins extracted from spermatozoa of fertile semen. *J. Reprod. Fertil.* 105, 43-48.

Jimenez, C., Lefrancois, A.M., Ghyselinck, N.B., y Dufaure, J.P. (1992) Characterization and hormonal regulation of 24kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *J. Endocrinol.* 133, 197-203.

Johnson, M.H. y Calarco, P.G. (1980) Mammalian preimplantation development. *Anat. Rec.* 196, 201-219.

Johnson, M.H., Eager, D., Muggleton-Harris, A., y Grave, H.M. (1975) Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. *Nature* 257, 321-322.



- Johnson, M.H., Pratt, H.P.M., y Handyside, A.H. (1981) The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. In: *Cellular and molecular aspects of implantation*, 55-74. Edited by Galsser, S.R. and Bullock, D.W. New York, Plenum Press.
- Jones, R., Brown, C.R., Cran, D.G., y Gaunt, S. (1983) Surface and internal antigens of rat spermatozoa distinguished using monoclonal antibodies. *Gam. Res.* 8, 255-265.
- Jones, R., Brown, C.R., von Glós, K.I., y Parker, M.G. (1980) Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. *Biochem. J.* 206, 161-164.
- Jones, R., Phorpramool, C., Setchell, B., y Brown, C.R. (1981) Labelling of membrane glycoproteins on rat spermatozoa collected from different regions of the epididymis. *Biochem. J.* 200, 457-460.
- Jones, R., Brown, C.R., y Lancaster, R.T. (1988) Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 102:781-792.
- Jones, R., Shalgi, R., Holland, J., y Phillips, D.M. (1990) Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa *in vitro*. *Dev. Biol.* 139, 349-362.
- Kalab, P., Visconti, P., Leclerc, P., y Kopf, G.S. (1994) p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J. Biol. Chem.* 269, 3810-3817.
- Kang, Y. (1974) Development of the zona pellucida in the rat oocyte. *Am. J. Anat.* 139, 535-566.
- Kaplan, R. y Kraicer, P.F. (1978) Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes *in vitro*. *Gam. Res.* 1, 281-285.
- Kasahara, M., Gutknecht, J., Brew, K., Spurr, N., y Goodfellow, P.N. (1989) Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5, 527-534.
- Katz, D.F., Drobnis, E.Z., y Overstreet, J.W. (1989) Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gam. Res.* 22, 443-469.
- Kaur, J., Ramakrishnan, P.R., y Rajalakshmi, M. (1991) Alterations in protein profile of rat spermatozoa during maturation. *Andrologia* 23, 53-56.
- Kawai, Y., Hama, T., Mayumi, T., y et al. (1989) Flow cytometric analysis of mouse sperm using monoclonal anti-sperm antibody OBF13. *J. Reprod. Immunol.* 16, 71-82.
- Kellom, T., Vick, A., y Boldt, J. (1992) Recovery of penetration ability in protease-treated zona-free mouse eggs occurs coincident with recovery of a cell surface 94 kD protein. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 46-52.
- Kim, Y.H., McFarlane, J.R., Almahbobi, G., Stanton, P.G., Temple-Smith, P.D., y De Kretser, D.M. (1995) Isolation and partial characterization of rat sperm tail fibrous sheath proteins and comparison with rabbit and human spermatozoa using a polyclonal antiserum. *J. Reprod. Fertil.* 104, 107-114.

- Kirchhoff, C., Pera, I., Rust, W., y Ivell, R. (1994) Major human epididymis-specific gene product, HE3, is the first representative of a novel gene family. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 130-137.
- Koehler, J.K. (1970) A freeze-etch study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J. Ultrastruct. Res.* 33, 598-614.
- Koehler, J.K. (1981) Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Arch. Androl.* 9, 444-456.
- Kohane, A.C., Cameo, M.S., Piñeiro, L., Garberi, J.C., y Blaquier, J.A. (1980) Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 23, 181-187.
- Kohane, A.C., Gonzalez Echeverria, F., Piñeiro, L., y Blaquier, J.A. (1980) Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 23, 737-742.
- Kohane, A.C., Piñeiro, L., y Blaquier, J.A. (1983) Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. *Endocrinology* 112, 1590-1596.
- Koo, G.C., Stackpole, C.W., Boyse, E.A., Hammerling, U., y Lardis, M.P. (1973) Topographical location of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1502-1505.
- Kopf, G.S. y Gerton, G.L. (1990) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: *Elements of mammalian fertilization*. 153-203. Edited by Wassarman, P.M. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Kratzschmar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., y Schleuning, W.D. (1996) The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur. J. Biochem.* 236, 827-836.
- Lacham, O. y Trounson, A. (1991) Fertilizing capacity of epididymal and testicular spermatozoa microinjected under the zona pellucida of the mouse oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 85-93.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen, W.J., Wert, S., y Brunner, G. (1986) A dramatic loss of cumulus cells gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* 113, 517-521.
- Lea, O.A., Petrusz, P., y French, F.S. (1978) Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating secreted by the rat epididymis. *Int. Androl. Supp.* 2, 592-607.
- Lee, V.H., Schwoebel, E., Prasad, S., Cheung, P., Timmons, T.M., Cook, R., y Dunbar, B.S. (1993) Identification and structural characterization of the 75-kDa rabbit zona pellucida protein. *J. Biol. Chem.* 268, 12412-12417.
- Leyton, L., LeGuen, P., Bunch, D., y Saling, P.M. (1992) Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11692-11695.
- Leyton, L. y Saling, P. (1989) Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 108, 2163-2168.
- Leyton, L. y Saling, P.M. (1989) 95kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57, 1123-1130.

- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., y Primakoff, P. (1994) A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* 125, 1157-1163.
- Linck, R.W. (1979) Advances in the ultrastructural analysis of the sperm flagellar axoneme. In: *The spermatozoon*, 43-53. Edited by Fawcett, D.W. and Bedford, J.M. Baltimore, Urban and Schwarzenberg.
- Liu, C.Y., Litscher, E.S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R.A., Stewart, C.L., y Wassarman, P.M. (1996) Targeted disruption of the *mZP3* gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5431-5436.
- Llanos, M.N., Morales, P., y Riffo, M.S. (1993) Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 267, 209-216.
- Longo, F.J. (1985) Fine structure of the mammalian egg cortex. *Am. J. Anat.* 174, 303-315.
- Lopez, L.C., Bayna, E.M., Litoff, D., Shaper, N.L., Shaper, J.H., y Shur, B.D. (1985) Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* 101, 1501-1510.
- Lopez, L.C. y Shur, B.D. (1987) Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 105, 1663-1670.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucy, J.A. y Ahkong, Q.F. (1986) An osmotic model for the fusion of biological membranes. *FEBS Lett.* 199, 1-11.
- Mahi, C. y Yanagimachi, R. (1976) Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 196, 189-196.
- Martinez, M.L., Fontenot, G.K., y Harris, J.D. (1996) The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 35-41.
- Matsudaira, P. (1990) Limited N-terminal sequence analysis. *Methods Enzymol.* 182, 602-613.
- McDonald, J.K. y Sampson, J. (1957) Intraperitoneal insemination of the heifer. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 95, 815-816.
- McNutt, T. y Weinstein, R.S. (1973) Membrane ultrastructure at mammalian intercellular junctions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 26, 45-101.
- Miller, C.C., Fayrer-Hosken, R.A., Timmons, T.M., Lee, V.H., Caudle, A.B., y Dunbar, B.S. (1992) Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis and immunological techniques. *J. Reprod. Fertil.* 96, 815-825.
- Miller, D.J. y Ax, R.L. (1990) Carbohydrates and fertilization in mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 184-198.
- Miller, D.J., Macek, M.B., y Shur, B.D. (1992) Complementarity between sperm surface B-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357, 589-593.

- Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y., y Hiramoto, Y. (1986) Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization in golden hamster eggs. *Dev. Biol.* 118, 259-267.
- Mizuki, N. y Kasahara, M. (1992) The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: Molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm. Genome* 3, 274-280.
- Mizuki, N. y Kasahara, M. (1992) Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89, 25-32.
- Moller, C.C. y Wassarman, P.M. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* 132, 103-112.
- Moore, A., Ensrud, K.M., White, T.W., Frethem, C.D., y Hamilton, D.W. (1994) Rat epididymis-specific sperm maturation antigens. I. Evidence that the 26 kD 4E9 antigen found on rat caudal epididymal sperm tail is derived from a protein secreted by the epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 181-194.
- Moore, H.D.M. (1980) Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 22, 706-717.
- Moore, H.D.M. (1981) Glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster: localization on epididymal spermatozoa and the effect of specific antibodies on fertilization in vivo. *J. Exp. Zool.* 215, 77-85.
- Moore, H.D.M. y Hartman, T.D. (1986) *In vitro* development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa following co-culture with epithelium from proximal cauda epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 78, 347-352.
- Moore, H.D.M., Smith, C.A., Hartman, T.D., y Bye, A.P. (1987) Visualization and characterization of the acrosome reaction of human spermatozoa by immunolocalization with monoclonal antibodies. *Gam. Res.* 17, 245-259.
- Morales, P. y Cross, N.L. (1987) A new procedure for determining acrosomal status of very small numbers of human sperm. *J. Histochem. Cytochem.*
- Morrisette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., El-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin, B.M., Jitandrakumar, R.P., Moss, R.L., Schleuning, W.D., Coronado, R., y Possani, L.D. (1995) Primary structure and properties of helothermine, a peptide that blocks ryanodine receptors. *Biophys. J.* 68, 2280-2288.
- Muradov, A.L., Petrasovits, A., Davidson, A., y Scott, K.J. (1993) A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* 23, 439-442.
- Myles, D.G. (1993) Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev. Biol.* 158, 35-45.
- Myles, D.G., Kimmel, L.H., Blobel, C.P., White, J.M., y Primakoff, P. (1994) Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4195-4198.
- Myles, D.G., Primakoff, P., y Koppel, D.E. (1984) A localized surface protein of guinea pig sperm exhibits free diffusion in its domain. *J. Cell Biol.* 98, 1905-1909.

- Nagae, T., Yanagimachi, R., Srivastava, P.N., y Yanagimachi, H. (1986) Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 45, 701-707.
- Nicolson, G., Bronginski, A.B., Beattie, G., y Yanagimachi, R. (1979) Cell surface changes in the proteins of rabbit spermatozoa during epididymal passage. *Gam. Res.* 2, 153-162.
- Nicolson, G., Lacorbiere, M., y Yanagimachi, R. (1972) Quantitative determination of plant agglutinin membrane sites on mammalian spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 661-663.
- Nicolson, G., Yanagimachi, R., y Yanagimachi, H. (1975) Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell Biol.* 66, 263-273.
- Niwa, K. y Chang, M.C. (1975) Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 43, 435-451.
- Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., y Nakano, M. (1994) Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1201, 7-14.
- Noyes, R.W., Walton, A., y Adams, C.E. (1958) Capacitation of rabbit spermatozoa. *J. Endocrinol.* 17, 374-380.
- O'Rand, M.G. y Fisher, S.J. (1987) Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zona. *Dev. Biol.* 119, 551-559.
- O'Rand, M.G., Welch, J.E., y Fisher, S.J. (1986) Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. In: *Molecular and cellular aspects of reproduction.* 131-144. Edited by Dhinsa, D.S. and Bahl, O.P. New York, Plenum Press.
- O'Rand, M.G., Widgren, E.E., y Fisher, S.J. (1988) Characterization of the rabbit sperm membrane autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein. *Dev. Biol.* 129:231-240.
- Odor, D. y Renninger, D.F. (1960) Polar body formation in the rat oocyte as observed with the electron microscope. *Anat. Rec.* 147, 13-23.
- Ohlendieck, K. y Lennarz, W.J. (1995) Role of the sea urchin egg receptor for sperm in gamete interactions. *Trends. Biochem. Sci.* 20, 29-33.
- Oikawa, T., Sendai, Y., Kurata, S., y Yanagimachi, R. (1988) A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gam. Res.* 19, 113-122.
- Okabe, M., Adashi, T., Takada, K., y et al. (1987) Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate *in vitro*. *J. Reprod. Immunol.* 11, 91-100.
- Okabe, M., Nagira, M., Kawai, Y., Matzno, S., Mimura, T., y Mayuni, T. (1990) A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil. Steril.* 54, 1112-1120.

- Okabe, M., Takada, K., Adashi, T., Kohama, Y., Miura, T., y Aonuma, S. (1986) Studies on sperm capacitation using monoclonal antibody-disappearance of an antigen from the anterior part of mouse sperm head. *J. Pharmacol. Dyn.* 9, 55-60.
- Okabe, M., Yagasaki, M., Oda, H., Matzno, S., Kohama, Y., y Mimura, T. (1988) Effect of monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. *J. Reprod. Immunol.* 13, 211-219.
- Okabe, M., Ying, X., Nagira, M., Ikawa, M., Kohama, Y., Mimura, T., y Tanaka, K. (1992) Homology of an acrosome-reacted sperm-specific antigen to CD46. *J. Pharmacobio-Dyn.* 15, 455-459.
- Olds-Clarke, P. (1990) Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation. In: *Fertilization in mammals*. 91-99. Edited by Bavister, B., Cummins, J., and Roldan, E. Norwell, Massachusetts, Serono Symposia USA.
- Oliphant, G. (1976) Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 9, 404-414.
- Oliphant, G. y Brackett, B.G. (1973) Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible capacitation with epididymal extracts. *Fertil. Steril.* 24, 948-955.
- Oliphant, G., Reynolds, A.B., y Thomas, T.S. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174, 269-283.
- Olson, G.E. y Danzo, B.J. (1981) Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 24, 431-443.
- Olson, G.E. y Hamilton, D.W. (1978) Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 19, 26-35.
- Orgebin-Crist, M.C. y Fournier-Delpech, S. (1982) Sperm-egg interaction. Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.* 3, 429-433.
- Overstreet, J.W., Cooper, G.W., y Katz, D.F. (1978) Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II: The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* 19, 115-132.
- Overstreet, J.W., Lin, Y., Yudin, A.I., Meyers, S.A., Primakoff, P., Myles, D.G., Katz, D.F., y Vandervoort, C.A. (1995) Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol. Reprod.* 52, 105-114.
- Parinaud, J., Labal, B., y Vieitez, G. (1992) High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil. Steril.* 58, 599-602.
- Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., y Lai, F.A. (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-368.
- Perez Martinez, S., Conesa, D., y Cuasnicú, P.S. (1995) Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J. Reprod. Immunol.* 29, 31-45.
- Phelps, B.M., Primakoff, P., Koppel, D.E., Low, M.G., y Myles, D.G. (1988) Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 240, 1780-1782.

- Phillips, D.M. (1977) Surface of the equatorial segment of the mammalian acrosome. *Biol. Reprod.* 16, 128-137.
- Phillips, D.M. (1977) Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J. Ultrastr. Res.* 58, 144-154.
- Phillips, D.M. y Shalgi, R. (1980) Sperm penetration into rat ova fertilized *in vivo*. *J. Ultrastr. Res.* 72, 1-12.
- Philpott, C., Ringuette, M., y Dean, J. (1987) Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 121, 568-575.
- Pierce, K.E., Grunvald, E.L., Schultz, R.M., y Kopf, G.S. (1992) Temporal pattern of synthesis of the mouse cortical granule protein, p75, during oocyte growth and maturation. *Dev. Biol.* 152, 145-151.
- Pierce, K.E., Siebert, M.C., Kopf, G.S., Schultz, R.M., y Calarco, P.G. (1990) Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Dev. Biol.* 141, 381-392.
- Ponce, R.H., Yanagimachi, R., Urch, U.A., Yamagata, T., y Ito, M. (1993) Retention of hamster oolemma fusibility with spermatozoa after various enzyme treatments: a search for the molecules involved in sperm-egg fusion. *Zygote* 1, 163-171.
- Primakoff, P., Hyatt, H., y 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.
- Primakoff, P., Hyatt, H., y Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* 104, 141-149.
- Primakoff, P. y Myles, D.G. (1983) A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 98, 417-428.
- Racowsky, C. y Satterlie, R. (1985) Metabolic, fluorescent dye and electrical coupling between hamster oocytes and cumulus cells during meiotic maturation *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.* 108, 191-202.
- Rahi, H., Sheikhejade, G., y Srivastava, P.N. (1983) Isolation of the inner acrosomal-nuclear membrane complex from rabbit spermatozoa. *Gam. Res.* 7, 215-225.
- Ralt, D., Goldenberg, M., Fetterolf, P.M., Thompson, D., Dor, J., Mashiach, S., Garbers, D.L., y Eisenbach, M. (1991) Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2840-2844.
- Ramarao, C.S., Myles, D.G., White, J.M., y Primakoff, P. (1996) Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin  $\beta$  subunit. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 70-75.
- Rankin, T.L., Tsuruta, K.J., Holland, M.K., Griswold, M.D., y Orgebin-Crist, M.C. (1992) Isolation, immunolocalization, and sperm-association of three proteins of 18, 25, and 29 kilodaltons secreted by the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 46, 747-766.
- Ravnik, S.E., Albers, J.J., y Muller, C.H. (1993) A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-I. *Fertil. Steril.* 59, 629-638.

- Ravnik, S.E., Zarutskie, P.W., y Muller, C.H. (1992) Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 47, 1126-1133.
- Richardson, R.T., Yamasaki, N., y O'Rand, M.G. (1994) Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 165, 688-701.
- Rifkin, D.M. y Olson, G.E. (1985) Characterization of maturation-dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface. *J. Cell Biol.* 100, 1582-1591.
- Rinehart, J.S., Bavister, B.D., y Gerrity, M. (1988) Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory: Comparison of bioassay systems for water quality. *J. of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 5, 335-342.
- Rochwerger, L., Cohen, D.J., y Cuasnicú, P.S. (1992) Mammalian sperm-egg fusion: The rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev. Biol.* 153, 83-90.
- Rochwerger, L. y Cuasnicu, P.S. (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after *in vivo* and *in vitro* capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 34-41.
- Roldan, E.R.S., Murase, T., y Shi, Q.X. (1994) Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science.* 266, 1578-1581.
- Roller, R., Kinloch, R.A., Hiraoka, B., Li, S., y Wassarman, P.M. (1989) Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: Quantification of three messenger RNAs abundant in fully-grown mouse oocytes. *Development* 106, 251-261.
- Ross, P., Kan, F.W.K., Antaki, P., Vigneault, N., Chapdelaine, A., y Roberts, K.D. (1990) Protein synthesis and secretion in the human epididymis and immunoreactivity with sperm antibodies. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 12-33.
- Rowland, I.W. (1957) Insemination of the guinea pig by intraperitoneal injection. *J. Endocrinol.* 16, 98-106.
- Russell, L.D. (1980) Sertoli-germ cell interactions: a review. *Gam. Res.* 3, 179-202.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., Hunt, W., y Strack, L.E. (1980) Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 30, 959-978.
- Saling, P. y Bedford, J.M. (1981) Absence of species-specificity for mammalian sperm capacitation *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.* 63, 119-123.
- Saling, P.M. (1981) Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to the zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6231-6235.
- Saling, P.M., Irons, G., y Waibel, R. (1985) Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 33, 515-526.
- Saling, P.M. y Storey, B.T. (1979) Mouse gamete interactions during fertilization *in vitro*. Chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 83, 544-555.



- Schlessinger, J., Lax, I., y Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factors activation by proteoglycans: What is the role of low affinity receptors? *Cell* 83, 357-360.
- Schuren, F.H., Asgeirsdottir, S.A., Kothe, E.M., Scheer, J.M., y Wessels, J.G. (1993) The Sc7/Sc14 gene family of *S. comune* codes for extracellular proteins specifically expressed during fruit-body formation. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2083-2090.
- Setchell, B. (1982) Spermatogenesis and spermatozoa. In: *Reproduction in mammals*. 63-101. Edited by Austin, C.R. and Short, R.V. Cambridge, Cambridge University Press.
- Shabanowitz, R.B. y O'Rand, M.G. (1988) Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J. Reprod. Fertil.* 82, 151-161.
- Shalgi, R., Kaplan, R., Nebel, L., y Kraicer, P.F. (1981) The male factor in fertilization of rat eggs *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 217, 319-402.
- Shalgi, R., Matilyahu, A., y Nobel, L. (1986) The role of carbohydrates in sperm-egg interactions in rats. *Biol. Reprod.* 34, 446-452.
- Shalgi, R. y Phillips, D.M. (1980a) Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J. Ultrastruct. Res.* 71, 154-161.
- Shalgi, R. y Phillips, D.M. (1980b) Mechanics of *in vitro* fertilization in the hamster. *Biol. Reprod.* 71, 154-161.
- Shur, B.D. y Hall, N.G. (1982) A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* 95, 574-579.
- Shur, B.D. y Neely, C.A. (1988) Plasma membrane association, purification, and partial characterization of mouse sperm beta 1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 263, 17706-17714.
- Siiteri, J.E. y Hamilton, D.W. (1995) Identification of osteopontin mRNA and protein in rat epididymis and of protein on epididymal sperm. *Ann. NY Acad. Sci.* 760, 361-362.
- Siracusa, G., De Felici, M., y Salustri, A. (1985) The proliferative and meiotic history of mammalian female germ cells. In: *Biology of fertilization*, 253-297. Edited by Metz, C.B. and Monroy, A. New York, Academic Press.
- Snell, W.J. y White, J.M. (1996) The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85, 629-637.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Staehein, L.A. (1974) Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39, 191-283.
- Stem, S., Biggers, J.D., y Anderson, E. (1971) Mitochondria and early development of the mouse. *J. Exp. Zool.* 176, 179-192.
- Stewart-Savage, J. y Bavister, B.D. (1988) A cell surface block to polyspermy occurs in the golden hamster eggs. *Dev. Biol.* 128, 150-157.
- Suarez, S.S., Katz, D.F., Owen, D.H., Andrew, J.B., y Powell, R. (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* 44, 375-381.

Suzuki, F. (1981) Changes in the intramembranous particle distribution in epididymal spermatozoa of the boar. *Anat. Rec.* 199, 361-376.

Suzuki, F. y Nagano, T. (1980) Epididymal maturation of rat spermatozoa studied by thin sectioning and freeze-fracture. *Biol. Reprod.* 22, 1219-1231.

Suzuki, F. y Yanagimachi, R. (1989) Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gam. Res.* 23, 335-347.

Szöllösi, D., Calarco, P.G., y Donahue, R. (1972) The nuclear envelope: Its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *Anat. Rec.* 174, 325-340.

Talbot, P. (1985) Sperm penetration through oocyte investments. *Am. J. Anat.* 174, 331-346.

Talbot, P. y Chacon, R.S. (1980) A triple stain technique for scoring acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201-208.

Tanphaichitr, N., Smith, J., y Kates, M. (1990) Levels of sulfogalactosyl-glycerolipid in capacitated motile and immotile mouse spermatozoa. *Biochem. Cell Biol.* 68, 528-535.

Tanphaichitr, N., Tayabali, A., Gradil, C., Juneja, S., Leveille, M.C., y Lingwood, C.A. (1992) Role of a germ cell-specific sulfolipid-immobilizing protein (SLIP1) in mouse *in vivo* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 17-22.

Tesarik, J. y Thébault, A. (1993) Fertilization failure after subzonal sperm insertion associated with defective fusional capacity of acrosome-reacted spermatozoa. *Fertil. Steril.* 60, 369-371.

Tezon, J.G., Ramella, R., Cameo, M.S., Vazquez, M.H., y Blaquier, J.A. (1985) Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 32, 591-597.

Tong, Z.B., Nelson, L.M., y Dean, J. (1995) Inhibition of zona pellucida gene expression by antisense oligonucleotides injected into mouse oocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 849-853.

Topfer-Petersen, E., Friess, A., Sinowatz, F., Biltz, S., y Schill, W.B. (1987) Immunological characterization of the outer acrosomal membrane during acrosome reaction in boar. *Histochemistry* 226, 38-42.

Topfer-Petersen, E., Friess, A., Stoffel, M., y Schill, W.B. (1990) Boar sperm membrane antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* 93, 491-495.

Topfer-Petersen, E. y Henschen, A. (1988) Zona pellucida-binding and fucose-binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 369, 69-76.

Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4360.

Toyoda, Y. y Chang, M.C. (1974) Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fertil.* 36, 9-22.

- Toyoda, Y., Yokoyama, M., y Hoshi, T. (1971) Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16, 147-157.
- Tulsiani, D.R.P., Comwall, G.A., Skudlarek, M.D., y Orgebin-Crist, M.-C. (1991) Increase in sperm plasma membrane  $\alpha$ -D-mannosidase correlates with the development of sperm binding ability. In: *Comparative spermatology 20 years after*, 703-707. Edited by Baccetti, B. New York, Raven Press.
- Tulsiani, D.R.P., Skudlarek, M.D., y Orgebin-Crist, M.-C. (1989) Novel  $\alpha$ -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions. *J. Cell Biol.* 109, 1257-1267.
- Tung, P.S. y Fritz, I.B. (1978) Specific surface antigens on rat pachytene spermatocytes and successive classes of germinal cells. *Dev. Biol.* 64, 297-315.
- Urch, U.A., Wardrip, N.J., y Hedrick, J.L. (1985) Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233, 479-483.
- Usui, N. y Yanagimachi, R. (1976) Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastr. Res.* 57, 276-288.
- Uto, N., Yoshimatsu, N., Lopata, A., y Yanagimachi, R. (1988) Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 248, 113-120.
- Valdivia, M., Yunes, R., Melendez, J., De Ioannes, A.E., Leyton, L., Becker, M.I., y Barros, C. (1994) Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 216-222.
- Vernon, R.B., Hamilton, M.S., y Eddy, E.M. (1985) Effects of *in vivo* and *in vitro* fertilization environments on the expression of a surface antigen on the mouse sperm tail. *Biol. Reprod.* 32, 669-680.
- Vernon, R.B., Mueller, C.H., Herr, J.C., Feutcher, F.A., y Eddy, E.M. (1982) Epididymal secretion of a mouse sperm surface component recognized by a monoclonal antibody. *Biol. Reprod.* 26, 523-535.
- Vierula, M.E. y Rajaniemi, H. (1980) Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Reprod. Fertil.* 58, 483-489.
- Vierula, M.E., Rankin, T.L., y Orgebin-Crist, M.C. (1995) Electron microscopic immunolocalization of the 18 and 29 kilodalton secretory proteins in the mouse epididymis: Evidence for differential uptake by clear cells. *Microsc. Res. Tech.* 30, 24-36.
- Vigil, P. (1989) Gamete membrane fusion in hamster with reacted equatorial segment. *Gam. Res.* 23, 203-213.
- Villaroya, S. y Scholler, R. (1987) Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and induction of the acrosome reaction *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 80, 545-562.
- Viriyapanich, P. y Bedford, J.M. (1981) Sperm capacitation in the Fallopian tube of the hamster and its supression by endocrine factors. *J. Exp. Zool.* 217, 403-407.

- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., y Kopf, G.S. (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121, 1129-1137.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., y Kopf, G.S. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121, 1139-1150.
- Voglmayr, J.R., Fairbanks, G., y Lewis, R.G. (1983) Surface glycoprotein changes in ram spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29, 767-775.
- Vreeburg, J.T.M., Holland, M.K., y Orgebin-Crist, M.-C. (1992) Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol. Reprod.* 47, 588-597.
- Walton, E. y Armstrong, D.T. (1983) Oocyte normality after superovulation in immature rats. *J. Reprod. Fertil.* 67, 309-314.
- Wassarman, P. y Litscher, E.S. (1995) Sperm-egg recognition mechanism in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30, 1-9.
- Wassarman, P. y Mortillo, S. (1991) Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 109
- Wassarman, P.M. (1983) Oogenesis: Synthetic events in the developing mammalian egg. In: *Mechanism and control of animal fertilization*. 1-54. Edited by Hartman, J. New York, Academic Press.
- Wassarman, P.M. (1987) The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235, 553-554.
- Wassarman, P.M. (1994) The mammalian ovum. In: *The physiology of reproduction*, 2nd Ed., 79-122. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. New York, Raven Press.
- Wassarman, P.M. (1995) Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 658-664.
- Wassarman, P.M., Josefowicz, W., y Letourneau, G. (1978) Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J. Morphol.* 156, 209-235.
- Wassarman, P.M., Liu, C.Y., y Litscher, E.S. (1996) Constructing the mammalian egg zona pellucida: Some new pieces of an old puzzle. *J. Cell Sci.* 109, 2001-2004.
- Weakley, B. (1966) Electron microscopy of oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.* 100, 503-534.
- Weinman, D.E. y Williams, W.L. (1964) Mechanism of capacitation in rabbit spermatozoa. *Nature* 203, 423
- White, J., Kielian, M., y Helenius, A. (1983) Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Quart. Reviews of Biophys.* 16, 151-195.
- Wolf, D.E. y Voglmayr, J.R. (1983) Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J. Cell Biol.* 96, 1786-1790.

- Wolf, D.E. y Ziomek, C.A. (1983) Regionalization and lateral diffusion of membrane proteins in unfertilized and fertilized mouse eggs. *J. Cell Biol.* 96, 1786-1790.
- Wolf, D.P., Boldt, J., Byrd, W., y Brechtol, K.B. (1985) Acrosomal status evaluation in human ejaculate sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32, 1157-1162.
- Wolf, D.P., Inoue, M., y Stark, R.A. (1976) Penetration of zona-free mouse ova. *Biol. Reprod.* 15, 213-221.
- Wong, P.Y.D. y Tsang, A.Y.F. (1982) Studies on the binding of a 32K rat epididymal protein to rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 27, 1239-1246.
- Xu, W. y Hamilton, D.W. (1992) Biochemical evidence for the presence of epididymis-specific secretory protein E on the rat sperm surface. *Ch. J. of Andrology* 6, 30(Abstract)
- Yanagimachi, R. (1969) *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 18, 275-286.
- Yanagimachi, R. (1972) Fertilization of guinea pig eggs *in vitro*. *Anat. Rec.* 174, 9-20.
- Yanagimachi, R. (1978) Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol. Reprod.* 19, 949-958.
- Yanagimachi, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and embryonic development in vitro.*, 81-182. Edited by Mastroianni, L. and Biggers, J.D. New York, Plenum Press.
- Yanagimachi, R. (1984) Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gam. Res.* 10, 187-232.
- Yanagimachi, R. (1988) Sperm-egg fusion. In: *Current topics in membranes and transport.* 3-43. Edited by Duzgunes, N. and Bronner, F. Orlando, FL, Academic Press.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction.* 2nd Ed., 189-317. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. New York, Raven Press.
- Yanagimachi, R. y Noda, Y.D. (1970) Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J. Ultrastruc. Res.* 31, 486-493.
- Yanagimachi, R. y Phillips, D.M. (1984) The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization *in vitro*. *Gam. Res.* 9, 1-19.
- Yanagimachi, R. y Usui, N. (1974) Calcium dependence on the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89, 161-174.
- Yoshimatsu, N. y Yanagimachi, R. (1988) Effects of cations and other medium components on the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Dev. Growth Diff.* 6, 651-659.
- Youakim, A., Hathaway, H.J., Miller, D.J., Gong, X., y Shur, B.D. (1994) Overexpressing sperm surface B-1,4-galactosyltransferase in transgenic mice affects multiple aspects of sperm-egg interactions. *J. Cell. Biol.* 126, 1573-1583.
- Young, L.G., Hinton, B.T., y Gould, K.G. (1985) Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 32, 399-412.

Zaheb, R. y Orr, G.A. (1984) Characterization of a maturation-associated glycoprotein on the plasma membrane of rat caudal epididymal sperm. *J. Biol. Chem.* 259, 839-848.

Zamboni, L. (1970) Ultrastructure of mammalian oocyte and ova. *Biol. Reprod. (Suppl. )* 2, 44-63.

Zimmerberg, J., Vogel, S.S., y Chernomordik, L.V. (1993) Mechanisms of membrane fusion. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 433-466.

Zuccotti, M., Piccinelli, A., Marziliano, N., Macheretti, S., y Redi, C.A. (1994) Development and loss of the ability of mouse oolemma to fuse with spermatozoa. *Zygote* 2, 333-339.

Zuccotti, M., Yanagimachi, R., y Yanagimachi, H. (1991) The ability of hamster oolemma to fuse with spermatozoa: Its acquisition during oogenesis and loss after fertilization. *Development* 112, 143-152.