



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Química Biológica

*N-ACETILGLUCOSAMINIDASA Y SU
PARTICIPACION DURANTE LA
INTERACCION DE GAMETAS EN EL
HAMSTER*

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Autor: Lic. Karina S. Zitta

Director: Dra. Patricia V. Miranda

**INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
CONICET**

Buenos Aires, marzo 2006

“Confía en el tiempo que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades.
Donde una puerta se cierra, otra se abre” .
Miguel de Cervantes Saavedra

INDICE

	Página
Resumen en castellano	11
Resumen en inglés	13
Agradecimientos	15
Abreviaturas	17
INTRODUCCION	19
La gameta femenina	20
Morfología del ovocito	20
Zona pelúcida	22
La gameta masculina	24
Morfología del espermatozoide	24
Maduración epididimaria del espermatozoide	26
Capacitación	28
Interacción entre gametas	30
Fertilización	30
Interacción espermatozoide-zona pelúcida	31
Unión primaria	32
Reacción acrosomal	34
Carbohidratos e interacción del espermatozoide con la zona pelúcida	35
Enzimas unidoras de zona pelúcida	36
α -D-manosidasa	36
β -1,4-galactosiltransferasa	37
β -N-acetilglucosaminidasa	38
Otros posibles receptores enzimáticos de ZP	39
Otros unidores de ZP no enzimáticos	40
Unión secundaria y penetración de la ZP	41
HIPOTESIS	44
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y METODOS	47
Animales	48
Obtención y purificación de espermatozoides	48
Capacitación "in vitro" de espermatozoides	49

Medición de reacción acrosomal y motilidad de los espermatozoides	49
Electroforesis e inmunoblot	51
Tinción de espermatozoides con clortetraciclina	51
Obtención de ovocitos	52
Medición de la actividad enzimática	53
Curvas de inhibición de NAG de espermatozoides	54
Obtención de enzima recombinante humana	54
Ensayos de unión a zona pelúcida	56
Efecto de distintos compuestos sobre la reacción acrosomal / unión a zona pelúcida	57
Preincubación de espermatozoides con GlcNAc ó hrNAG	58
Preincubación de ovocitos con GlcNAc o con hrNAG	59
Determinación de reacción acrosomal sobre zona pelúcida	59
Ensayos de fertilización in vitro (FIV)	60
Activación de ovocitos	62
Efecto de la zona pelúcida soluble sobre la actividad de NAG	63
Actividad de NAG de espermatozoides durante la capacitación, ruptura acrosomal inducida y reacción acrosomal espontánea	63
Obtención de extractos de espermatozoides	64
Análisis de la presencia de un modulador de NAG	65
Expresión de los resultados	65
RESULTADOS	67
CAPITULO I :Participación de la GlcNAc en la interacción de gametas de hámster	69
La GlcNAc participa en la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida	70
El estroncio puede reemplazar al calcio en la capacitación	72
La fosforilación en tirosina es similar en espermatozoides incubados En calcio o estroncio	74
El patrón de tinción con Clortetraciclina es similar en espermatozoides capacitados en calcio o estroncio	76
El estroncio es capaz de sostener la unión entre gametas	77
Reacción acrosomal sobre la zona pelúcida	78
La GlcNAc afecta la unión espermatozoide-zona pelúcida en ausencia de reacción arosomal	80
La pre-incubación de los espermatozoides con GlcNAc reproduce el	

efecto inhibitorio	81
Efecto de la GlcNAc en la fertilización in vitro	82
La GlcNAc no afecta la reacción de zona	87
La GlcNAc inhibe la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida	89
CAPITULO II: Caracterización de la β -N-Acetilglucosaminidasa de espermatozoides de hámster.	91
La actividad de N-Acetilglucosaminidasa disminuye con la reacción acrosomal	92
Caracterización de la NAG de espermatozoides de hámster	95
La disminución en la actividad de NAG no sería por proteólisis	97
Presencia de un modulador de la actividad de NAG en espermatozoides	98
Localización subcelular de la NAG de espermatozoides de hámster	100
CAPITULO III: Análisis de la participación de la β -N-Acetilglucosaminidasa en la interacción de gametas	103
La zona pelúcida es sustrato de la NAG de espermatozoides	104
Inhibidores específicos de NAG afectan la unión espermatozoide-zona pelúcida	105
Un sustrato específico de NAG inhibe la unión a la zona pelúcida	107
Análisis de la participación de la NAG en los distintos pasos del proceso de fertilización	109
La presencia de NAG exógena afecta la unión/interacción entre gametas	113
Análisis de la participación de la galactosiltransferasa en la unión del espermatozoide de hámster a la zona pelúcida	116
DISCUSION	121
1 ^{ra} PARTE: GlcNAc en la interacción entre gametas	123
2 ^{da} PARTE: Caracterización de β -N-Acetilglucosaminidasa de espermatozoides	131
3 ^{ra} PARTE: β -N-Acetilglucosaminidasa en la interacción de gametas	137
CONCLUSION	145
BIBLIOGRAFIA	148

RESUMEN EN CASTELLANO

N-ACETILGLUCOSAMINIDASA Y SU PARTICIPACIÓN DURANTE LA INTERACCIÓN DE GAMETAS EN EL HÁMSTER

La interacción entre gametas está mediada por los oligosacáridos de la cubierta del ovocito (la zona pelúcida, ZP) y proteínas complementarias del espermatozoide. En este trabajo se estudió la participación de los carbohidratos en las distintas etapas del proceso de interacción entre el espermatozoide de hámster y ZP. La presencia de GlcNAc fue capaz de inhibir la unión del espermatozoide a la ZP, revelando que es el azúcar más relevante en este proceso de interacción. El monosacárido también inhibió la reacción acrosomal (RA) espontánea e inducida por ZP. Usando un modelo que nos permitió tener capacitación y unión a ZP sin RA, pudimos verificar que la GlcNAc está involucrada en la unión primaria a través de sitios de unión para el azúcar en el espermatozoide. Utilizando ensayos de fertilización in vitro (FIV), analizamos la participación de GlcNAc en los diferentes pasos de la interacción espermatozoide-ovocito, pero no hallamos evidencias de su participación más allá de la unión primaria. La ZP fue reconocida como un ligando por la β -N-acetilglucosaminidasa (NAG) de espermatozoides de hámster. Esta enzima estaría distribuida en dos poblaciones: una acrosomal y otra débilmente asociada a la membrana plasmática. La actividad total de NAG disminuyó como consecuencia de la activación y liberación de un modulador luego de la capacitación y RA. Ligandos de NAG fueron capaces de inhibir la unión primaria del espermatozoide a la ZP. En ensayos de FIV, no se detectó efecto alguno cuando un inhibidor de NAG fue agregado luego de que la unión primaria tuviera lugar. Por otro lado, el agregado de NAG exógena fue capaz de inhibir la interacción entre gametas. En conclusión, los resultados presentados en este trabajo indican que una NAG de membrana del espermatozoide actuaría como proteína de unión para los residuos GlcNAc terminales de la ZP, mediando de esta manera la unión primaria entre ambas gametas.

Palabras clave: espermatozoide, reacción acrosomal, carbohidratos, lectinas, N-acetilglucosamina, N-acetilglucosaminidasa, zona pelúcida, unión primaria, unión espermatozoide - zona pelúcida, fertilización.

RESUMEN EN INGLES

N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE PARTICIPATION DURING THE HAMSTER GAMETES INTERACTION

Gamete interaction is mediated by the oligosaccharides of the egg extracellular coat (the zona pellucida, ZP) and complementary proteins in the spermatozoa. In this study, the participation of carbohydrates in the different steps of hamster sperm interaction with the ZP was analyzed. The presence of GlcNAc inhibited sperm binding to the ZP, revealing that it is the most relevant sugar in this interaction process. The monosaccharide also inhibited the spontaneous and ZP-induced acrosome reaction (AR). Taken advantage of a method that allowed capacitation and ZP binding without AR, the involvement of sperm GlcNAc binding sites in primary binding to the ZP was verified. Carrying out in vitro fertilization (IVF) assays, the participation of GlcNAc in the different steps involved in sperm-oocyte interaction was analyzed, but no evidences for its involvement beyond primary binding was found. Soluble ZP was recognized as a ligand by the hamster sperm β -N-acetylglucosaminidase (NAG). This enzyme seems to be distributed in two populations in sperm: one within the acrosome and another one weakly associated to the plasma membrane. Total NAG activity diminished as a consequence of the activation and release of a regulatory molecule after capacitation and AR. NAG ligands were able to inhibit sperm primary binding to ZP. During IVF assays, no effect was detected when a NAG inhibitor was added after primary binding took place. Additionally, exogenous NAG was able to inhibit gamete interaction. In conclusion, results suggest that a membrane sperm NAG would be acting as a binding protein for the ZP terminal GlcNAc residues during primary binding between gametes.

Keywords: sperm, acrosome reaction, carbohydrates, lectin, N-acetylglucosamine, N-acetylglucosaminidase, zona pellucida, primary binding, zona binding, fertilization.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se habría escrito sin la inspiración y el apoyo de muchas personas e instituciones. Estoy especialmente agradecida:

...a la Dra. Patricia Miranda por haberme guiado con infinita paciencia, calidez y esmero en el transcurso de la investigación, por su continuo aliento y sabiduría y por crear y mantener un ambiente motivador para el trabajo en equipo.

...a Eva, Silvina, Renata y Sandra mis compañeras de laboratorio y colegas, por estar siempre presentes.

...a Alejandra, Cecilia, Mónica, Estela, Griselda, Marina, Fernanda, Dalia, Dolores, Vanina, Debora, Mariana...por su presencia en momentos adversos, por sus consejos que hicieron más llevadero el trabajo cotidiano y por haber compartido buenos momentos.

...al IByME lugar en el cual tuve el privilegio de realizar la presente tesis.

...al CONICET por haberme otorgado las becas necesarias para la concreción del proyecto.

...y finalmente a mi familia, amigas y amigos por su cariño y apoyo permanente.

ABREVIATURAS

AMPc	3',5'fosfato cíclico de adenosina
At	Actividad Total de NAG
BSA	Albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
CTC	Clortetracilina
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GalTasa	Galactosiltransferasa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	1-Piperazineethane sulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)- monosodium salt
hrNAG	N-Acetilglucosaminidasa recombinante humana
ES	Error standard
kD	Kilodaltons
Lacta	Alfa-lactalbúmina
Lactona	2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-Lactona
MU	4-methylumbelliferona
MUG	4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide
NAG	N-Acetilglucosaminidasa
P	Pellet
PBS	Buffer fosfato salino
PNP-GlcNAc	<i>p-nitro</i> -phenyl-N-acetilglucosaminide
PMSG	Gonadotropina sérica de yegua preñada
PVA	Polivinilalcohol
PVDF	Polivinilideno difluride
RA	Reacción acrosomal
SN	Sobrenadante
SWM	Medio para el lavado de espermatozoides
TALP	Medio Tyrode
Tiazolina	N-acetilglucosamina-tiazolina
UDP-Gal	Di fosfouridina-galactosa
UDP-Glu	Di fosfouridina-glucosa
UF	Unidades de fluorescencia
UI	Unidades internacionales
ZP	Zona pelúcida

INTRODUCCION

La fertilización es un proceso por el cual una gameta femenina y una masculina se unen para crear un descendiente genéticamente diferente de los progenitores. Este tipo de reproducción surgió durante la evolución y se mantuvo en diversos grupos de animales, incluidos los mamíferos, por ser un mecanismo más eficiente para que los organismos puedan adaptarse a los diversos cambios del medio ambiente.

La fertilización es el punto donde potencialmente comienza una nueva vida. El conocimiento más detallado de este proceso permitiría desarrollar nuevas técnicas y terapias que regulen la fertilidad y ayuden a solucionar los casos de infertilidad.

LA GAMETA FEMENINA

Morfología del ovocito

En el ovario, el ovocito madura y crece. Luego es ovulado y transportado al oviducto donde se produce la fertilización (Harper, 1982). En la mayoría de las especies de mamífero el ovocito se encuentra arrestado en la metafase II de la meiosis al momento de la ovulación. Este proceso se reanuda con la fertilización (Figura 1).

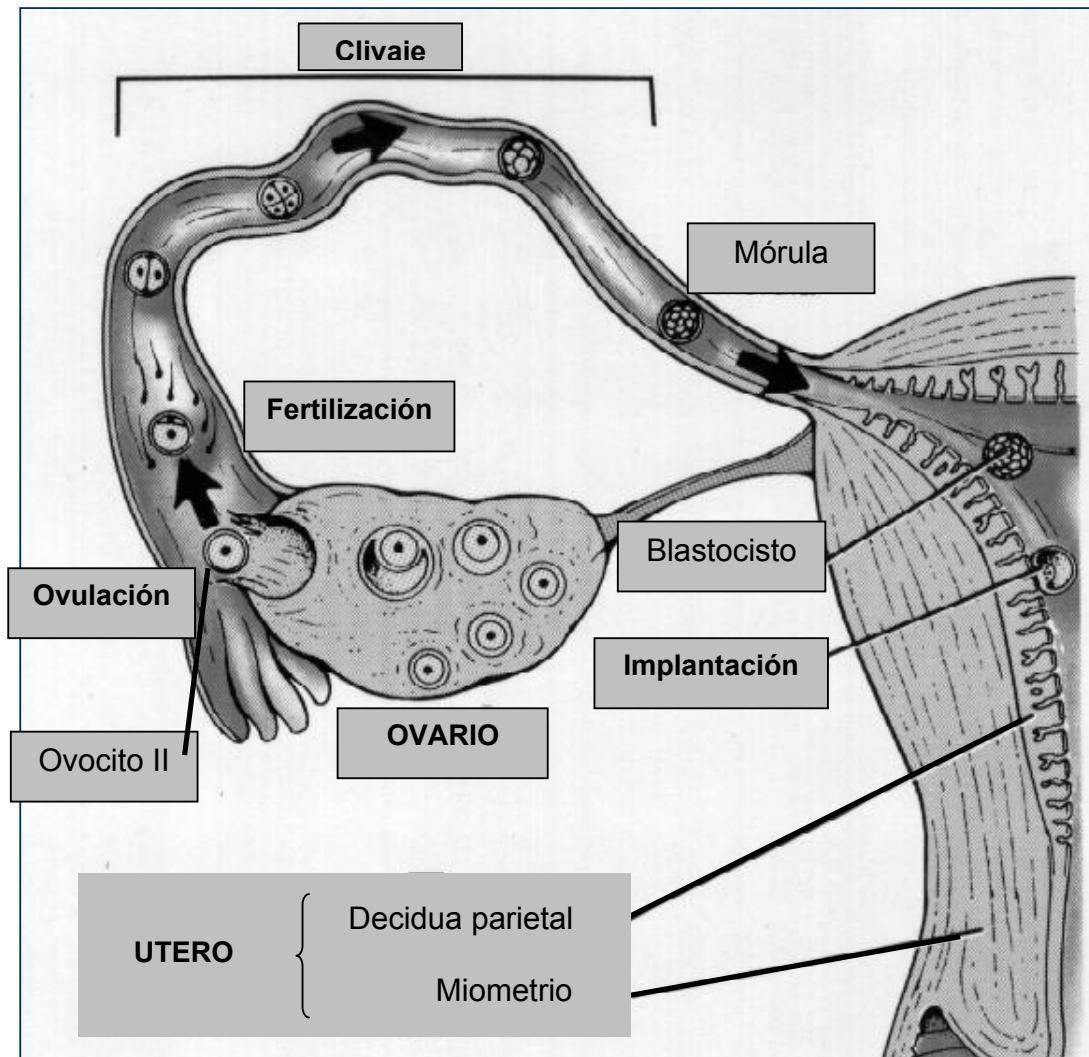


Figura 1. Esquema del recorrido del ovocito y del embrión en el aparato genital femenino

Cuando es ovulado, el ovocito está rodeado por una capa de células de la granulosa, el cúmulus oophorus, y por la zona pelúcida (ZP). Las células del cúmulus están inmersas en una matriz extracelular de ácido hialurónico polimerizado conjugado a proteínas (Yanagimachi, 1994). Se cree que una de las funciones principales de esta gran masa de células y proteínas es la de

aumentar la superficie del ovocito para hacerlo mas fácil de capturar por las fimbrias, así como también para que el espermatozoide encuentre a la gameta femenina con mayor facilidad (Bedford and Kim, 1993). Otra de las funciones que se le pueden atribuir al cúmulus es la de reducir variaciones individuales en la capacidad de fertilizar ovocitos entre machos de una misma especie. Sin embargo, ninguna de estas funciones parecería esencial para el proceso de fertilización ya que en algunas especies el cúmulus no está presente durante la interacción entre gametas.

Zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una malla de glicoproteínas que rodea a los ovocitos de todas las especies de mamíferos. Las cadenas de oligosacáridos de la ZP y proteínas complementarias unidoras de carbohidratos en el espermatozoide median el reconocimiento e interacción entre ambas gametas (Bedford, 1977; Setchell, 1982; Töpfer-Petersen *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Nixon *et al.*, 2001; Diekman, 2003). Además, la ZP participa en el bloqueo de la polispermia y acompaña al embrión hasta el momento de la implantación en la cavidad uterina (Wassarman, 1989). Aunque la composición de la ZP varía entre las distintas especies, la mayoría comprende 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3. Esta es la denominación original atribuida de acuerdo a la ubicación después de una corrida electroforética. Las moléculas de ZP2 y ZP3 se unen para formar filamentos que se conectan a través de ZP1 constituyendo una

estructura tridimensional. Cada una de las glicoproteínas de la ZP muestra un amplio rango de peso molecular debido a una extensiva glicosilación. Aunque la anterior es la denominación mas conocida y sigue siendo la mas utilizada, una clasificación posterior basada en los genes que codifican para estas proteínas las rebautizó ZP A, B y C (Harris *et al.*, 1994). Recientemente, se ha descrito que son 4 las glicoproteínas que forman la ZP, por lo que a ésta última lista se agregó la ZP D (Rodeheffer and Shur, 2004a; Hoodbhoy *et al.*, 2005).

La composición de la ZP varía a lo largo de la vida del ovocito (Fowler and Grainge, 1985; Kimura *et al.*, 1991; Kalab *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994). Incluso después de la ovulación se incorporan proteínas oviductales que alteran sus características glicosídicas y funcionales (Schmidt *et al.*, 1997; Rufas and Shalgi, 1990; Shalgi *et al.*, 1991; El-Mestrah and Kan, 2001).

En algunas especies se ha descrito que la ZP no es homogénea, sino que su composición varía a lo ancho de su estructura al ser analizada con lectinas y anticuerpos (Phillips and Shalgi, 1980; Maymon *et al.*, 1994; Avilés *et al.*, 2000). Existen diferencias entre las distintas especies de mamíferos con respecto a la composición glicosídica de las ZP. Los distintos patrones de distribución de azúcares podrían servir como determinantes en la interacción especie-específica entre gametas (Skutelsky *et al.*, 1994; Avilés *et al.*, 2000).

LA GAMETA MASCULINA

Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula polarizada y especializada en la cual se distinguen dos regiones principales altamente conservadas entre las distintas especies: la cabeza, que contiene el núcleo con el ADN y toda la maquinaria para la interacción con el ovocito, y la cola, relacionada con la producción de energía y motilidad (Figura 2). Ambas regiones pueden además ser subdivididas en compartimientos que se correlacionan con una función específica. La organización básica de los espermatozoides es común en todos los mamíferos, variando principalmente en la forma y el tamaño (Figura 3).

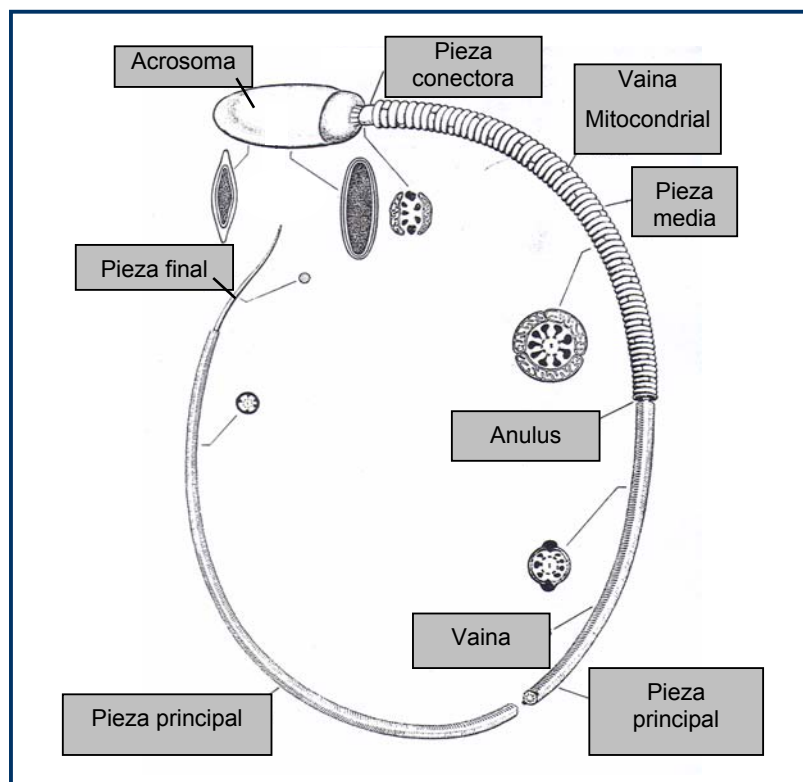


Figura 2. Esquema representativo del espermatozoide de mamíferos.

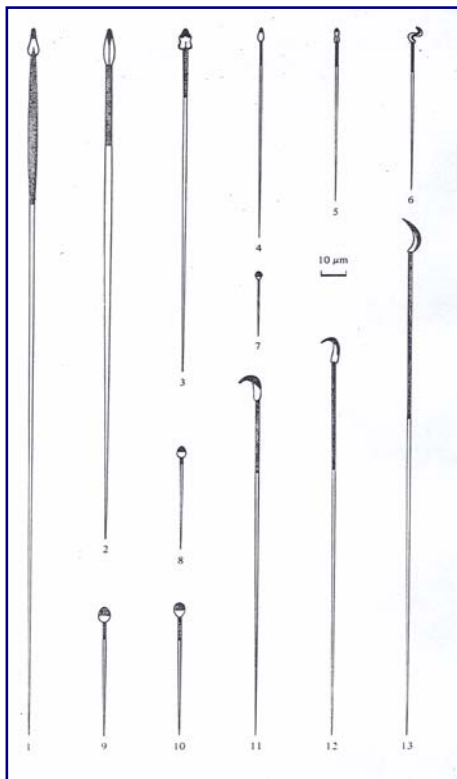


Figura 3. Diagrama de diversos espermatozoides de mamíferos euterios (7-13) y marsupiales 1-6).

- 1- Money possum: *Tarsipes rostratus*
- 2- Rata marsupial: *Dasyuroides byrney*
- 3- Brindled bandicoot de nariz corta: *Isodon macrourus*
- 4- Tammar wallaby: *Macropus eugenii*
- 5- Possum de cola de cepillo: *Trichosurus vulpecula*
- 6- Koala: *Pahascalactos cinereus*
- 7- Hipopótamo: *Hippopotamus amphibius*
- 8- Hombre: *Homo sapiens*.
- 9- Conejo: *Oryctolagus cuniculus*
- 10- Raam: *Ovis aries*
- 11- Hámster dorado: *Mesocricetus auratus*.
- 12- Rata: *Rattus norvegicus*
- Hámster chino: *Cicetulus griseus*
- 13- Chinese hamster *Crisetulus griseus*.

La interacción con el ovocito está restringida a la cabeza del espermatozoide, cuya membrana plasmática puede ser dividida en tres dominios: acrosomal, post acrosomal y segmento ecuatorial. Inmediatamente por debajo de la membrana plasmática de la zona anterior de la cabeza, se encuentra el acrosoma. Esta es una organela ubicada por encima del núcleo, lo cual diferencia la membrana que la rodea en acrosomal interna (la que queda yuxtapuesta al núcleo) y externa (la que queda más cerca de la membrana plasmática). En el acrosoma se almacena material particulado (la matriz acrosomal) y un amplio número de enzimas hidrolíticas como la manosidasa, acrosina, hialuronidasa, sialiltransferasa, fosfatasa acida, fosfolipasas, N-acetilglucosaminidasa, colagenasa y galactosiltransferasa entre otras. Estas

enzimas son liberadas con la reacción acrosomal, un evento exocitótico que se produce como consecuencia de la interacción con la ZP.

Maduración epididimaria del espermatozoide

Los espermatozoides de mamífero están altamente diferenciados al abandonar el testículo (Figura 4), sin embargo aun no poseen la capacidad de moverse progresivamente, ni de fertilizar un ovocito.

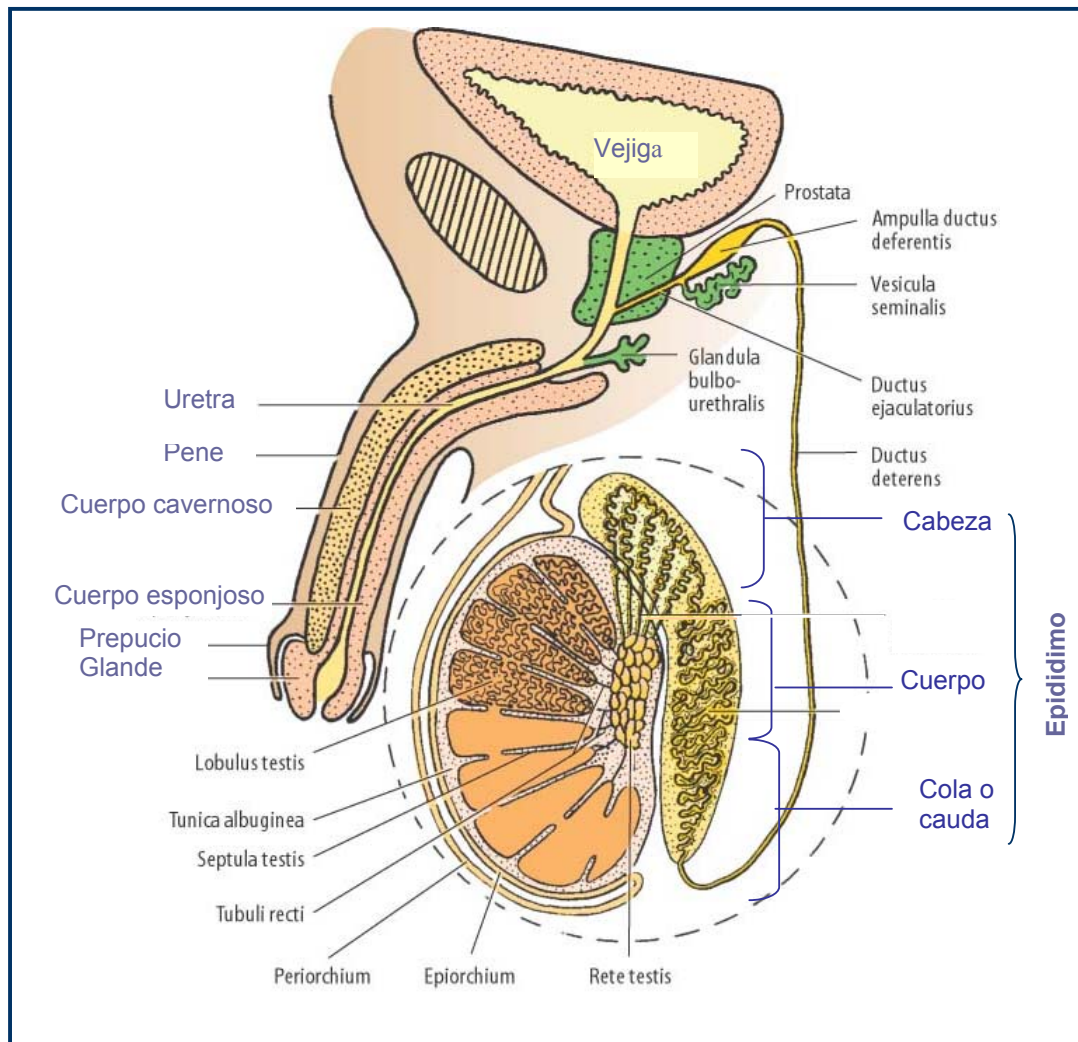


Figura 4. Esquema del aparato genital masculino

La capacidad fertilizante y la motilidad progresiva se obtienen durante el pasaje de los espermatozoides a través del epidídimo, en un proceso denominado maduración (Bedford, 1979; Dacheux *et al.*, 1991; Cooper, 1992; Amann *et al.*, 1993). Aunque no todos los espermatozoides adquieren estas características al mismo tiempo, cuando alcanzan la zona del cauda epididimario (el sitio de almacenamiento de los espermatozoides) ya casi todos poseen motilidad y una capacidad fertilizante potencial. El epidídimo provee las secreciones y el tiempo necesario para que los espermatozoides testiculares (inmaduros) se transformen en maduros. Durante este proceso, se producen cambios metabólicos y morfológicos o estructurales (Cooper, 1992; Yanagimachi, 1994). Es importante destacar los diversos cambios que sufren los componentes de la membrana plasmática del espermatozoide:

- Modificación y/o desenmascaramiento de componentes existentes debido a glicosilación, fosforilación, proteólisis o hidrólisis de glicoconjugados (Cuasnicú *et al.*, 2002; Yeung and Cooper, 2003; Tulsiani, 2003).
- Redistribución de componentes existentes (Lin and Kan, 1996; Myles and Primakoff, 1984; Rochwerger and Cuasnicu, 1992; Spungin *et al.*, 1995; Cuasnicú *et al.*, 2002; Gatti *et al.*, 2004).
- Unión de nuevos componentes de origen epididimario a la superficie del espermatozoide (Hunnicuttt *et al.*, 1997; Agrawal *et al.*, 1989; Boue *et al.*, 1992; Boué *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1997; Cuasnicú *et al.*, 2002; Gatti *et al.*, 2004).

Se han determinado varias proteínas secretadas por el epidídimo que se asocian al espermatozoide durante la maduración y participan en la adquisición de la capacidad fertilizante (Cuasnicu *et al.*, 1984; Gatti *et al.*, 2004). Su papel como mediadoras de la maduración epididimaria ha sido sustentado por estudios en animales de experimentación. En varias especies se ha demostrado que el agregado de proteínas epididimarias a espermatozoides inmaduros aumentan su capacidad de unión a ZP (Orgebin-Crist and Fournier Delpech, 1982; Sanjurjo *et al.*, 1990; Cooper, 1992; Boué *et al.*, 1995) .

Capacitación

El espermatozoide maduro es almacenado en el segmento más distal del epidídimo (la cola o cauda) hasta el momento de la eyaculación (Figura 4). A pesar de ser una célula madura, el espermatozoide eyaculado no está preparado para lograr una fertilización efectiva. Para poder expresar su capacidad fertilizante, la gameta masculina debe sufrir una serie de eventos moleculares que ocurren en el tracto genital femenino y que se conocen en conjunto como capacitación (Austin, 1951; Chang, 1951; Iwamatsu and Chang, 1969). Este proceso puede llevarse a cabo *in vitro* por incubación en medios definidos (Bavister, 1989; Fraser, 1993). Estos medios deben contener básicamente: sustratos energéticos, un aceptor de colesterol, concentraciones fisiológicas de sodio y bicarbonato de sodio. Actualmente, el mecanismo completo del proceso de capacitación no está del todo definido. Sin embargo

algunos eventos han sido identificados, como por ejemplo, el eflujo de colesterol de la membrana plasmática (Davis, 1981; Langlais *et al.*, 1988; Ehrenwald *et al.*, 1988; Ehrenwald *et al.*, 1990; Hoshi *et al.*, 1990; Hamamah *et al.*, 1993; Cross, 1998), el influjo de calcio a la célula (Emiliozzi *et al.*, 1996; Minami *et al.*, 1995), la activación de la adenilato ciclasa (lo cual causa un aumento del AMPc), la actividad de fosfolipasas, (que modifican las características de las membranas), la remoción, alteración y redistribución de componentes de superficie (Matson, 1995), la modificación de la concentración intracelular de iones (Fraser and Ahuja, 1988; Breitbart, 2002), la hiperpolarización de la membrana plasmática (Zeng *et al.*, 1995) y el incremento en la fosforilación en tirosina de varias proteínas (Visconti *et al.*, 1995a).

Como consecuencia de la capacitación, el espermatozoide cambia notoriamente su patrón de movimiento, que se vuelve más enérgico y menos progresivo a causa de una mayor amplitud en el movimiento del flagelo y la cabeza (Yanagimachi, 1970; Burkman, 1990). Los espermatozoides “hiperactivados” se mueven muy rápidamente y aunque en solución este patrón de motilidad parezca poco progresivo, provee la propulsión necesaria para avanzar en medios más viscosos y penetrar las envolturas del ovocito (Suarez and Dai, 1992).

Los cambios sufridos por el espermatozoide durante la capacitación provocan la exposición de los receptores para la ZP y/o la capacidad de responder a estos sufriendo la reacción acrosomal (RA).

INTERACCION ENTRE GAMETAS

Fertilización

La fertilización representa una compleja interacción entre células altamente especializadas. Está comprendida por una serie de eventos coordinados que comienzan con la penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito, seguido por la incorporación del espermatozoide al citoplasma de la gameta femenina, y la consiguiente activación de la misma. Luego de una transformación del material nuclear de ambas gametas, tiene lugar la formación de los pronúcleos masculino y femenino y la unión del material genético de los mismos, proceso denominado singamia. Cada uno aporta el set haploide de material genético necesario para la formación del nuevo individuo.

Durante muchos años fue difícil aceptar el hecho de que un ovocito de mamífero sea fertilizado en condiciones de cultivo. Los primeros experimentos exitosos fueron llevados a cabo por Charles Thibault y Louis Dausier en 1954 con gametas de conejo, pero evidencias irrefutables fueron aportadas por M. C. Chang en 1959, quien cultivó ovocitos *in vitro* hasta el estadio de 4 células, los transplantó al oviducto de una hembra, y luego obtuvo descendientes vivos y de ambos sexos. En 1979 este tipo de experimentos permitieron llevar a cabo el nacimiento del primer bebe humano producto de una fertilización *in vitro*.

En la actualidad la utilización de gametas de animales de laboratorio en ensayos de fertilización *in vitro* (FIV) permite, entre otras cosas, dilucidar los mecanismos involucrados en el proceso de fertilización.

El espermatozoide debe estar capacitado e hiperactivado para ser capaz de atravesar el cúmulus oophorus y llegar hasta la ZP. La unión del espermatozoide a la ZP desencadena la RA con la consecuente liberación de las enzimas que hacen posible la penetración de la zona. Una vez en el espacio perivitelino, el espermatozoide puede fusionarse con el ovocito y finalizar el proceso de fertilización.

Interacción espermatozoide-zona pelúcida

La interacción entre el espermatozoide y la ZP comprende varios pasos (Figura 5):

- Asociación débil y reversible (attachment)
- Unión primaria, caracterizada por ser fuerte y resistente al pipeteo
- Reacción acrosomal
- Unión secundaria/penetración

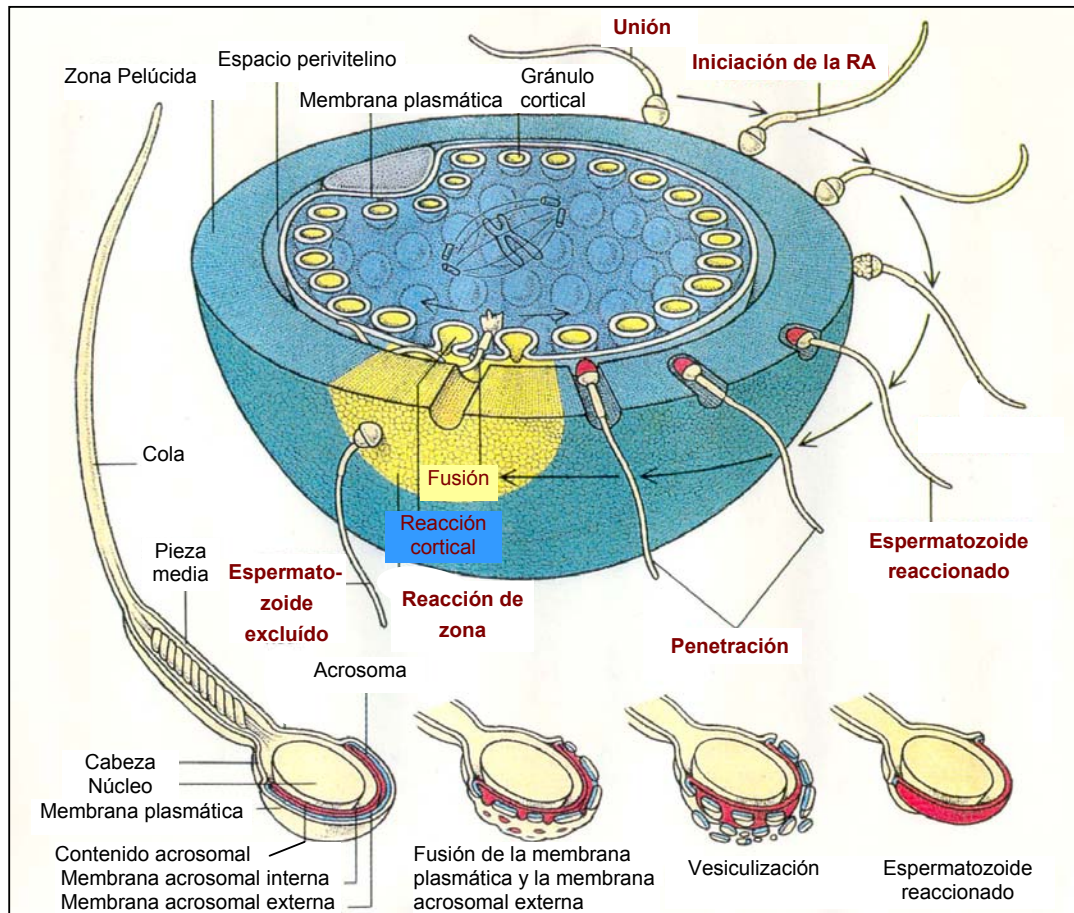


Figura 5: Pasos del proceso de Fertilización.

Unión primaria

Una asociación inicial rápida y débil entre el espermatozoide y la ZP, fácilmente disuelta por pipeteo, permite que tenga lugar el posterior acoplamiento fuerte y estable que se denomina unión primaria. El reconocimiento entre el espermatozoide y la ZP es altamente específico. Para garantizar esta especificidad, el espermatozoide presenta receptores que se unen principalmente a una proteína de la ZP, la ZP3. Sin embargo existen

evidencias de que esta molécula no es la única responsable de la unión primaria (Yurewicz *et al.*, 1998; Rodeheffer and Shur, 2004a).

La identidad del receptor para ZP3 es, hoy en día, muy controvertida (Bleil and Wassarman, 1990; Wassarman, 1990; Miller *et al.*, 1992). En los últimos años se han propuesto una variedad de proteínas espermáticas capaces de unirse a la ZP (Tabla 1). Sin embargo, a pesar del sustento experimental de los resultados reportados, ninguno de los candidatos propuestos parece tener la exclusividad absoluta para establecer la unión primaria entre las gametas.

Tabla 1: Proteínas propuestas como receptores para la ZP en distintas especies.

Especie	Receptor de zona propuesto
Ratón	Galactosiltransferasa (60kDa) Manosidasa Sialiltransferasa Proteína de 95kDa Proteína de 56kDa Proteína de 15kDa
Hámster	Proteína de 26kDa Acrosina
Cobayo	Proteína de 60 - 64 kDa Acrosina
Conejo	Proteína de 87kDa
Cerdo	Proteína de 15kDa Proacrosina (53 - 55kDa) Proteína de 55kDa no Proacrosina Proteína de 18kDa
Caballo y toro	Galactosiltransferasa
Humano	Proteína tipo lectina de 54kDa Acrosina

Reacción acrosomal

La asociación de varias proteínas receptoras del espermatozoide con una única molécula de ZP3 (Litscher *et al.*, 1995) induce la agregación de los receptores en la gameta masculina y, como consecuencia, dispara la RA (Wassarman, 1987; Leyton and Saling, 1989; Saling *et al.*, 1991). Este evento excitotóxico está precedido de una entrada masiva de calcio (Lee and Storey, 1989), y caracterizado por la vesiculización del acrosoma por fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa (Figura 6), generando vesículas híbridas. Como consecuencia de la RA, se libera el contenido del acrosoma, queda expuesta la membrana acrosomal interna y se modifica el segmento ecuatorial adquiriendo capacidad fusogénica (Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1988).

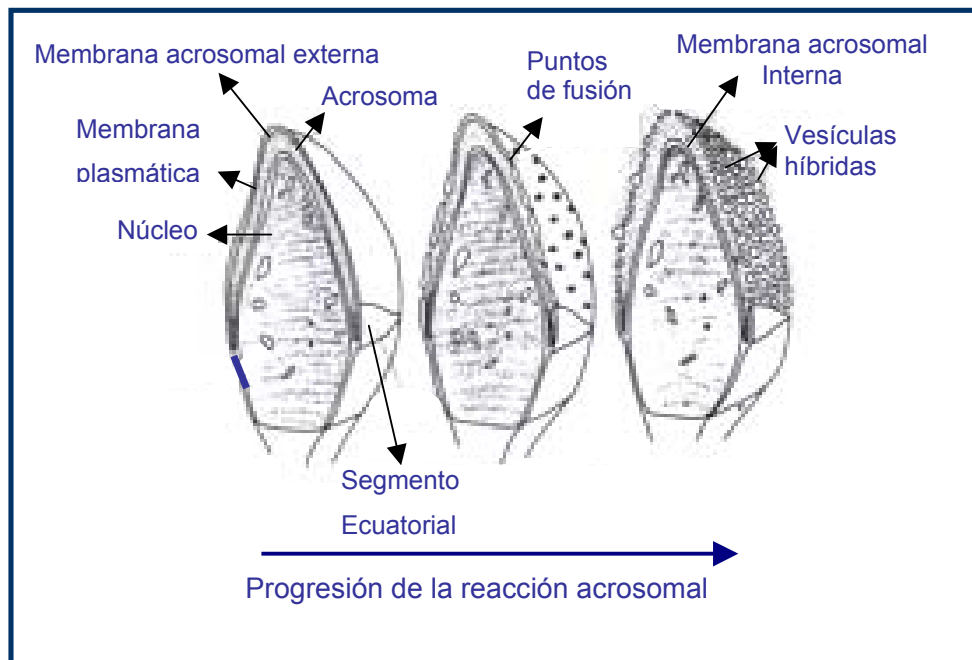


Figura 6. Progresión de la reacción acrosomal.

Carbohidratos e interacción del espermatozoide con la ZP

Los oligosacáridos de las glicoproteínas de la ZP son los encargados de efectuar el primer contacto con receptores específicos del espermatozoide. A pesar de que diversos experimentos han demostrado que los carbohidratos juegan un rol fundamental en el reconocimiento entre gametas (Ahuja, 1982; Yanagimachi, 1988; Kumar *et al.*, 1990; Chapman and Barratt, 1996; Miranda *et al.*, 1997; Benoff, 1997; Oehninger *et al.*, 1998; Loeser *et al.*, 1999; Diekman, 2003), el conocimiento de las estructuras oligosacáridicas de la ZP de mamíferos es limitada (Litscher and Wassarman, 1996; Avilés *et al.*, 2000). La manosa y la N-Acetilglucosamina terminales fueron encontradas en la ZP de todos los ovocitos examinados con lectinas (Konami *et al.*, 1995). Por lo tanto, las diferencias parecen encontrarse principalmente en la distribución que estos monosacáridos tienen en los oligosacáridos asociados a las glicoproteínas.

En el caso de la ZP3 de ratón y de hámster, aunque los polipéptidos tienen tamaños similares, están glicosilados de manera diferente, a notar por el tamaño de la glicoproteína madura. A pesar de que las gametas de hámster y ratón pueden unirse *in vitro* (sugiriendo que sus receptores reconocen ciertos determinantes oligosacáridicos compartidos (Moller *et al.*, 1990)), la ZP de ratón induce la RA en espermatozoides homólogos, pero no en los de hámster (Cherr *et al.*, 1986; Uto *et al.*, 1988).

El patrón de unión a lectinas es distinto en ovocitos provenientes de diferentes especies animales, y las variaciones aumentan con la distancia evolutiva de las mismas (Skutelsky *et al.*, 1994).

Dado que la ZP es una matriz glicoproteica, moléculas del espermatozoide que sean capaces de unir azúcares se podrían relacionar con el reconocimiento de la zona. Las enzimas glicosídicas (glicosidasas y glicosiltransferasas) representan una posibilidad atractiva para esta hipótesis, ya que son abundantes en el espermatozoide y antes de ejercer su función enzimática deben reconocer al azúcar y unirlo (Conchie and Mann, 1957; Hoshi *et al.*, 1985; Hall and Killian, 1987; Sada *et al.*, 1992; Focarelli *et al.*, 1997; Pasini *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2000; Hutchinson *et al.*, 2002b). Diversos reportes mencionan a estas enzimas del espermatozoide como elementos clave en el proceso de fertilización. Al principio habían sido relacionadas solo con la penetración del cúmulus y la ZP (Farooqui and Srivastava, 1980; Rodger and Young, 1981; Sada *et al.*, 1992), pero posteriormente se las relacionó con la unión primaria a la ZP (Durr *et al.*, 1977; Hoshi *et al.*, 1985; Shur, 1993; Nixon *et al.*, 2001).

Enzimas unidoras de ZP

α -D-manosidasa

La α -D-manosidasa es una de las enzimas más fuertemente postuladas como participante en la unión del espermatozoide a la ZP (Tulsiani *et al.*, 1989).

Los espermatozoides presentan dos isoformas de α -manosidasa que difieren, entre otras cosas, en su especificidad de sustrato. Una es la típica hidrolasa ácida y está dentro del acrosoma. La otra es una isoforma de membrana plasmática que hidroliza sustratos naturales (oligosacáridos) con un pH óptimo cercano al valor fisiológico (Tulsiani *et al.*, 1989).

β -1,4-galactosiltransferasa

La β -1,4-galactosiltransferasa (GalTasa) es una glicosiltransferasa que transfiere galactosa de su co-factor, el UDP-Gal, a residuos terminales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Shur and Hall, 1982a).

Esta es una de las enzimas más estudiadas en el proceso de unión de gametas por Shur y colaboradores (Shur, 1993). Inicialmente se observó que diversos ligandos y/o co-factores de la GalTasa (UDP-Gal, GlcNAc, lactosaminoglicano, α -lactalbúmina) podían inhibir la adhesión entre las gametas de ratón (Shur and Hall, 1982a; Lopez *et al.*, 1985). El mismo efecto tenía la presencia de anticuerpos específicos o de GalTasa soluble (Lopez *et al.*, 1985; Fayrer-Hosken *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991b). Posteriormente se comprobó que esta enzima reconoce los residuos terminales GlcNAc de la ZP3 (Bleil and Wassarman, 1980; Miller *et al.*, 1992) e induce la RA por activación de una proteína G (Gong *et al.*, 1995). Más aún, espermatozoides de ratones knock out para la GalTasa se unen muy poco a ZP3 y presentan una marcada reducción en la RA inducida por ZP (Rodeheffer and Shur, 2004a). Sin embargo estos espermatozoides aún son capaces de unirse a los ovocitos *in vitro* (Rodeheffer

and Shur, 2004a; Rodeheffer and Shur, 2004b), indicando que existiría un mecanismo independiente de GalTasa para la unión primaria entre las gametas.

β -N-Acetilglucosaminidasa

La β -N-Acetilglucosaminidasa (NAG), es una glicosidasa ácida que hidroliza los residuos terminales GlcNAc de diversos glicoconjugados. Es una enzima ubicua, usualmente ubicada en los lisosomas, sin embargo en el tracto reproductivo de mamíferos presenta características muy peculiares.

La NAG es la glicosidasa más activa en el epidídimo (Skudlarek and Orgebin-Crist, 1986; Kapur and Gupta, 1988; Miranda *et al.*, 1995; Adamali *et al.*, 1999a), donde es secretada de manera andrógeno dependiente y ha sido asociada con la maduración epididimaria (Chapman and Killian, 1984; Hall and Killian, 1987; Miranda *et al.*, 1995).

En el espermatozoide, fue reportada como una de las enzimas acrosomales y la glicosidasa con mayor actividad (Miller *et al.*, 1993b; Takada *et al.*, 1994).

Muchas evidencias apoyan su participación durante la fertilización en diversos grupos de animales como mosca, ascidia, erizo de mar, sapo, y varios mamíferos (Khar and Anand, 1977; Sada *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993b; Matsuura *et al.*, 1995; Pasini *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2000). Sin embargo, ha sido involucrada en distintos eventos incluídos en el proceso de fertilización, como la penetración del cúmulus (Farooqui and Srivastava, 1980; Rodger and

Young, 1981), la ZP (Miller *et al.*, 1993b) y el bloqueo de la polispermia (Miller *et al.*, 1993a; Miller *et al.*, 1993b; Takada *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995).

Los ratones knock out para la NAG presentan anomalías epididimarias e infertilidad tardía (Adamali *et al.*, 1999a; Adamali *et al.*, 1999b; Juneja, 2002).

A pesar de que la NAG es conocida como una de las enzimas acrosomales, evidencias de diversos laboratorios apoyan su presencia en la membrana plasmática de espermatozoides de distintas especies (Hall and Killian, 1987; Downey and Lambert, 1994; Schmid *et al.*, 1994; Pasini *et al.*, 1999). En nuestro laboratorio también hemos encontrado una población de NAG en la membrana plasmática de espermatozoides humanos (resultados no publicados) que estaría involucrada en la unión a la ZP (Miranda *et al.*, 2000) y la inducción de RA (Brandelli *et al.*, 1994).

Otros posibles receptores enzimáticos de ZP

Otra enzima que también ha sido implicada en el reconocimiento de la ZP por el espermatozoide es la Fucosiltransferasa (FucTasa), aunque las evidencias presentadas no son contundentes. Esta enzima se localiza en la superficie del espermatozoide durante la espermatogénesis y permanece solo en la zona de la cabeza en la célula madura (Cardullo *et al.*, 1989). Por otro lado, ligandos de la FucTasa (GDP-fucosa y asialofetuína) inhiben la unión a ZP en ensayos de fertilización *in vitro* (Huang, Jr. *et al.*, 1982).

La α -Glucosidasa ha sido desde hace tiempo utilizada como marcador epididimario (Tremblay, 1986). Se ha propuesto su participación en la unión del espermatozoide a la ZP ya que el nivel de actividad de glucosidasa en semen pudo ser relacionado con el número de espermatozoides unidos a la ZP (Ali *et al.*, 1994).

Otra enzima con capacidad de unirse a la ZP es la Hialuronidasa. Aunque se la considera principalmente como disgregadora del cúmulus, existen varias formas de Hialuronidasa. Una de ellas, conocida como PH-20, fue relacionada con la unión a ZP en macacos (Yudin *et al.*, 1998; Yudin *et al.*, 1999).

La P68/arilsulfatasa (AS-A) fue localizada en la superficie de espermatozoides de ratón y cerdo. Su función en la interacción de gametas, fue demostrada por el efecto inhibitorio dosis dependiente producido por anticuerpos específicos anti-AS-A (Tantibhedhyangkul *et al.*, 2002).

Otros unidores de ZP no enzimáticos

SED1 es una proteína que contiene secuencias Notch de tipo EGF y dominios discoidina expresada en una variedad de tejidos epiteliales donde funciona como proteína de adhesión. Fue recientemente implicada en la

adhesión entre el espermatozoide y la ZP (Ensslin and Shur, 2003; Shur *et al.*, 2004).

Las espermadhesinas son proteínas multifuncionales que fueron encontradas en la superficie de espermatozoides de algunas especies de mamíferos como el cerdo, el toro y el caballo (Haase *et al.*, 2005). En el cerdo, la unión del espermatozoide con la ZP parece estar mediado por estas proteínas (Calvete *et al.*, 1995; Calvete *et al.*, 1996).

P-47 es una proteína de 47 kDa que se encontró por cromatografía en la fracción de proteínas de membrana plasmática de espermatozoides porcinos que unen glicoproteínas de la ZP. Se la relaciona con el remodelamiento de la membrana y/o la unión a ZP (Ensslin *et al.*, 1998).

Unión secundaria y penetración de la ZP

Una vez liberado el contenido acrosomal, comienza la segunda fase de la interacción entre la ZP y el espermatozoide: la penetración. Las enzimas hidrolíticas le permiten al espermatozoide, junto a la hiperactivación, penetrar la ZP (Honda *et al.*, 2002). Una vez reaccionado, el espermatozoide permanece asociado a la zona por la denominada unión secundaria, que se da entre la ZP2 y nuevos componentes de superficie expuestos luego de la exocitosis acrosomal. Por otro lado, la acción de las enzimas acrosomales va hidrolizando la ZP destruyendo los sitios de unión. El resultado de estos dos fenómenos

contrapuestos es un continuo proceso de asociación-disociación que da lugar a la penetración. Existe un modelo propuesto por Shur y colaboradores (Miller *et al.*, 1993b) que, aunque no destaca la unión secundaria, resulta muy ilustrativo. En el espermatozoide de ratón, la GalTasa, establece la unión primaria por asociación a los residuos GlcNAc de la ZP3. Esto desencadena la RA, la NAG acrosomal se libera e hidroliza los residuos terminales GlcNAc causando la disociación del espermatozoide. Este se mueve hacia otro residuo GlcNAc y el proceso se repite. La existencia de otras moléculas que medien la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, proveería mayor estabilidad al espermatozoide penetrante.

Para la unión secundaria, el candidato más estudiado es la acrosina, una proteasa tipo tripsina que ha sido postulada como unidora de ZP (Saling, 1981; Benau and Storey, 1987). Actualmente se considera a su precursor, la proacrosina, como una proteína multifuncional que, además de dar lugar a la enzima activa, está involucrada en la disgregación de la matriz acrosomal (Yamagata *et al.*, 1998) y en la unión de los espermatozoides reaccionados a la superficie de la ZP (Howes *et al.*, 2001; Tantibhedhyangkul *et al.*, 2002; Howes and Jones, 2002; Furlong *et al.*, 2005a), probablemente a través de un dominio de unión a manosa (Topfer-Petersen and Henschen, 1987; Furlong *et al.*, 2005a). Durante la reacción acrosomal, la alcalinización del acrosoma permite la autoactivación de proacrosina para generar acrosina (Fock-Nüzel *et al.*, 1984; Topfer-Petersen *et al.*, 1989; Topfer-Petersen and Cechova, 1990; Mortillo and Wassarman, 1991). Dentro del acrosoma existe además una proteína de matriz,

la SP32, que regula la activación de la acrosina (Baba *et al.*, 1989; Baba *et al.*, 1994b). Se cree que la acrosina utiliza el mecanismo de unión y corte a través de su actividad de proteasa, permitiéndole al espermatozoide atravesar la ZP.

A pesar de las evidencias a favor de la participación de la acrosina en la penetración de la ZP, ratones portadores de una acrosina mutante resultaron ser fértiles (Baba *et al.*, 1994a). Sin embargo, los ratones knock out de acrosina muestran un retardo en el proceso de fertilización (Adham *et al.*, 1997).

Existen otras moléculas que también facilitan y/o modulan la penetración, como los polisulfatos (Moreno *et al.*, 2001) y la acrina 3 (Saxena *et al.*, 2000).

HIPOTESIS

Durante los últimos años el laboratorio en el que se desarrolló esta tesis ha estudiado la participación de la GlcNAc y la NAG en la reproducción humana. Se ha comprobado que este azúcar y la enzima que lo une/hidroliza estarían involucrados en la unión espermatozoide-ZP (Miranda *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2000), la inducción de la RA (Brandelli *et al.*, 1994) y que esta capacidad está relacionada con el éxito reproductivo *in vitro* (Brandelli *et al.*, 1995). Sin embargo, la interacción espermatozoide-ZP es un proceso que consta de varias etapas. Incluso el evento individual de unión puede ser reflejo de interacciones diversas: unión primaria (espermatozoide intacto) o secundaria (espermatozoide reaccionado).

La disección de los distintos eventos involucrados en el proceso de fertilización está restringida en humanos. La escasez de material y la limitación ética de ciertos diseños experimentales nos llevaron a desarrollar un modelo animal para estudiar la participación de la GlcNAc y la NAG en los distintos pasos del proceso de fertilización.

Por lo tanto, utilizando un modelo animal como el caso del hámster, quisimos investigar si una NAG de membrana plasmática del espermatozoide media la unión primaria a la ZP.

OBJETIVOS

Tomando como modelo de trabajo al hámster, los objetivos de este trabajo fueron:

- 1- Analizar el rol de la GlcNAc en la interacción espermatozoide-ZP.
- 2- Caracterizar a la NAG del espermatozoide de hámster.
- 3- Determinar si la NAG está involucrada en la interacción de gametas de hámster y, de ser así, estudiar en cual de los pasos del proceso de fertilización

MATERIALES Y METODOS

Animales

Los animales utilizados para los experimentos de esta tesis fueron hámsters de la especie Mesocricetus auratus (Hámster Dorado). Estos fueron criados bajo un régimen estricto de 14 hs. de luz y 10 hs. de oscuridad, a una temperatura de 22-24°C recibiendo agua y alimento balanceado “*ad libitum*”. Se utilizaron machos adultos (3-5 meses) para la obtención de los espermatozoides, y hembras prepúberes (4-6 semanas) para la obtención de ovocitos. Los animales fueron anestesiados y/o sacrificados con éter.

Obtención y purificación de espermatozoides

Los epidídimos de hámster fueron expuestos a través de un corte efectuado en la región escrotal. La zona del cauda fue disecada y, luego de practicar varios cortes transversales, colocada en una cápsula de Petri (Falcon, 60 mm) con 10 ml de medio SWM (3mM KCl; 144mM NaCl; 1mM CaCl₂; 0.83mM MgCl₂; 300mM Sacarosa; 1mg/ml PVA; 6.4mM Na₂HPO₄; 1.17mM KH₂PO₄) (Bavister, 1989). Luego de incubar en una placa termostaticada a 37°C por 3-4 minutos para permitir la salida de los espermatozoides, la suspensión se centrifugó a 600xg durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en 1ml de SWM y sembrado en una columna (4 ml de lecho) de esferas de vidrio (diámetro 212-300 µm, Sigma), para seleccionar los espermatozoides móviles. La elución se llevó a cabo con medio SWM, recogiendo alícuotas de 500 µl y analizando

la presencia y motilidad de los espermatozoides en cada fracción por microscopía óptica (100X). Se juntaron las fracciones con mayor cantidad de células móviles, y se determinó la concentración con hemocitómetro.

Capacitación “in vitro” de espermatozoides

Para la capacitación, se utilizó medio TL (2.68mM KCl; 101.02mM NaCl; 1.8mM CaCl₂.H₂O; 0.49mM MgCl₂; 4.5mM glucosa; 1mg/ml PVA; 0.36mM NaH₂PO₄; 35.7mM NaHCO₃; 9mM lactato de sodio), (Bavister, 1989) suplementado con: 3 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos (Pentex), 20ug/ml piruvato de sodio y factores de motilidad (2mM D-penicillamina, 10mM hypotaurina y 100uM epinefrina) (TALP). Estos últimos fueron adicionados al medio poco antes del agregado de los espermatozoides. Alternativamente, se utilizó un TALP modificado, en el cual el CaCl₂ fue reemplazado por SrCl₂ (TALP-Sr²⁺). Los espermatozoides (5 x 10⁵ células/ml) fueron incubados por un período total de 6 horas en pocillos de 15 mm de diámetro (placas de 24 wells Corning-Costar) conteniendo 500ul de medio cubierto por vaselina líquida.

Medición de reacción acrosomal y motilidad de los espermatozoides

La determinación del estado acrosomal de los espermatozoides se realizó por microscopía óptica (campo oscuro, 200X) teniendo en cuenta la clasificación descripta para hámster (Yanagimachi and Phillips, 1984). Se consideraron

“intactos” aquellos espermatozoides sin alteraciones morfológicas del acrosoma (Figura 7a) y “reaccionados” los que presentaron modificaciones del mismo (hinchado, colapsado, con rugosidades o cambios de forma) (Figura 7b) o que perdieron el capuchón acrosomal en forma completa (Figura 7c). El porcentaje de RA se evaluó en una alícuota de muestra, contando 100 o más espermatozoides móviles.



Figura 7. Morfología del espermatozoide de hámster y reacción acrosomal.

El estado acrosomal del espermatozoide de hámster se evaluó por microscopía óptica (campo oscuro): acrosoma intacto (a), acrosoma modificado (b), ausencia de acrosoma (c).

Para evaluar la motilidad de los espermatozoides, una pequeña alícuota de la suspensión se colocó sobre un portaobjetos mantenido a 37°C. El porcentaje de espermatozoides móviles se evaluó por microscopía óptica (campo oscuro, 200X) en cien o más células. Se contabilizaron indistintamente los espermatozoides que presentaran hiperactivación, motilidad *in situ* o progresiva.

Electroforesis e inmunoblot

Para la determinación del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina, alícuotas conteniendo 200.000 espermatozoides frescos o incubados por 90 minutos (en TALP ó TALP-Sr²⁺), fueron centrifugadas a 600xg durante 1min. Luego de un lavado con 1 ml de PBS se extrajeron las proteínas por calentamiento en buffer de lisis (50mM Tris, 1% dodecilsulfato de sodio (SDS), pH=6.8). Luego de suplementar el sobrenadante con β-mercaptoetanol (5%), las muestras se hirvieron por 5 minutos, y se sometieron a electroforesis en geles con 10% de poliacrilamida (20mA/gel). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (2 horas a 50V). La membrana fue bloqueada con 10% gelatina en PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente e incubada toda la noche con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (Clon 4G10, Upstate Biotechnology) diluido 1/10.000 en PBS-T con 1% de gelatina. Luego de lavar las membranas 5 veces por 5 minutos con PBS-T, se incubó con anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (diluído 1/10.000 en PBS/BSA 1mg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se revelaron los complejos inmunes utilizando sustrato quimioluminiscente (ECL plus, Amersham).

Tinción de espermatozoides con clortetraciclina

Alícuotas de espermatozoides fueron incubadas con un volumen de solución de clortetraciclina (CTC) (750uM CTC, 5mM Cisteína disueltas en

20mM Tris, 130mM NaCl, pH=7.4). Luego de 5 minutos, se agregó formaldehído (4% concentración final) y se fijó por 15 min. La señal se observó en microscopio de fluorescencia utilizando un filtro para Hoechst (330nm–380nm). Se determinó la proporción de células que mostraban señal en todo el espermatozoide exceptuando la región post acrosomal (patrón B, característico de espermatozoides capacitados) (Ward and Storey, 1984; Fraser and Herod, 1990; Furlong *et al.*, 2005b).

Obtención de ovocitos

Hembras prepúberes fueron estimuladas por administración subcutánea de 40 UI de PMSG (Novormon de Sintex), seguida (50–65 horas mas tarde) de 40 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Sigma). Quince a 17 horas post-hCG se sacrificaron las hembras y se extrajeron los oviductos. Los cúmulos se obtuvieron por punción de la ampula, y fueron disgregados por tratamiento con 0.1% Hialuronidasa durante 5 minutos para liberar a los ovocitos. Luego de lavarlos con TALP suplementado con 5 mM HEPES (TALP-HEPES), los ovocitos se mantuvieron en estufa para ser utilizados posteriormente en ensayos de fertilización, o guardados a 4°C en solución salina concentrada (0.5M (NH₄)₂SO₄, 0.75M MgCl₂, 0.2mM ZnCl₂, 0.1mg/ml PVA, pH=7.4), hasta su utilización. Este tratamiento induce la contracción y consecuente destrucción del oolema conservando las propiedades de la zona pellucida (Yanagimachi *et al.*, 1979).

Todos estos procedimientos fueron realizados bajo lupa estereoscópica con un aumento de 60x.

Medición de la actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática de NAG se utilizó un sustrato fluorométrico específico, la 4-metilumbelliferil-N-acetil- β -D-glucosamina (MUG, 4 mg/ml) (Leaback and Walker, 1961). El producto de reacción, la metilumbeliferona (MU), fue detectado utilizando un fluorímetro Hoeffler TKO 100 (emisión 380 nm, absorción 460 nm). La determinación del pH óptimo se hizo incubando a la enzima en buffer 0.25M citrato o fosfato con diferentes valores de pH entre 2.5 a 6 y 6 a 8 respectivamente. Una vez comprobado el pH óptimo, el resto de las incubaciones se hicieron utilizando 0.25 M citrato, pH=4.5. A 100ul de las muestras a analizar se les agregaron 100ul de buffer y 100ul de sustrato y se las incubó a 37°C por un tiempo adecuado. La reacción enzimática fue detenida por agregado de 1 ml de 0.5M NaHCO₃, pH=11.3. Luego de medir la fluorescencia emitida, se determinó la cantidad de producto liberado por interpolación en una curva patrón de MU. Para la expresión de la actividad en unidades internacionales (UI), una unidad fue definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 nmol de MU por minuto a 37°C.

Para determinar la concentración saturante de sustrato colorimétrico, el *p*-nitro-fenil-N-acetil-glucosaminide (PNP-GlcNAc, Sigma), cantidades crecientes

(0,01-10 mM), fueron agregadas a espermatozoides de hámster e incubadas a 37°C durante 3 hs. Luego de parar la reacción, la actividad enzimática fue determinada por medición de la absorbancia a 405nm.

Curvas de inhibición de NAG de espermatozoides

Para trazar las curvas dosis-respuesta de inhibición de NAG, cantidades crecientes de diversos compuestos fueron agregadas al ensayo de medición de actividad enzimática. Se utilizaron dos inhibidores específicos de la NAG: la 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactona (0-10mM de Lactona, Toronto Chemicals Inc.) (Godknecht and Honegger, 1995) y la N-acetylglucosamina-tiazolina (0-10mM de Tiazolina). Esta última fue gentilmente donada por el Dr. Spencer Knapp. También se realizaron curvas de inhibición con el monosacárido sustrato de la NAG: GlcNAc (0-50 mM) y con ZP soluble (0-33 ZP/ml).

Obtención de enzima recombinante humana

Células CHO con expresión estable de NAG humana y células CHO no transfectadas (controles), fueron retiradas del N₂ líquido y descongeladas por incubación a 37°C durante 5 minutos. Fueron sembradas en placas de 60 mm (Corning, COSTAR) con medio α -MEM (GIBCO) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB). Una vez que las células se adhirieron a la placa, se

cambió el medio a α -MEM con 10% SFB suplementado con antibióticos y antimicóticos (Gentamicina y Anfotericina B) hasta que llegar a confluencia (2 -3 días). Luego de dos lavados con PBS, las células fueron despegadas por tratamiento con una solución de tripsina (0.25% 10mM EDTA, GIBCO) durante 3-5 minutos. Luego del agregado de un volumen de α -MEM con 10% SFB, la suspensión fue homogeneizada para obtener células aisladas y se utilizó para sembrar placas de 100 mm para su propagación. Una vez que las células llegaron aproximadamente al 50% de confluencia, se lavaron 2 veces con PBS y se les agregó un medio libre de suero (CHO-S-SFM-II, GIBCO). Se recogió el medio cada dos días en 3 oportunidades. La enzima se purificó del medio de cultivo siguiendo el procedimiento descrito (Miranda *et al.*, 2000). Brevemente, el medio fue centrifugado 20 minutos a 450xg para remover las células que pudiera contener y fue sembrado en una columna de 5 ml de Concanavalina A-Sefarosa (Con A, Pharmacia) equilibrada con buffer 10 mM Tris, 1M NaCl pH=7.5. Luego de la siembra, la NAG se eluyó con este mismo buffer conteniendo 0.1 y 0.4M α -metil-manopiranosido y se seleccionaron las fracciones de mayor actividad. Esta solución fue dializada contra buffer 20 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, pH=7.1, y sembrada en una columna de Affi Gel Blue (AGB) de 5 ml de lecho, previamente equilibrada en el mismo buffer. La elución se hizo con concentraciones crecientes de NaCl (0-2M) en el mismo buffer. Se midió la actividad en cada fracción y se seleccionó aquella que contenía la mayor actividad. Esta solución fue concentrada utilizando un concentrador CX-10 (Amicon). Por último, el concentrado se sometió a una cromatografía en una

columna de afinidad por sustrato (GlcNAc acoplada a Sepharosa), de la que fue eluída con 10 mM Tris 0.1M NaCl, pH=8.5. El medio de cultivo proveniente de las células CHO control fue sometido a los mismos procedimientos.

En esta preparación final de enzima recombinante se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y la actividad específica (AE=0.17mU/ug de proteína).

Ensayos de unión a zona pelúcida

Ovocitos conservados en solución salina fueron lavados 5 veces (durante 1 hora) en medio TALP-HEPES para eliminar los restos de sal (Boatman *et al.*, 1988). Gotas de 50 μ l de TALP (Sr^{2+} ó Ca^{2+}) conteniendo 10-15 ovocitos fueron inseminadas con espermatozoides previamente capacitados por 3 horas (en TALP ó TALP- Sr^{2+} , concentración final 100.000 espermatozoides/ml). Luego de co-incubar a las gametas por 45 minutos a 37°C en 5% CO_2 , se agregó azida sódica (concentración final 1%) para inmovilizar a los espermatozoides. Los ovocitos se pipetearon repetidamente en gotas de medio fresco para remover los espermatozoides que no estaban unidos. Luego de fijarlos durante 5 minutos en TALP-HEPES conteniendo 0.1% formaldehído, se lavaron con medio fresco y luego en 2.3% citrato:etanol (3:1) conteniendo PVA (0.75mg/ml). Los ovocitos se examinaron en microscopio invertido (200X) para determinar la presencia y el número de espermatozoides por ovocito.

Efecto de distintos compuestos sobre la reacción acrosomal / unión a zona pelúcida

Para analizar el efecto de distintos inhibidores ó sustratos de NAG sobre la RA espontánea, los mismos fueron agregados a espermatozoides capacitados y la proporción de células reaccionadas fue evaluada 3 horas después. Para aquellos compuestos que afectaban este parámetro, los ensayos de unión se llevaron a cabo en TALP-Sr²⁺.

En el caso de estudiar el efecto sobre la unión a la ZP, los compuestos se agregaron a la gota de co-incubación. Los compuestos que se utilizaron fueron: 1mM de GlcNAc, 1mM de Lactona, 1mM de Tiazolina, 3mM de *p*-nitro-fenil-N-Acetilglucosaminide (PNP-GlcNAc), 0.011UI de NAG recombinante humana (hrNAG), 20uM de manganeso (Mn²⁺) y 2mM de UDP-Glucosa y UDP-Galactosa. En el caso de UDPs, y debido a la labilidad de estos compuestos, los ensayos se realizaron con mayor concentración de espermatozoides (500.000 células/ml) y se detuvieron a tiempos mas cortos (15 min.) para proceder al montado y fijado de los ovocitos. En todos los casos, los controles utilizados consistieron en el agregado del solvente de cada compuesto en la gota de co-incubación.

Para determinar la cantidad de hrNAG a utilizar en los ensayos biológicos se trazó una curva dosis respuesta. Esta indicó un EC50 de 0.011 UI, cantidad utilizada posteriormente en los ensayos (Figura 8).

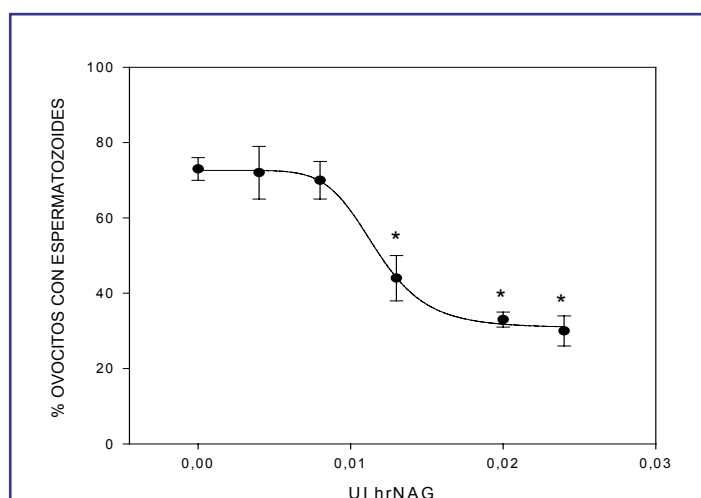


Figura 8. Curva dosis-respuesta del efecto de la hrNAG en la unión de gametas.

Ovocitos y espermatozoides capacitados fueron co-incubados en ausencia (control) o presencia de distintas concentraciones de hrNAG. Luego de 45 minutos los ovocitos fueron lavados, fijados y montados para determinar el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos. *:p<0.05 vs. control.

Preincubación de espermatozoides con GlcNAc ó hrNAG

Espermatozoides fueron pre-incubados con GlcNAc (1mM ó 10mM) ó con hrNAG (0.011 UI). Estos compuestos fueron agregados al pocillo de capacitación a las 2 hs. 15 min. después del comienzo de la incubación. Luego de 30 min., 2.5ml de suspensión de espermatozoides fueron centrifugados a 600xg durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 10ml de medio fresco y centrifugado nuevamente. Este último pellet fue resuspendido en un volumen final de 1ml. Como control, la suspensión fue sometida a una manipulación similar, pero sin el agregado de ningún compuesto. Este procedimiento de

lavado fue diseñado para garantizar que la concentración final de GlcNAc ó hrNAG remanente estuviera por debajo de la dosis mínima efectiva. Finalmente, los espermatozoides preincubados se agregaron a gotas conteniendo ovocitos sin pre-incubar y el ensayo de unión se continuó como se describió previamente.

Preincubación de ovocitos con GlcNAc o con hrNAG

Los ovocitos, mantenidos en sal y lavados, fueron colocados en gotas conteniendo GlcNAc (10 mM) ó hrNAG (0.011 UI) por 30 min. Luego de lavarlos durante 15 min. por pasaje a través de 5 gotas de medio, se agregaron los espermatozoides y se completó el ensayo de unión siguiendo el procedimiento ya descrito.

Determinación de reacción acrosomal sobre zona pelúcida

Ovocitos mantenidos en solución salina fueron lavados e incubados con espermatozoides capacitados (500.000 células/ ml) durante 5 min. Luego se pasaron a gotas de medio sin espermatozoides y se incubaron por 2 horas más. A distintos tiempos se tomaron algunos ovocitos, se colocaron en portaobjetos con gotas de parafina/vaselina (7:3) en los extremos (para evitar el aplastamiento al colocar el cubreobjetos), y se observaron al microscopio óptico (200X). Se determinó el estado acrosomal de los espermatozoides motiles unidos a la ZP (Uto *et al.*, 1988).

En los experimentos controles y el análisis del medio modificado con Sr^{2+} , tanto la capacitación como la co-incubación fueron realizadas en el mismo medio (TALP ó TALP- Sr^{2+} respectivamente). Para determinar si los espermatozoides incubados en medio con Sr^{2+} podían sufrir la RA sobre la ZP cuando se les proveía Ca^{2+} en el momento, la capacitación de los espermatozoides se hizo utilizando TALP- Sr^{2+} y la co-incubación se realizó en medio completo (TALP). Para el análisis del efecto de GlcNAc sobre la RA sobre la ZP, este monosacárido (1mM GlcNAc) estuvo presente durante la co-incubación en medio TALP.

Ensayos de fertilización in vitro (FIV)

En gotas de 50 μl de medio TALP-conteniendo 10-15 ovocitos frescos se agregaron espermatozoides previamente capacitados por 3 hs. (concentración final 70.000 espermatozoides/ml) (Bavister, 1989). Luego de una co-incubación de 3 horas a 37°C en 5% CO_2 , los ovocitos fueron pasados por gotas con 1% azida sódica, TALP y TALP-formaldehído 0,1%. Después de la fijación, los ovocitos fueron lavados y teñidos con Hoechst 33342 (Sigma), para facilitar la visualización de los espermatozoides. Para esto, los ovocitos se colocaron en una gota de colorante Hoechst (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 2.3% citrato: etanol 3:1) por 6-8 min, luego fueron lavados en citrato:etanol y colocados sobre portaobjetos con gotas de vaselina:parafina (7:3) en cada esquina. Después de aspirar el líquido transferido junto con los ovocitos, se agregaron 25 μl de solución de montado

(glicerol 9:1 en 2.3% citrato de sodio) conteniendo 20 mg/ml de N-propilgalato, Sigma). Por observación (aumento 200X) bajo microscopio equipado con óptica para epifluorescencia (Nikon Optiphot, filtro: 330nm–380nm) se determinó tanto la presencia como el número de espermatozoides penetrados por ovocito. Se clasificaron como "penetrados" aquellos ovocitos que presentaban cabezas decondensadas en el ooplasma (Figura 9).

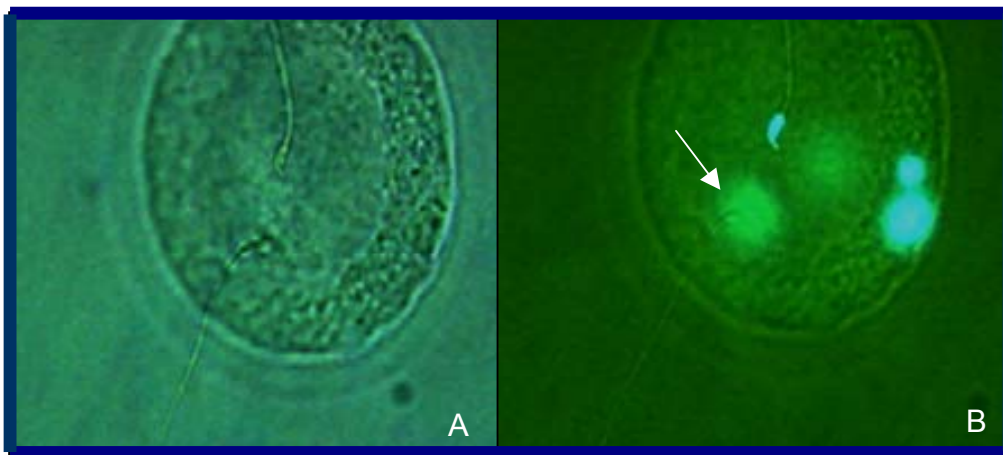


Figura 9. Fertilización *in vitro*.

Ovocitos y espermatozoides de hámster fueron co-incubados durante 3 hs., lavados y teñidos con Hoechst. Panel A: ovocito con 2 espermatozoides, campo claro. Panel B: la imagen fluorescente permite observar la cabeza decondensada de uno de los espermatozoides (flecha).

Para comparar el efecto de distintos compuestos en la unión y en la penetración en el mismo ensayo, se registró también en estos ovocitos, el número total de espermatozoides, es decir los penetrados (decondensados) más los unidos (totales).

Para disecar en cual de las etapas del proceso de interacción espermatozoide-ZP estaba involucrada la NAG, distintos compuestos fueron

agregados en diferentes momentos de la incubación. Por un lado, estuvieron presentes durante todo el período de co-incubación de gametas (3hs., constante). Para diferenciar la penetración de la unión primaria, el agente se agregó 45 min. después del comienzo de la co-incubación de las gametas (adición), momento en que la unión primaria tuvo lugar. Alternativamente, a los 45 min. los ovocitos fueron transferidos a gotas sin espermatozoides con el agente (transferencia) o sin el mismo (control de transferencia).

Los compuestos utilizados en los ensayos de FIV fueron inhibidores y ligandos de NAG (1mM Lactona, 1mM GlcNAc) y NAG recombinante humana (0.011 UI).

Activación de ovocitos

Ovocitos frescos fueron activados utilizando dos estrategias diferentes. Por un lado se realizó una incubación previa en medio TALP-Sr²⁺, ya que este ion es capaz de inducir la activación (Fraser, 1987b). Como alternativa, los ovocitos fueron tratados con ionóforo de Calcio A23187 (10uM) en TALP común (Miller *et al.*, 1993b). Estos tratamientos fueron hechos en presencia o ausencia de GlcNAc ó Lactona 1mM. En ambos casos, los ovocitos fueron incubados por 30 min. a 37°C en estufa gaseada, lavados en TALP (3 veces por 5 minutos) y utilizados para ensayos de FIV en condiciones control. Una vez finalizado el ensayo, se realizó la tinción con Hoechst para determinar la activación de los ovocitos por visualización de 2 pronúcleos en el oolema.

Efecto de la zona pelúcida soluble sobre la actividad de NAG

Ovocitos guardados en solución salina fueron lavados durante 1 hora por pasaje a gotas con medio TALP-HEPES. Luego se colocaron en un volumen muy pequeño (10ul) de ácido acético 10% con observación continua bajo lupa. Cuando las ZP ya no fueron visibles (aproximadamente después de 5 min.) se removieron los oolemas. El líquido conteniendo la ZP soluble fue diluido 30 veces con TALP (concentración final 300 ZP/ ml) y esta solución se mantuvo a -20°C hasta su uso. Cantidades crecientes de ZP soluble (0-33 ZP/ml) fueron incluidas en ensayos de actividad utilizando espermatozoides como fuente de enzima. El buffer utilizado para la solubilización de las ZP y diluido de igual manera en TALP fue usado como control.

Actividad de NAG de espermatozoides durante la capacitación, ruptura acrosomal inducida y reacción acrosomal espontánea

Alícuotas de espermatozoides fueron tomadas a diferentes tiempos de incubación en condiciones capacitantes. Luego de centrifugar a 600xg durante 5 min. se separó el medio de capacitación (sobrenadante, SN) y el pellet de espermatozoides (P) que fue resuspendido en un volumen igual de medio. Se midió la actividad de NAG en cada uno de estos extractos. En cada caso se tomó una alícuota de la suspensión original para medir la RA.

Por otro lado, espermatozoides frescos o incubados por 1.5 hs en condiciones capacitantes fueron sometidos a distintos tratamientos para producirles la ruptura del acrosoma. La suspensión fue congelada a -20°C ó tratada con ionóforo de Calcio (A23187, 10 μM final) por 90 min. ó sin tratamiento (control). Luego de los tratamientos se midió la actividad de NAG en la suspensión.

Obtención de extractos de espermatozoides

Los espermatozoides fueron resuspendidos en distintos medios de extracción: hipotónico (10 mM Tris, pH=7.4), isotónico (SWM ó 10mM Tris, 0.15M NaCl) ó hipertónico (SWM ó 10mM Tris, 0.5M NaCl). Además se utilizaron estos mismos medios con al agregado de 0.1 % Triton X100. Los espermatozoides fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 min. ó congelados. Luego de una centrifugación a 600xg durante 5 min. se separó el extracto (SN) de las células (P) y se midió la actividad de NAG en ambas fracciones. El efecto de los distintos tratamientos en la integridad celular fue verificado determinando el porcentaje de reacción acrosomal en cada caso. En todos los casos los buffers fueron suplementados con un cóctel de inhibidores de proteasas (5mM Benzamidina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatina A, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptina y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bestatina).

Análisis de la presencia de un modulador de NAG

Para analizar la presencia de un modulador de NAG en las células o en el medio luego de la reacción acrosomal, el P o SN obtenido luego de incubar a los espermatozoides por 5 hs. fue agregado a espermatozoides frescos (EF, utilizados como fuente de enzima). Alícuotas de P o SN equivalentes a la misma cantidad de espermatozoides (15-20ul) fueron utilizadas. Luego, se midió la actividad en las muestras individuales (EF, P y SN) y en las muestras combinadas (EF + P y EF + SN). Los resultados se expresaron como la actividad relativa al control (actividades individuales sumadas).

Para analizar la naturaleza química del modulador de NAG, el extracto activo fue calentado a 100°C por 15 min. o dializado utilizando una membrana con valor de corte de 12 kD. Tanto el extracto original como los tratados fueron agregados a espermatozoides frescos. La actividad de NAG fue medida en las muestras individuales y combinadas, y expresada en relación al control (suma de actividades individuales).

Expresión de los resultados

En las curvas de pH y dosis respuesta, los extractos de espermatozoides y los experimentos de ruptura acrosomal, la actividad enzimática se expresó en unidades arbitrarias (unidades de fluorescencia, UF) asignadas por la señal del fluorímetro. La actividad total luego de la centrifugación de muestras de

espermatozoides, fue considerada como las UF del P mas el SN. En los experimentos donde se analizó la actividad de NAG en el transcurso de la incubación de los espermatozoides, los resultados fueron expresados como UF/10⁶ espermatozoides/hs. Otros resultados fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides reaccionados (%RA); el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el porcentaje de ovocitos activados ó penetrados. En algunos casos, los resultados fueron normalizados respecto a los valores control, considerando estos últimos como 100%. El porcentaje de inhibición se calculó como: $((\text{control}-\text{tratado})\times 100)/\text{control}$. Los resultados presentados en los gráficos representan el promedio \pm error estándar (ES) de 3-12 experimentos individuales. Para asumir distribución normal de las muestras, los datos fueron transformados según el arcoseno de la raíz cuadrada. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test t para las comparaciones simples y los tests de Tukey o Dunnett's para las comparaciones múltiples. Los análisis de correlación fueron realizados con el test de Pearson, luego de verificar la distribución normal de los datos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Graph Pad.

RESULTADOS

CAPITULO I

Participación de la GlcNAc en la interacción de gametas de hámster

La GlcNAc participa en la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida

Con el objeto de analizar que azúcares estaban involucrados en la interacción del espermatozoide de hámster con la ZP, se llevaron a cabo ensayos de unión *in vitro*. Ovocitos de hámster mantenidos en solución salina fueron incubados en presencia de diferentes monosacáridos (1mM) con espermatozoides previamente capacitados. De todos los monosacáridos evaluados solo la GlcNAc fue capaz de afectar significativamente la unión espermatozoide-ZP (Figura 9).

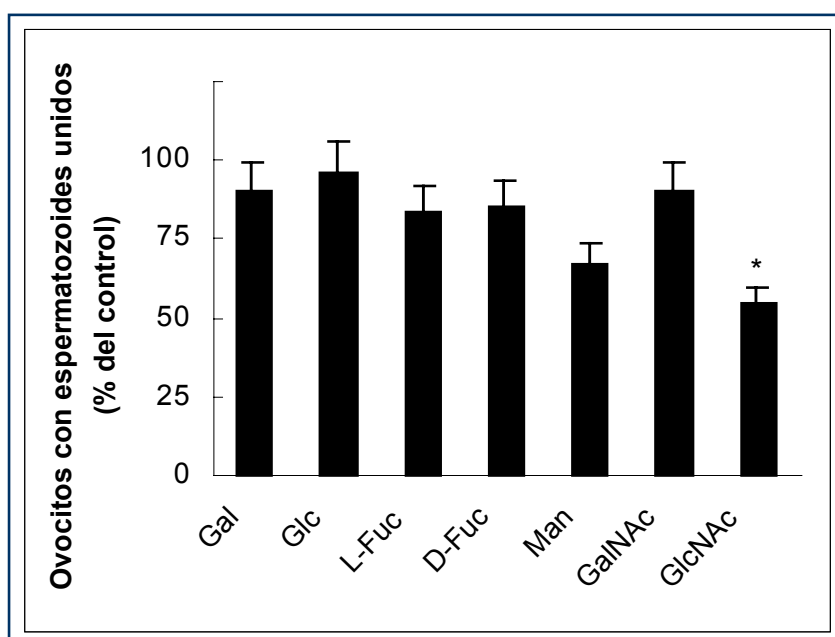


Figura 9. Efecto de distintos monosacáridos en la unión entre el espermatozoide y la ZP.

Ovocitos y espermatozoides fueron co-incubados en presencia de 1mM de: galactosa (Gal), glucosa (Glc), D-fucosa (D-Fuc), L-fucosa (L-Fuc), manosa (Man), N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc). Luego se determinó el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los resultados fueron relativizados al control, considerado como 100%, y los valores representan la media \pm ES de 3-12 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. 100.

El número de espermatozoides por ovocito se redujo en un $67\pm 5\%$ respecto del control, y el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos un $38\pm 6\%$. La especificidad de la inhibición producida por la GlcNAc fue comprobada por la falta de efecto de los otros azúcares.

Para verificar la especificidad del efecto observado sobre el evento en estudio (unión del espermatozoide a la ZP), se analizó si la GlcNAc estaba afectando algún parámetro funcional de los espermatozoides. La motilidad no se vio afectada aún utilizando concentraciones mayores de éste monosacárido (50mM) ó tiempos de incubación más largos. La reacción acrosomal, en cambio, se encontró inhibida tanto a los 30 min. como 3hs. después del agregado de GlcNAc a espermatozoides capacitados (Tabla 2) ($57\pm 5\%$ y $80\pm 3\%$ de inhibición, respectivamente). Este efecto también demostró ser específico de la GlcNAc, ya que los otros monosacáridos dieron resultados similares al control.

Tabla 2. Efecto de distintos monosacáridos sobre la RA espontánea.

Monosacárido	Reacción acrosomal (% del control)	
	30 min.	3 hs.
Galactosa	96 ± 6	95 ± 2
Glucosa	105 ± 7	93 ± 3
D-Fucosa	92 ± 8	96 ± 2
L-Fucosa	96 ± 14	99 ± 3
Manosa	107 ± 3	98 ± 2
GalNAc	92 ± 9	91 ± 3
GlcNAc	35 ± 4 *	47 ± 7 *

Luego de la incubación de los espermatozoides durante 3 hs. en condiciones capacitantes, se agregaron los distintos monosacáridos en concentración 1mM. La RA se cuantificó 30min. y 3hs. más tarde. Los resultados fueron normalizados respecto del control, considerado como 100%, y representan la media de 3 a 11 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. 100.

El estroncio puede reemplazar al calcio en la capacitación

La inhibición de la RA espontánea por GlcNAc introdujo un factor que podría interferir o enmascarar el resultado del ensayo. Con el fin de independizarnos de este efecto secundario del azúcar, buscamos condiciones donde la RA no se produjera. Para ello, probamos un sistema previamente utilizado por nosotros en humanos, donde al reemplazar al calcio (Ca^{2+}) del medio (ión absolutamente necesario para que se produzca la RA) por estroncio (Sr^{2+}), los espermatozoides son capaces de capacitarse y de unirse a la ZP, pero no de sufrir la reacción acrosomal (Marín-Briggiler *et al.*, 1999). Analizamos

entonces si los espermatozoides de hámster podían capacitarse en un medio donde el Ca^{2+} fuera reemplazado por Sr^{2+} . Una vez verificado que esta modificación no afectó la motilidad de los espermatozoides ni la aparición del patrón hiperactivado, evaluamos la RA en función del tiempo. Al incubar a los espermatozoides en medio con Ca^{2+} (control), el porcentaje de espermatozoides reaccionados comenzó a aumentar luego de 2.5 hs., momento en que los espermatozoides se consideran capacitados. A partir de entonces los espermatozoides comienzan a sufrir la RA de manera asincrónica, hasta llegar a un máximo de 80-90% a las 5-6 hs. (Figura 10).

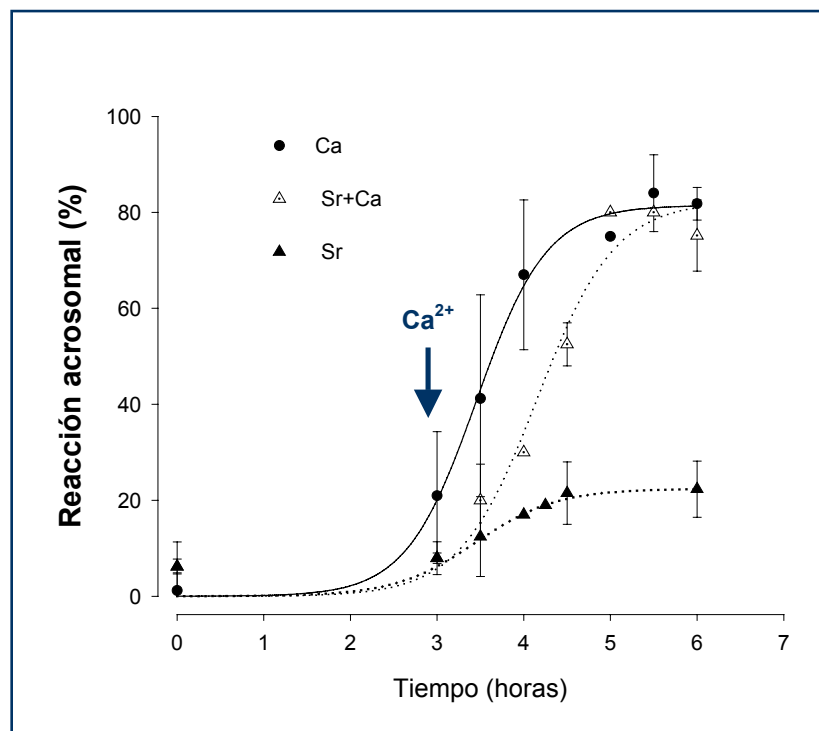


Figura 10. Capacitación y reacción acrosomal: requerimiento de iones divalentes.

La RA fue evaluada a distintos tiempos en espermatozoides incubados durante un período total de 6hs. en: TALP control (Ca: -●-), TALP modificado con Sr^{2+} (Sr: -▲-), o TALP-Sr suplementado con Ca^{2+} a las 3hs. (Sr+Ca, -△-). La flecha indica el momento del agregado de Ca^{2+} en este último tratamiento. Los resultados representan el porcentaje de RA promedio \pm ES de 6 a 30 experimentos.

Cuando el Ca^{2+} del medio fue reemplazado por Sr^{2+} , el porcentaje de RA no se diferenció de los valores basales en ningún momento. Sin embargo, hasta aquí no podíamos saber si los espermatozoides incubados en medio con Sr^{2+} no estaban capacitados, o lo estaban pero no podían reaccionar en este medio. Para diferenciar entre estas dos posibilidades, a espermatozoides incubados en Sr^{2+} les agregamos Ca^{2+} a las 2.5 hs, de manera que si estos espermatozoides estuvieran capacitados, el agregado de Ca^{2+} les permitiría reaccionar. En estas condiciones, los espermatozoides fueron capaces de sufrir la RA espontánea llegando a valores similares al control y con la misma cinética. Este efecto no fue debido a la mayor concentración total de iones, ya que el agregado de Sr^{2+} en lugar de Ca^{2+} a estos mismos espermatozoides no fue capaz de producir ningún efecto.

Para confirmar que los espermatozoides incubados en Sr^{2+} estaban capacitados, decidimos analizar otros parámetros usualmente asociados con este evento.

La fosforilación en tirosina es similar en espermatozoides incubados en calcio o estroncio

En el hámster, así como en todos los mamíferos analizados hasta la fecha, la capacitación de los espermatozoides está relacionada con un aumento en la fosforilación en tirosina de un grupo de proteínas (Galantino-Homer *et al.*, 1997; Duncan and Fraser, 1993; Visconti *et al.*, 1995a; Visconti *et al.*, 1995b;

Luconi *et al.*, 1996; Naz, 1999; Jha and Shivaji, 2002; Marquez and Suarez, 2004; Mitra and Shivaji, 2004; Naz and Rajesh, 2004; Dube *et al.*, 2005). Aunque esto no es sinónimo de capacitación, es un requisito para que la misma ocurra. Por lo tanto, si el Sr^{2+} puede reemplazar al Ca^{2+} durante la capacitación, debería ser capaz de sostener el aumento de fosforilación en tirosina que acompaña este proceso. Para analizar este punto, se incubaron los espermatozoides en medio con Ca^{2+} ó Sr^{2+} y se tomaron alícuotas de los mismos a tiempo cero y a los noventa minutos. Extractos proteicos de estas células fueron analizados por inmunoblot con anti-fosfotirosina. Como puede verse en la figura 11, los espermatozoides de hámster incubados en medio con Ca^{2+} ó Sr^{2+} presentaron un patrón similar de fosforilación.



Figura 11. Fosforilación en tirosina en espermatozoides incubados con Ca^{2+} ó Sr^{2+} .

Proteínas de espermatozoides de hámster sin capacitar (T_0) ó incubados durante 90 min. en medio con Ca^{2+} (Ca) ó con Sr^{2+} (Sr), fueron analizadas por inmunoblot con anti-fosfotirosina.

El patrón de tinción con Clortetraciclina es similar en espermatozoides capacitados en calcio ó estroncio

La clortetraciclina (CTC) es un quelante fluorescente de cationes divalentes que aumenta su emisión cuando se une a estos iones. Es utilizado para determinar la presencia de Ca^{2+} unido a la membrana (Smolen *et al.*, 1983), y en espermatozoides se pueden distinguir diferentes patrones de tinción. Inicialmente se observa una marca uniforme en toda la célula, característica de espermatozoides no capacitados. La incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes ha sido correlacionada con la aparición de una señal diferente, el patrón de tinción B, caracterizado por la desaparición de la señal en la región post-acrosomal.

Considerando que el CTC también puede unir Sr^{2+} (Heffner *et al.*, 1980), quisimos analizar si este ión era capaz de producir esta modificación asociada con la capacitación. Los espermatozoides fueron incubados en medios con Ca^{2+} ó Sr^{2+} y teñidos con CTC al comienzo y después de 3hs. de incubación. Como se puede observar en la figura 12, la proporción de células con patrón B fue similar en medio con Ca^{2+} ó Sr^{2+} .

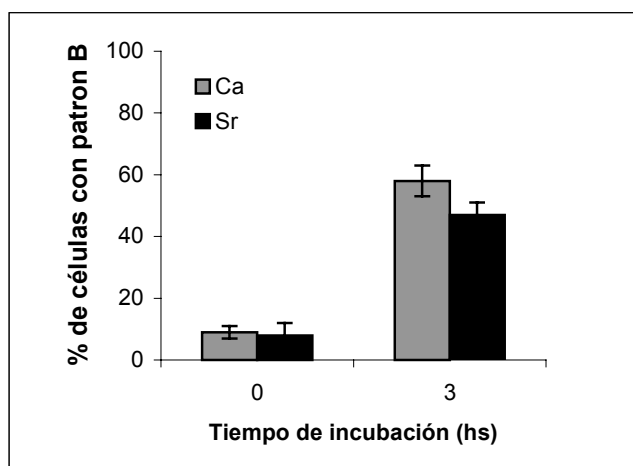


Figura 12. Aparición de patrón B de tinción con CTC en espermatozoides capacitados en distintos medios.

Espermatozoides de hámster fueron teñidos con CTC antes (0) o después (3) de la incubación en medio de capacitación control (Ca) o reemplazado con estroncio (Sr). Los resultados se expresaron como la proporción de células con patrón de tinción tipo B.

El estroncio es capaz de sostener la unión entre gametas

Entre los cambios que tienen lugar durante la capacitación, se asume que los que ocurren a nivel de membrana permiten que se expongan y/o se vuelvan funcionales las moléculas que median la unión a la ZP (Medeiros and Parrish, 1996; Kinsey and Koehler, 1978; Schwarz and Koehler, 1979; Focarelli *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1996).

Además, la unión a la ZP *per sé* requiere de la presencia de Ca^{2+} en el medio. Por este motivo, analizamos si los espermatozoides incubados en Sr^{2+} podían unirse a la ZP y, mas aún, si este ión era capaz de sostener la unión. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13 e indican que la unión a la ZP en medio con Sr^{2+} y utilizando espermatozoides capacitados en Sr^{2+} es

indistinguible de la que ocurre en condiciones control (cuando se utiliza Ca^{2+} en ambos procesos).

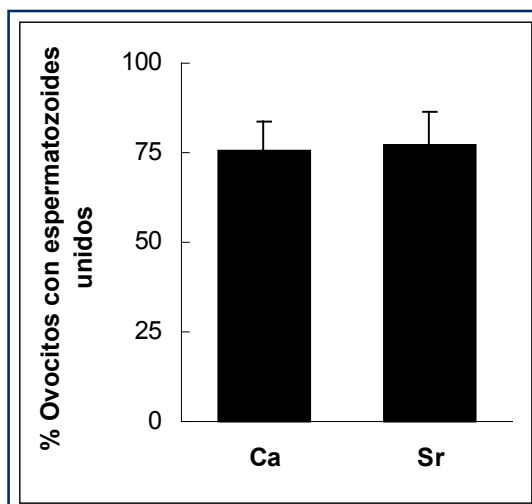


Figura 13. Unión a ZP en medio reemplazado con Sr^{2+} .

Los espermatozoides fueron capacitados en TALP (Ca) o TALP modificado con Sr^{2+} (Sr) y luego utilizados en ensayos de unión a ZP en el mismo medio. Luego de 45 min. los ovocitos fueron lavados y fijados. Los resultados muestran el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos a la ZP como promedio \pm ES de 5-6 experimentos.

Reacción acrosomal sobre la zona pelúcida

Aunque en el hámster la RA espontánea puede ser considerada un evento fisiológico, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, aquella que tiene lugar en la ZP es la mejor indicadora del evento real que sufre un espermatozoide fertilizante. Por lo tanto, si el Sr^{2+} puede reemplazar al Ca^{2+} durante la capacitación, un espermatozoide capacitado en este medio debería poder sufrir la RA al entrar en contacto con la ZP. Para analizar esto,

observamos la ocurrencia de la RA en los espermatozoides unidos a la ZP. Como puede verse en la figura 14, en condiciones control (Ca), la RA sobre la ZP aumenta significativamente a los 60 min. de co-incubación. Por el contrario, cuando todos los procedimientos se llevaron a cabo en medio con Sr^{2+} , la RA se mantuvo en los niveles basales aun después de 2 hs. de co-incubación (Figura 14, Sr). En cambio, cuando a los espermatozoides capacitados en Sr^{2+} se los co-incubó con los ovocitos en presencia de Ca^{2+} , la reacción acrosomal sobre la ZP llegó a los mismos valores del control (Figura 14, Sr/Ca).

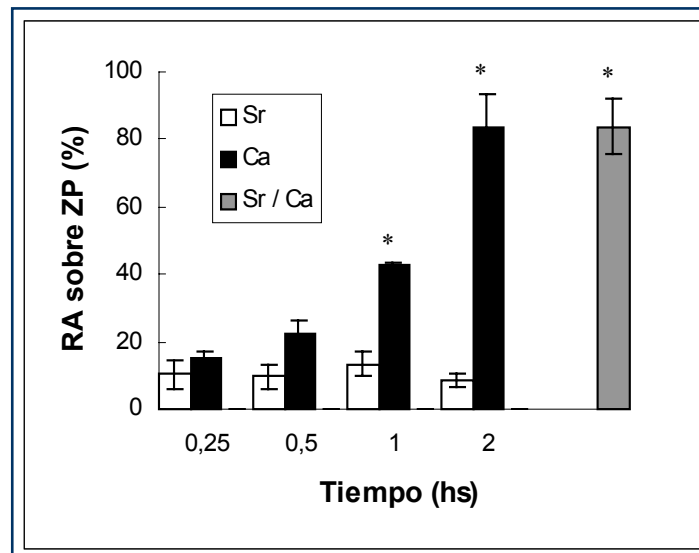


Figura 14. Reacción acrosomal sobre la ZP: requerimiento de iones divalentes.

Espermatozoides capacitados en medio TALP control (Ca) o TALP reemplazado con Sr^{2+} (Sr), fueron incubados en el mismo medio con ovocitos (mantenidos en solución salina). Luego de 5 min., se removieron los espermatozoides débilmente unidos por pipeteo y los ovocitos fueron colocados en medio sin espermatozoides por 2 hs. más. A distintos tiempos se tomaron algunos ovocitos, se montaron, y se observó el estado acrosomal de los espermatozoides motiles unidos a la ZP. La barra gris representa a los espermatozoides capacitados en Sr^{2+} y colocados en medio con Ca^{2+} para la co-incubación (Sr/Ca). Los resultados representan la media \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. 15 min.

La GlcNAc afecta la unión espermatozoide-zona pelúcida en ausencia de reacción acrosomal

Una vez que comprobamos que el reemplazo del Ca^{2+} por Sr^{2+} en el medio nos permitía separar los eventos de unión y RA, reevaluamos el efecto de la GlcNAc. Al llevar a cabo los ensayos de unión a ZP en medio con Sr^{2+} y en presencia de este monosacárido (1mM), volvimos a observar el efecto inhibitorio en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos ($67 \pm 13\%$ de inhibición), figura 15.

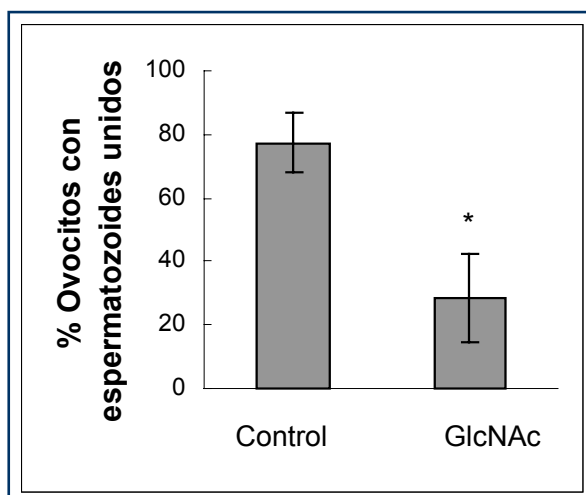


Figura 15. Inhibición de la unión espermatozoide-ZP por GlcNAc en medio reemplazado con Sr^{2+} .

Espermatozoides capacitados en TALP-Sr fueron incubados con ovocitos en el mismo medio en presencia (GlcNAc) o ausencia (Control) de GlcNAc 1mM. Luego de 45 min., los ovocitos fueron lavados, fijados y montados. Los resultados fueron expresados como el porcentaje promedio \pm ES de 4-5 experimentos *: $p < 0.05$ vs. control.

Al hacer este mismo ensayo en presencia de cantidades crecientes de monosacárido, determinamos que la dosis mínima de GlcNAc necesaria para

producir el efecto inhibitorio en la unión era 1mM (Figura 16).

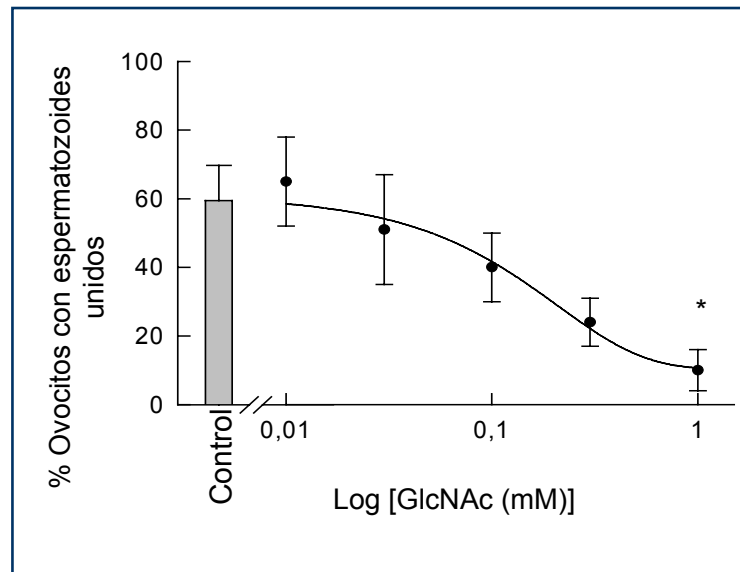


Figura 16. Curva dosis respuesta del efecto de GlcNAc en la unión espermatozoide-ZP.

Espermatozoides capacitados en TALP-Sr fueron utilizados para ensayos de unión en el mismo medio en presencia de distintas concentraciones de GlcNAc. Los resultados representan el promedio \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. control sin azúcar.

La pre-incubación de los espermatozoides con GlcNAc reproduce el efecto inhibitorio

El efecto inhibitorio de la GlcNAc en la unión espermatozoide-ZP se debería a la interacción del azúcar con los receptores de una de las gametas impidiendo la unión con la otra. Para determinar sobre cual de las gametas estaba actuando la GlcNAc, pre-incubamos a cada una con el azúcar, las lavamos y las utilizamos en ensayos de unión en condiciones control. Únicamente la pre-incubación de los espermatozoides con GlcNAc fue capaz de

reproducir el efecto inhibitorio (Figura 17). Es interesante notar que en este caso debimos utilizar una mayor concentración de azúcar (10mM) para obtener un efecto significativo. El procedimiento de lavado se diseñó para que la concentración de GlcNAc remanente durante la co-incubación estuviera por debajo de 0,03mM, condiciones en las que el azúcar no produce un efecto inhibitorio por si mismo (Figura 16).

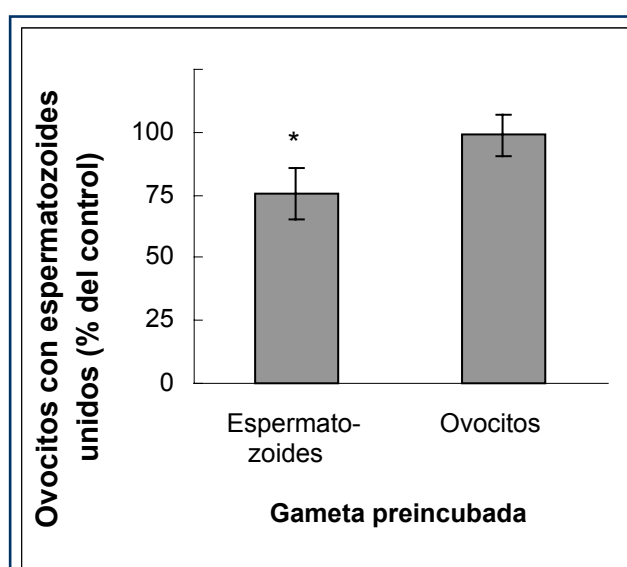


Figura 17. Pre-incubación de gametas con GlcNAc.

Espermatozoides capacitados u ovocitos fueron pre-incubados con GlcNAc 10mM durante 30 min. Luego del lavado, fueron co-incubados en condiciones control con la gameta contraria sin tratamiento previo. Los resultados muestran el promedio \pm ES de 3 a 6 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. 100.

Efecto de la GlcNAc en la fertilización in vitro

Hasta aquí sabemos entonces que la GlcNAc participa en la unión primaria. Sin embargo, en ratón se ha descrito que este azúcar está relacionado

con la penetración de la ZP. Para analizar si la GlcNAc estaba involucrada en más de uno de los varios eventos comprendidos en la fertilización, se realizaron ensayos de fertilización *in vitro* (FIV). Para ello, ovocitos frescos se incubaron con espermatozoides capacitados en presencia o no de GlcNAc. Al cabo de 3 hs. de co-incubación, se determinó la proporción de ovocitos que habían sido penetrados (presencia de espermatozoides fusionados).

Cuando la GlcNAc estuvo presente durante el ensayo de co-incubación, se observó una inhibición específica y significativa en la proporción de ovocitos penetrados ($92 \pm 8\%$, Figura 18).

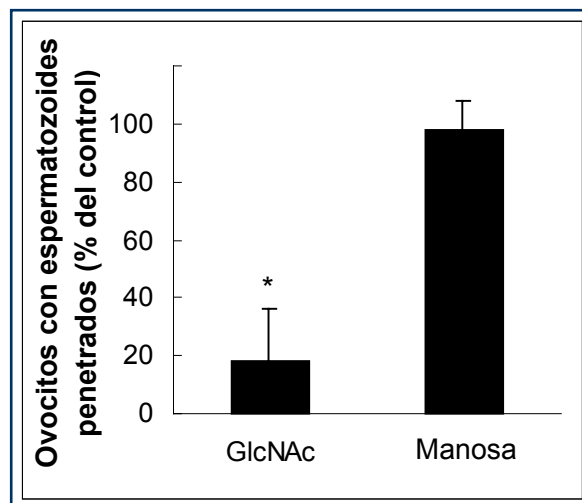


Figura 18. Efecto de GlcNAc en la fertilización *in vitro*.

Espermatozoides capacitados fueron incubados con ovocitos frescos en condiciones normales (control) o en presencia de 1 mM GlcNAc o Manosa. Luego de 3 hs. de co-incubación los ovocitos fueron lavados, fijados y teñidos con Hoechst 33342, según se describió en materiales y métodos. Los resultados se expresaron como el porcentaje de ovocitos penetrados y fueron normalizados con respecto al control (considerado como 100%). Los números representan la media \pm ES de 3 a 5 experimentos. *: $p < 0.05$. vs 100.

La magnitud del efecto producido por la GlcNAc en la FIV parecía mayor que el observado en los ensayos de unión. Para confirmarlo, comparamos la inhibición producida por GlcNAc en ambos eventos (unión y penetración) en los mismos ovocitos. Para ello, luego de la FIV registramos el número total de espermatozoides asociados a los ovocitos (unión) o solo los fusionados (penetración). Como se puede observar de la tabla 3, la inhibición producida por GlcNAc es significativamente mayor en la penetración que en la unión. Esto estaría indicando que la GlcNAc participa en algún otro evento del proceso de fertilización además de la unión primaria.

Tabla 3. Comparación del efecto de la GlcNAc en unión y penetración.

	% Inhibición por GlcNAc	
	Unión	Penetración
% Ovocitos con espermatozoides	36 ± 11	66 ± 11 *
Número de espermatozoides por ovocito	58 ± 11	75 ± 9 *

Luego del ensayo de FIV en ausencia o presencia de GlcNAc se cuantificó la unión y la penetración según se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio ± ES de 13 experimentos. *: p< 0.05 vs. unión.

Considerando que este azúcar no inhibe la fusión entre gametas (Ahuja, 1982; Ponce *et al.*, 1994), algún otro paso relacionado específicamente con la interacción entre el espermatozoide y la ZP debería estar siendo afectado.

Para analizar la interacción más allá de la unión primaria, agregamos la GlcNAc luego de 45 minutos de co-incubación, tiempo en el que los espermatozoides ya están unidos a la ZP. Además, utilizamos dos variantes: en la primera, la GlcNAc se agregó a la gota de co-incubación (adición). En la otra, los ovocitos fueron pasados a una gota sin espermatozoides pero con azúcar (transferencia). Para este último tratamiento se incluyó un control adicional en el que los ovocitos fueron transferidos a una gota sin espermatozoides ni azúcar (control transferencia, Figura 19).

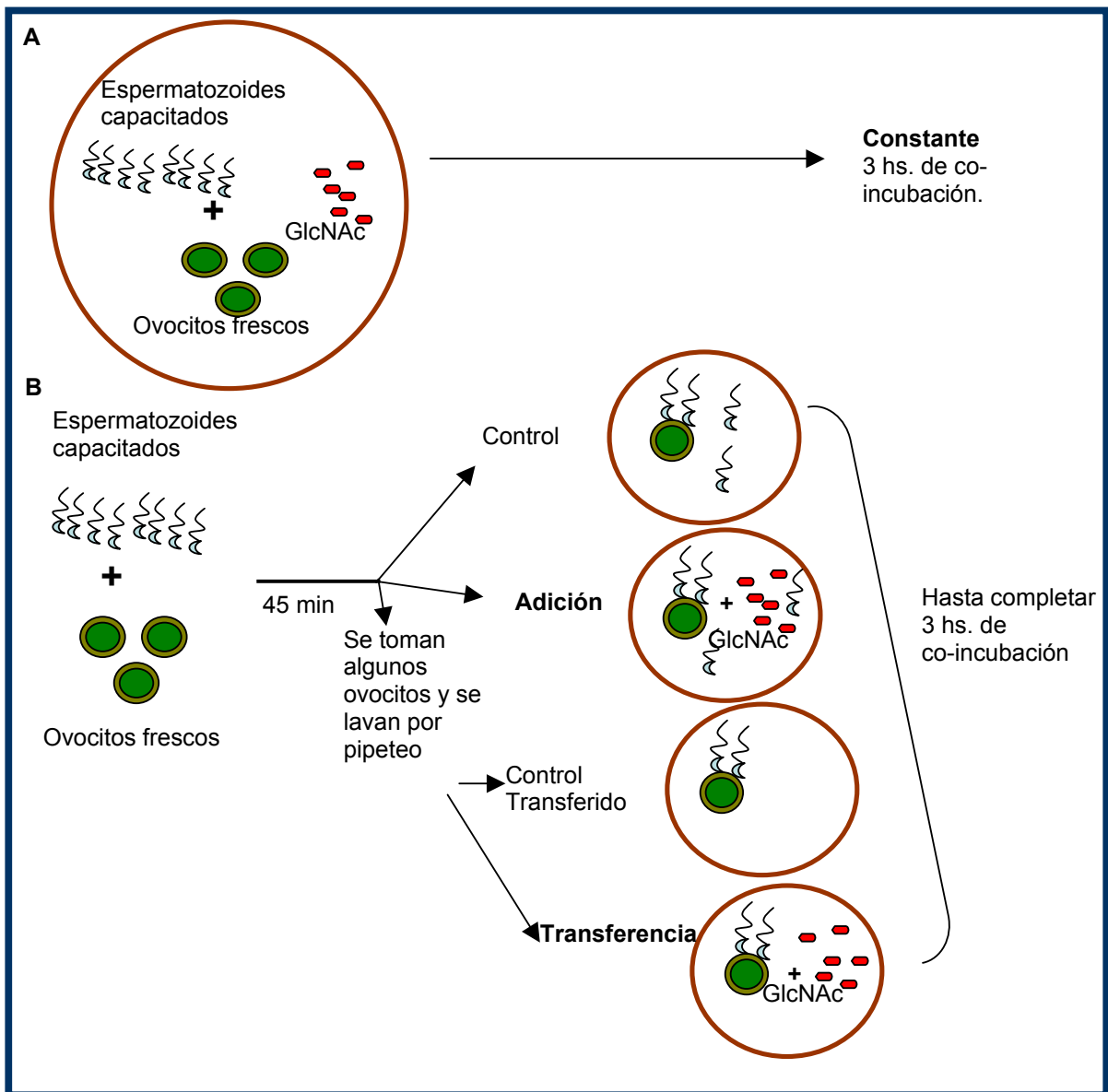


Figura 19. Esquema representativo de las estrategias utilizadas para analizar el efecto de la GlcNAc en los distintos pasos de la FIV.

- **Constante:** los espermatozoides fueron co-incubados con los ovocitos en presencia de GlcNAc 1mM durante todo el ensayo.
- **Adición:** luego de 45 min. de co-incubación sin azúcar, se agregó 1mM de GlcNAc a la gota.
- **Transferencia:** Luego de 45 min. de co-incubación en ausencia del azúcar, los ovocitos fueron transferidos a una gota sin espermatozoides conteniendo o no GlcNAc 1mM.

Solo la presencia de GlcNAc durante todo el ensayo de fertilización fue capaz de producir un efecto significativo (Figura 20, panel A). Estos resultados sugieren que la GlcNAc no estaría afectando la penetración de la ZP.

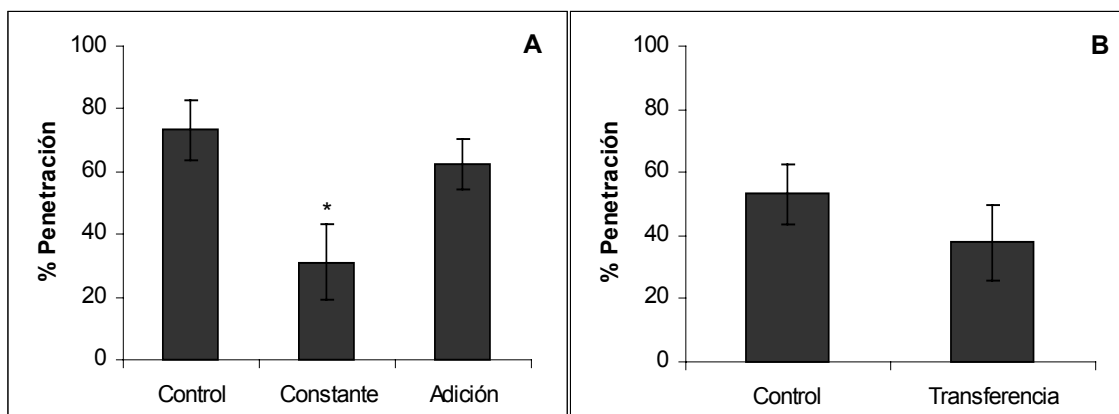


Figura 20. Efecto de GlcNAc en los distintos pasos de la interacción espermatozoide-ZP.

Se realizaron ensayos de FIV en distintas condiciones (Figura 19): Panel A: Ausencia (Control) o presencia de GlcNAc durante todo el período de co-incubación (Constante) o luego de 45 min. de comenzada la co-incubación (Adición). Panel B: Luego de 45 min. de incubación en condiciones control, los ovocitos fueron pasados a gotas de medio sin espermatozoides en ausencia (Control) o presencia de GlcNAc (Transferencia). Los resultados se expresaron como el porcentaje de ovocitos penetrados y representan el promedio \pm ES de 4 experimentos.

*: $p < 0.05$ vs. control.

La GlcNAc no afecta la reacción de zona

Cuando el primer espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, se desencadenan una serie de procesos que en conjunto se denominan activación. Entre los primeros eventos que tienen lugar, se excitan los gránulos corticales (reacción cortical) y su contenido es liberado al espacio perivitelino, modificando las características de la ZP en lo que se ha denominado

reacción de zona (Yanagimachi, 1994).

En ratón se ha propuesto que una N-acetilglucosaminidasa (NAG) liberada con la reacción cortical, modifica los residuos GlcNAc de la ZP y de esta manera la hace impenetrable por otros espermatozoides (Miller *et al.*, 1993b). La presencia de la GlcNAc durante todo el ensayo de FIV podría estar inhibiendo a esta enzima y con ello la reacción de zona. Si esto fuera así, un efecto del azúcar en la penetración podría estar enmascarado. Es decir, aunque la GlcNAc redujera el número de espermatozoides capaces de penetrar la ZP, la ausencia de reacción de zona permitiría que más espermatozoides sigan penetrando. Como resultado, podría no notarse diferencia con el control. Para descartar esta posibilidad, decidimos analizar si la GlcNAc afectaba la reacción de zona.

Ovocitos frescos fueron activados, por incubación en medio con Sr^{2+} , en presencia o ausencia de GlcNAc, y luego se utilizaron en ensayos de FIV bajo condiciones control. El método utilizado fue eficiente para producir activación, como pudo observarse por la presencia de dos pronúcleos femeninos (característicos de ovocitos activados). Además, el porcentaje de ovocitos activados fue similar en presencia del monosacárido (Ca: $8 \pm 2\%$; Sr: $79 \pm 9\%$ y Sr+GlcNAc: $79 \pm 21\%$ de activación). Por otro lado, el bloqueo de la penetración también demostró que los ovocitos fueron eficientemente activados, como se puede observar en la figura 21. La presencia de GlcNAc durante la activación no modificó el porcentaje de penetración, con lo cual puede descartarse un efecto del monosacárido en la reacción de zona.

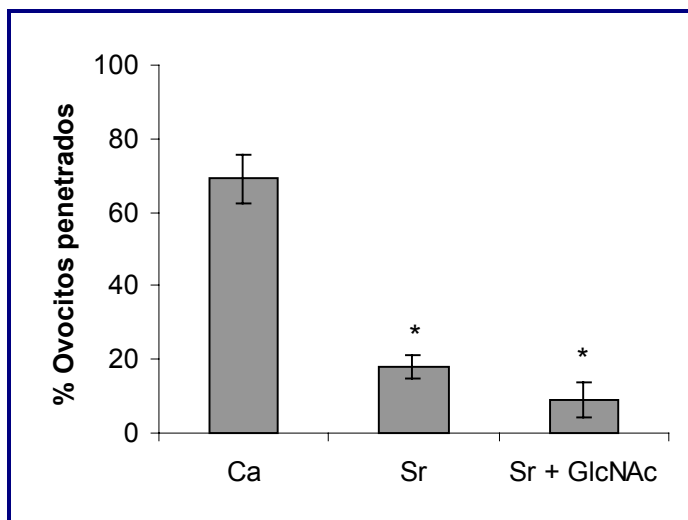


Figura 21. Presencia de GlcNAc durante la activación de ovocitos.

Ovocitos frescos fueron incubados durante 30 min. en TALP-Sr para su activación, en presencia (Sr+GlcNAc) o ausencia (Sr) de GlcNAc 1mM. Los controles (Ca) fueron incubados el mismo tiempo en TALP. Luego fueron lavados y sometidos a ensayos de FIV en condiciones control. Los números representan el porcentaje promedio de ovocitos penetrados \pm ES de 3 experimentos.

*: $p < 0,05$ vs. Ca.

La GlcNAc inhibe la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida

Hasta aquí entonces, vimos que el efecto de la GlcNAc en la penetración de los ovocitos es mayor que el producido en la unión, pero esto no se debe a la participación de este azúcar en la penetración de la ZP. El otro evento que podría estar afectado por la GlcNAc es la RA inducida por ZP. Para analizar esta posibilidad se realizaron ensayos de RA sobre ZP en presencia de GlcNAc. Como se muestra en la figura 22, aquellos espermatozoides que pudieron unirse a la ZP en presencia de este monosacárido, no fueron capaces de sufrir la RA .

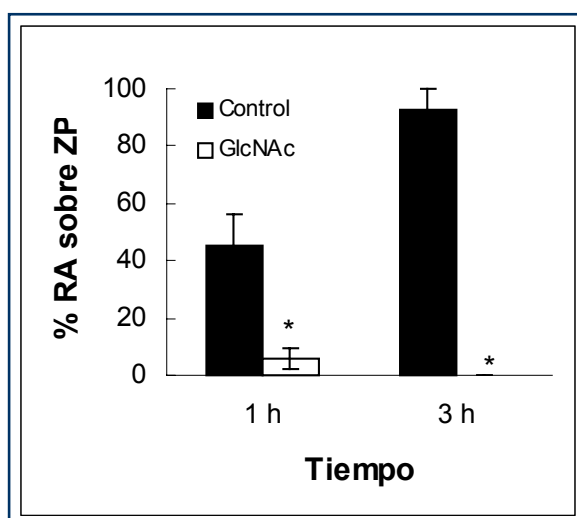


Figura 22. Efecto de GlcNAc en la reacción acrosomal sobre la zona pelúcida.

Espermatozoides capacitados fueron co-incubados con ovocitos en TALP conteniendo GlcNAc 1mM. Luego de 5-10 min., los ovocitos fueron lavados y colocados en una gota sin espermatozoides conteniendo (GlcNAc) o no (Control) de GlcNAc, e incubados 3 hs. más. A distintos tiempos, se analizó la RA de los espermatozoides unidos a la ZP. Los resultados representan el promedio \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. control.

CAPITULO II

Caracterización de la β -N-Acetilglucosaminidasa de espermatozoides de hámster

La actividad de N-Acetilglucosaminidasa disminuye con la reacción acrosomal

La β -N-Acetilglucosaminidasa (NAG) es la glicosidasa con mayor actividad en el fluido epididimario. También fue reportada como la más activa en el acrosoma del espermatozoide (Miller *et al.*, 1993b), aunque algunas evidencias indican que también se encuentra en la membrana plasmática (Godknecht and Honegger, 1991; Godknecht and Honegger, 1995; Miranda *et al.*, 2000; Hutchinson *et al.*, 2002a).

Los resultados presentados en el capítulo anterior sugieren que el azúcar hidrolizado por esta enzima, la GlcNAc, cumple un papel significativo en el proceso de fertilización. Por este motivo, decidimos estudiar las características de esta enzima en el espermatozoide de hámster.

Dado que su localización y comportamiento están relacionados con la función que la NAG pudiera cumplir, comenzamos analizando que ocurría con la actividad de esta enzima durante la incubación de los espermatozoides de hámster en condiciones capacitantes. Para ello, se midió la actividad de NAG en el medio de incubación (sobrenadante: SN) y en los espermatozoides (pellet: P) a distintos tiempos. Como se observa en la figura 23, la actividad enzimática total (espermatozoides + medio de incubación) se mantuvo estable durante el período de capacitación (0-2.5 hs.). Sin embargo, a las 5 hs. de incubación la actividad total de NAG se redujo de manera significativa ($44 \pm 10\%$ de disminución)

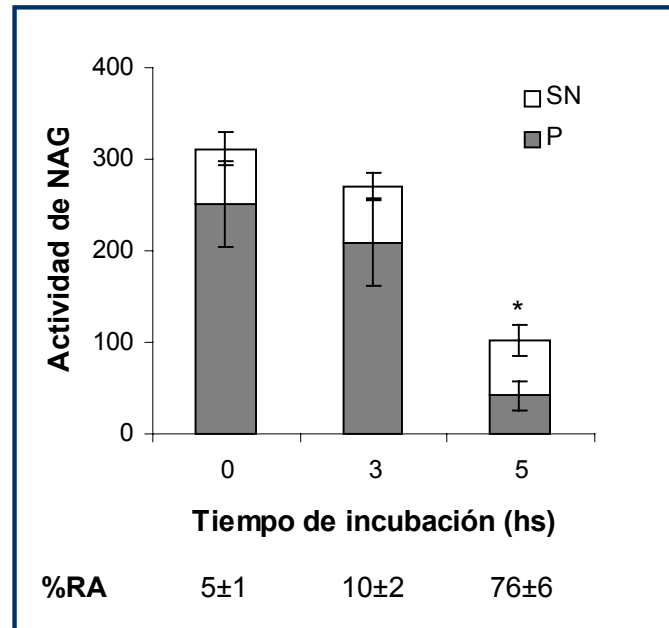


Figura 23. Actividad de NAG de espermatozoides durante la capacitación y RA.

Espermatozoides de hámster fueron incubados en condiciones capacitantes. A distintos tiempos, se tomaron alícuotas, se centrifugaron y se determinó la actividad de NAG en el pellet (P) y el sobrenadante (SN). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UF/10⁶ espermatozoides/hs.) y se representa el promedio ± ES de 4 experimentos. *: p<0.05 vs. actividad de NAG a tiempo cero.

Dado que esta disminución coincide con el aumento en la reacción acrosomal quisimos analizar si estos dos eventos estaban relacionados. Si la disminución de la actividad es concomitante con el aumento en la RA, algún componente acrosomal podría modular la actividad de NAG una vez liberado al medio. Para analizar esta posibilidad, produjimos la ruptura acrosomal en espermatozoides frescos utilizando dos tratamientos: congelamiento o tratamiento con ionóforo de calcio (A23187, 10uM). Ninguno de estos procesos

fue capaz de reproducir la disminución en la actividad total de NAG, aunque sí desencadenaron la pérdida total del acrosoma (Figura 24).

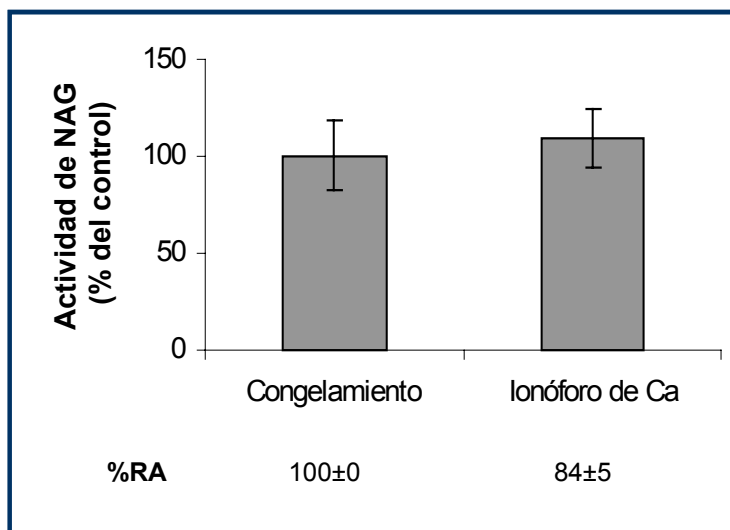


Figura 24. Ruptura acrosomal y actividad de NAG en espermatozoides no capacitados.

Espermatozoides frescos fueron incubados con ionóforo de Calcio (A23187, 10 μ M) por 90 min., o congelados para inducir la ruptura del acrosoma. Luego se midió la actividad total de NAG en la suspensión resultante. Los números representan la actividad de NAG (en unidades arbitrarias) relativa al control (sin tratar).

Dado que la ruptura acrosomal en espermatozoides no capacitados no reprodujo la disminución en la actividad de NAG, una posibilidad interesante era que un proceso fisiológico fuera absolutamente necesario para que esto ocurra. Para analizar si la capacitación era responsable de que las gametas masculinas adquirieran esta capacidad, repetimos los experimentos de ruptura del acrosoma utilizando espermatozoides capacitados (incubados por 2.5 hs. en medio capacitante). En este caso, aunque el congelamiento produjo la ruptura de los acrosomas, no disminuyó la actividad total de NAG. Sin embargo, cuando los

espermatozoides capacitados fueron tratados con ionóforo de calcio, la actividad total se redujo significativamente (Figura 25).

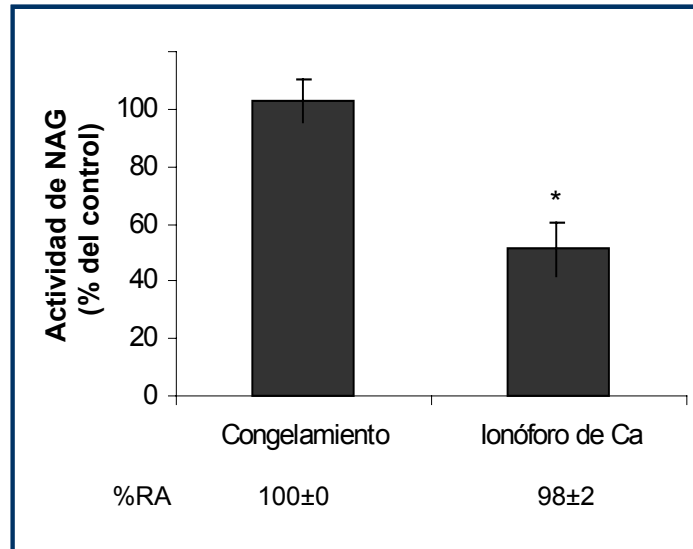


Figura 25. Ruptura acrosomal y actividad de NAG en espermatozoides capacitados.

Espermatozoides capacitados fueron congelados o incubados con ionóforo de Ca^{2+} (A23187, 10uM) y la actividad de NAG medida en la suspensión resultante. Los números representan la actividad relativa al control (sin tratar), expresada en unidades arbitrarias. *: $p < 0.05$ vs. 100.

Caracterización de la NAG de espermatozoides de hámster

El resultado anterior indica que la actividad total de la NAG disminuye con la reacción acrosomal. Sin embargo, esto no sería coherente con la supuesta participación de esta enzima en la penetración de la ZP (Miller *et al.*, 1993b). Una alternativa coherente con esta posibilidad era que la RA produjera una modificación en la NAG que se reflejara en una reducción de la actividad al ser medida de la manera usual, pero que en realidad fuera un cambio en sus características. Para tratar de analizar esta posibilidad, comparamos el pH

óptimo y la especificidad de sustrato de la NAG de espermatozoides de hámster frescos y reaccionados.

Para evaluar el primer parámetro, se midió la actividad de NAG a distintos valores de pH. Aunque, como era de esperar, la actividad fue mayor en espermatozoides frescos que en reaccionados, el pH óptimo en ambos casos fue el mismo (pH= 4.5, Figura 26).

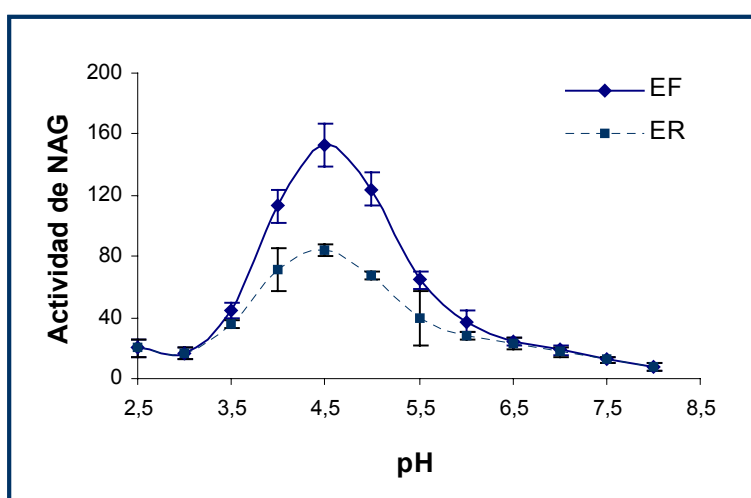


Figura 26. Curva de pH para la NAG de espermatozoides frescos y reaccionados.

Alícuotas de espermatozoides (200.000 células/tubo) frescos (EF) o reaccionados (ER, 5hs. de incubación) fueron incubadas en buffers con diferentes valores de pH con el sustrato específico de NAG. Los valores representan la actividad de NAG en unidades arbitrarias ($UF/10^6$ espermatozoides/hs.).

Para analizar una posible diferencia en la especificidad de sustrato en la NAG de espermatozoides frescos y reaccionados, trazamos curvas de inhibición por GlcNAc. Como puede verse en la figura 27, el efecto de éste azúcar en la actividad de NAG de espermatozoides frescos y reaccionados fue similar.

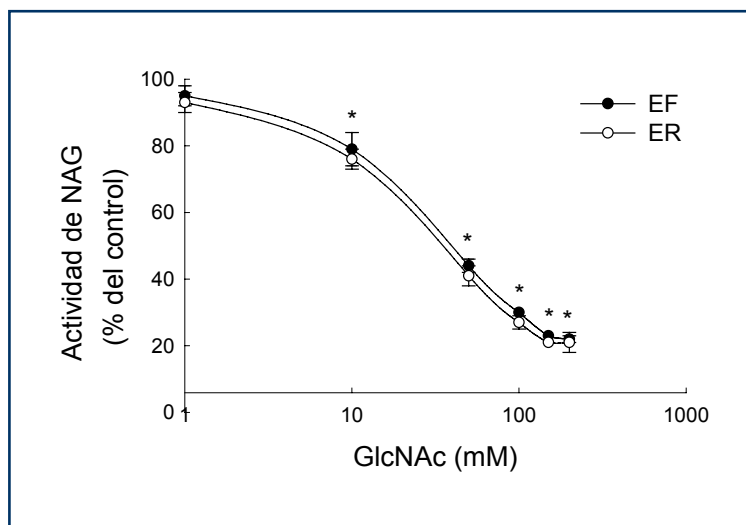


Figura 27. Curvas de inhibición de NAG de espermatozoides frescos y reaccionados por GlcNAc.

Cantidades equivalentes de espermatozoides frescos (EF) o reaccionados (ER) fueron utilizados para medir la actividad de NAG en presencia de distintas concentraciones de GlcNAc. Los resultados representan la actividad (en unidades arbitrarias) respecto del control.

*:p<0.05 vs. 100.

La disminución en la actividad de NAG no sería por proteólisis

Dado que no detectamos cambios en la afinidad por sustrato ó el pH óptimo de la NAG, asumimos que la actividad total de la enzima realmente disminuye con la RA. Como consecuencia de la exocitosis, muchas enzimas contenidas dentro del acrosoma son liberadas, entre las cuales hay proteasas que podrían clivar e inactivar a la NAG.

Para analizar esta posibilidad, espermatozoides capacitados fueron incubados con ionóforo de calcio en presencia o ausencia de un cocktail de

inhibidores de proteasas. Como se observa en la tabla 4, la disminución en la actividad de NAG fue similar en ambos casos. La presencia de estos inhibidores en el medio de incubación no afectó la motilidad ni la reacción acrosomal.

Tabla 4. Efecto de los inhibidores de proteasas en la disminución de la actividad total de NAG.

% Disminución de la Actividad de NAG	
Ionóforo de Ca ²⁺	Ionóforo de Ca ²⁺ + Inhibidores de proteasas
41 ± 2	40 ± 1

Espermatozoides capacitados fueron incubados con ionóforo de calcio (A23187, 10uM) en presencia o ausencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Benzamidina, Pepstatina A, Leupeptina y Bestatina). La actividad de NAG fue medida y expresada respecto al control (sin tratamiento).

Presencia de un modulador de la actividad de NAG en espermatozoides

Por último, decidimos determinar si existía un modulador de la actividad de NAG que se liberara y/o activara cuando los espermatozoides reaccionaban. De ser así, el medio de incubación ó el pellet de espermatozoides reaccionados debían ser capaces de disminuir la actividad de NAG. El agregado del medio de incubación de espermatozoides reaccionados a una suspensión de espermatozoides frescos redujo la actividad total de NAG en un 49±14%, p<0.05 (Figura 28). Por el contrario, el agregado del pellet de espermatozoides

reaccionados no produjo ningún efecto. Este resultado sugiere que la RA libera al medio algún agente que reduce la actividad de NAG.

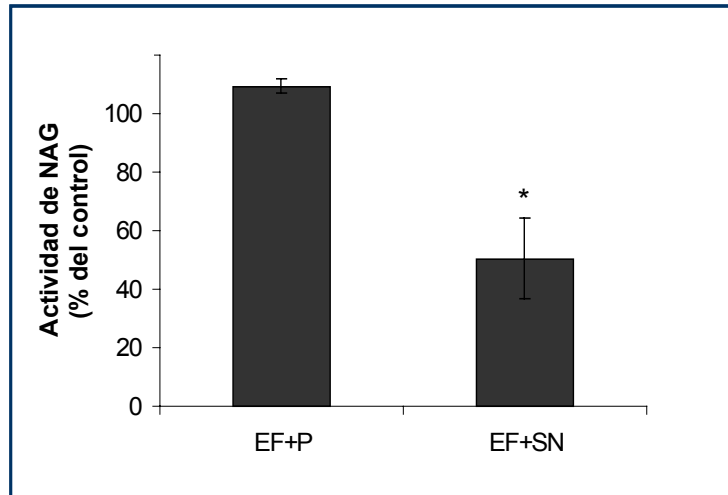


Figura 28. Disminución de la actividad de NAG por el medio condicionado de espermatozoides reaccionados.

Espermatozoides frescos (EF) fueron incubados en presencia del pellet (P) o el sobrenadante (SN) de espermatozoides reaccionados. La actividad de NAG fue medida en las muestras combinadas (EF+P y EF+SN) e individuales (EF, P y SN). Los resultados se expresaron como la actividad relativa al control (suma de las actividades individuales). *: $p < 0.05$ vs. 100.

Para tratar de determinar la naturaleza de este potencial inhibidor, el medio condicionado de espermatozoides reaccionados fue calentado o dializado. Al analizar el efecto de estos medios tratados sobre la NAG de espermatozoides frescos, observamos que solo el medio original produjo una disminución significativa de la actividad de NAG (Figura 29). Estos resultados sugieren que el inhibidor o modulador de la NAG es termosensible y de bajo peso molecular, o su función dependería de algún componente con estas características.

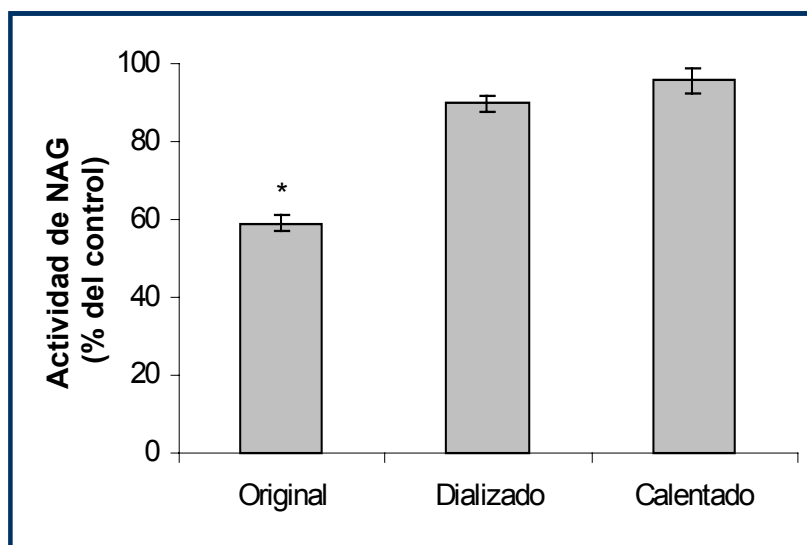


Figura 29. Sensibilidad del inhibidor de NAG al calentamiento y la diálisis.

Espermatozoides frescos (EF) fueron incubados en presencia del sobrenadante (SN) de espermatozoides reaccionados sin tratar (Original) o luego de la diálisis (Dializado) o calentamiento (Calentado) del mismo. Se midió la actividad de NAG en las muestras combinadas (EF + SN) e individuales (EF, SN de espermatozoides original, SN dializado y SN calentado) y los resultados se expresaron como la actividad relativa al control (actividades individuales sumadas). *: $p < 0.05$ vs. 100.

Localización subcelular de la NAG de espermatozoides de hámster

Para analizar la localización subcelular de la NAG en los espermatozoides de hámster se llevaron a cabo diferentes procedimientos de extracción. Utilizamos medios con distinta concentración salina para analizar interacciones moleculares de tipo iónicas, y también detergente o congelamiento para romper el acrosoma. Luego de cada tratamiento, se separó el sobrenadante (SN) del pellet (P) por centrifugación, y se midió la RA y la actividad de NAG en cada fracción.

La incubación de los espermatozoides en condiciones hipotónicas produjo la pérdida del acrosoma en la totalidad de las células, pero la actividad de NAG se encontró asociada mayormente al P (solo $22\pm 2\%$ de la actividad total fue extraída, Figura 30). Este resultado no varió cuando las suspensiones fueron congeladas o cuando se agregó detergente ($23\pm 2\%$ y $22\pm 2\%$ en SN respectivamente, Figura 30).

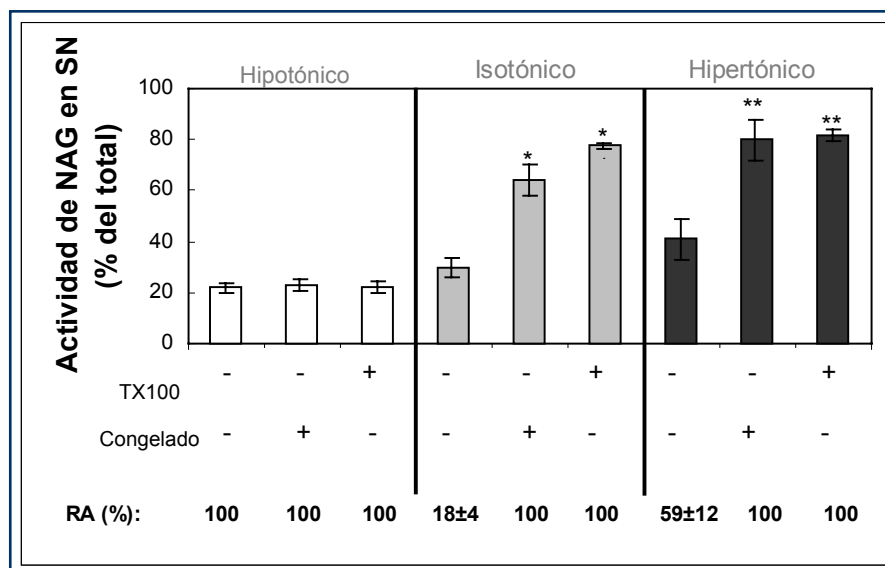


Figura 30. Extracción de NAG de espermatozoides de hámster.

Espermatozoides frescos fueron resuspendidos en medios hipotónico, isotónico ó hipertónico a temperatura ambiente durante 30 min., ó se sometieron a ruptura acrosomal por agregado de Tritón X100 ó congelamiento. Luego del tratamiento, se centrifugaron las muestras para separar el extracto (SN) de las células (P) y se midió la actividad de NAG en ambas fracciones. El gráfico representa el porcentaje de actividad en el SN respecto de la actividad total. *: $p < 0.05$ vs. cero y **: $p < 0.001$ vs. cero. El efecto de los distintos tratamientos en la integridad celular fue analizado determinando el porcentaje de reacción acrosomal, que se presenta en la parte inferior del gráfico (%RA). En todos los casos los buffers fueron suplementados con inhibidores de proteasas.

Cuando las células fueron incubadas en condiciones fisiológicas (medio SWM, isotónico), $30\pm 4\%$ del total de la actividad enzimática fue liberada al medio de incubación (Figura 30, barras grises). Aunque este tratamiento fue capaz de producir la ruptura del acrosoma en una baja proporción de espermatozoides (RA: $18\pm 4\%$), no se encontró correlación entre la proporción de actividad encontrada en el SN y la cantidad de espermatozoides reaccionados ($r=0.052$). Cuando en este medio isotónico (SWM) se indujo la ruptura de los acrosomas, la mayor parte de la actividad enzimática pudo ser extraída ($80\pm 8\%$ y $82\pm 3\%$ para células congeladas y tratadas con detergente respectivamente) (Figura 30, barras grises).

Por último la extracción de los espermatozoides en condiciones hipertónicas (0,5M NaCl) demostró ser capaz de inducir ruptura del acrosoma (RA: $59\pm 12\%$, $p<0.001$). En estas condiciones, se observó una correlación positiva entre la actividad extraída y el porcentaje de espermatozoides reaccionados ($r^2= 0.7$, $p<0.02$). Sin embargo, como se muestra en la figura 30 (barras negras) la actividad extraída ($41\pm 8\%$) no fue significativamente diferente del valor obtenido en condiciones isotónicas.

Estos resultados sugieren que aunque la mayor parte de la NAG es acrosomal, una pequeña fracción estaría débilmente asociada a la membrana plasmática.

CAPITULO III

Análisis de la participación de la β -N-Acetilglucosaminidasa en la interacción de gametas

Como hemos detallado previamente, varias enzimas han sido involucradas en la interacción del espermatozoide con los oligosacáridos de la ZP. El modelo mejor descrito es el de la galactosiltransferasa (GalTasa) en el espermatozoide de ratón (Miller *et al.*, 1991a). Muchas evidencias involucran a la NAG en la fertilización en diversas especies (Farooqui and Srivastava, 1980; Godknecht and Honegger, 1991; Sada *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993b; Godknecht and Honegger, 1995; Miranda *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2000; Perotti *et al.*, 2001b). Sin embargo, no está claro en cual de los pasos que conforman este complejo proceso cumple su función la NAG, ya que hay evidencias de su participación en la unión a la ZP (Miranda *et al.*, 2000), la penetración de la ZP (Miller *et al.*, 1993b) y el bloqueo de polispermia (Miller *et al.*, 1993b; Lambert *et al.*, 1997).

Los resultados presentados en el primer capítulo sugieren que la GlcNAc cumple una función relevante durante la interacción del espermatozoide de hámster con la ZP. En el segundo capítulo, vimos que el espermatozoide contiene NAG no solo en el acrosoma, sino también en la membrana plasmática. Por lo tanto, quisimos analizar si la NAG participaba en la interacción entre las gametas de hámster y, de ser así, en cual de los eventos involucrados en este proceso.

La zona pelúcida es sustrato de la NAG de espermatozoides

Dado que según nuestra hipótesis la NAG estaría involucrada en la

interacción del espermatozoide con la ZP, determinamos si la ZP podía funcionar como ligando de la NAG. Para ello, se midió la actividad de NAG de espermatozoides de hámster en presencia de distintas cantidades de ZP soluble.

Como se muestra en la figura 31, la ZP solubilizada fue capaz de inhibir de manera dosis dependiente la actividad de la NAG de espermatozoides (EC50: 7 ZP/ml).

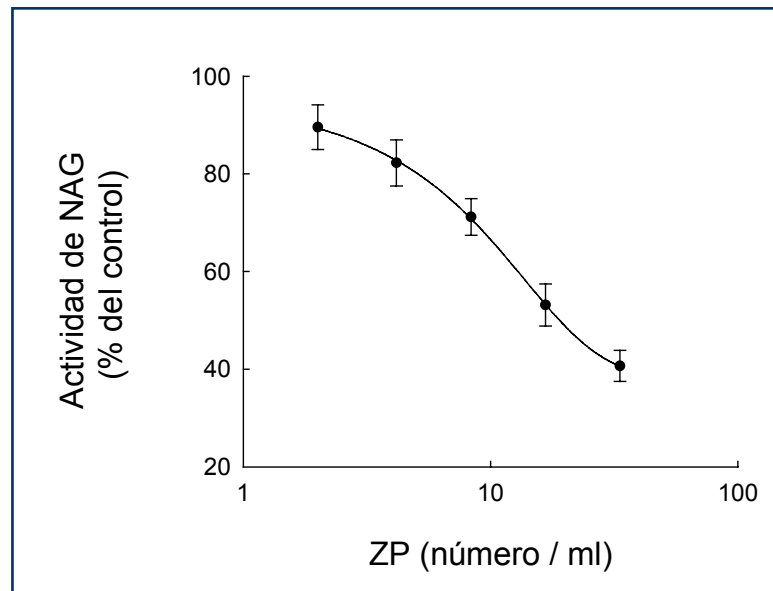


Figura 31. Inhibición de la NAG de espermatozoides por ZP soluble.

La actividad de NAG de espermatozoides fue medida en presencia de distintas cantidades de ZP soluble. Los resultados representan la actividad respecto del control (en unidades arbitrarias).

Inhibidores específicos de NAG afectan la unión espermatozoide-zona pelúcida

Analizamos la efectividad de dos inhibidores específicos de NAG, la

Lactona y la Tiazolina, sobre la enzima de espermatozoides de hámster trazando sus curvas dosis-respuesta. Como se puede observar en la figura 32, la Lactona resultó ser el inhibidor más potente (EC50: 0.02 y 5mM para Lactona y Tiazolina, respectivamente)

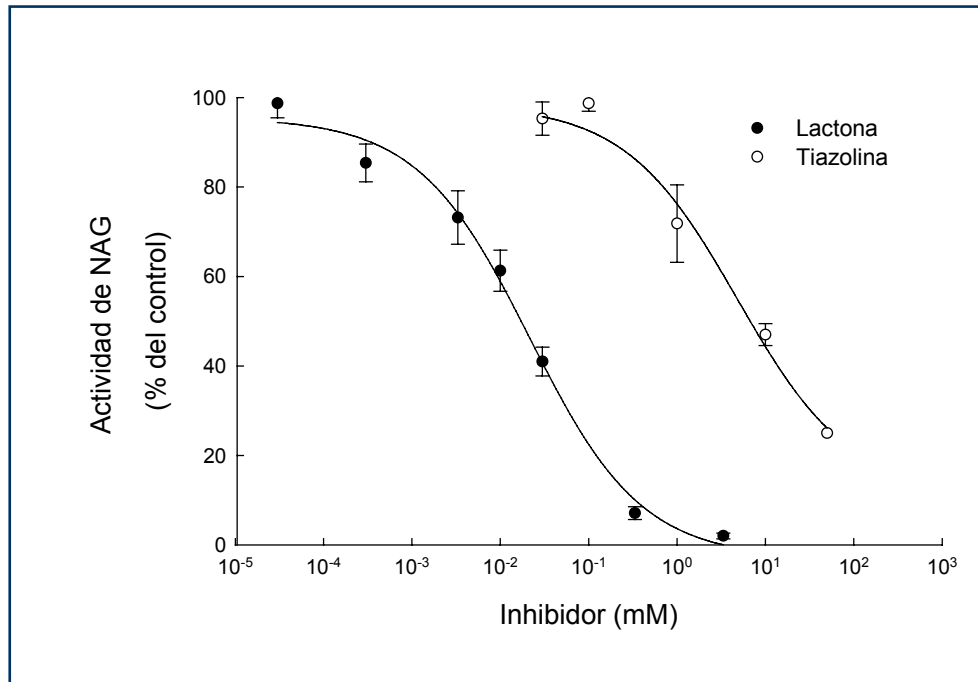


Figura 32. Curva dosis-respuesta de inhibición de la NAG de espermatozoides.

Espermatozoides frescos fueron incubados con cantidades crecientes de dos inhibidores específicos de NAG: Lactona (0-10mM) o Tiazolina (0-100mM). Las actividades fueron expresadas en unidades arbitrarias y normalizadas respecto al control.

Para comenzar a estudiar la participación de la NAG de espermatozoides en la interacción entre gametas, llevamos a cabo ensayos de unión en presencia de Lactona. Cuando los espermatozoides se co-incubaron con los ovocitos en presencia de Lactona, se produjo una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos ($49 \pm 13\%$ y $68 \pm 6\%$ del valor control

para 1 y 10mM de Lactona, respectivamente, Figura 33). Por otro lado, la RA espontánea se vió afectada por la presencia de este compuesto cuando fue utilizado a una concentración de 10mM (Tabla 5).

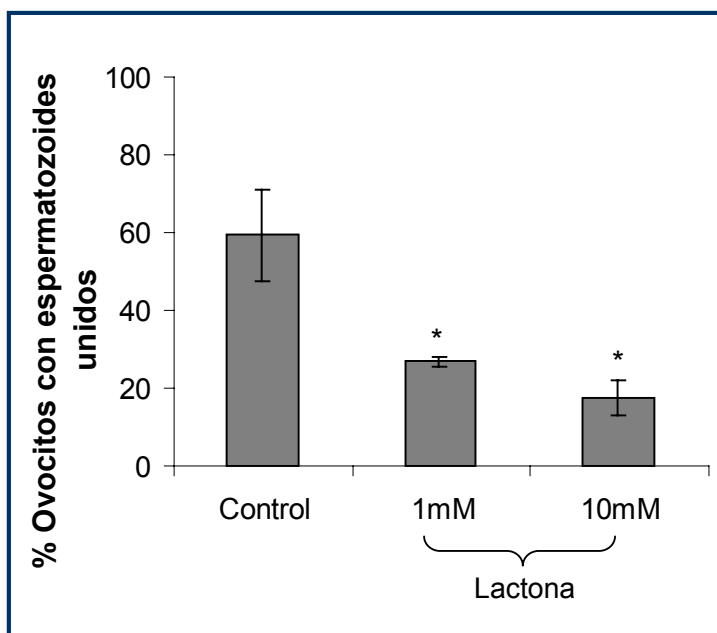


Figura 33. Efecto de la Lactona en la unión de gametas.

Ovocitos mantenidos en sal fueron lavados e inseminados con espermatozoides capacitados en medio reemplazado con estroncio, en presencia de Lactona 1 y 10mM. A los 45 min., los ovocitos fueron lavados, fijados y montados para determinar la presencia de espermatozoides en su superficie. *: $p < 0.001$ vs. control.

Un sustrato específico de NAG inhibe la unión a la ZP

Para confirmar la identidad de la molécula responsable de la participación de los residuos GlcNAc en la unión espermatozoide-ZP, decidimos analizar el efecto de sustratos específicos de la NAG en los ensayos biológicos.

El sustrato fluorométrico utilizado para medir la actividad, 4-methylumbelliferyl-N-acetil- β -D-glucosaminide, no produjo efecto a bajas

concentraciones y no pudo ser utilizado en condiciones saturantes en el ensayo biológico por problemas de solubilidad. En su reemplazo, utilizamos una concentración saturante del sustrato colorimétrico, el *p*-nitro-fenil-N-Acetilglucosaminide (PNP-GlcNAc), en los ensayos de unión (ver inserto en la figura 34).

El agregado de PNP-GlcNAc 3mM en el medio de incubación de los espermatozoides no afectó la motilidad, pero la capacidad de sufrir la RA espontánea estaba inhibida (Tabla 5). Además como se puede ver en la figura 34, el sustrato específico de NAG fue capaz de inhibir la unión del espermatozoide a la ZP ($46 \pm 13\%$ de inhibición).

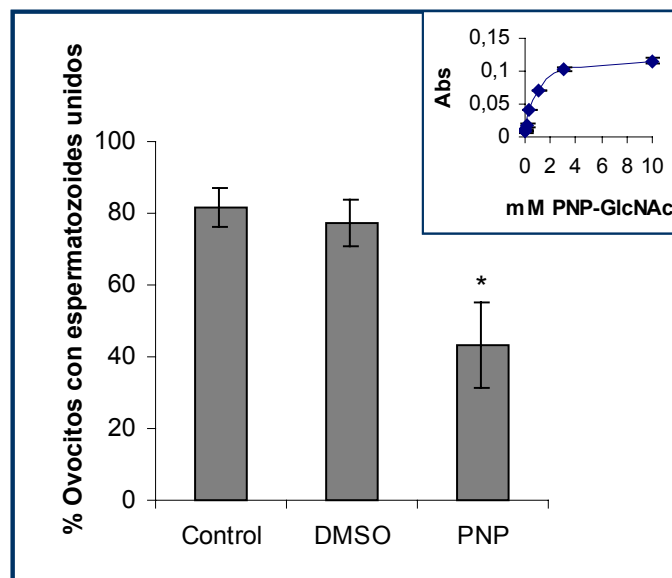


Figura 34. Efecto de PNP-GlcNAc sobre la unión de gametas.

Ensayos de unión fueron llevados a cabo en TALP-Sr en ausencia (Control) o presencia de 3mM PNP-GlcNAc (PNP) o su vehículo como control (DMSO). Los resultados muestran el promedio \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$ vs DMSO. En el inserto, se observa la actividad de NAG de espermatozoides vs. distintas concentraciones de PNP-GlcNAc.

Tabla 5. Efecto de ligandos de NAG sobre la RA espontánea.

% Inhibición de la RA		
Lactona 1mM	Lactona 10mM	PNP-GlcNAc 3mM
9±3	39±4*	29±9*

Espermatozoides de hámster incubados en medio TALP por 3hs. fueron tratados con Lactona (1 y 10 mM) ó PNP-GlcNAc (3mM) y la RA fue cuantificada 3 hs. más tarde. *: $p < 0.05$ vs. cero.

Análisis de la participación de la NAG en los distintos pasos del proceso de fertilización

Como la NAG ha sido involucrada en la penetración de la ZP en el ratón (Miller *et al.*, 1993b), analizamos si participaba en algún otro paso durante la interacción de gametas de hámster. Al realizar ensayos de fertilización *in vitro* (FIV) en presencia de Lactona (1mM) se observó una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos penetrados (48±8% de inhibición, $p < 0.05$, Figura 35).

La magnitud del efecto producido por la Lactona en los ensayos de FIV resultó similar a la observada en los experimentos de unión a ZP (48±8% vs. 49±13%, respectivamente). Este resultado sugería que el único paso afectado del proceso de fertilización sería la unión a la ZP.

Para determinar si la NAG estaba involucrada en algún evento posterior a la unión primaria, realizamos ensayos de FIV utilizando las mismas variantes descritas para la GlcNAc en el capítulo 1. La Lactona estuvo presente durante todo el período de co-incubación ó 45 min. después, donde el inhibidor fue agregado directamente en la gota de fertilización o los ovocitos transferidos a una gota con inhibidor y sin espermatozoides.

Como se observa en la figura 35, solo la presencia de Lactona durante todo el ensayo fue capaz de producir un efecto significativo en la FIV.

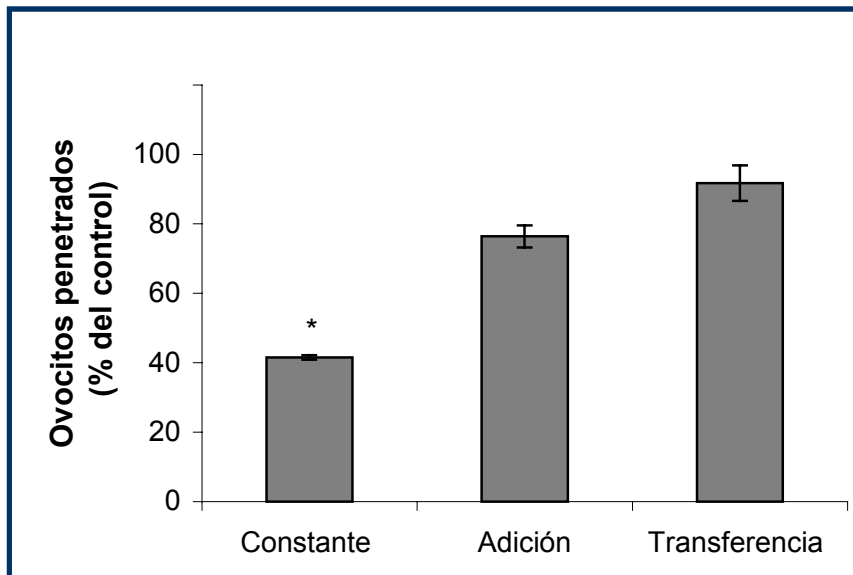


Figura 35. Efecto de Lactona en los distintos pasos del proceso de fertilización.

Se realizaron ensayos de FIV en presencia de Lactona (1mM) durante todo el ensayo (Constante) o después de 45 min. de co-incubación (Adición). Una gota sin Lactona fue utilizada como control. En otro procedimiento, luego de 45 min. en condiciones control, los ovocitos fueron transferidos a gotas con Lactona y sin espermatozoides (Transferencia). Para este último tratamiento, el control consistió en la transferencia de los ovocitos a una gota sin inhibidor ni espermatozoides. Los resultados fueron normalizados con sus respectivos controles (considerados como 100%). Los números representan el promedio \pm ES de 10 experimentos.

*: $p < 0.05$ vs. 100.

Dado que la presencia de Lactona 45 min. después del comienzo de la co-incubación no produjo efecto alguno, los procesos posteriores a la unión primaria no estarían afectados por este compuesto. Esto sugiere que la NAG no estaría involucrada en la penetración de la ZP ni en la fusión. Sin embargo, dado que otro inhibidor de NAG es capaz de bloquear la reacción de zona (Miller *et al.*, 1993a), quisimos comprobar que nuestros resultados no se debieran a un efecto secundario de este tipo.

Para analizar esta posibilidad, ovocitos frescos fueron activados por incubación en medio con estroncio o ionóforo de calcio, en presencia o ausencia de Lactona y luego utilizados en ensayos de FIV en condiciones control. Ambos métodos indujeron la activación de los ovocitos, a juzgar por la presencia de dos pronúcleos femeninos (Tabla 6) y el bloqueo de la penetración (Figura 36). La presencia de Lactona durante la activación no afectó este proceso (Tabla 6) ni produjo diferencias en el porcentaje de ovocitos penetrados ($5\pm 4\%$ y $2.5\pm 0.5\%$ respectivamente, Figura 36). Estos resultados indicarían que la Lactona no interfiere con la reacción de zona.

Tabla 6. Activación de ovocitos en presencia de Lactona.

	% de Activación	
	Sin Lactona	Con Lactona
Control	6 ± 1	11 ± 4
Ionóforo de Calcio	70 ± 1 *	80 ± 1 *
Sr	79 ± 1 *	76 ± 16 *

Ovocitos frescos fueron activados por incubación en medio con estroncio (Sr) ó con Ionóforo de Calcio (10uM) durante 30 minutos, en presencia o ausencia de Lactona 1mM. Luego de la tinción con Hoescht se determinó la presencia de 2 pronúcleos en el oolema, característicos de ovocitos activados. Los valores representan el porcentaje promedio de ovocitos activados.

*: p<0.001 vs. control (ovocitos pre-incubados en medio control).

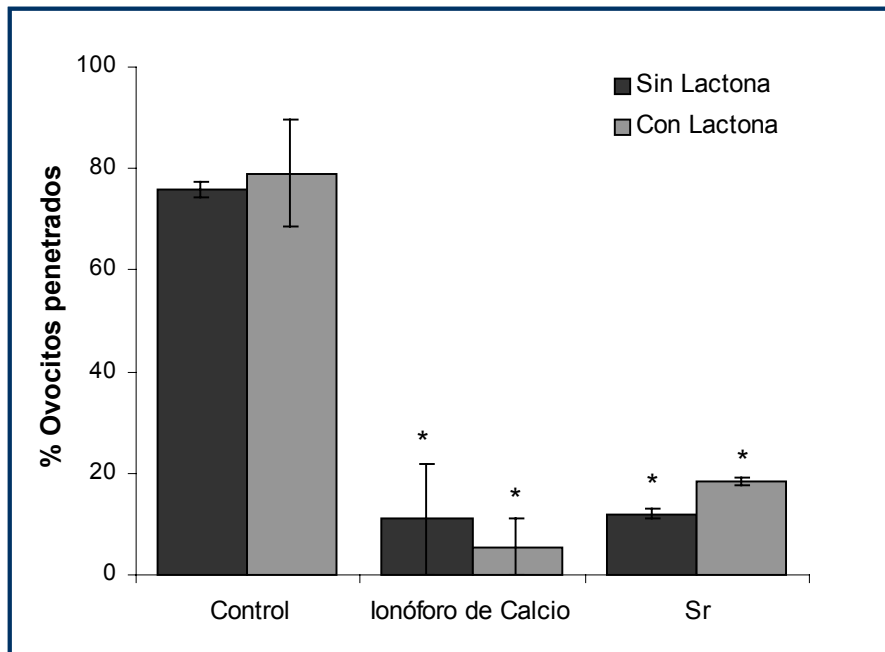


Figura 36. Efecto de Lactona sobre la reacción de zona.

Ovocitos frescos fueron pre-incubados 30 min. en TALP-Sr (Sr) o con ionóforo de calcio (A 23187, 10mM) en ausencia o presencia de 1mM Lactona. Los controles fueron incubados por el mismo período en medio TALP (control) en ausencia o presencia de Lactona 1mM. Todos los ovocitos fueron lavados y utilizados en ensayos de FIV en condiciones control. *: p<0.001 vs. respectivo control.

La presencia de NAG exógena afecta la unión/interacción entre gametas

Como estrategia alternativa para verificar la participación de la NAG en la unión espermatozoide-ZP, agregamos enzima exógena a los ensayos funcionales. Para ello, purificamos NAG recombinante humana (hrNAG) del medio de cultivo de un clon de células CHO con expresión estable de la enzima (Miranda *et al.*, 2000). El mismo procedimiento se siguió con el medio condicionado proveniente de células CHO control. Trazando una curva dosis-respuesta para analizar el efecto de la hrNAG en ensayos de unión (según se describió en materiales y métodos), observamos un efecto inhibitorio dosis-dependiente, con un EC50 de 0.011UI (equivalente a 1.6 ug de proteína). Por lo tanto, utilizamos esta cantidad de enzima en los siguientes ensayos biológicos.

La presencia de hrNAG durante los ensayos fue capaz de disminuir específicamente la unión de los espermatozoides a la ZP (31±1% de inhibición, figura 37). La motilidad no se vio afectada por el agregado de hrNAG o su control, y la RA permaneció inalterada (84.0±0.3% vs. 79±1% para el control y hrNAG, respectivamente).

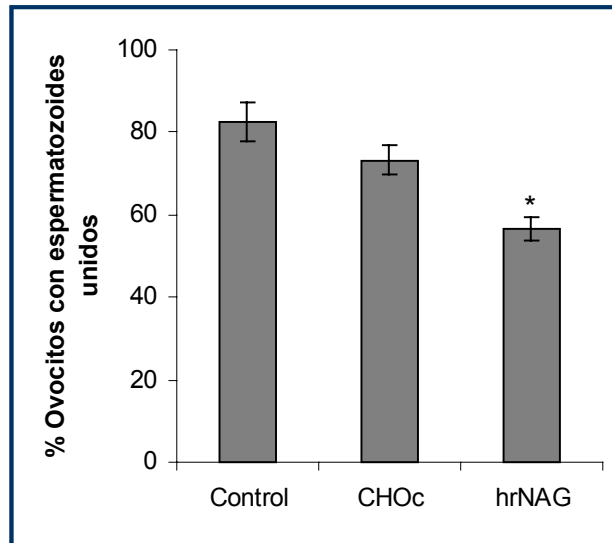


Figura 37. Efecto de la hrNAG en la unión de gametas.

NAG recombinante humana (hrNAG; 0.011 UI) expresada en células CHO e igual cantidad de proteína total de células CHO control (CHOc), fueron agregadas al medio durante los ensayos de unión. Se incluyó además una gota sin agregados (Control). Los resultados representan el porcentaje de ovocitos con espermatozoides \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$ vs. CHOc.

Aunque los resultados obtenidos con la Lactona no apoyaban la participación de la NAG en la penetración de la ZP, realizamos ensayos de FIV en presencia de hrNAG para confirmarlo y también obtener más información sobre el mecanismo de acción.

Cuando la hrNAG estuvo presente durante las 3 hs. de co-incubación de las gametas, produjo una disminución significativa ($55.5 \pm 0.6\%$) en la proporción de ovocitos penetrados (Figura 38).

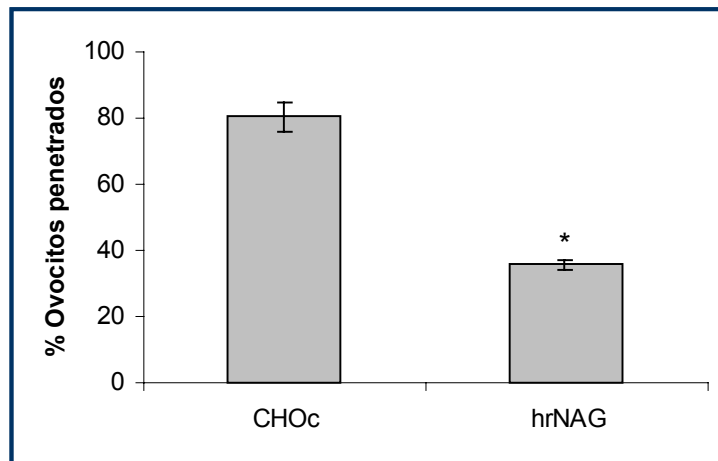


Figura 38. Efecto de hrNAG en ensayos de FIV.

Espermatozoides capacitados fueron incubados con ovocitos frescos en presencia de 0.011UI hrNAG. Luego de 3 hs. de co-incubación se determinó el porcentaje de ovocitos penetrados. Los números representan la media \pm ES de 3 experimentos.*:p< 0.05. vs. control.

Cuando los ovocitos frescos fueron pre-incubados con la enzima recombinante, disminuyó significativamente el grado de penetración ($45\pm 2\%$, Figura 39). Por el contrario no se observaron efectos cuando la hrNAG fue utilizada para pre-incubar a los espermatozoides (Figura 39), ni tampoco al usar enzima desnaturalizada por calentamiento (datos no presentados).

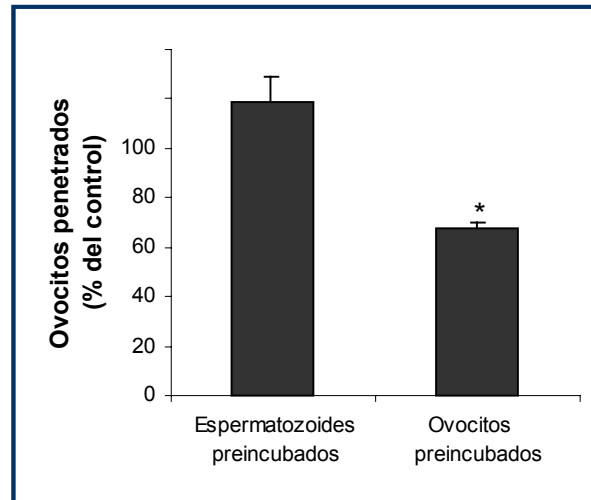


Figura 39. Preincubación de gametas con hrNAG y su efecto sobre la FIV.

Espermatozoides capacitados u ovocitos frescos fueron pre-incubados con 0.011UI hrNAG o con proteínas de células CHO control durante 30 minutos. Luego las gametas fueron lavadas y co-incubadas en condiciones control con la gameta contraria sin tratamiento previo. Los resultados muestran el promedio de ovocitos penetrados \pm ES de 3 experimentos, relativizados con respecto al control (proteínas de CHOc). *: $p < 0.05$ vs. 100.

Análisis de la participación de la galactosiltransferasa en la unión del espermatozoide de hámster a la ZP

En ninguno de los resultados presentados hasta aquí logramos bloquear por completo la unión del espermatozoide a la ZP. Aún utilizando inhibidores de NAG que disminuían un 90% su actividad, el efecto en los ensayos biológicos no superó el 50%. Esto podría estar relacionado con el requerimiento de mayores concentraciones de inhibidor en los ensayos biológicos, como ha sido reportado previamente (Miller *et al.*, 1993b). Sin embargo, también es de esperar que existan mecanismos múltiples que garanticen la unión de las gametas.

Considerando que la GalTasa protagoniza el modelo más comprobado de unión de gametas (Shur and Hall, 1982a; Shur and Hall, 1982b; Lopez *et al.*, 1985; Cooke and Shur, 1994; Dubois and Shur, 1995) y que esta enzima reconoce el mismo residuo que la NAG, la GlcNAc, quisimos estudiar si la GalTasa estaba involucrada en la unión del espermatozoide de hámster a la ZP.

Para determinar si la GalTasa participaba en la unión de gametas en el hámster, agregamos Mn^{2+} (20uM) a los ensayos de unión, ya que este ión es esencial para la actividad y conformación espacial de la GalTasa (Shur and Hall, 1982a; Shur and Hall, 1982b; Lopez *et al.*, 1985). Como se observa en la figura 40, la presencia de Mn^{2+} no produjo diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos (control: $75 \pm 5\%$, Mn^{2+} : $62 \pm 9\%$). Este resultado sugiere que la GalTasa no está contribuyendo en la unión del espermatozoide de hamster a la ZP. Tampoco se observaron diferencias en la inhibición producida por la GlcNAc al agregar Mn^{2+} , lo cual descartaría la participación de la GalTasa en la unión a ZP mediada por GlcNAc.

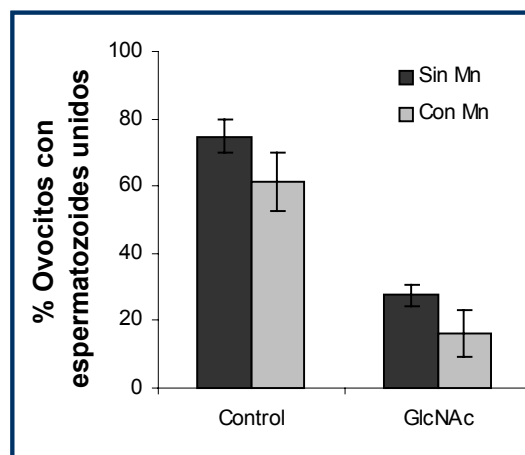


Figura 40. Efecto del Mn^{2+} en la unión a la ZP y su inhibición por GlcNAc.

Ensayos de unión fueron llevados a cabo en TALP-Sr, con y sin Mn^{2+} 20uM, en presencia o ausencia de GlcNAc 1mM. Los resultados muestran el porcentaje promedio de ovocitos con espermatozoides unidos a la ZP \pm ES de 3 experimentos.

La α -lactalbúmina es un compuesto capaz de cambiar la afinidad de la GalTasa haciendo que ésta se una a residuos glucosa en vez de GlcNAc. Por lo tanto, como otra manera de analizar la participación de la GalTasa en la unión a la ZP en el hámster, realizamos ensayos de unión en presencia de α -lactalbúmina (3mg/ml). Como puede verse en la figura 41, en presencia de α -lactalbúmina hay una disminución significativa de la unión espermatozoide-ZP ($41\pm 4\%$). Al comprobar si alguno de los compuestos usados afectaban a la NAG, comprobamos que la preparación comercial de α -lactalbúmina utilizada poseía actividad intrínseca de esta enzima. Por lo cual, la inhibición producida en el ensayo podría no tener relación con la GalTasa.

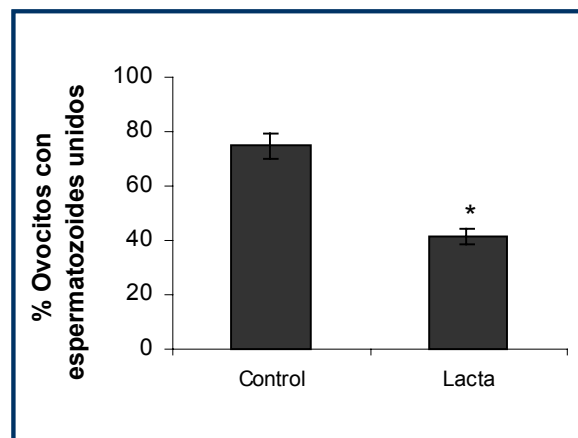


Figura 41. Efecto de α -lactalbúmina sobre la unión de gametas.

Espermatozoides capacitados fueron utilizados en los ensayos de unión en presencia o ausencia de α -lactalbúmina 3mg/ml (Lacta). Luego de 45 min. los ovocitos fueron lavados, fijados y montados. Los resultados muestran el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos a la ZP como promedio \pm ES de 3 experimentos. *: $p < 0.05$.

Como estrategia adicional para analizar la posible participación de la GalTasa en la unión espermatozoide-ZP en el hámster, hicimos ensayos de

unión en presencia de UDP-Gal. Este es el co-factor de la GalTasa, proveedor de los residuos Galactosa que son transferidos por la enzima a la GlcNAc a la que está unida. La GalTasa puede funcionar como proteína de unión a la ZP debido a la ausencia de este co-factor. En su presencia, la enzima ejerce su actividad catalítica, y como consecuencia, se disocia del sitio al que está unida. Al llevar a cabo los ensayos en presencia de UDP-Gal (2mM), la unión entre gametas no fue afectada, al igual que con el UDP-Glu, compuesto análogo utilizado como control negativo (Figura 42).

Estos resultados sugieren que la GalTasa no interviene en la unión del espermatozoide de hámster a la ZP.

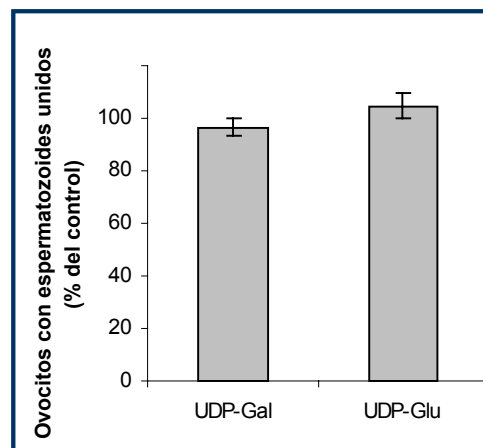


Figura 42. Efecto de UDP-Gal sobre la unión de gametas.

Ensayos de unión fueron llevados a cabo en presencia de UDP-Gal (2mM) o UDP-Glu (2mM). Luego de 15 min. los ovocitos fueron lavados y fijados. Los resultados muestran el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos a la ZP relativo al control (sin tratar) \pm ES de 3 experimentos.

DISCUSSION

1^{ra} PARTE:

GlcNAc en la interacción entre gametas

La participación de residuos glicosídicos en la interacción del espermatozoide con el ovocito ha sido ampliamente estudiada en diversas especies. Sin embargo, no se ha profundizado en los diversos pasos del proceso de interacción del espermatozoide con la ZP y su relación con los azúcares.

Nuestro laboratorio ha estado trabajando en este campo durante los últimos años y encontramos que en humanos la GlcNAc está relacionada con la unión a la ZP y la RA (Brandelli *et al.*, 1993; Brandelli *et al.*, 1994; Brandelli *et al.*, 1995; Brandelli *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2000). Para poder estudiar en profundidad los diferentes pasos del proceso de fertilización, debimos desplazarnos a un modelo animal.

Comenzamos analizando que monosacáridos podrían estar participando en la interacción del espermatozoide de hámster con la ZP y observamos que la GlcNAc se distinguía de los demás azúcares. Fue el único capaz de producir un efecto inhibitorio en la unión a bajas concentraciones, mientras que otros monosacáridos no fueron capaces de alterar el evento de interacción aún a concentraciones 50 veces más altas (datos no mostrados).

A pesar de que otros grupos han reportado previamente la participación de la GlcNAc en la fertilización de hámster (Ahuja, 1982; Kumar *et al.*, 1990), no se había analizado profundamente en cual de los eventos de este proceso estaba involucrado. Llamativamente, este azúcar también parece estar relacionado con la interacción entre el espermatozoide y el ovocito en Ascidas,

Xenopus, Drosophila, ratón y humanos entre otros (Oikawa *et al.*, 1973; Shur and Hall, 1982a; Godknecht and Honegger, 1995; Matsuura *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 1997; Perotti *et al.*, 2001a; Vo *et al.*, 2003). Aunque esto podría entenderse como inespecificidad, también podría ser un requerimiento básico de la interacción entre gametas, ya que la presencia de residuos terminales GlcNAc en la cubierta extracelular de los ovocitos es una característica común en especies muy diversas. Por lo tanto, y dada la universalidad de los azúcares, la especificidad de especie no residiría en un único monosacárido, sino en un sistema más complejo que seguramente se extiende más allá del azúcar terminal y de una glicoproteína, como por ejemplo: diferentes arreglos de azúcares en los oligosacáridos de la cubierta extracelular del ovocito.

En trabajos previos se sugirió que tanto el ovocito (Ahuja, 1982) como el espermatozoide (Kumar *et al.*, 1990) eran afectados por la GlcNAc. En este estudio hemos observado que al pre-incubar ambas gametas por separado con el monosacárido, el efecto inhibitorio solo se reproducía al tratar a los espermatozoides. Además, para poder observar este efecto debimos aumentar diez veces la concentración de GlcNAc. Esto sugiere que el monosacárido afecta al espermatozoide y la asociación con el mismo es de baja afinidad.

Cuando analizamos el estado de los espermatozoides tratados con GlcNAc, observamos que la reacción acrosomal espontánea estaba inhibida. Aunque es sabido que los monosacáridos deben estar asociados a una estructura molecular mas compleja para inducir la RA (Brandelli *et al.*, 1995;

Benoff *et al.*, 1997), estos azúcares son capaces de interferir con estas estructuras (Ahuja, 1985; Bleil and Wassarman, 1988; Tulsiani *et al.*, 1989; Mori *et al.*, 1989; Chiu *et al.*, 2004). Sin embargo, no se había reportado que pudieran producir un efecto por si mismos. Éste no se debería a un efecto tóxico sobre el espermatozoide, ya que el lavado luego de la preincubación con GlcNAc permite que ocurra la RA (dato no mostrado). Sin embargo, no podemos descartar que la GlcNAc perturbe de manera reversible algún proceso metabólico en el espermatozoide.

El efecto de la GlcNAc sobre la reacción acrosomal no sería el causante de la inhibición en los ensayos de unión, ya que sería de esperar que tener un mayor número de espermatozoides no reaccionados aumente la unión en vez de disminuirla. Sin embargo, la disponibilidad de una cantidad diferente de espermatozoides intactos introduciría una diferencia adicional para las condiciones control y tratado que podría enmascarar o alterar el resultado. Por esta razón, decidimos buscar condiciones experimentales que nos permitieran analizar la unión a la ZP en ausencia de RA.

Los resultados obtenidos al sustituir al Ca^{2+} del medio sugieren que los espermatozoides capacitados en Sr^{2+} no pueden sufrir la RA espontánea ni la inducida por ZP cuando están en este medio, pero están listos para reaccionar si se les proporciona Ca^{2+} en el momento de la exocitosis. Además, los espermatozoides incubados en medio reemplazado con Sr^{2+} resultaron indistinguibles del control cuando se analizó el patrón de fosforilación en tirosina, la tinción con CTC y la habilidad de unirse a la ZP. Por lo tanto, pareciera que el

Sr^{2+} puede sustituir al Ca^{2+} en diversos eventos asociados a la capacitación de los espermatozoides de hámster. Estos resultados en conjunto nos permiten concluir que el Sr^{2+} puede reemplazar al Ca^{2+} en la capacitación y la unión a la ZP, pero no en la RA, tal como habíamos descripto en humanos (Marín-Briggiler *et al.*, 1999).

Aunque el medio que utilizamos no puede considerarse libre de Ca^{2+} , la concentración residual de este ión en el medio (proveniente de contaminación de los otros componentes) sería mucho menor que la requerida para que se produzca la RA (Yanagimachi, 1982; Fraser, 1987a; Marín-Briggiler *et al.*, 1999). Por otro lado, experimentos recientes incluyendo 0.1mM EGTA en el medio conteniendo Sr^{2+} confirmaron estos resultados, por lo que podemos concluir que el Sr^{2+} es capaz de sostener la capacitación.

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes previos que sugieren que el Sr^{2+} es capaz de reemplazar al Ca^{2+} durante la capacitación (Fraser, 1987b; Marín-Briggiler *et al.*, 1999), pero parecen diferir con otros que concluyen que este ión es capaz de sostener la RA (Yanagimachi and Usui, 1974; Mortimer *et al.*, 1986; Mortimer, 1986; Fraser, 1987b). El hámster tiene la particularidad de que casi la totalidad de los espermatozoides sufren la RA espontánea una vez completado el proceso de capacitación. La ocurrencia de la exocitosis se determina por microscopía óptica en células móviles y se considera un evento fisiológico indicador de la compleción de la capacitación. Los estudios que sugieren que el Sr^{2+} puede sostener la exocitosis, analizaron la RA espontánea en espermatozoides de cobayo, ratón y humano (Yanagimachi and Usui, 1974;

Fraser, 1987b; Mortimer *et al.*, 1988; Stock and Fraser, 1989). En estas especies, la RA espontánea ocurre en un bajo porcentaje de espermatozoides y suele ser un evento asociado a la muerte celular. En estos casos, el análisis de los mecanismos involucrados en la RA requiere el uso de un inductor, y aquí podría residir la discrepancia entre nuestros resultados y los de otros grupos. De acuerdo con esta posibilidad, mientras la RA espontánea en espermatozoides humanos es similar con ambos iones, la inducida por fluido folicular no tiene lugar si el Ca^{2+} es reemplazado por Sr^{2+} (Marín-Briggiler *et al.*, 1999). Esto sugiere que la RA fisiológica se produce solo en presencia de Ca^{2+} en el medio de incubación.

Al llevar a cabo los ensayos de unión a ZP en medios con Sr^{2+} observamos que los resultados fueron similares a los obtenidos en condiciones control. Recientemente comprobamos que esto también ocurre cuando incluimos 0.1mM EGTA en el ensayo (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que el Sr^{2+} , además de capacitar, puede sostener la unión de los espermatozoides a la ZP. Aunque esto contradice un estudio que reporta una unión mayor en medio con Ca^{2+} (Mortimer *et al.*, 1988), es consistente con nuestros reportes previos en humanos (Marín-Briggiler *et al.*, 1999).

Al re-analizar el efecto de la GlcNAc en la unión espermatozoide-ZP en medio con Sr^{2+} , la inhibición producida por el azúcar en medio con calcio fue reproducible. Por lo tanto, la GlcNAc participa en la unión primaria del espermatozoide de hámster a la ZP.

Para analizar si la GlcNAc estaba involucrada en alguna otra etapa durante el proceso de fertilización, realizamos ensayos de fertilización *in vitro*. El monosacárido fue capaz de inhibir la penetración de los ovocitos, aunque sólo cuando estuvo presente desde el comienzo del ensayo y no luego de que tuviera lugar la unión primaria. Sin embargo, considerando la hipótesis de Shur y colaboradores (Miller *et al.*, 1993b), la GlcNAc podía estar afectando la reacción de zona. Si este fuera el caso, el resultado final observado podía ser la sumatoria de dos efectos contrapuestos: la inhibición de la penetración por GlcNAc compensada por el mayor número de espermatozoides que pueden penetrar en ausencia de reacción de zona. En concreto, la existencia de estos dos eventos contrapuestos podía dar un resultado igual al control. Por este motivo, decidimos evaluar el efecto de la GlcNAc sobre la reacción de zona. Los experimentos de activación de ovocitos en presencia del monosacárido demostraron que la GlcNAc no afecta la reacción de zona ya que la penetración resultó ser similar que en el control.

Por último, observamos que la RA inducida por la ZP se encontraba bloqueada en presencia de GlcNAc. Por lo tanto, la mayor inhibición obtenida en los ensayos de FIV es, al menos, la suma de los efectos encontrados en la unión primaria y la RA.

Estos resultados sugieren que la GlcNAc no estaría involucrada en la penetración de la ZP en el hámster. Sin embargo, no se puede descartar que, por una cuestión de afinidad, exista una unión preferencial del espermatozoide a los residuos oligosacáridicos de la ZP.

En resumen, la GlcNAc participa en la unión primaria del espermatozoide de hámster a la ZP. Dado que la pre-incubación de los espermatozoides con GlcNAc inhibe la subsecuente asociación de los mismos a la zona, sitios de unión para este azúcar en el espermatozoide y residuos GlcNAc de la ZP estarían mediando el evento. La habilidad del monosacárido de inhibir la RA sobre la ZP sugiere además su participación en la exocitosis inducida por la zona, aunque no puede descartarse un bloqueo en la cascada de señales considerando la inhibición de la exocitosis espontánea. Por último, la GlcNAc no estaría involucrada en la penetración de la ZP.

2^{da} PARTE:

Caracterización de β -N-

Acetilglucosaminidasa de espermatozoides

La NAG es la enzima mas activa en epidídimo y espermatozoides (Hermo *et al.*, 1997; Datti *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 1995; Adamali *et al.*, 1999b) y está relacionada con el proceso de fertilización en diversas especies (Farooqui and Srivastava, 1980; Godknecht and Honegger, 1991; Sada *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993b; Godknecht and Honegger, 1995; Miranda *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2000; Perotti *et al.*, 2001a; Perotti *et al.*, 2001b; Hayashi *et al.*, 2004).

Cuando analizamos la actividad la NAG durante la incubación de los espermatozoides de hámster en condiciones capacitantes, observamos una disminución que parecía estar asociada con la ocurrencia de la RA. Cuando tiene lugar la exocitosis es de esperar que la NAG acrosomal se libere causando la disminución de la actividad asociada al pellet. Esto implicaría solo un reordenamiento en la distribución de la actividad entre las células (P) y el medio (SN). Sin embargo, observamos que la actividad total de la NAG (P + SN) disminuyó.

Al romper el acrosoma de espermatozoides frescos por congelamiento o tratamiento con ionóforo de calcio, no pudimos reproducir este efecto. Lo mismo ocurrió cuando congelamos espermatozoides capacitados. Sin embargo, el tratamiento de espermatozoides capacitados con ionóforo de calcio fue capaz de disminuir la actividad total de NAG. Aunque el ionóforo es un inductor farmacológico de la reacción acrosomal, la entrada de Ca^{2+} induce la fusión de la membrana plasmática y acrosomal externa y una vesiculización organizada. Esta es una ruptura del acrosoma más parecida al evento fisiológico que la producida por congelamiento. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren

que dos eventos fisiológicos son necesarios para que disminuya la actividad total de NAG: la capacitación y la RA.

Evaluamos si lo que se evidenciaba como una disminución en la actividad catalítica era en realidad un cambio en otros parámetros funcionales de la enzima. Por ejemplo, que la ocurrencia de la RA modificara el pH óptimo de la enzima o su afinidad por el sustrato. Sin embargo, las curvas de pH y de inhibición por GlcNAc de espermatozoides frescos y reaccionados fueron similares.

Otra posibilidad era que alguna proteasa acrosomal digiriera a la NAG y de esta manera disminuyera su capacidad catalítica. Sin embargo, la inclusión de un cocktail de inhibidores de proteasas durante la RA espontánea o inducida con ionóforo no impidió la disminución en la actividad total de NAG. Aunque este resultado sugiere que la proteólisis no sería la causante de este fenómeno, no puede descartarse la acción de una proteasa que no sea afectada por los inhibidores usados (es decir, distinta de cathepsina B, papaina, plasmina, tripsina, carboxil proteasas y aminoexopeptidasas) (Jones *et al.*, 1987).

Una explicación posible para que la actividad de NAG baje con la RA era que exista un modulador de la enzima dentro del acrosoma. Para testear esta posibilidad, agregamos el medio de incubación o los espermatozoides reaccionados a espermatozoides frescos. El agregado del medio condicionado produjo una disminución significativa de la actividad total, apoyando la existencia

de un componente que al ser liberado durante la RA afecta la actividad de NAG.

El poder inhibitorio de estos sobrenadantes se perdió al calentarlos o dializarlos. Esto indicaría que el inhibidor, o algún componente asociado al mismo, es de bajo peso molecular y sensible al calentamiento.

En cuanto a la localización de la NAG en el espermatozoide de hámster, los experimentos de extracción revelaron que la presencia de NaCl en concentraciones fisiológicas fue capaz de liberar un 30% de la actividad enzimática total. La primer explicación posible es que esta actividad proviene de los pocos espermatozoides que sufrieron ruptura acrosomal en estas condiciones. Sin embargo, la falta de correlación entre la actividad de NAG en el extracto y el porcentaje de RA va en contra de esta posibilidad. Esto indicaría que una parte de la NAG estaría asociada débilmente a la superficie del espermatozoide, ya que es liberada en condiciones fisiológicas.

La incubación de los espermatozoides utilizando un medio hipertónico produjo la liberación del contenido acrosomal, ya que el porcentaje de actividad en el SN correlacionó positivamente con el porcentaje de espermatozoides reaccionados. Sin embargo, esta contribución no aumentó significativamente la proporción de enzima extraída con respecto al medio isotónico, apoyando la existencia de una fracción de NAG en la membrana plasmática.

Por último, al producir la ruptura del acrosoma por congelamiento o incubación de las células en medio con detergente, la actividad liberada fue mayor pero solo si el medio contenía sal. Esto indica que la NAG acrosomal no es soluble, en concordancia con reportes de otro grupo que sugiere la existencia

de una proteína unidora de NAG en la matriz acrosomal del espermatozoide de hámster (Nagdas *et al.*, 1996). Por otro lado, nuestros resultados demuestran que no es necesario un medio hipertónico para disociar a la NAG de la matriz acrosomal, como sugiere este mismo grupo, sino que una vez roto el acrosoma, concentraciones fisiológicas de sal son suficientes.

En resumen, aunque la NAG es una enzima mayormente acrosomal, también hay una población que se localiza en la membrana plasmática. La NAG es modulada por un componente acrosomal que causa una disminución de la actividad total de la enzima como consecuencia de la RA. Esta característica no sería compatible con una función catalítica durante la penetración de la ZP.

3^{ra} PARTE:

***β -N-Acetilglucosaminidasa en la interacción
de gametas***

Numerosos reportes demuestran que la NAG está involucrada en la fertilización en diversas especies (Legler and Bollhagen, 1992; Miller *et al.*, 1993b; Barbieri *et al.*, 1994; Godknecht and Honegger, 1995; Matsuura *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 2000; Perotti *et al.*, 2001b; Cattaneo *et al.*, 2002; Hermo *et al.*, 2004). Algunos trabajos hechos en Ascidas proponen su participación en la unión del espermatozoide a la cubierta extracelular del ovocito (Godknecht and Honegger, 1991). Sin embargo, aunque en mamíferos el mismo azúcar terminal (GlcNAc) es responsable de la unión a la ZP, las evidencias apuntan a la participación de la NAG en otros eventos de la fertilización (Gwatkin and Andersen, 1973; Joyce *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1993b).

Cuando analizamos la actividad de NAG de espermatozoides de hámster en presencia de ZP soluble, observamos una inhibición dosis-dependiente, indicando que la ZP es reconocida como ligando.

Para comprobar si la NAG participaba en la interacción entre las gametas, analizamos el efecto de ligandos específicos en ensayos biológicos. La Lactona resultó ser el inhibidor más potente de la NAG y por ello fue elegido para el análisis más completo. El efecto inhibitorio de este compuesto en ensayos de unión sugiere que la NAG está involucrada en este evento temprano del proceso de interacción entre las gametas.

Otro ligando de NAG con la capacidad de ser hidrolizado, el PNP-GlcNAc, también produjo un efecto inhibitorio en la unión espermatozoide-ZP. El grado de inhibición obtenido en este caso fue similar al observado al utilizar la Lactona,

sugiriendo que el hecho de que el ligando sea procesado o no, no cambia su capacidad inhibitoria.

Para determinar si la NAG participaba además en la penetración de la ZP, se realizaron ensayos de FIV en presencia de Lactona. Se observó una inhibición específica y significativa en la proporción de ovocitos penetrados cuando el inhibidor estuvo presente durante toda la incubación. Sin embargo, no se observó ningún efecto cuando la Lactona fue agregada luego de que la unión primaria tuviera lugar. Estos resultados nos llevarían a pensar que la NAG no está involucrada en la penetración de la ZP ni en la fusión de gametas. Sin embargo, teniendo en cuenta que otro inhibidor de NAG es capaz de afectar el bloqueo de la polispermia (Miller *et al.*, 1993a), era necesario verificar que la Lactona no estuviera causando este mismo efecto. Si el inhibidor de NAG impide que tenga lugar la reacción de zona, la consecuente polispermia podría enmascarar un efecto inhibitorio en la penetración. Para descartar esta posibilidad, activamos ovocitos por incubación en medio con Sr^{2+} y luego analizamos su capacidad de ser penetrados en ensayos de FIV bajo condiciones control. La presencia del inhibidor de NAG durante el proceso de activación no produjo modificaciones en el número de espermatozoides fusionados por ovocito. Dado que la activación de los ovocitos por Sr^{2+} ha sido cuestionada (Horvath *et al.*, 1993), también utilizamos ionóforo de Ca^{2+} , que es el agente usado por quienes proponen la participación de la NAG en el bloqueo de polispermia (Miller *et al.*, 1993a). La presencia de Lactona durante la

activación de los ovocitos con ionóforo tampoco modificó el resultado obtenido en la FIV.

Es interesante destacar que varios compuestos químicamente relacionados (GlcNAc, PNP-GlcNAc, Lactona) fueron capaces de inhibir la RA en el espermatozoide de hámster. Varias hipótesis podrían postularse para explicar este efecto. Quizás, la exocitosis dependa de una interacción GlcNAc-dependiente entre dos moléculas localizadas en la membrana, como se ha reportado para neutrófilos (Chang *et al.*, 2005). También podría ocurrir que la NAG estuviera involucrada directamente en la RA, utilizando por ejemplo el mismo mecanismo que el recientemente descrito para otra glicosidasa de membrana que activa un canal de Ca^{2+} (Huang *et al.*, 2004). Por último, no puede descartarse la inhibición reversible de algún proceso metabólico indispensable para la exocitosis.

En el caso de la GlcNAc y el PNP-GlcNAc, no pudimos encontrar una concentración inhibitoria de la unión a la ZP que no afectara la RA. Sin embargo, en el caso de la Lactona esto fue posible. Por lo tanto, pudimos llevar a cabo ensayos de FIV en presencia de un inhibidor de NAG y sin afectar la RA. Cabe destacar que la magnitud de la inhibición producida por la Lactona en los ensayos de unión y de FIV fue similar (49 ± 13 y $48 \pm 8\%$, respectivamente). Este resultado corrobora que el mayor efecto producido por la GlcNAc en la FIV está relacionado con la inhibición de la RA y está de acuerdo con la no participación de la NAG/GlcNAc en la penetración de la ZP.

Asumiendo que la NAG del espermatozoide funciona como receptor durante la interacción entre gametas, otra estrategia que decidimos utilizar fue el agregado de NAG exógena en los ensayos de unión. La presencia de NAG recombinante humana (rhNAG) produjo una disminución en la unión de los espermatozoides a la ZP. Además, la preincubación de los ovocitos con la enzima recombinante reprodujo la inhibición (datos no mostrados). Este resultado indica que, como complemento de lo observado en el capítulo 1, la enzima actúa sobre el ovocito impidiendo la subsecuente unión de los espermatozoides.

También observamos un efecto inhibitorio de la NAG recombinante en la FIV, ya sea cuando estuvo presente durante los ensayos o cuando se utilizó para pre-incubar a los ovocitos. En este punto es interesante destacar que si la NAG actuara como enzima hidrolítica durante la fertilización, el agregado de hrNAG ayudaría a los espermatozoides a traspasar la ZP ocasionando un aumento en la penetración. Sin embargo, obtuvimos un efecto inhibitorio, lo que sugiere que la enzima está funcionando como proteína de unión.

Por otro lado, el hecho de que un sustrato de NAG (PNP-GlcNAc) y un inhibidor (no hidrolizable) produzcan el mismo grado de inhibición, apoya la hipótesis de que la enzima actúa principalmente como proteína de unión y no a través de su actividad catalítica.

La NAG es una hidrolasa ácida y como tal tiene un pH óptimo cercano a 4.5. A un valor de pH cercano al fisiológico, la NAG solo expresa el 10-20% de su actividad pero es capaz de unirse al sustrato (Geiger *et al.*, 1974). Esto estaría

de acuerdo con una función no catalítica durante la fertilización. Sin embargo, una acción catalítica no puede ser descartada ya que el microambiente de la enzima en el momento de la interacción con la ZP podría ser ácido. Además, se ha descrito para otras glicosidasas la existencia de isoformas con pH óptimo neutro al enfrentarlas a sustratos naturales, algunas de ellas específicas de membrana plasmática (Tulsiani *et al.*, 1989; Tulsiani *et al.*, 1990; Skudlarek *et al.*, 1993).

La inhibición obtenida en los ensayos biológicos, aún utilizando distintos agentes, nunca llegó a ser total. Como es lógico pensar que deben existir mecanismos redundantes que garanticen la eficiencia de la reproducción de un organismo, quisimos determinar si la GalTasa participaba en la unión de gametas en el hámster. Este es el candidato mejor estudiado y uno el mismo residuo sacarídico que la NAG (Shur and Hall, 1982a; Miller *et al.*, 1992; Shur, 1993).

Actualmente existen varios trabajos que han cuestionado la participación de la GalTasa en la unión del espermatozoide a la ZP (Loeser *et al.*, 1999; Shur *et al.*, 2004). De cualquier manera, para analizar la posible intervención de la GalTasa en la asociación de los espermatozoides de hámster a la ZP, se realizaron ensayos de unión en presencia de diferentes compuestos relacionados con esta enzima: el Mn^{2+} , la α -lactalbúmina y el UDP-Gal, (Shur and Hall, 1982a; Shur and Hall, 1982b). Dado que el Mn^{2+} no aumentó la unión en condiciones control, la GalTasa parece no estar involucrada en la asociación

del espermatozoide de hámster a la ZP. Mas aún, como el grado de inhibición por GlcNAc fue independiente de la presencia de Mn^{2+} , la participación de este azúcar en la unión espermatozoide-ZP no estaría relacionada con la GalTasa. Los ensayos de unión subsecuentes, realizados agregando α -lactalbúmina, mostraron inhibición, sugiriendo que al cambiar la especificidad de la GalTasa se afectaba la unión entre gametas. Sin embargo, la α -lactalbúmina comercial utilizada mostró tener actividad de NAG, seguramente como un contaminante. En consecuencia, no se podía establecer si la inhibición producida por este compuesto era causada por la NAG contaminante o por efecto de la α -lactalbúmina sobre la GalTasa. Para diferenciar estas dos posibilidades, decidimos evaluar la acción del UDP-Gal (Lopez *et al.*, 1985). La presencia de UDP-Gal o su análogo en los ensayos no afectó la unión. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la GalTasa no estaría participando en la unión primaria entre las gametas de hámster.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo apoyan la participación de la NAG de los espermatozoides de hámster como una proteína tipo lectina durante la unión primaria a la ZP. Además, no encontramos evidencias de que esta enzima participe en la penetración ni en la reacción de zona en el hámster.

Llamativamente, estos resultados se oponen al modelo propuesto en el ratón. Sin embargo, se suma a las evidencias que señalan la diferencia entre

ambos sistemas. El PNP-GlcNAc, sustrato de NAG que inhibe la unión a la ZP en el hámster, no produce el mismo efecto en el ratón (Lopez *et al.*, 1985). En concordancia con esto, se ha sugerido que la NAG de espermatozoides de ratón tiene una localización exclusivamente acrosomal (Miller *et al.*, 1993b). Probablemente, estas diferencias estén relacionadas con la existencia de mecanismos divergentes en distintas especies.

CONCLUSION

El objetivo general de este trabajo fue analizar la participación de los carbohidratos en la interacción del espermatozoide de hámster con la ZP y su mecanismo de acción.

En el primer capítulo, analizamos que monosacárido era capaz de afectar la interacción del espermatozoide con la ZP *in vitro* y observamos que la GlcNAc era el azúcar capaz de inhibir la unión y la RA. La capacidad del Sr^{2+} de reemplazar al Ca^{2+} durante la capacitación y la unión a la ZP nos permitió disociar la unión de la RA y demostrar que sitios de unión para GlcNAc en el espermatozoide y residuos terminales de este azúcar en la ZP estarían mediando la unión entre las gametas. Por el contrario, la GlcNAc no parece estar relacionada con la penetración o unión secundaria del espermatozoide a la ZP.

Dado que la GlcNAc es el sustrato de la NAG y esta enzima es particularmente abundante en fluido epididimario y en espermatozoides, decidimos estudiar su posible participación en la interacción espermatozoide-ZP mediada por GlcNAc.

En el segundo capítulo comenzamos estudiando las características de la NAG en el espermatozoide de hámster. Observamos que además de la conocida localización acrosomal de esta enzima, habría una población asociada débilmente a la membrana plasmática. La ocurrencia de la RA produce una disminución en la actividad total de esta enzima en el espermatozoide. Esto

involucra un modulador de la NAG que se encontraría dentro del acrosoma y requiere de la capacitación y la RA para volverse activo. Esta disminución de la actividad de NAG no sería compatible con la participación de la misma como enzima hidrolítica en la penetración de la ZP.

Por último, en el capítulo tres, analizamos la participación de la NAG en el proceso de fertilización. Vimos que la ZP puede funcionar como sustrato de la NAG de espermatozoides de hámster y que la enzima participa en el proceso de fertilización.

En concordancia con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, la función de la NAG estaría limitada a actuar como proteína de unión durante la unión primaria de los espermatozoides a la ZP.

Estos resultados en conjunto sugieren que una NAG de membrana plasmática estaría mediando la unión primaria de los espermatozoides de hámster a residuos terminales GlcNAc de la ZP.

BIBLIOGRAFIA

Adamali,H.I., Somani,I.H., Huang,C.-Q., Mahuran,D., Gravel,R.A., Trasler,J.M., Hermo,L. (1999a). II. Characterization and development of the regional- and cellular-specific abnormalities in the epididymis of mice with b-Hexosaminidase A deficiency. *Journal of Andrology* 20, 803-824.

Adamali,H.I., Somani,I.H., Huang,J.-Q., Mahuran,D., Gravel,R.A., Trasler,J.M., Hermo,L. (1999b). I. Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with b-Hexosaminidase A and B deficiency. *Journal of Andrology* 20, 779-802.

Adham,I.M., Nayernia,K., Engel,W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 46, 370-376.

Agrawal,Y., Ram,P., Cardullo,R.A., Millette,C.F. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete Research* 22, 321-332.

Ahuja,K.K. (1982). Fertilization studies in the hamster. The role of cell surface carbohydrates. *Experimental Cell Research* 140, 353-362.

Ahuja,K.K. (1985). Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am.J.Anat.* 174, 207-223.

Ali,H.B., Guerin,J.F., Pinatel,M.C., Mathieu,C., Boulieu,D., Tritar,B. (1994). Relationship between semen characteristics, a-glucosidase and the capacity of spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *International Journal of Andrology* 17, 121-126.

Amann,R.P., Hammerstedt,R.H., Veeramachaneni,D.N.R. (1993). The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reproduction, Fertility and Development* 5, 361-381.

Austin,C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust.J.Sci.Res.* 4, 581-596.

Avilés,M., Okinaga,T., Shur,B.D., Ballesta,J. (2000). Differential Expression of Glycoside Residues in the Mammalian Zona Pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 57, 296-308.

Baba,T., Azuma,S., Kashiwabara,S., Toyoda,Y. (1994a). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry* 269, 31845-31849.

Baba,T., Michikawa,Y., Kashiwabara,S., Arai,Y. (1989). Proacrosin activation in the presence of a 32-kDa protein from boar spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 160, 1026-32.

Baba,T., Niida,Y., Michikawa,Y., Kashiwabara,S., Kodaira,K., Takenaka,M., Kohno,N., Gerton,G.L., Arai,Y. (1994b). An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 269, 10133-10140.

Barbieri,M.A., Sosa,M.A., Couso,R., Ielpi,L., Merello,S., Tonn,C.E., Bertini,F. (1994). Affinity sites for *N*-acetyl-b-D-glucosaminidase on the surface of rat epididymal spermatozoa. *International Journal of Andrology* 17, 43-49.

Bavister,B.D. (1989). A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster. *Gamete Research* 23, 139-158.

Bedford,J.M. (1977). Sperm/egg interaction: The specificity of Human Spermatozoa. *Anat.Rec.* 188, 477-488.

Bedford,J.M. (1979). Evolution of the Sperm Maturation and Sperm Storage Functions of the Epididymis. Baltimore: Urban and Swarzenberg.

Bedford,J.M., Kim,H.H. (1993). Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, in vivo. *Journal of Experimental Zoology.* 265, 321-328.

Benau,D.A., Storey,B.T. (1987). Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biology of Reproduction* 36, 282-293.

Benoff,S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol.Hum.Reprod.* 3, 599-637.

Benoff,S., Hurley,I.R., Mandel,F.S., Cooper,G.W., Hershlag,A. (1997). Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose - containing neoglycoprotein ligands. *Mol.Hum.Reprod.* 3, 827-837.

Bleil,J.D., Wassarman,P.M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873.

Bleil,J.D., Wassarman,P.M. (1988). Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 85, 6778-6782.

Bleil,J.D., Wassarman,P.M. (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome - intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5563-5567.

Boué,F., Duquenne,C., Lassalle,B., Lefèvre,A., Finaz,C. (1995). FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process. *Biology of Reproduction* 52, 267-278.

Boue,F., Lassalle,B., Duquenne,C., Villaroya,S., Testart,J., Lefevre,A., Finaz,C. (1992). Human sperm proteins from testicular and epididymal origin that participate in fertilization: Modulation of sperm binding to zona-free hamster oocytes, using monoclonal antibodies. *Molecular Reproduction and Development* 33, 470-480.

Bradford,M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Brandelli,A., Miranda,P.V., Añón-Vazquez,M.G., Marín-Briggiler,C.I., Sanjurjo,C., Gonzalez-Echeverría,F., Blaquier,J.A., Tezón,J.G. (1995). A new predictive test for in-vitro fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by N-acetylglucosamine- neoglycoprotein. *Hum.Reprod.* 10, 1751-1756.

Brandelli, A., Miranda, P. V., and Tezon, J. G. Sitios de union para N-acetilglucosamina y/o Manosa acoplados a proteinas G median la reaccion acrosomal en espermatozoides humanos. *Medicina XXXVIII Reunion Cientifica SAIC 52 Supl.2, 2-3.* 1993.

Ref Type: Abstract

Brandelli,A., Miranda,P.V., Tezon,J.G. (1994). Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: Possible role of N-acetylglucosaminidase. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research* 1220, 299-304.

Brandelli,A., Miranda,P.V., Tezón,J.G. (1996). Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins. *Journal of Andrology* 17, 522-529.

Breitbart,H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187, 139-144.

Burkman,L.J. (1990). Hyperactivated Motility of Human Spermatozoa During in Vitro Capacitation. In: *Controls of sperm motility*, ed. C.Gagnon Boca Raton: CRC Press, 303-329.

Calvete,J.J., Carrera,E., Sanz,L., Topfer-Petersen,E. (1996). Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biol.Chem.* 377, 521-7.

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

Cardullo,R.A., Armant,D.R., Millette,C.F. (1989). Characterization of fucosyltransferase activity during mouse spermatogenesis: evidence for a cell surface fucosyltransferase. *Biochemistry-USA* 28, 1611-1617.

Cattaneo,F., Ogiso,M., Hoshi,M., Perotti,M.E., Pasini,M.E. (2002). Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa. *Insect Biochem.Mol.Biol.*2002.Aug;32(8):929-41. 32, 929-41.

Chang,M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature* 168, 997-998.

Chang, Q., Hoefs,S., van der Kemp,A.W., Topala,C.N., Bindels,R.J., Hoenderop,J.G. (2005). The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 310:490-493.

Chapman,D.A., Killian,G.J. (1984). Glycosidase activities in principal cells, basal cells, fibroblasts and spermatozoa isolated from the rat epididymis. *Biology of Reproduction* 31, 627-636.

Chapman,N.R., Barratt,C.L.R. (1996). The role of carbohydrate in sperm-ZP3 adhesion. *Mol.Hum.Reprod.* 2, 767-774.

Chen,J.-S., Doncel,G.F., Alvarez,C., Acosta,A.A. (1995). Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zona pellucida binding. *Journal of Andrology* 16, 55-63.

Cherr,G.N., Lambert,H., Meizel,S., Katz,D.F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Developmental Biology* 114, 119.

Chiu,P.C., Tsang,H.Y., Koistinen,R., Koistinen,H., Seppala,M., Lee,K.F., Yeung,W.S. (2004). The contribution of D-mannose, L-fucose, N-acetylglucosamine, and selectin residues on the binding of glycodefin isoforms to human spermatozoa. *Biol.Reprod.*2004.Jun;70(6):1710-9.Epub.2004.Feb.18. 70, 1710-9. Epub 2004 Feb 18.

Conchie,J., Mann,T. (1957). Glycosidases in mammalian sperm and seminal plasma. *Nature* 179, 1190-1191.

Cooke,S.V., Shur,B.D. (1994). Cell surface b1,4-galactosyltransferase: Expression and function. *Development, Growth and Differentiation* 36, 125-132.

Cooper,T.G. (1992). Epididymal Proteins and Sperm Maturation. In: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction.*, ed. E.Nieschlag, U.-F.HabenichtBerlin: Springer-Verlag, 285-317.

Cross,N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 59, 7-11.

Cuasnicú,P.S., Cohen,D.J., Ellerman,D.A., Busso,D., Da Ros,V.G., Morgenfeld,M. (2002). Changes in Specific Sperm Proteins During Epididymal Maturation. In: *The epididymis. From molecules to clinical practice.*, ed. B.Robaire, B.T.Hinton New York: Kluwer Academic/Plenum, 389-403.

Cuasnicu,P.S., Gonzalez Echeverria,F., Piazza,A.D., Pineiro,L., Blaquier,J.A. (1984). Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 71, 427-431.

Dacheux,J.L., Okamura,N., Chevrier,C., Dacheux,F., Jeulin,C., Gatti,J.L., Paquignon,M. (1991). The Epididymal Environment and Sperm Maturation. In: *Comparative spermatology 20 years after.*, ed. B.Baccetti New York: Serono Symposia Publications - Raven Press, 461-464.

Datti,A., Beccari,T., Emiliani,C., Stirling,J.L., Orlacchio,A. (1993). Blood testosterone levels are correlated with b-N-acetylhexosaminidase activity in human caput epididymis. *Biochemistry and Molecular Biology International* 30, 1013-1020.

Davis,B.K. (1981). Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 78, 7560-7564.

Diekman,A.B. (2003). Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cell Mol.Life Sci.*2003.Feb;60(2):298-308. 60, 298-308.

Downey,J.C., Lambert,C.C. (1994). Attachment of the ascidian sperm surface egg receptor N- acetylglucosaminidase to the cell membrane. *Molecular Reproduction and Development* 38, 453-458.

Dube,C., Leclerc,P., Baba,T., Reyes-Moreno,C., Bailey,J.L. (2005). The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J.Androl.*2005.Jul-Aug;26(4):519-28. 26, 519-28.

Dubois,D.H., Shur,B.D. (1995). Cell surface b1,4-galactosyltransferase - A signal transducing receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 376, 105-114.

Duncan,A.E., Fraser,L.R. (1993). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation *in vitro*: Identification of an M_r 95 000 phosphotyrosine-containing protein. *Journal of Reproduction and Fertility* 97, 287-299.

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

Ehrenwald,E., Foote,R.H., Parks,J.E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular Reproduction and Development* 25, 195-204.

Ehrenwald,E., Parks,J.E., Foote,R.H. (1988). Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol [published erratum appears in *Gamete Res* 1989 Nov;24(3):357]. *Gamete Res.* 20, 145-157.

El-Mestrah,M., Kan,F.K.W. (2001). Distribution of Lectin-Binding Glycosidic Residues in the Hamster Follicular Oocytes and Their Modifications in the Zona Pellucida After Ovulation. *Molecular Reproduction and Development* 60, 517-534.

Emiliozzi,C., Cordonier,H., Guérin,J.F., Ciapa,B., Benchaïb,M., Fénichel,P. (1996). Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in- vitro fertilization. *International Journal of Andrology* 19, 39-47.

Ensslin,M., Shur,B.D. (2003). Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114, 405-417.

Ensslin,M., Vogel,T., Calvete,J.J., Thole,H.H., Schmidtke,J., Matsuda,T., Topfer-Petersen,E. (1998). Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biology of Reproduction* 58, 1057-1064.

Farooqui,A.A., Srivastava,P.N. (1980). Isolation of b-N-acetylhexosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization. *Biochemical Journal* 191, 827-834.

Fayrer-Hosken,R.A., Caudle,A.B., Shur,B.D. (1991). Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development* 28, 74-78.

Focarelli,R., Cacace,M.G., Seraglia,R., Rosati,F. (1997). A Nonglycosylated, 68-kDa a-L-Fucosidase is bound to the mollusc bivalve *Unio elongatulus* sperm plasma membrane and differs from a glycosylated 56-kDa form present in the seminal fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234, 54-58.

Focarelli,R., Giuffrida,A., Rosati,F. (1995). Changes in the sialylglycoconjugate distribution on the human sperm surface during *in-vitro* capacitation: Partial purification of a 20 kDa sialylglycoprotein of capacitated spermatozoa. *Hum.Reprod.* 10, 2755-2759.

Fock-Nüzel,R., Lottspeich,F., Henschen,A., Müller-Esterl,W. (1984). Boar acrosin is a two-chain molecule. Isolation and primary structure of the light chain; homology with the pro-part of other serine proteinases. *European Journal of Biochemistry* 141, 441-446.

Fowler,R.E., Grainge,C. (1985). A histochemical study of the changes occurring in the protein-carbohydrate composition of the cumulus-oocyte complex and zona pellucida in immature mice in response to gonadotrophin stimulation. *Histochemical Journal* 17, 1235-1249.

Fraser,L.R. (1987a). Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 77-89.

Fraser,L.R. (1987b). Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. *Gamete Research* 18, 363-374.

Fraser,L.R. (1993). *In vitro* capacitation and fertilization. *Methods Enzymol.* 225, 239-253.

Fraser,L.R., Ahuja,K.K. (1988). Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Research* 20, 491.

Fraser,L.R., Herod,J.E. (1990). Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *Journal of Reproduction and Fertility* 88, 611-621.

Furlong,L.I., Harris,J.D., Vazquez-Levin,M.H. (2005a). Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I. Studies with recombinant human ZPA, ZPB, and ZPC. *Fertil.Steril.*2005.Jun;83(6):1780-90. 83, 1780-90.

Furlong,L.I., Veaute,C., Vazquez-Levin,M.H. (2005b). Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida glycoproteins. II. Participation of mannose residues in the interaction. *Fertil.Steril.*2005.Jun;83(6):1791-6. 83, 1791-6.

Galantino-Homer,H.L., Visconti,P.E., Kopf,G.S. (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- dependent pathway. *Biology of Reproduction* 56, 707-719.

Gatti,J.L., Castella,S., Dacheux,F., Ecroyd,H., Metayer,S., Thimon,V., Dacheux,J.L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim.Reprod.Sci.*2004.Jul;82-83:321-39. 82-83, 321-39.

Geiger,B., Ben-Yoseph,Y., Arnon,R. (1974). Purification of human hexosaminidases A and B affinity chromatography. *FEBS Letters* 45, 276-281.

Godknecht,A., Honegger,T.G. (1991). Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N- acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Developmental Biology* 143, 398-407.

Godknecht,A.J., Honegger,T.G. (1995). Specific inhibition of sperm b-N-acetylglucosaminidase by the synthetic inhibitor N-acetylglucosaminono-1,5-lactone O-(phenylcarbamoil)oxime inhibits fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Development, Growth and Differentiation* 37, 183-189.

Gong,X., Dubois,D.H., Miller,D.J., Shur,B.D. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4- galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269, 1718-1721.

Gwatkin,R.B.L., Andersen,O.F. (1973). Effect of glycosidase inhibitors on the capacitation of hamster spermatozoa by cumulus cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 35, 565-567.

Haase,B., Schlotterer,C., Hundrieser,M.E., Kuiper,H., Distl,O., Topfer-Petersen,E., Leeb,T. (2005). Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* 2005.Jun.6;352:20-9. 352, 20-9.

Hall,J.C., Killian,G.J. (1987). Changes in rat sperm membrane glycosidases activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biology of Reproduction* 36, 709-718.

Hamamah,S., Lanson,M., Barthelemy,C., Garrigue,M.A., Lansac,J., Muh,J.P., Royere,D. (1993). Treatment of human spermatozoa with follicular fluid can influence lipid content and motility during in vitro capacitation. *Reprod.Nutr.Dev.* 33, 429-435.

Harper,M.J.K. (1982). Sperm and Egg Transport. In: *Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization.*, ed. C.R.Austin, R.V.ShortCambridge: Cambridge University Press, 102-128.

Harris,J.D., Hibler,D.W., Fontenot,G.K., Hsu,K.T., Yurewicz,E.C., Sacco,A.G. (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4, 361-93.

Hayashi,M., Yonezawa,N., Katsumata,T., Ikeda,K., Imai,F.L., Kikuchi,K., Hamano,S., Nakano,M. (2004). Activity of exoglycosidases in ejaculated spermatozoa of boar and bull. *Zygote*.2004.May;12(2):105-9. 12, 105-9.

Heffner,L.J., Saling,P.M., Storey,B.T. (1980). Separation of calcium effects on motility and zona binding ability in mouse spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*. 212, 53-60.

Hermo,L., Adamali,H.I., Mahuran,D., Gravel,R.A., Trasler,J.M. (1997). b-hexosaminidase immunolocalization and a- and b-subunit gene expression in the rat testis and epididymis. *Molecular Reproduction and Development* 46, 227-242.

Hermo,L., Adamali,H.I., Trasler,J.M. (2004). Postnatal development and regulation of beta-hexosaminidase in epithelial cells of the rat epididymis 2. *J Androl* 25, 69-81.

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

Hoodbhoy,T., Joshi,S., Boja,E.S., Williams,S.A., Stanley,P., Dean,J. (2005). Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J.Biol.Chem*.2005.Apr.1;280(13):12721-31.Epub.2005.Jan.27. 280, 12721-31. Epub 2005 Jan 27.

Horvath,P.M., Kellom,T., Caulfield,J., Boldt,J. (1993). Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development* 34, 65-72.

Hoshi,K., Aita,T., Yanagida,K., Yoshimatsu,N., Sato,A. (1990). Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Hum.Reprod*. 5, 71-74.

Hoshi,M., DeSantis,R., Pinto,M.R., Cotelli,F., Rosati,F. (1985). Sperm glycosidases as mediators of sperm-egg binding in the ascidians. *Zool.Sci*. 2, 65-69.

Howes,E., Pascall,J.C., Engel,W., Jones,R. (2001). Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J.Cell Sci*.2001.Nov;114(Pt.22):4127-36. 114, 4127-36.

Howes, L., Jones,R. (2002). Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin / acrosin during fertilization. *J.Reprod.Immunol*.2002.Jan; 53(1-2):181-92. 53, 181-92.

Huang, J.B., Takeda,Y., Araki,Y., Sendo,F., Petty,H.R. (2004). Molecular proximity of complement receptor type 3 (CR3) and the glycosylphosphatidylinositol-linked protein GPI-80 on neutrophils: effects of cell adherence, exogenous saccharides, and lipid raft disrupting agents. *Mol. Immunol*. 40: 1249-1256.

Huang,T.T.F., Jr., Ohzu,E., Yanagimachi,R. (1982). Evidence suggesting that L-fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. *Gamete Research* 5, 355-361.

Hunnicut,G.R., Koppel,D.E., Myles,D.G. (1997). Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Developmental Biology* 191, 146-159.

Hutchinson,T., Dwivedi,K., Rastogi,A., Prasad,R., Pereira,B.M. (2002a). N-acetyl beta-D-glucosaminidase is not attached to human sperm membranes through the glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchor. *Asian.J.Androl.*2002.Mar;4(1):27-33. 4, 27-33.

Hutchinson,T., Dwivedi,K., Rastogi,A., Prasad,R., Pereira,B.M.J. (2002b). N-Acetyl b-D-glucosaminidase is not attached to human sperm membranes through the glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchor. *Asian J.Androl.* 4, 27-33.

Iwamatsu,T., Chang,M.C. (1969). In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature* 222, 919-920.

Jha,K.N., Shivaji,S. (2002). Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. *Mol.Reprod.Dev.*2002.Sep;63(1):119-30. 63, 119-30.

Jin,Y.Z., Bannai,S., Dacheux,F., Dacheux,J.L., Okamura,N. (1997). Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. *Molecular Reproduction and Development* 47, 490-496.

Jones,O.T., Earnest,J.P., McNamee,M.G. (1987). Solubilization and Reconstitution of Membrane Proteins. In: *Biological membranes. A practical approach*, ed. J.C.B.Findlay, W.H.EvansOxford: IRL Press, 139-177.

Joyce,C.L., Mack,S.R., Anderson,R.A., Zaneveld,L.J.D. (1986). Effect of Hyaluronidase, B-glucuronidase and B-N-acetylglucosaminidase inhibitors on sperm penetration of the mouse oocyte. *Biology of Reproduction* 35, 336-346.

Juneja,S.C. (2002). Development of infertility at young adult age in a mouse model of human Sandhoff disease. *Reproduction, Fertility and Development* 14, 407-412.

Kalab,P., Schultz,R.M., Kopf,G.S. (1993). Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation: Inhibitory effects of follicular fluid, fetuin, and a₂HS-glycoprotein. *Biology of Reproduction* 49, 561-567.

Kapur,D.N., Gupta,G.S. (1988). Immunocytochemical localization of b-N-acetyl glucosaminidase in human reproductive organs. *Biology of Reproduction* 38, 373.

Khar,A., Anand,S.R. (1977). Purification and properties of B-N-acetylglucosaminidase from bull sperm. *Biochimica et Biophysica Acta* 483, 141-151.

Kimura,J., Sato,K., Tsukise,A., Okano,M. (1991). Appearance of lectin binding affinity to the zona pellucida during hamster oocyte maturation. *Cell.Mol.Biol.* 37, 623-629.

Kinsey,W.H., Koehler,J.K. (1978). Cell surface changes associated with in vitro capacitation of hamster sperm. *Journal of Ultrastructure Research* 64, 1-13.

Konami,Y., Uno,T., Fujii,M., Yamamoto,K., Osawa,T., Irimura,T. (1995). A high degree of sequence homology in the putative carbohydrate recognition domains of pokeweed mitogen and wheat germ agglutinin: Poly-N-acetyllactosamine-binding lectins from different species. *Glycobiology* 5, 663-670.

Kumar,G.P., Laloraya,M., Agrawal,P., Laloraya,M.M. (1990). The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. *Andrologia* 22, 184-194.

Lambert,C., Goudeau,H., Franchet,C., Lambert,G., Goudeau,M. (1997). Ascidian eggs block polyspermy by two independent mechanisms: one at the egg plasma membrane, the other involving the follicle cells. *Molecular Reproduction and Development* 48, 137-143.

Langlais,J., Kan,F.W., Granger,L., Raymond,L., Bleau,G., Roberts,K.D. (1988). Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20, 185-201.

Leaback,D.H., Walker,P.G. (1961). Studies on Glucosaminidase. 4 The fluorometric assay of N-Acetyl-b-Glucosaminidase. *Biochemical Journal* 78, 151-156.

Lee,M.A., Storey,B.T. (1989). Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H⁺ and Ca²⁺ permeability: population and single cell kinetics. *Gamete Research* 24, 303-326.

Legler,G., Bollhagen,R. (1992). (±)-6-Acetamido-1,2-anhydro-6-deoxy-*myo*-inositol: A tight-binding inhibitor and pseudosubstrate for N-acetyl-b-glucosaminidases. *Carbohydrate Research* 233, 113-123.

Leyton,L., Saling,P.M. (1989). Evidence that aggregation of sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *Journal of Cell Biology* 108, 2163-2168.

Lin,Y., Kan,F.W.K. (1996). Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biology of Reproduction* 55, 1133-1146.

Litscher,E.S., Juntunen,K., Seppo,A., Penttilä,L., Niemelä,R., Renkonen,O., Wassarman,P.M. (1995). Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs *in vitro*. *Biochemistry* **34**, 4662-4669.

Litscher,E.S., Wassarman,P.M. (1996). Characterization of a mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity *in vitro*. *Biochem.* **35**, 3980-3985.

Loeser,C.R., Tulsiani,D.R.P., Tulsiani,D.R. (1999). The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* **60**, 94-101.

Lopez,L.C., Bayna,E.M., Litoff,D., Shaper,N.L., Shaper,J.H., Shur,B.D. (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *Journal of Cell Biology* **101**, 1501-1510.

Luconi,M., Krausz,C., Forti,G., Baldi,E. (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **55**, 207-216.

Marín-Briggiler,C.I., Vazquez-Levin,M., Gonzalez Echeverria,F., Blaquier,J.A., Tezón,J.G., Miranda,P.V. (1999). Strontium supports human sperm capacitation but not follicular fluid-induced acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **61**, 673-680.

Marquez,B., Suarez,S.S. (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol.Reprod.*2004.Jun;70(6):1626-33.Epub.2004.Feb.06. **70**, 1626-33. Epub 2004 Feb 06.

Martinez,M.A., Martelotto,L., Cabada,M.O. (2000). Purification and biological characterization of N-Acetyl-b-D-Glucosaminidase from *Bufo arenarum* Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **57**, 194-203.

Matson,P.L. (1995). Sperm Antibodies: Formation and Significance. In: *From Gametes: The Spermatozoon*, ed. J.G.Grudzinskas, J.L.Yovich Cambridge University Press, 237-249.

Matsuura,K., Sawada,H., Yokosawa,H. (1995). N-acetylglucosaminidase inhibitor isolated from the vitelline coat of ascidian eggs is a candidate sperm receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **213**, 311-316.

Maymon,B.B.S., Maymon,R., Ben-Nun,I., Ghetler,Y., Shalgi,R., Skutelsky,E. (1994). Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* **102**, 81-86.

Medeiros,C.M.O., Parrish,J.J. (1996). Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 44, 525-532.

Miller, D. J., Cross, N. L., Vazquez-Levin, M., and Shur, B. D. The role of sperm galactosyltransferase in fertilization : presence and possible function in human and other mammals. 1991a. *Proceedings Sperm Physiol. Siena Italy*.
Ref Type: Report

Miller,D.J., Cross,N.L., Vazquez-Levin,M., Shur,B.D. (1991b). The Role of Sperm Galactosyltransferase in Fertilization: Presence and Possible Function in Humans and Other Mammals. In: *Comparative spermatology 20 years after.*, ed. B.Baccetti New York: Serono Symposia Publications - Raven Press, 569-574.

Miller,D.J., Gong,X., Decker,G., Shur,B.D. (1993a). Egg cortical granule *N*-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *Journal of Cell Biology* 123, 1431-1440.

Miller,D.J., Gong,X., Shur,B.D. (1993b). Sperm require *b-N*-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118, 1279-1289.

Miller,D.J., Macek,M.B., Shur,B.D. (1992). Complementarity between sperm surface B-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357, 589-593.

Minami,S., Yamano,S., Ishikawa,H., Aono,T. (1995). Increase of intracellular free $[Ca^{2+}]$ in single human motile spermatozoa treated with human follicular fluid. *Archives of Andrology* 34, 115-123.

Miranda,P.V., Brandelli,A., Tezón,J.G. (1995). Characterization of *b-N*-acetylglucosaminidase from human epididymis. *International Journal of Andrology* 18, 263-270.

Miranda,P.V., Gonzalez Echeverria,F., Blaquier,J.A., Mahuran,D., Tezon,J.G. (2000). Evidence for the participation of *b*-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro*. *Mol.Hum.Reprod.* 6, 699-706.

Miranda,P.V., Gonzalez-Echeverría,F., Marín-Briggiler,C.I., Brandelli,A., Blaquier,J.A., Tezón,J.G. (1997). Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding *in vitro*. *Mol.Hum.Reprod.* 3, 399-404.

Mitra,K., Shivaji,S. (2004). Novel tyrosine-phosphorylated post-pyruvate metabolic enzyme, dihydrolipoamide dehydrogenase, involved in capacitation of hamster spermatozoa. *Biol.Reprod.*2004.Apr;70(4):887-99.Epub.2003.Nov.26. 70, 887-99. Epub 2003 Nov 26.

Moller,C.C., Bleil,J.D., Kinloch,R.A., Wassarman,P.M. (1990). Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins
2. *Dev.Biol* 137, 276-286.

Moreno,R., Orihuela,P., Barros,C. (2001). Differential effects of polysulphates between mouse and hamster during in vitro fertilization. *Andrologia*.2001.Jan;33(1):19-25. 33, 19-25.

Mori,K., Daitoh,T., Irahara,M., Kamada,M., Aono,T. (1989). Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161, 207-211.

Mortillo,S., Wassarman,P.M. (1991). Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 113, 141-149.

Mortimer,D. (1986). Comparison of the fertilizing ability of human spermatozoa incubated in calcium- and strontium-containing media. *Journal of Experimental Zoology*. 237, 21-24.

Mortimer,D., Chorney,M.J., Curtis,E.F., Trounson,A.O. (1988). Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. *Journal of Experimental Zoology*. 246, 194-201.

Mortimer,D., Curtis,E.F., Dravland,J.E. (1986). The use of strontium-substituted media for capacitating human spermatozoa: an improved sperm preparation method for the zona-free hamster egg penetration test. *Fertility and Sterility* 46, 97-103.

Myles,D.G., Primakoff,P. (1984). Localized surface antigens of guinea-pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *Journal of Cell Biology* 99, 1634-1641.

Nagdas,S.K., Winfrey,V.P., Olson,G.E. (1996). Identification of hydrolase binding activities of the acrosomal matrix of hamster spermatozoa. *Biology of Reproduction* 55, 1405-14.

Naz,R.K. (1999). Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 60, 1402-1409.

Naz,R.K., Rajesh,P.B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod.Biol.Endocrinol*.2004.Nov.9;2(1):75. 2, 75.

Nixon,B., Lu,Q., Wassler,M.J., Foote,C.I., Ensslin,M.A., Shur,B.D. (2001). Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues.Organs* 2001;168(1-2):46-57. 168, 46-57.

- Oehninger,S., Patankar,M.S., Seppala,M., Clark,G.F. (1998). Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia* 30, 269-274.
- Oikawa,T., Yanagimachi,R., Nicolson,G.L. (1973). Wheat germ agglutinin blocks mammalian fertilization. *Nature* 241, 256-259.
- Orgebin-Crist,M.C., Fournier Delpech,C. (1982). Sperm-egg interaction: Evidence for maturational changes during epididymal transit. *Journal of Andrology* 3, 429-433.
- Pasini,M.E., Cattaneo,F., Pinto,M.R., De Santis,R., Perotti,M.-E. (1999). Plasma membrane association and preliminary characterization of *Drosophila* sperm surface glycosidases. *Molecular Reproduction and Development* 52, 166-173.
- Perotti,M.E., Cattaneo,F., Pasini,M.E., Verni,F., Hackstein,J.H. (2001a). Male sterile mutant *casanova* gives clues to mechanisms of sperm- egg interactions in *Drosophila melanogaster*. *Mol.Reprod.Dev.*2001.Oct;60(2):248-59. 60, 248-59.
- Perotti,M.-E., Cattaneo,F., Pasini,M.E., Verni,F., Hackstein,H.P. (2001b). Male sterile mutant *casanova* gives clues to mechanisms of sperm-egg interactions in *Drosophila melanogaster*. *Mo.Reprod.Devel.* 60, 248-259.
- Phillips,D.M., Shalgi,R. (1980). Surface properties of the zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology.* 213, 1-8.
- Ponce,R., Urch,U., Yanagimachi,R. (1994). Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote* 2, 253-262.
- Rochwerger,L., Cuasnicu,P.S. (1992). Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 31, 34-41.
- Rodeheffer,C., Shur,B.D. (2004a). Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development* 2004.Feb;131(3):503-12.Epub.2003.Dec.24. 131, 503-12. Epub 2003 Dec 24.
- Rodeheffer,C., Shur,B.D. (2004b). Sperm from beta1,4-galactosyltransferase I-null mice exhibit precocious capacitation. *Development* 2004.Feb;131(3):491-501.Epub.2003.Dec.24. 131, 491-501. Epub 2003 Dec 2.
- Rodger,J.C., Young,R.J. (1981). Glycosidase and cumulus dispersal activities of acrosomal extracts from Opossum (marsupial) and rabbit (eutherian) spermatozoa. *Gamete Research* 4, 507-514.
- Rufas,O., Shalgi,R. (1990). Maturation-associated changes in the rat zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 26, 324-330.

Sada,A., Santin,M., Magnano,A.R., Cacace,M.G. (1991). Properties of B-N-Acetylglucosaminidase From Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* Spermatozoa. In: Comparative spermatology 20 years after., ed. B.Baccetti New York: Serono Symposia Publications - Raven Press, 227-231.

Sada, A., Santin, M., Pallini, R., and Cacace, M. G. Glycosidases as recognition molecules in the early steps of fertilization. *Ital.J.Biochem.* 41, 270A-271A. 1992. Ref Type: Abstract

Saling,P., Bunch,D., Le Guen,P., Leyton,L. (1991). A Model for ZP3-Induced Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm. In: Comparative spermatology 20 years after., ed. B.Baccetti New York: Serono Symposia Publications - Raven Press, 593-597.

Saling,P.M. (1981). Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 6231-6235.

Sanjurjo,C., Dawidowsky,A.R., Cameo,M.S., Echeverria,F.G., Blaquier,J.A. (1990). Participation of human epididymal sperm coating antigens in fertilization. *Journal of Andrology* 11, 476-483.

Saxena,D.K., Tanii,I., Oh-oka,T., Yoshinaga,K., Toshimori,K. (2000). Behaviour and role of an intra-acrosomal antigenic molecule, acrin 3, during mouse fertilisation in vitro. *Zygote*.2000.Nov;8(4):329-38. 8, 329-38.

Schmid,C.E., Schroer,N., Müller,D.G. (1994). Female gamete membrane glycoproteins potentially involved in gamete recognition in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Plant Sci.* 102, 61-67.

Schmidt,A., Mavrogianis,P.A., O'Day-Bowman,M.B., Verhage,H.G. (1997). Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 46, 201-207.

Schwarz,M.A., Koehler,J.K. (1979). Alterations in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 21, 1295-1307.

Setchell,B.P. (1982). Spermatogenesis and Spermatozoa. In: *Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization*, ed. C.R.Austin, R.V.Short Cambridge University Press, 63-101.

Shalgi,R., Maymon,R., Bar-Shira,B., Amihai,D., Skutelsky,E. (1991). Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 29, 365-372.

Shur,B.D. (1993). Glycosyltransferases as cell adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 854-863.

Shur,B.D., Ensslin,M.A., Rodeheffer,C. (2004). SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. *Curr.Opin.Cell Biol.*2004.Oct;16(5):477-85. 16, 477-85.

Shur,B.D., Hall,N.G. (1982a). A role for mouse sperm surface galactosyl transferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *Journal of Cell Biology* 95, 574-579.

Shur,B.D., Hall,N.G. (1982b). Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. *Journal of Cell Biology* 95, 567-573.

Skudlarek,M.D., Orgebin-Crist,M.C. (1986). Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion. *Biology of Reproduction* 35, 167-178.

Skudlarek,M.D., Tulsiani,D.R.P., Nagdas,S.K., Orgebin-Crist,M.-C. (1993). b-D-galactosidase of rat spermatozoa: Subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biology of Reproduction* 49, 204-213.

Skutelsky,E., Ranen,E., Shalgi,R. (1994). Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 35-41.

Smolen,J.E., Noble,P., Freed,R., Weissmann,G. (1983). Metabolic requirements for maintenance of the chlortetracycline-labeled pool of membrane-bound calcium in human neutrophils
1. *J Cell Physiol* 117, 415-422.

Spungin,B., Margalit,I., Breitbart,H. (1995). A 70 kDa protein is transferred from the outer acrosomal to the plasma membrane during capacitation. *FEBS Letters* 357, 98-102.

Stock,C.E., Fraser,L.R. (1989). Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 87, 463-478.

Suarez,S.S., Dai,X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction* 46, 686-91.

Suzuki,H., Yang,X., Foote,R.H. (1994). Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 38, 421-430.

Takada,M., Yonezawa,N., Yoshizawa,M., Noguchi,S., Hatanaka,Y., Nagai,T., Kikuchi,K., Aoki,H., Nakano,M. (1994). pH-sensitive dissociation and association of b-N-acetylhexosaminidase from boar sperm acrosome. *Biology of Reproduction* 50, 860-868.

Tantibhedhyangkul,J., Weerachayanukul,W., Carmona,E., Xu,H., Anupriwan,A., Michaud,D., Tanphaichitr,N. (2002). Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol.Reprod.*2002.Jul;67(1):212-9. 67, 212-9.

Topfer-Petersen,E., Cechova,D. (1990). Zona pellucida induces proacrosin-to-acrosin conversion. *International Journal of Andrology* 13, 190-196.

Topfer-Petersen,E., Friess,A.E., Henschen,A., Cechova,D., Steinberger,M. (1989). Sperm Acrosin and Binding to the Zona Pellucida. In: *Gamete Interaction. Prospects for Immunocontraception*, ed. N.J.Alexander, D.Griffin, J.M.Spieler, G.M.H.Waites New York: Wiley-Liss, 1165-1172.

Topfer-Petersen,E., Henschen,A. (1987). Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Letters* 226, 38-43.

Töpfer-Petersen,E., Mann,K., Calvete,J.J. (1993). Identification of porcine oocyte 55 kDa a and b proteins within the zona pellucida glycoprotein families indicates that oocyte sperm receptor activity is associated with different zona pellucida proteins in different mammalian species. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 374, 411-417.

Tremblay,R.R. (1986). Epididymal Markers and Sperm Analysis. In: *Andrology: Male fertility and sterility.*, ed. J.D.Paulson, A.Negro-Vilar, E.Lucena, L.Martini Orlando: Academic Press.Inc., 273-291.

Tulsiani,D.R. (2003). Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc.Res.Tech.*2003.May.1;61(1):18-27. 61, 18-27.

Tulsiani,D.R.P., Skudlarek,M.D., Orgebin-Crist,M.C. (1990). Human sperm plasma membranes possess a-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biology of Reproduction* 42, 843-858.

Tulsiani,D.R.P., Skudlarek,M.D., Orgebin-Crist,M.C., Tulsiani,D.R. (1989). Novel a-D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: Characterization and potential role in sperm-egg interactions. *Journal of Cell Biology* 109, 1257-1267.

Uto,N., Yoshimatsu,N., Lopata,A., Yanagimachi,R. (1988). Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*. 248, 113-121.

Vázquez,J.M., Martínez,E., Pastor,L.M., Roca,J., Matas,C., Calvo,A. (1996). Lectin histochemistry during *in vitro* capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: New lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochemica* 98, 93-100.

Visconti,P.E., Bailey,J.L., Moore,G.D., Pan,D., Olds-Clarke,P., 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., 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.

Vo,L.H., Yang Yen,T., Macher,B.A., Hedrick,J.L. (2003). Identification of the ZPC Oligosaccharide ligand involved in sperm binding and the glycan structures of *Xenopus laevis* vitelline envelope glycoproteins. *Biology of Reproduction* 69, 1822-1830.

Ward,C.R., Storey,B.T. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay
1. *Dev.Biol* 104, 287-296.

Wassarman,P.M. (1987). Early events in mammalian fertilization. *Annu.Rev.Cell Biol.* 3, 109-143.

Wassarman,P.M. (1989). Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 57, 415-443.

Wassarman,P.M. (1990). Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 108, 1-17.

Yamagata,K., Murayama,K., Okabe,M., Toshimori,K., Nakanishi,T., Kashiwabara,S., Baba,T. (1998). Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10470-10474.

Yanagimachi,R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility* 23, 193-196.

Yanagimachi,R. (1981). Mechanism of Fertilization in Mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, ed. L.J.Mastroianni, J.D.Biggers Plenum Press, 82-182.

Yanagimachi,R. (1982). Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 5, 323-344.

Yanagimachi,R. (1988). Mammalian Fertilization. In: *Physiology of Reproduction*, ed. E.Knobil, J.NeillNew York: Raven Press, 135-185.

Yanagimachi,R. (1994). Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, ed. E.Knobil, J.D.NeillNew York: Raven Press, Ltd., 189-317.

Yanagimachi,R., Lopata,A., Odom,C., Bronson,R., Mahi,C., Nicolson,G. (1979). Retention of biological characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertility and Sterility* 31, 562-574.

Yanagimachi,R., Phillips,D.M. (1984). The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. *Gamete Research* 9, 1-9.

Yanagimachi,R., Usui,N. (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research* 89, 161-174.

Yeung,C.H., Cooper,T.G. (2003). Developmental changes in signalling transduction factors in maturing sperm during epididymal transit. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)*.2003.May;49(3):341-9. 49, 341-9.

Yudin,A.I., Cherr,G.N., Vandevort,C.A., Overstreet,J.W. (1998). Rearrangement of the PH-20 protein on the surface of macaque spermatozoa following exposure to anti-PH-20 antibodies or binding to zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 50, 207-220.

Yudin,A.I., Vandevort,C.A., Li,M.W., Overstreet,J.W. (1999). PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 53, 350-62.

Yurewicz,E.C., Sacco,A.G., Gupta,S.K., Xu,N., Gage,D.A. (1998). Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 273, 7488-7494.

Zeng,Y., Clark,E.N., Florman,H.M. (1995). Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental Biology* 171, 554-563.