



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, FISICOQUÍMICA Y DINÁMICA DE
MIGRACIÓN DE DOS PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS PORCINAS CON AFINIDAD
A ZONA PELÚCIDA HOMÓLOGA**

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

HÉCTOR ZAYAS PÉREZ

Julio del 2005

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93. Adicionalmente el CONACyT apoyó a Héctor Zayas Pérez a través de la beca 95360.

Esta tesis formó parte del Proyecto Multidisciplinario denominado: *“Caracterización bioquímica, fisicoquímica y localización dinámica de una proteína espermática de 55 kDa durante la capacitación”*, llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud (División de Ciencias Biológicas y de la Salud) y el Área de Biofisicoquímica del Departamento de Química (División de Ciencias Básicas e Ingeniería) de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa en el período comprendido de 1999 a 2004.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud (División de Ciencias Biológicas y de la Salud) y en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química (División de Ciencias Básicas e Ingeniería) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

HÉCTOR ZAYAS PÉREZ

El día 01 de julio del 2005

COMITÉ TUTORIAL:

Co-tutor: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

Co-tutor: DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Asesor: DR. SALVADOR RAMÓN TELLO SOLÍS

Sinodal: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES

Sinodal: DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORIAL

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR “C” Y PROFESOR DISTINGUIDO DE LA
UAM-I. MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR “C” DE LA UAM-I. MIEMBRO DEL
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

ASESOR DE TESIS

DR. SALVADOR RAMÓN TELLO SOLÍS

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR “C” DE LA UAM-I. MIEMBRO DEL
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar un cumplido reconocimiento al Dr. José Miguel Betancourt Rule, al Dr. Humberto González Márquez y al Dr. Salvador Ramón Tello Solís, por su paciencia y apoyo en la realización de este trabajo. Agradezco al Dr. Federico Martínez Montes, así como al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por haber aceptado la revisión del presente trabajo y por ser miembros de mi jurado.

Dedico con todo mi ser este trabajo a mi familia, quienes consciente o inconscientemente soportaron todo tipo de desatenciones: A Marieanne, a Héctor Mattheus y a Paty mi esposa.

Sea este un humilde homenaje póstumo a mi mamá, Martha Pérez Espinoza, quien desde hacía varios años deseaba, que su hijo fuera Doctor.

A mi papá, por quien he llegado hasta donde estoy por ser un promotor incansable de que sus hijos se superen.

A mis hermanos: Griselda, Sergio, Mirna, Elvia y Milton, a quienes quiero cada día más.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Celular.

Pero sobre todo ... gracias a Dios.

RESUMEN

Aunque generalmente se ha aceptado que ZP3 (componente 3 de la zona pelúcida) es la principal proteína del ovocito que es la responsable de la unión primaria entre el ovocito y el espermatozoide en la mayoría de las especies, la identificación del receptor complementario sobre la superficie de los espermatozoides se ha mantenido controvertido. Actualmente se ha propuesto el concepto de múltiples proteínas espermáticas que actúan en coordinación para facilitar los complejos eventos que ocurren durante el reconocimiento entre gametos de mamíferos. La cantidad de proteínas y jerarquía con la que éstas coordinan el fenómeno de reconocimiento especie-específico es actualmente poco claro. En esta tesis, se muestra la purificación de dos proteínas espermáticas porcinas con afinidad a ZP por medio de cromatografía de afinidad —la acrosina y la lactadherina— de las cuales se analiza la estructura secundaria obtenida por dicroísmo circular (DC), así como la cinética de migración determinada por microscopía electrónica, antes y después de la capacitación espermática. El análisis de los espectros de DC de ambas proteínas muestran que el patrón de plegamiento que sigue la lactadherina es del tipo $\alpha+\beta$, mientras que la acrosina muestra el tipo α . Esto demuestra que se trata de dos proteínas de adhesión diferentes en su estructura secundaria. El análisis de la localización antes y después de la capacitación, pudo ser determinado solamente para la acrosina, de la cual se confirmó que está ubicada en el interior del acrosoma al observar marcaje solamente cuando algunas membranas se mostraban dañadas después de 4 h de capacitación. Puesto que la lactadherina es una

proteína novedosa de adhesión en el espermatozoide porcino y dado que su concentración es minoritaria, en esta tesis se demostró que puede ser sustituida por aquella obtenida abundantemente en la leche de la misma especie o bien, por la lactadherina de leche bovina, con quienes se comparó la secuencia completa de aminoácidos. Los resultados de esta última parte del trabajo demuestran que las lactadherinas porcina y bovina encontradas abundantemente en la fracción grasa de la leche puede ser usada como análogo disponible de la lactadherina de origen espermático ya que: (1) mostró afinidad por la ZP porcina, (2) su secuencia de aminoácidos tienen un alto porcentaje de identidad con aquella presente en los espermatozoides y (3) el análisis de sus espectros presentan el mismo patrón de plegamiento (tipo $\alpha+\beta$). Debido a estas características y por razones de cantidad y disponibilidad, la lactadherina de leche bovina puede ser la proteína de elección para estudiar el reconocimiento entre gametos porcinos.

ABSTRACT

Although generally has been accepted that ZP3 (component 3 from zona pellucida) is the main responsible sperm-oocyte binding protein present in the most of species, identification of complementary receptor on surface from sperm, it has been debatable. Currently, it has been proposed the concept of multiple sperm proteins that act in coordinated manner to facilitate the complex events that occur during recognition between mammal gametes. The quantity of protein and hierarchy which they coordinate the species-specific recognition phenomenon is currently few clear. In present thesis, it is shown the purification from two pig sperm proteins with affinity of ZP by means of affinity chromatography — acrosina and lactadherin—from which it is analyzed the secondary structure obtains from circular dichroism (CD), as well as the kinetic of migration by electronic microscopy, before and after sperm capacitation. Analysis of CD spectra from both proteins show that folding pattern is type $\alpha+\beta$ for lactadherin, while acrosin show a pattern type α . This shows that is a matter of two different identifying adhesion proteins as for its secondary structure. Analysis of localization before and after capacitation, it could be determined only for acrosin, of which was confirmed that is located inside the acrosome to observe marking only when some membranes they were shown damaged after 4 h capacitation. Lactadherin —a novel adhesion protein from pig sperm— being a minority protein, can be replaced for that one obtained abundantly from milk of same species as well as from bovine milk lactadherin, with which ones, the primary structure it

was compared. The results of this last part of research showing that the pig and bovine lactadherins, abundantly found in the milk fat fraction can be used as suitable analogs of sperm origin lactadherin for the following reasons: (1) The affinity for the ZP, (2) the fact that the primary sequence of both milk lactadherins is highly homologous as well as being homologous with the spermatid lactadherin and (3) the secondary structures for both milk lactadherins present the same folding pattern (type $\alpha+\beta$). Due to this evidence and to quantity and availability reasons, the bovine lactadherin may be the selected protein for future studies as a recognition molecule between porcine gametes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ÍNDICE DE CONTENIDO	11
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	15
GLOSARIO	16
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Aspectos Generales de la Fertilización en Mamíferos	21
1.2. Aspectos Específicos de la Fertilización en Mamíferos	22
1.3. Papel de la Zona Pelúcida (ZP) en el Reconocimiento entre Gametos	23
1.3.1. <i>Estructura</i>	23
1.3.2. <i>Papel de la ZP3</i>	24
1.4. Proteínas Espermáticas Porcinas Propuestas como Responsables de la Interacción Primaria con la ZP Homóloga	26
1.4.1. <i>Espermadhesinas</i>	27
1.4.2. <i>Zonadhesina</i>	28
1.4.3. <i>Proteína de adhesión a zona (APz)</i>	30
1.4.4. <i>Acrosina</i>	31
1.4.5. <i>Lactadherina</i>	33
1.4.6. <i>Otras proteínas de unión propuestas en cerdo</i>	35
1.5. El Concepto de Múltiples Proteínas Espermáticas Actuando en Coordinación	35
1.6. Estructura Secundaria de Moléculas Biológicas Determinada por Dicroísmo Circular	38
2. ANTECEDENTES	40
2.1. Bloqueo Directo de la Unión Ovocito – Espermatozoide	40

2.2. Bloqueo Indirecto de la Unión Espermatozoides-Anti-55 kDa y Ovocitos	42
2.3. Inmunolocalización de la Proteína Espermática de 55 kDa	42
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo General	46
4.2. Objetivos Particulares	46
5. MATERIAL Y MÉTODO	47
5.1. Colecta y Procesamiento del Semen Porcino para la Obtención del Extracto Total de Proteínas Espermáticas	47
5.2. Cromatografía de Afinidad	48
5.2.1. <i>Obtención de la ZP</i>	48
5.2.2. <i>Preparación de la columna de afinidad</i>	49
5.2.3. <i>Condiciones de separación de las proteínas espermáticas afines a ZP</i>	50
5.3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)	51
5.4. Inmunodetección en Membrana de Nitrocelulosa de las Proteínas Espermáticas (<i>western-blot</i>)	52
5.5. Secuenciación	53
5.6. Aislamiento y Purificación de Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina.....	53
5.6.1. <i>Aislamiento de las fracciones ricas en lactadherinas</i>	53
5.6.2. <i>Purificación de las lactadherinas</i>	54
5.7. Purificación de la Acrosina Porcina	55
5.8. Dicroísmo Circular (DC) de las Lactadherinas y la Acrosina	55
5.9. Determinación de Carbohidratos de las Lactadherinas	56

5.10. Obtención de Anticuerpos Policlonales contra Lactadherina de Leche y Acrosina Porcinas	57
5.11. Titulación de los Anticuerpos	58
5.12. Microscopía Electrónica	58
5.12.1. <i>Capacitación espermática</i>	59
5.12.2. <i>Preparación de las muestras para el microscopio electrónico</i>	59
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1. Purificación de las Proteínas Espermáticas Porcinas con Afinidad por la ZP Homóloga	61
6.1.1. <i>Análisis de la zona pelúcida porcina (ZP) utilizando como ligando inmovilizado en la columna de afinidad</i>	61
6.1.2. <i>Análisis de las fracciones de proteínas espermáticas separadas por cromatografía de afinidad</i>	64
6.1.3. <i>Ensayo de afinidad por la ZP de la fracción proteínica retenida (P_R) determinada por western-blot</i>	66
6.1.4. <i>Análisis de secuencia de aminoácidos de los componentes de la fracción retenida</i>	69
6.2. Obtención de las Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina como una Alternativa a su Baja Disponibilidad en Espermatozoides	69
6.2.1. <i>Obtención de las fracciones ricas en lactadherina porcina y bovina ...</i>	70
6.2.2. <i>Afinidad de las fracciones ricas en lactadherinas de leche porcina y bovina por ZP porcina, determinada por western-blot</i>	70
6.2.3. <i>Purificación de las lactadherinas de leche porcina y bovina</i>	71
6.2.4. <i>Análisis de secuencias de las lactadherinas porcina y bovina</i>	75
6.3. Identificación de Acrosina y Lactadherina en Extracto Crudo Espermático, Determinado por Western-Blot	78
6.4. Estudios Físicoquímicos de las Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina	80

6.4.1. <i>Afinidad de las lactadherinas (sometidas a DC) por la ZP porcina, determinada por western-blot</i>	80
6.4.2. <i>Análisis de la estructura secundaria de las lactadherinas de leche porcina y bovina, y acrosina espermática por difracción circular (DC)</i>	81
6.4.3. <i>Contenido de carbohidratos de las lactadherinas de leche porcina y bovina</i>	87
6.5. Dinámica de Migración de la Lactadherina y la Acrosina Espermáticas sobre la Membrana de Espermatozoides, Analizada por Microscopía Electrónica	87
6.5.1. <i>Titulación de los anticuerpos</i>	88
6.5.2. <i>Localización de la lactadherina y de la acrosina en la membrana del espermatozoide durante la capacitación in vitro</i>	88
7. DISCUSIÓN GENERAL	92
8. CONCLUSIONES	97
9. PERSPECTIVAS	99
10. REFERENCIAS	100
11. ANEXOS	116
12. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	129

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Análisis electroforético de la ZP solubilizada	63
Figura 2. Cromatograma de afinidad de las proteínas de espermatozoides porcinos	65
Figura 3. Análisis de las proteínas espermáticas porcinas que mostraron afinidad por ZP homóloga	68
Figura 4. Ensayo de afinidad por ZP porcina de lactadherinas porcina y bovina (<i>western-blot</i>)	71
Figura 5. Análisis en SDS-PAGE de la lactadherina de leche porcina en los diferentes pasos de purificación.....	73
Figura 6. Análisis en SDS-PAGE de la lactadherina de leche bovina después de la purificación	74
Figura 7. Alineamiento de los segmentos secuenciados de las lactadherinas	77
Figura 8. <i>Western-blot</i> de extracto crudo espermático porcino	79
Figura 9A. Espectro de DC de la lactadherina porcina	82
Figura 9B. Espectro de DC de la lactadherina bovina	83
Figura 10. Espectros de DC de la acrosina de espermatozoides porcinos	85
Tabla 2. Contribución de la estructura secundaria de lactadherina porcina, lactadherina bovina y acrosina	66
Figura 11. Espermatozoide sin capacitar e incubado con anticuerpos anti-acrosina	90
Figura 12. Espermatozoides después de 4 h de capacitación e incubados en presencia de anticuerpos anti-acrosina	91

Glosario

AMPc	Adenosinmonofosfato cíclico
APz	Iniciales de una proteína de adhesión a zona pelúcida identificada por Peterson y Hunt en 1989 (A dhesion P rotein zona)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico producto de RT-PCR
E β G	Endo- β -galactosidasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Fab	Fragmento del anticuerpo que reconoce específicamente al antígeno.
Factor von Willebrand	Proteína promotora de la coagulación de la sangre que actúa como pegamento para ayudar a las plaquetas presentes en la sangre a mantenerse unidas y sellar endotelios vasculares afectados por una herida.
Gal	α -galactosa

GalTasa	β -1,4-galactosiltransferasa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Haplotipo	Combinación, en un individuo concreto, de los alelos de varios genes que están ligados en una región cromosómica específica.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<i>Knout-out</i>	Técnica de biología molecular que consiste en la inactivación de las dos copias de un gen en una célula o en un organismo completo (ratón por ejemplo) y que permite establecer la función de cada uno de los genes en el organismo entero, a través de los efectos causados por su anulación, pudiéndose evaluar fenómenos macroscópicos como la fisiología, la morfología, el desarrollo y el comportamiento

MAM	Uno de los 4 tipos de dominios de la zonadhesina. MAM se encuentra en la meprina (metaloproteasa localizada en membrana plasmática de células de riñon de mamíferos), antígeno A5 identificado en <i>Xenopus</i> y tirosina fosfatasa μ que actúa como receptora.
MGP	Proteína de glándula mamaria (M ammary G land P rotein)
M_r	Masa molecular relativa
PAS-6/7	Dos variantes de la lactadherina identificada en leche de mamíferos y cuya diferencia estriba en el grado de glicosidación.
pI	Punto Isoeléctrico.
RA	Reacción acrosomal
rAGS	O-acetil gangliósido sintasa de rata
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR	Amplificación de los RNAm mediante la retrotranscriptasa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
sp38	Proteína espermática de 38 kDa (sperm protein de 38 kDa)
SP47	Nombre que se le dio inicialmente a la proteína espermática que compartía semejanzas con la lactadherina de leche de mamíferos. Proteína espermática de 47 kDa (47 kDa Sperm Protein).
sp56	Proteína espermática de 56 kDa (sperm protein de 56 kDa)
UDP-Gal	Uridildifosfato-Galactosa
ZP	Zona Pelúcida
ZP1 ó ZPB	Componente glucoproteico de la Zona Pelúcida cuya masa molecular es de 90 kDa sin carbohidratos.
ZP2 ó ZPA	Componente glucoproteico de la Zona Pelúcida cuya masa molecular es de 40 kDa sin carbohidratos.

ZP3 ó ZPC Componente glucoproteico de la Zona Pelúcida cuya masa molecular es de 37 kDa sin carbohidratos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos Generales de la Fertilización en Mamíferos

La fertilización está definida como el proceso de unión del ovocito y el espermatozoide de modo que el número de cromosomas somáticos es restaurado, iniciándose de esta manera el desarrollo de un nuevo individuo con las características de la especie que le dio lugar [Wassarman, 1999]. Si la fertilización no se lleva a cabo, ambos gametos degeneran de manera relativamente rápida en el tracto reproductor femenino, ya que estas dos células son altamente especializadas y por ello no pueden sobrevivir por sí mismas.

En los mamíferos, el proceso de unión de las células germinales incluye varios pasos con un orden determinado [Yanagimachi, 1994; Snell y White, 1996]. Este proceso de reconocimiento comienza en el oviducto con la unión de varios espermatozoides a la cubierta extracelular (la zona pelúcida, ZP) del ovocito liberado por el folículo, y termina algunas horas más tarde con la fusión de las membranas plasmáticas del ovocito y del espermatozoide para formar una sola célula “activada”, el cigoto [Wassarman, 1999]. Durante la fertilización, tienen lugar varios eventos claramente reconocibles como son: la reacción acrosomal (RA) del espermatozoide (una forma de excitosis celular), la penetración de la ZP del ovocito por el espermatozoide, la reacción cortical del ovocito y la reacción de zona. El resultado de éste último evento es que la ZP se altera bioquímicamente de modo que

ningún otro espermatozoide puede unirse al ovocito fertilizado. Cada uno de estos eventos en el proceso de la fertilización ha sido estudiado con detalle.

1.2. Aspectos Específicos de la Fertilización en Mamíferos

Los pasos finales de la ovogénesis y espermatogénesis en mamíferos preparan al ovocito y al espermatozoide, respectivamente, para la fertilización. Durante la ovulación, los ovocitos que ya tienen su tamaño final en los folículos antrales (de Graaf), llevan a cabo una “maduración meiótica”, proceso que transforma a los ovocitos primarios en células completamente formadas y preparadas para ser fertilizadas [Wassarman y Albertini, 1994]. Una vez que el espermatozoide se encuentra en el tracto reproductor femenino e inicia su recorrido hacia el encuentro con el ovocito, éste sufre una serie de modificaciones bioquímicas conocidas en conjunto como “capacitación”, proceso que prepara al espermatozoide a unirse al ovocito y llevar a cabo la RA [Darszon y cols., 1996; Visconti y Kopf, 1998]. La capacitación involucra la remoción de factores inhibidores presentes en la superficie del espermatozoide, generalmente asociados a proteínas y/o lípidos de membrana [Wassarman, 1999]. Algunas alteraciones que sufre durante la capacitación están mediadas, en parte por la fosforilación de la tirosina cinasa dependiente de AMPc, así como de cambios en el pH y concentraciones de Ca^{2+} . La maduración meiótica de los ovocitos y la capacitación espermática están orientadas a la formación de un cigoto viable o la degeneración de ambos gametos.

1.3. Papel de la Zona Pelúcida (ZP) en el Reconocimiento entre Gametos

El espermatozoide humano no se adhiere a los ovocitos de otras especies a causa de la presencia de la ZP, matriz extracelular de proteínas que rodea al ovocito y constituye una barrera durante la fertilización [Oehninger y cols., 1993]. La ZP de la mayoría de las especies no roedoras está constituida por una estructura bilaminar que consiste de una capa interna (ovocito–proximal) y una capa externa (ovocito–distal) ensamblada por uniones tipo lectina [Shalgi y cols., 1991; Maymon y cols., 1994], como lo muestran también los trabajos de microscopía electrónica de Dunbar y cols. [1991], y por microscopía de polarización no invasiva [Keefe y cols., 1996].

1.3.1. Estructura.

La ZP de mamíferos está compuesta de tres glucoproteínas sulfatadas, la proteína 1 de zona ('ZP1', también llamada ZPB), la proteína 2 de zona ('ZP2' o ZPA) y la proteína 3 de zona ('ZP3' o ZPC) [Shimizu y cols., 1983; Wassarman y Albertini, 1994]. Éstas forman filamentos de heteropolímeros de ZP2/ZP3 que están entrecruzados por ZP1 [Greve y Wassarman, 1985]. Cada componente tiene un péptido señal que dirige su secreción y está ausente de la secuencia amino terminal de la molécula madura y posee una estructura α -hélice muy pequeña. Además, cada polipéptido tiene una región altamente hidrofóbica en su extremo

carboxilo terminal que puede modular la formación de estructura repetitiva [Liang y cols., 1990].

1.3.2. Papel de ZP3.

Los trabajos de Wassarman a principios de los años 80's permitieron establecer que, en ratón, ZP3 sirve como ligando primario para la unión de los espermatozoides además de ser inductor de la RA [Wassarman y Litscher, 1995]. El papel de reconocimiento de sus contrapartes en los espermatozoides, se le ha atribuido específicamente a los carbohidratos de la ZP3. Se ha postulado que los residuos de α -galactosa (Gal) contenidos en oligosacáridos unidos a oxígeno (*O-linked*) de las glucoproteínas ZP3 son los aceptores o ligandos de la proteína de membrana plasmática llamada sp56 [Listcher y cols., 1995]. Sin embargo, un estudio simultáneo llevado a cabo con mutantes "*knock-out*" estableció que ratones carentes del epítipo α -Gal son fértiles [Thall y cols., 1995]. En otro estudio se reportó que la N-acetilglucosamina (GlcNAc) está involucrada en el reconocimiento espermatozoide-ZP [Miller y cols., 1993], ya que sus residuos son reconocidos por la β -1,4-galactosiltransferasa que está presente en la membrana plasmática de espermatozoides de ratón [Miller y cols., 1992].

Algunos grupos han intentado producir ZP3 humana recombinante para comprobar estos hallazgos. Sin embargo, en el modelo humano, ha sido muy difícil obtener esta glucoproteína purificada y biológicamente activa. No obstante,

existen algunos reportes que muestran que la ZP3 humana recombinante induce la RA en espermatozoides homólogos [Van Duin y cols., 1994; Brewis y cols., 1998]. Esta observación ha reforzado la sospecha de que ZP3 es también el inductor fisiológico principal de la RA espermática en humanos. La inducción de la RA como resultado de la interacción espermatozoide–ZP3 causa la liberación del contenido enzimático acrosomal permitiendo una interacción secundaria zona–espermatozoide, que se cree involucra una unión más persistente con la membrana acrosomal interna. Esta unión secundaria del espermatozoide con la ZP está poco estudiada en la mayoría de los mamíferos; pero en ratón, ZP2 ha sido identificada como la proteína principal del ovocito responsable de esta interacción [Yanagimachi, 1994]. La unión secundaria no ha sido estudiada con detalle en humanos, aunque existe cierta evidencia que sugiere que ZP2 también está involucrada [Hinsch y cols., 1998].

En la ZP porcina la cadena de carbohidratos unidos a nitrógeno (*N-linked*) de la familia de glicoproteínas ZP3 muestra actividad receptora para espermatozoides [Nakano y cols., 1996]. Los dos componentes de la familia de ZP3 porcina (PZP3) pueden ser separados por HPLC de fase reversa, después de la digestión con endo- β -galactosidasa (E β G), y en particular, uno de los componentes, E β G–PZP3 α , posee la actividad receptora de espermatozoides [Zayas y cols., 1995; Nakano y cols., 1996].

1.4. Proteínas Espermáticas Porcinas Propuestas como Responsables de la Interacción Primaria con ZP Homóloga

El reconocimiento de los espermatozoides de mamíferos y la red de glucoproteínas que rodean al ovocito en la ZP, al parecer están mediadas por una interacción proteína-carbohidrato y este mecanismo básico parece estar conservado en la escala filogenética [Calvete y cols., 1992]. Actualmente se han identificado una gran cantidad de proteínas espermáticas involucradas en este reconocimiento por glucoproteínas de la ZP, por medio de *western-blot* de proteínas del espermatozoide con proteínas de la ZP marcadas o por la identificación de epítopes por medio de anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales que bloquean la unión ovocito-espermatozoide. Sin embargo, solamente una reducida cantidad de estas moléculas ha sido bioquímica o estructuralmente caracterizada [Töpfer-Petersen y Calvete, 1996], además de que la capacidad de unión a carbohidratos a sido demostrada solo en pocos estudios. A pesar de que en años recientes se han identificado una gran cantidad de proteínas asociadas a la membrana plasmática de espermatozoides porcinos, la identidad de la(s) proteína(s) clave para la unión a ZP permanece aún controvertida, estando sólo de acuerdo en que las proteínas candidatas se unen a la ZP, de manera particular a su componente ZP3, disparando de este modo la RA [Brewis y Wong, 1999].

Entre las proteínas espermáticas porcinas con afinidad a ZP homóloga más estudiadas y propuestas como responsables de la unión entre

gametos se encuentran las siguientes:

1.4.1. *Espermadhesinas*

Las espermadhesinas son una familia de polipéptidos de 12–16 kDa expresados en el tracto genital del cerdo (además de caballo y toro). Estas proteínas constituyen el mayor componente del plasma seminal y se han encontrado asociadas periféricamente a la superficie del espermatozoide [Reinert y cols., 1996]. La estructura y función de las espermadhesinas se ha investigado ampliamente en el cerdo, que exhibe la más grande diversidad de miembros: AWN, AQN–1, AQN–2, PSP–I y PSP–II, así como sus isoformas glicosiladas [Töpfer–Petersen y cols., 1998]. La concentración de estas proteínas en el fluido seminal es de entre 0.6 – 7 mg/mL [Dostálová y cols., 1994]. AWN–1 es sintetizada por la red testicular y por los túbulos rectos [Sinowitz y cols., 1995] y es el único miembro de su familia presente sobre los espermatozoides epididimarios, donde se ha calculado que hay $6-7 \times 10^6$ moléculas por célula [Dostálová y cols., 1994]. Después de la eyaculación, $12-60 \times 10^6$ moléculas de cada una de las espermadhesinas AQN–1, PSP–1, AQN–2, AQN–3, AWN–1 y AWN–2 cubren una tercera parte de la región apical del borde acrosomal [Töpfer–Petersen y cols., 1998]. Sin embargo, la mayoría de estas moléculas que cubren al espermatozoide son liberadas durante la capacitación *in vitro*, cuando el nivel de cada una de las espermadhesinas alcanza de 5 a 6×10^6 moléculas por espermatozoide [Dostálová y cols., 1994]. El fraccionamiento por

cromatografía de afinidad de proteínas solubilizadas de membrana plasmática de espermatozoides porcinos no capacitados sobre ZP porcina inmovilizada identificó a AWN-1 y a AQN-3 como las proteínas con mayor afinidad a ZP [Ensslin y cols., 1995], indicando que estas espermadhesinas se unen fuertemente a la superficie de los espermatozoides.

Las espermadhesinas agregadas parecen servir como factores estabilizantes del acrosoma y podrían constituir la subpoblación de proteínas que son liberadas durante la capacitación; las moléculas de espermadhesinas remanentes sobre los espermatozoides capacitados son las principales responsables de actuar como proteínas de unión a ZP, por su capacidad de interactuar tanto con oligosacáridos unidos a oxígeno como a nitrógeno. Sin embargo, aún no se ha confirmado plenamente si las espermadhesinas están involucradas directamente en la interacción ovocito-espermatozoide al momento de la fertilización [Töpfer-Petersen y cols., 1998].

1.4.2. Zonadhesina

La zonadhesina se caracterizó en cerdo y se determinó que es semejante al factor von Willebrand presente en la sangre, con dominios repetidos que podrían facilitar interacciones múltiples con la ZP, posiblemente por unión a carbohidratos. Esta proteína transmembranal presenta alta afinidad especie-específica de unión a ZP y es la única proteína espermática en la que dicha especificidad ha sido

observada a nivel molecular [Hardy y Garbers, 1994; 1995]. La forma activa de zonadhesina de espermatozoides de cerdo, tanto epididimarios como capacitados, está compuesta por dos cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente, una de movilidad relativa (Mr) de 105 (p105) y otra de Mr de 45 (p45) en SDS-PAGE [Hardy y Garbers, 1995].

También se han observado formas de Mr alta, lo que sugiere la posible formación de oligómeros covalentes [Hardy y Garbers, 1994]. Esta observación sugiere que la proteína sufre una proteólisis limitada y posiblemente también ocurre la oligomerización en la maduración funcional del factor von Willebrand. Sin embargo, aún no está claro en qué momento de la maduración del espermatozoide ocurre dicho procesamiento post-transcripcional, o si es importante para la actividad de unión de la zonadhesina a ZP. La región extracelular de esta proteína presenta cuatro tipos de dominios (MAM, mucina, von Willebrand D y EGF) que también están presentes en otras moléculas de adhesión [Varki, 1994]. Gao y Garbers [1998], sugirieron que los dominios MAM y mucina de la zonadhesina podrían tener la función de prevenir interacciones no específicas entre los espermatozoides y las células del tracto reproductor de la hembra.

A pesar de la gran cantidad de eventos que tienen lugar en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, la zonadhesina se localiza siempre sobre la parte anterior de la cabeza en espermatozoides obtenidos de la

cola del epidídimo, así como en espermatozoides eyaculados y capacitados [Lea y cols., 2001].

1.4.3. Proteína de adhesión a zona (APz)

APz es una proteína integral de membrana plasmática de espermatozoides de cerdo que muestra una masa molecular de 55 kDa. Se determinó que no presenta actividad enzimática, ni cruza con anticuerpos contra proacrosina, ni se une a fucosa (un azúcar que se une a proacrosina) [Peterson y Hunt, 1989; Peterson y cols., 1991]. APz es un componente minoritario de la membrana de espermatozoides, representa <1% de la proteína total de membrana que muestra microheterogeneidad y alta afinidad por polisacáridos sulfatados [Peterson y cols., 1991]. Mediante el uso de anticuerpos, APz se detecta primero sobre espermatozoides epididimarios, y la cantidad de ésta se incrementa después de la eyaculación en asociación con la capacitación. Esta molécula está asociada con el citoesqueleto que, a su vez, se asocia con la membrana en los espermatozoides porcinos. Esto está de acuerdo con la hipótesis de que las interacciones de las proteínas de la membrana plasmática con la actina juegan un papel importante en la capacitación espermática [Saxena y cols., 1986a, b]. Anticuerpos monoclonales contra APz bloquean la unión ovocito–espermatozoide. Algunos estudios indican que se une específicamente a ZP3 α , el componente de la ZP porcina con actividad de unión a espermatozoides [Yurewicz y cols., 1993]. APz parece ser una de las principales proteínas de la

membrana plasmática encargada de regular la unión firme de espermatozoides de cerdo con acrosoma intacto a los ovocitos homólogos.

1.4.4. Acrosina

La acrosina (E.C. 3.4.21.10) es una proteasa serínica específica de espermatozoides y es una de las enzimas liberadas como consecuencia de la RA [Hedrick y cols., 1989]. Esta enzima se ha identificado en varias especies, pero la más estudiada es la porcina, por lo que se ha incluido en este apartado. Se sabe que contribuye de manera importante en la penetración de las glicoproteínas de la ZP por la proteólisis limitada y específica por parte de los espermatozoides que la liberan [Urch y cols., 1985]. La acrosina está contenida en el acrosoma como una sola molécula de 53–55 kDa: la proacrosina [Töpfer–Petersen y Calvete, 1995], que al contacto con la ZP, se autoactiva para formar la β -acrosina, que a su vez está constituida por una cadena ligera entrecruzada con una cadena pesada por dos puentes disulfuro [Tranter y cols., 2000]. Se sabe que la β -acrosina es una proteína multifuncional que desempeña funciones tanto en la exocitosis acrosomal como de receptor a proteínas de la ZP y como proteasa para facilitar la penetración de espermatozoides al interior del ovocito. Sin embargo, aun existen diferencias en los puntos de vista con respecto al papel de la β -acrosina durante la fertilización. Tradicionalmente se ha pensado que ayuda al espermatozoide a penetrar la ZP; es decir, participa en la lisis de la matriz extracelular del ovocito [Planchenault y cols.,

1991]. Sin embargo, no se ha explicado satisfactoriamente la causa por la que, espermatozoides de ratón *knock-out*, carentes de β -acrosina, son capaces de penetrar la ZP [Baba y cols., 1994; Adham y cols., 1997].

Se ha sugerido también, que la β -acrosina mejora la dispersión del contenido acrosomal después de la RA [Yamagata y cols., 1998]; además, existe evidencia de que participa como proteína en la unión secundaria con moléculas de la membrana plasmática del ovocito. Existe también evidencia acerca de su función como ligando secundario. Se ha mostrado, por ejemplo, que la β -acrosina se une de manera no enzimática a glucoproteínas de la ZP, a través de interacciones con residuos básicos localizados sobre la superficie de la enzima, formando enlaces iónicos fuertes con grupos polisulfato de los carbohidratos de glucoproteínas de la ZP [Moreno y cols., 1998].

A la acrosina se le han asignado dos sitios efectores [Tranter y cols., 2000]. El sitio efector I también llamado sitio catalítico, es por homología, igual al de la familia de las proteasas parecidas a la tripsina. La β -acrosina de cerdo ha sido co-cristalizada en presencia de benzamidina, y se ha observado que se une a la cavidad S1 del sitio activo, en contacto con la Asp-189 [Tranter y cols., 2000]. El sitio efector II (también llamado exositio) ha sido analizado como receptor secundario a glucoproteínas de ZP, para hacer más firme la unión del espermatozoide reaccionado a la superficie del ovocito.

1.4.5. *Lactadherina*

La lactadherina es una glucoproteína de 47 kDa presente en los glóbulos grasos de la leche. También se le conoce con el nombre de PAS-6/7 (lo que indica dos variantes de glicosilación) [Hvarregaard y cols., 1996], BA46, P47 y MFG-E8 [Stubbs y cols., 1990]. Tiene una estructura de dominios EGF1-EGF2-C1-C2 en el que EGF indica dominios con homología al factor de crecimiento epidérmico y los dominios C tienen homología con la familia de la discoidina, incluyendo los dominios C de unión a lípidos de los factores V y VIII de la coagulación sanguínea [Stubbs y cols., 1990]. El segundo dominio EGF contiene un tripéptido (Arg-Gly-Asp) [Couto y cols., 1996] que se une a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ [Hvarregaard y cols., 1996; Andersen y cols., 1997]. El segundo dominio C se une a fosfolípidos [Andersen y cols., 2000].

En los glóbulos grasos de la leche, la lactadherina se localiza sobre la superficie de la bicapa de los fosfolípidos que rodea a la gota central de triglicéridos, que al parecer estabiliza la bicapa [Butler y cols., 1980]. Entre las funciones conocidas de la lactadherina, se sabe que disminuye los síntomas de las infecciones por rotavirus en niños, posiblemente por su unión a partículas del rotavirus a través de residuo de carbohidrato [Newburg y cols., 1998]. Se ha observado también que la lactadherina inhibe los complejos enzimáticos de la coagulación sanguínea por competencia de sitios de unión a fosfolípidos, por lo que se ha sugerido que esta

molécula podría ser un buen candidato para el desarrollo de un anticoagulante farmacológico [Shi y Gilbert, 2003].

La lactadherina también está asociada al borde apical de la cabeza de espermatozoides testiculares, epididimarios y eyaculados, y ha sido identificada como una proteína de unión a ZP [Ensslin y cols., 1995]. Se sabe que durante la capacitación, dicha molécula parece estar expuesta por la liberación de otras proteínas asociadas a ésta, y que migra del borde apical de la cabeza del espermatozoide hacia la región acrosomal completa [Petrunkina y cols., 2003]. La lactadherina fue aislada de espermatozoides porcinos por cromatografía de afinidad de la fracción de proteínas solubilizadas de membrana plasmática unidas a glucoproteínas de ZP porcina. La secuencia N-terminal, así como las secuencias internas de aminoácidos revelan semejanzas estructurales entre SP47 (47 kDa sperm protein) y la O-acetil gangliósido sintasa de rata (rAGS), una proteína de 57/53 kDa de glándula mamaria bovina (MGP 57/53) y con la proteína E8 de glóbulos grasos de leche de ratón; todas ellas, proteínas de función poco clara secretadas por células epiteliales de glándula mamaria de ambas especies [Ensslin y cols., 1998]. El análisis con inmunofluorescencia indirecta mostró que SP47, ahora identificada como lactadherina, se localiza sobre la región acrosomal de espermatozoides testiculares, así como de aquellos recuperados a lo largo de diferentes secciones del ducto epididimario y en espermatozoides capacitados *in vitro* [Ensslin y cols., 1998].

Mediante el análisis de los transcritos con RT-PCR, se aislaron

cDNAs (homólogos de SP47) de testículos de cerdo y tejidos de glándula mamaria porcina. Las proteínas obtenidas de esos cDNAs mostraron un 60–100% de identidad al analizar las secuencia de aminoácidos y muestran estructuras organizadas en el N-terminal seguidas inmediatamente una de la otra.

1.4.6. Otras proteínas de unión propuestas en cerdo

Existen otras proteínas propuestas en el modelo porcino que han mostrado tener afinidad por la ZP [17–18 kDa: Moos y cols., 1990; Capková y Pekniková, 1997; 15 kDa: Veselský y cols., 1992], o más específicamente por alguno de las glucoproteínas de la ZP [52–55 kDa: Zayas y cols., 1995]. Y, aunque el efecto de estas proteínas sobre la unión ovocito–espermatozoide ha sido el de bloquear esta interacción, aún no han sido caracterizadas suficientemente. Lo anterior se debe, posiblemente, a que se encuentran en cantidades muy pequeñas y pueden ser fácilmente degradadas durante el proceso de purificación por las enzimas acrosomales [Brewis y Wong, 1999].

1.5. El Concepto de Múltiples Proteínas Espermáticas Actuando en Coordinación

El número y diversidad de proteínas que se unen a ZP3 es tal vez sorprendente, pero la mayoría de los autores reconocen que múltiples receptores

podrían estar involucrados en el proceso de unión entre gametos. Esto sería necesario para facilitar los eventos tan complejos que ocurren durante la unión ovocito–espermatozoide. El reconocimiento inicial entre la superficie de ambos gametos, la unión firme y específica, la inducción de la cascada de transducción de señales para iniciar la RA y la unión secundaria para facilitar la penetración de la ZP, necesitan estar coordinadas y siguen, probablemente, una “secuencia jerárquica” de interacciones que involucran a diferentes proteínas [Brewis y Wong, 1999]. El requerimiento de múltiples proteínas se apoya también por las diferencias espacio–temporales observadas durante la unión ovocito–espermatozoide.

Ya que la fertilización es un proceso fundamental para la propagación de las especies, debería esperarse que un buen número de procesos reguladores se coordinaran para asegurar el contacto inicial entre la superficie del espermatozoide y la ZP. Es probable también que tenga lugar una combinación de eventos de unión, algunos de los cuales pueden no ser esenciales, pero que optimizan las probabilidades de fertilización. Podría haber incluso un grado de redundancia de interacciones involucrado en el proceso de fertilización [Snell y White, 1996]. Los sistemas redundantes en la fertilización son interacciones molécula–molécula que muestran funciones semejantes o idénticas. Se piensa que la presencia de sistemas redundantes existen para compensar la pérdida de la función en moléculas de otros sistemas [Jansen y cols., 2001]. Este concepto de múltiples proteínas o sistemas redundantes explicaría la capacidad de los gametos y particularmente de los

espermatozoides de interactuar de una manera óptima con todas las señales bioquímicas posibles en el tracto genital de la hembra, hasta alcanzar al ovocito e interactuar con él. Adicionalmente, la competencia entre espermatozoides como la principal fuerza evolutiva es la razón para explicar la presencia de una plétora de moléculas de adhesión, así como una gran variedad de éstas con funciones semejantes.

Thaler y Cardullo [1996a, b] llevaron a cabo una serie de experimentos para investigar los diferentes tipos de afinidades de unión que pueden existir entre el ovocito y el espermatozoide en ratón. Mostraron que la adhesión inicial es un evento de alta afinidad, pero que, sin embargo, existen eventos tanto de baja como de alta afinidad, sugiriendo la participación de múltiples receptores y, tal vez, de múltiples ligandos que formarían un gran complejo de fertilización. Este punto de vista se apoya también por datos del grupo de Kiani y cols., [1994], en el que se muestra que al menos cuatro diferentes proteínas espermáticas en humano entrecruzan con ZP3 *in vitro*. Las interacciones pueden ocurrir ya sea del tipo proteína–proteína, proteína–carbohidrato, carbohidrato–carbohidrato o combinaciones de éstos. Se ha propuesto que las interacciones carbohidrato–carbohidrato son importantes durante la adhesión inicial de gametos; después el fenómeno puede ser regulado por interacciones proteína–carbohidrato (por ejemplo GalTasa) e interacciones proteína–proteína (por ejemplo, el receptor a tirosina cinasa de 95 kDa) [Brewis y Wong, 1999].

Otro hecho que apoya el concepto de múltiples receptores es que aunque los espermatozoides de ratón sin GalTasa son incapaces de unirse a ZP3, los ratones son aun fértiles. Sorpresivamente, estos espermatozoides, carentes de GalTasa, pueden unirse a la superficie de ovocitos recién ovulados, aunque no se unan a ZP3 [Talbot y cols., 2003]. Esto implica que GalTasa se une a oligosacáridos de ZP3 en el contexto de otros componentes de membrana espermática que son responsables para la unión primaria a ligandos independientes de ZP3 en la cubierta del ovocito.

Se ha propuesto que una misma proteína puede tener papeles diferentes. En cerdo, existe un modelo combinado para la acción de la β -acrosina. Las actividades catalítica y receptora de esta enzima han sido estudiadas por separado [Tranter y cols., 2000]. Aunque algunos estudios [Jansen y cols., 1995; Töpfer-Petersen y Henschen, 1988; Crosby y cols., 1998;] han destacado que la actividad de receptor de la β -acrosina se mantiene en presencia de inhibidores específicos de tripsina, esta división de funciones (como receptor y como enzima) es compatible con las identidades físicas separadas de los dos sitios reportados en estudios de estructura por cristalografía de rayos X [Tranter y cols., 2000].

1.6. Estructura Secundaria de Moléculas Biológicas Determinada por Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (DC), es un método espectroscópico que mide la actividad óptica de moléculas asimétricas en solución, por ejemplo,

proteínas [Wallace, 2000]. El espectro DC de una proteína es el reflejo de las estructuras secundaria y terciaria de la macromolécula. Las proteínas en DC presentan señales en dos regiones espectrales: el UV-lejano (170-250 nm) donde podemos analizar predominantemente la contribución de los enlaces peptídicos, es decir, el reflejo de la estructura secundaria de la proteína; y el UV-cercano (250-300 nm), donde se observan bandas debidas principalmente a la presencia de aminoácidos aromáticos (estructura terciaria).

La información contenida en los espectros de DC se puede trabajar como una suma de los espectros individuales característicos que surgen de cada tipo de estructura secundaria presente en una muestra de proteína. Típicamente, los métodos empíricos del análisis utilizan una base de datos como referencia de los espectros de proteínas cuyas estructuras de cristales (y por lo tanto sus estructuras secundarias) son conocidos. Utilizando valores unitarios de las desconvoluciones, el componente principal analiza los procedimientos variables de la selección, ellos calculan la fracción que cada estructura de componente contribuye al espectro experimental completo. Los datos calculados con el programa, consisten generalmente en una lista de fracciones de estructura secundaria y un espectro calculado, que puede ser comparado al espectro experimental para evaluar la calidad del análisis. El número de tipos diferentes de la estructura secundaria que se puede analizar depende en la gama disponible de longitud de onda de los espectros (los espectros en longitudes de ondas más bajas tienen un contenido más alto de

información, y de ahí se puede desconvolucionar en más tipos de componentes) y en la gama de tipos de estructura secundaria presentes en las proteínas de la base de datos de referencia.

Se han desarrollado varios algoritmos [*SELCON3*: Sreerama y cols., 1999; *CDSSTR*: Compton y Johnson, 1986; *VARSLC*: Manavalan y Johnson, 1987; *K2d*: Andrade y cols., 1993 y *CONTIN*: Provencher y Glockner, 1981; Van Stokkum y cols., 1990 Grennfield 2004] para realizar los cálculos de desconvolución de espectros de DC y poder estimar el contenido de estructura secundaria [Whitmore y Wallace, 2004].

2. ANTECEDENTES

En un trabajo realizado en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, se logró extraer y aislar a una banda proteínica de 55 kDa de espermatozoides recién eyaculados para estudiar su función durante la unión de los gametos, así como su localización *in situ* por microscopía de fluorescencia [Zayas y cols., 1998]. Los hallazgos de dicho trabajo se mencionan a continuación:

2.1. Bloqueo Directo de la Unión Ovocito–Espermatozoide

Concentraciones de 50 y 100 μg de esta banda proteínica eluída, bloquearon

en un 100 % la unión ovocito-espermatozoide cuando se adicionó una hora antes de la inseminación. Como control positivo se usó un pozo sin proteína espermática de 55 kDa y como control negativo un pozo donde se adicionaron proteínas de espermatozoides con masa molecular menor de 30 kDa, en cuyos casos no se bloqueó la unión. Un control más consistió en adicionar únicamente el amortiguador de elución bajo el tratamiento de purificación que se dió a la banda. Para el caso de los controles, la mayor cantidad de espermatozoides que se podía contar fue de aproximadamente 40, por lo que en esos casos se reportó como >40.

Para determinar si había una relación entre la concentración de la banda proteínica y el bloqueo de la unión, se realizó una serie de experimentos con tres concentraciones menores a 50 μg . Cuando se trabajó una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ de medio de maduración, se empezaron a observar algunos espermatozoides unidos por ovocito. Cuando la concentración fue de 30 $\mu\text{g/ml}$ de medio de maduración, el número de espermatozoides unidos incrementó ligeramente con respecto a la concentración anterior. Finalmente, cuando se trabajó con una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ de medio de maduración, el número de espermatozoides unidos incrementó aún más, sin llegar a la cantidad observada en el control positivo. Un análisis de covarianza mostró que existe correlación significativa con una $p < 0.05$ entre la cantidad de la banda proteínica de 55 kDa utilizada para el bloqueo y el número de espermatozoides unidos por ovocito. El análisis de regresión lineal mostró un coeficiente de correlación (r) de – 0.95.

2.2. Bloqueo Indirecto de la Unión Espermatozoides-Anti-55 kDa y Ovocitos

Para bloquear la unión entre gametos de una manera indirecta; es decir, cubriendo a la proteína de 55 kDa con otra molécula, se probaron tres diluciones (1:100, 1:400 y 1:800) de un antisuero anti-55 kDa obtenido en el mismo Laboratorio de Biología Celular, el cual bloqueó totalmente la unión cuando el antisuero fue diluido 1:100 e incubado en presencia de los espermatozoides una hora antes de terminar el período de capacitación. Cuando el antisuero se diluyó 1:400, se observaron algunos espermatozoides unidos, mientras que la dilución 1:800 no bloqueó la unión.

2.3. Inmunolocalización de la Proteína Espermática de 55 kDa

Con los anticuerpos producidos en el laboratorio, se distinguieron dos patrones de fluorescencia. Los espermatozoides capacitados, mostraron una ligera fluorescencia homogénea en la mayor parte de la cabeza y cola, siendo más intensa en el borde apical de la cabeza, mientras que los que sufrieron reacción acrosomal por inducción con progesterona, perdieron esa banda intensamente fluorescente, manteniéndose una débil fluorescencia distribuida homogéneamente en la superficie de los espermatozoides. No hubo diferencias en los patrones de fluorescencia para cada una de tres diluciones de antisueros empleadas (1:100, 1:50, 1:20). Cuando se incubaron los espermatozoides con antisuero anti-ZP (control negativo), no se observó fluorescencia en alguna parte de ellos. Los espermatozoides

tratados únicamente con el segundo anticuerpo (anti-IgG conjugada con fluoresceína) tampoco mostraron fluorescencia.

Los espermatozoides recién eyaculados mostraron fluorescencia homogénea en la cabeza, ligeramente más intensa que en los capacitados. Esta observación se debe a que probablemente existe una migración de las proteínas de unión —difusas en la cabeza del espermatozoide— a la zona postacrosomal de espermatozoides que han pasado por el período de capacitación, lo que explica la presencia de la banda intensamente fluorescente, que se pierde una vez que se ha inducido la reacción acrosomal.

3. JUSTIFICACIÓN

Se han descrito en mamíferos un buen número de proteínas sobre la membrana de espermatozoides que funcionan como receptoras a ZP, pero aún no está clara la manera en que funcionan individual o colectivamente. En espermatozoides porcinos, varias moléculas se han aislado con base en su afinidad por la ZP; sin embargo, ha sido más difícil la identificación de los receptores presentes en la superficie del espermatozoide que identificar a sus ligandos en la ZP, probablemente a causa de la gran complejidad de la superficie del espermatozoide comparado con la de la ZP [Miller y cols., 2002]. La zonadhesina, proacrosina, sp38, lactadherina y un grupo de proteínas de baja masa molecular llamadas espermadhesinas (todas estas estudiadas principalmente en espermatozoides de

cerdo) fueron aisladas aprovechando su afinidad por ZP completa y parcialmente caracterizadas bioquímica y estructuralmente [Hardy y Garbers, 1995; Ensslin y cols., 1998; Jansen y cols., 2001; Miller y cols., 2002], entre otras menos estudiadas que también han mostrado tener afinidad por la ZP [17–18 kDa: Moos y cols., 1990; Capková y Pekniková, 1997; 15 kDa: Veselský y cols., 1992], o más específicamente por alguno de los componentes glucoproteínicos de la ZP [proteínas espermáticas de 52–55 kDa: Zayas y cols., 1995]. Y, aunque se ha observado bloqueo de la unión entre gametos en ensayos de competencia, además de observar su localización en la membrana [Zayas y cols., 1998], aun no se cuenta con la descripción funcional. La especificidad a determinados carbohidratos de la ZP y los dominios de unión han sido estudiados únicamente en las espermadhesinas y la proacrosina, por la determinación de estructura tridimensional y modelamiento de proteínas [Menéndez y cols., 1995; Nimtz y cols., 1999; Töpfer-Petersen, 1999], o bien algún otro tipo de estudios fisicoquímicos como el análisis de la organización estructural o estabilidad térmica que solamente ha sido determinado para dos espermadhesinas (PSP-I y PSP-II) [Menéndez y cols., 1995]. Este tipo de estudios fisicoquímicos no existen para las demás proteínas propuestas y que podrían tener funciones de receptores, por lo que la descripción y caracterización funcional de las proteínas de superficie son necesarias y resultarían relevantes para la comprensión de las bases moleculares de la fertilización.

Cabe señalar, que la identificación y cuantificación de la lactadherina

espermática en esta tesis, sugiere que se trata de una proteína que se encuentra presente en espermatozoides porcinos en muy baja cantidad y que aunque se almacenaron diferentes muestras para ser inyectadas en una columna de afinidad, siempre se observó degradación, aún en presencia de inhibidores de proteasas como el PMSF, haciendo imposible su purificación. Por su afinidad a ZP homóloga, la lactadherina fue colectada de la columna de afinidad en presencia de acrosina (que también reconoce a la ZP), y por su cercana masa molecular, fueron dializadas y liofilizadas en la misma preparación. Como una alternativa para la obtención de cantidades mayores de lactadherina de la misma especie (porcina), pero diferente tejido —en el que se expresa el mismo gen— se presenta detalladamente la purificación de lactadherina de leche porcina. Adicionalmente, se incluyó también la purificación de la lactadherina de leche bovina por razones de cantidad, disponibilidad y alta homología de la secuencia completa de aminoácidos respecto a la lactadherina porcina, pues la leche de esta última especie es particularmente complicada obtenerla debido a la fisiología propia de la especie.

Con la información de la que hasta ahora se dispone, es importante incrementar el conocimiento de las proteínas espermáticas que funcionan como receptores, a través de la caracterización bioquímica y/o fisicoquímica para entender integralmente el fenómeno de la fertilización.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Purificar y caracterizar bioquímica y fisicoquímicamente a dos proteínas espermáticas porcinas que muestran afinidad por la zona pelúcida homóloga.

4.2. Objetivos particulares

- Purificar a las proteínas espermáticas porcinas por medio de cromatografía de afinidad, usando como ligando a la zona pelúcida homóloga.
- Conocer la identidad de las proteínas espermáticas a través de la determinación de la secuencia de aminoácidos.
- Analizar la estructura secundaria de las proteínas purificadas por medio de la espectroscopía de dicroísmo circular.
- Analizar la dinámica de migración de las proteínas en el espermatozoide al inicio y al final del periodo de capacitación a través de la microscopía electrónica.

5. MATERIAL Y MÉTODO

Todos los reactivos empleados en la presente tesis fueron grado reactivo, a menos que se especifique otra cosa.

5.1. Colecta y Procesamiento del Semen Porcino para la Obtención del Extracto Total de Proteínas Espermáticas

Las muestras de semen porcino para la extracción de las proteínas se obtuvieron de animales sanos por el método de “la mano enguantada” en el Centro de Mejoramiento Genético (Tláhuac, Distrito Federal) y de la granja “Los Cipreses” (Cocotitlán, Estado de México). La fracción rica en espermatozoides se filtró a través de una gasa (para eliminar las partículas gelatinosas) y se transportaron al laboratorio a 37 °C en un tiempo no mayor a 1 h.

Para extraer las proteínas espermáticas se empleó el método descrito por Zayas y cols. [1995]. El semen se lavó por centrifugación a 800 x g / 5 min (seis veces) con una solución amortiguadora de NaCl 140 mM y NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 20 mM a pH 7.4 [Russell y cols., 1985], para eliminar el plasma seminal. Las proteínas se extrajeron resuspendiendo el paquete celular en una solución de SDS al 2%, glicerol al 13% y Tris 62.5 mM a pH final de 6.8 [O’Rand y cols., 1985] e incubando durante 12 h a 4 °C. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó a 4 000 x g durante 15 min y el sobrenadante (proteínas espermáticas) se dializó 48 h contra Tris 50 mM pH 7.4 en membranas de tamaño de poro (MWCO) de 12-14

kDa (Spectra/Por; Spectrum Medical Industries, Inc., Texas. U.S.A) y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Una alícuota del extracto proteínico se cuantificó por el método de Peterson [1977] [modificación del método de Lowry y cols., 1951] en un espectrofotómetro BECKMAN DU-600 computarizado.

5.2. Cromatografía de Afinidad

Esta técnica se basa en la capacidad química de las proteínas de unirse no covalentemente a otra molécula llamada ligando. La molécula a ser purificada es reversiblemente unida a una molécula de unión complementaria (ligando), la cual ha sido inmovilizada sobre una matriz de soporte inerte. La molécula retenida puede ser recuperada (después de varios lavados para retirar impurezas) por un cambio en la composición del eluyente. Si se cuenta con una fuente pura de una de las dos moléculas que interactúan (ligando o receptor), este tipo de cromatografía puede ser usada para purificar la pareja (molécula complementaria) a partir de mezclas biológicas complejas. Para purificar las proteínas espermáticas porcinas de interés, se utilizó la cromatografía de afinidad y como molécula complementaria, ZP homóloga.

5.2.1. Obtención de la ZP porcina

Para la obtención de la ZP se empleó el método descrito por Hedrick y Wadrip

[1986]. Se colectaron ovarios porcinos en el rancho ABC de los Reyes (Los Reyes la Paz, Edo. de México) y se almacenaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la obtención de ovocitos, los ovarios fueron descongelados y triturados en un procesador de alimentos. El material triturado se filtró a través de varias mallas de nylon de diferente tamaño de poro: 1000, 500, 200, 150 y $85\text{ }\mu\text{m}$, donde quedaron retenidos los restos de tejido ovárico, excepto en el último tamiz, donde quedaron los ovocitos libres de las células foliculares. Para recuperar la mayor cantidad de ovocitos, el material retenido en el tamiz de $150\text{ }\mu\text{m}$ o mayores fue lavado con una solución de NaCl 0.157 M . Los ovocitos fueron recuperados en una caja de Petri al hacer pasar solución salina a presión por el tamiz de $85\text{ }\mu\text{m}$ invertido. Los ovocitos fueron transferidos a un homogeneizador manual Potter-Elvehjem, donde fueron “aplastados”. El homogeneizado fue filtrado en un último tamiz, esta vez de $40\text{ }\mu\text{m}$, para retener solamente la matriz extracelular (ZP) de los ovocitos aplastados. Para solubilizar la ZP, el tamiz fue colocado dentro de un tubo Ependorff al que se le agregaron 0.5 mL de una solución de NH_4HCO_3 0.5 mM y se incubó 30 min en un baño de agua a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La proteína fue cuantificada por el método de Peterson (1977) y congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Esta ZP solubilizada fue usada como ligando para retener a las proteínas espermáticas de interés, así como para comprobar la afinidad de éstas durante el proceso de purificación.

5.2.2. Preparación de la columna de afinidad

Se utilizó una columna HiTrap de sefarosa activada con N-hidroxi-

succinimida (un éster unido por epicloro-hidrina a la sefarosa) (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) de 5 mL. Como ligando se utilizó ZP completa y solubilizada. Antes de acoplar la ZP a la columna de afinidad, una alícuota fue analizada por SDS-PAGE para verificar que no estuviera degradada o con otras proteínas que pudieran interferir. Se inyectaron a la columna 17 mg de ZP solubilizada (3.4 mg/mL) en NH_4HCO_3 0.5 mM y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Para remover el exceso de ZP no acoplada, la columna se lavó con 3 cambios alternados de 30 mL cada uno de un amortiguador de NaCl 0.5 M / etanolamina 0.5 M, pH final de 8.3 seguido de un amortiguador de NaCl 0.5 M / acetato de sodio 0.1 M, pH final de 4.0. La columna ya acoplada fue refrigerada hasta su uso a 4 °C en NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0.05 M, pH 7.0 suplementado con NaN_3 al 0.1%.

5.2.3. Condiciones de separación de las proteínas espermáticas afines a ZP

La columna con la ZP acoplada fue conectada a un cromatógrafo (BioLogic, *Bio-Rad*[®]) y se equilibró con un amortiguador de columna (NaCl 150 mM / PMSF 1mM / colato de sodio al 1% / NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 20 mM, pH final de 7.8) a una velocidad de flujo fue 1 mL/min. Se inyectó 1 mL del extracto crudo espermático (17 mg/mL) y se dejó lavando hasta que todas las proteínas no retenidas fueron removidas. La elusión para proteínas retenidas se realizó con NaCl 3 M amortiguado con NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 20 mM, pH final de 7.8. La fracción retenida fue dializada

durante 24 h a 4°C contra un amortiguador de Tris 50 mM, PMSF 1 mM, pH final de 6.8 y liofilizada a sequedad. Se hizo un cálculo de rendimiento cuantificando la proteína antes de la inyección (1 mg/mL, correspondiente al extracto crudo) y comparándola con la cantidad de proteína contenida en las dos fracciones obtenidas de la columna de afinidad.

5.3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)

Para analizar las proteínas aisladas y/o purificadas en el presente trabajo, se prepararon geles analíticos al 8 % en condiciones reductoras (ver 11.1.) según el método reportado por Laemmli [1970]. Las muestras se prepararon en SDS al 10 % mas un amortiguador de muestra SPB (**S**ample **P**reparation **B**uffer: Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS al 10 %, Glicerol, mercaptoetanol y azul de bromofenol) (16 partes de muestra + 4 partes de SDS al 10 % + 10 partes de SPB) y se calentaron 3 min a 100 °C. Dichos geles se resolvieron en una cámara mini-protean II (*Bio-Rad*[®]) a 200 V durante 30 min en un amortiguador de corrimiento preparado con Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS al 1 %. Una vez separadas las proteínas, los geles fueron fijados en una mezcla de isopropanol al 10 % y ácido acético al 10 % durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles fueron incubados en: (1) una solución de azul de Coomassie al 0.025 % en alcohol isopropílico al 25 % y ácido acético al 10 % durante 4 h, (2) una solución de azul de Coomassie al 0.0025 % en alcohol isopropílico al 10 % y ácido acético al 10 % durante 12 h y (3) en

ácido acético al 10 % hasta que el fondo de los geles se mostró totalmente claro.

5.4. Inmunodetección en Membrana de Nitrocelulosa de las Proteínas Espermáticas (Western-Blot)

El análisis por *western-blot* se realizó de acuerdo al método reportado por Towbin y cols. [1979]. Se preparó un gel de acrilamida al 8 % (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (ver 5.2.4.) en donde se resolvió el extracto crudo, la fracción no retenida (P_{NR}) y la fracción retenida (P_R), y fue transferido a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Esta membrana fue bloqueada 3 h con BSA al 5 % y se incubó 12 h con ZP solubilizada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Después de tres lavados de 10 min cada uno con TBS (NaCl 0.9%, tris 10 mM, pH final de 7.4), la membrana fue incubada 12 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-ZP, se lavó 3 veces más y se incubó 2 h con un segundo anticuerpo (anti-IgG) conjugado con peroxidasa (Sigma; SIGMA CHEMICAL, CO. St. Louis, MO, USA), para finalmente revelarse con una solución de TBS/4-cloro-1-naftol/ H_2O_2 .

Los ensayos de afinidad de las diferentes lactadherinas por la ZP porcina (*dot-blot*) se realizaron de la misma manera que el *western-blot* desde el bloqueo hasta el revelado. La diferencia consistió en que se colocaron directamente y por separado 5 μg de cada una de ellas sobre una membrana de nitrocelulosa.

5.5. Secuenciación

La secuencia N-terminal de cada una de las proteínas obtenidas en la fracción retenida fue determinada por degradación automática de Edman en un secuenciador de proteínas de fase gaseosa (LF 3000, Beckman Instruments). El cromatógrafo incluía una bomba modelo 126 y un detector de arreglo de diodos calibrado a 268 y 293 nm para señal y referencia, respectivamente. La columna para la secuenciación fue de 2 x 150 mm (Beckman Spherogel Micro PTH). Para dicho análisis se emplearon los reactivos estándar Beckman.

5.6. Aislamiento y Purificación de Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina

Para disponer de una buena cantidad de lactadherina para su caracterización, y dado que los espermatozoides cuentan con una baja concentración de ésta, la obtuvimos de una fuente diferente: la leche porcina. Adicionalmente, por razones de cantidad y disponibilidad se obtuvo lactadherina bovina.

5.6.1. Aislamiento de las fracciones ricas en lactadherinas

Las muestras de leche porcina y bovina fueron obtenidas de animales sanos en la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y una granja local de la delegación Tláhuac, respectivamente. Ambas lactadherinas fueron extraídas de acuerdo al método reportado por

Aoki y cols. [1994]. La leche completa fue centrifugada a 4500 x g durante 15 min y la fase grasosa fue lavada 5 veces con agua desionizada para remover componentes de la leche completa adheridos a la grasa. La fracción grasa ya lavada fue congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h, descongelada y diluída 1:2 (v/v) con agua desionizada y agitada durante 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente la fracción grasa se centrifugó a 5500 x g por 20 min a temperatura ambiente. Se formaron 3 fases: una fase superior constituida por grasa, una intermedia reportada como rica en lactadherina y una inferior constituida por componentes proteicos precipitados. La fracción enriquecida con lactadherina fue recuperada y dializada 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ contra agua desionizada. Las proteínas contenidas en dicha fracción fueron cuantificadas por el método de Peterson [1977].

5.6.2. Purificación de las lactadherinas

Las fracciones ricas en lactadherinas porcina y bovina fueron resueltas en SDS-PAGE [Laemmli, 1970] en un gel al 8 %. Los geles fueron incubados en acetato de sodio 4 M hasta que los componentes de las fracciones fueron visibles. Las bandas correspondientes a 47 kDa fueron recortadas de cada gel, electroeluídas 12 h y dializadas 72 h. Las lactadherinas fueron cuantificadas y almacenadas por separado en alícuotas de 1 mL a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y otras a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de dicroísmo circular (DC).

5.7. Purificación de la Acrosina Porcina

La purificación de la acrosina se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Parrish y Polakoski [1978]. La fracción completa de semen se ajustó a una concentración final de 0.05 M de benzamidina y alícuotas de 25 mL se centrifugaron 30 min a 500 x g sobre 20 ml de una mezcla de sacarosa 1 M / benzamidina 0.05 M y NaN_3 al 0.02%. El paquete celular se incubó 14 h a 4 °C en una mezcla de glicerol al 10 % / benzamidina 0.05 M, pH 4, se centrifugó a 27 000 x g. Para precipitar la acrosina, el sobrenadante se llevó al 35 % de saturación con sulfato de amonio sólido, cuidando que el pH se mantuviera en 3, durante 4 h sobre hielo. La solución se centrifugó 15 min a 27 000 x g y el precipitado se resuspendió en agua desionizada y se dializó 14 h contra HCl 0.001 M (pH 3). Esta preparación fue analizada en SDS-PAGE y transferida a PVDF para la determinación de la secuencia de aminoácidos, así como para la electroelución preparativa de la acrosina (ver párrafo 5.4.3.) para la obtención del espectro de DC.

5.8. DC de las Lactadherinas y la Acrosina

Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco 715-J calibrado con ácido (+)-canforsulfónico a 25 °C [Hennessey y Johnson, 1982]. Las determinaciones en la región del ultravioleta lejano (190-240 nm) se llevaron a cabo a 25 °C con 0.038 mg/ml de lactadherina porcina y con 0.013 mg/ml de lactadherina bovina, y para el caso de la acrosina la concentración fue de 0.01776

mg/ml empleando una celda de 0.5 cm. de recorrido óptico para todas las determinaciones. Las muestras usadas en los estudios de DC fueron dializadas previamente durante 72 h con cambios de agua desionizada cada 12 h. Los valores de DC se reportan como elipticidad por residuo medio, $[\theta]_{m.r.w.}$ [Sreerama y Woody, 2004], que fue calculada usando la masa molecular de residuo medio de 110. Para estimar el contenido de estructuras secundarias, los espectros de DC fueron analizados por el algoritmo CONTIN [Provencher y Glockner, 1981; Van Stokkum y cols., 1990 Grennfield 2004], disponible en un DICHROWEB [Lobley y Wallace, 2001; Lobley y cols., 2002; <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html>, un sitio para el análisis de estructura secundaria de proteínas a partir de espectros de DC].

5.9. Determinación de Carbohidratos de las Lactadherinas

El contenido de carbohidratos presente en las proteínas fue determinado de manera directa por el uso de fenol-ácido sulfúrico según el procedimiento de Dubois y cols. [1956] y por el método descrito por Kapitany y Zebrowsky [1973]. Para el método descrito por Dubois, se realizó una curva estándar con D(+)-glucosa en tubos con 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μg / 2mL, a los cuales se le adicionaron 50 μL de fenol al 80 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejaron en reposo durante 10 min, se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 30 °C durante 20 min. La absorbencia del color amarillo—naranja característico para esta reacción, fue determinado a 490 nm. El mismo procedimiento se llevó a cabo con las lactadherinas de leche porcina y

bovina, colocando 10 µg / 2mL de cada una en diferentes tubos para la determinación de hexosas.

Para la determinación de carbohidratos por el método de Kapitany y Zebrowsky, se resolvieron 10 µg de cada lactadherina en diferentes carriles de un gel al 8 % que se fijó toda la noche en metanol al 40 % / ácido acético al 5 % (solución fijadora). Después, el gel se incubó 3 h en solución de ácido periódico (ver 11.7.), 30 min en solución de bisulfito de sodio (ver 11.7.) seguido de 3 h con un cambio de bisulfito de sodio (en oscuridad de este paso en adelante), 18 h en reactivo de Schiff (ver 11.7.), 90 min en solución de bisulfito de sodio (incubación en un baño María a 55 °C), para finalmente desteñir con 4 cambios de solución fijadora.

5.10. Obtención de Anticuerpos Policlonales contra Lactadherina de Leche y Acrosina Porcinas

Se preparó una solución de antígeno (acrosina o lactadherina) (40 µg por cada 125 µL de PBS) más un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund (SIGMA). Se mezcló bien la suspensión y se inyectó a un ratón por vía intraperitoneal. Transcurridos 30 días, se inyectó nuevamente al animal una cantidad igual de antígeno sin adyuvante. Tres días posteriores a la hiperinmunización, se sacrificó al ratón y se recuperó la sangre de la vena femoral en un tubo Eppendorff y se mantuvo en refrigeración durante 12 h. Se desprendió el coágulo de las paredes del tubo con la ayuda de un palillo y se centrifugó 5 min a 800 x g. El sobrenadante se almacenó

en alícuotas a – 70 °C hasta su uso.

5.11. Titulación de los Anticuerpos

En una placa de 96 pozos, se colocaron 50 ng/50 µL de antígeno en cada pozo y se incubaron a 39 °C sin humedad hasta sequedad. Como control, se usó antisuero preinmune. Se reconstituyó el antígeno con 50 µl de leche descremada al 0.1 % en PBS durante 1 h y se dejó secar. Se agregó el antisuero en diluciones decrecientes (colocando en el primer pozo el antisuero sin diluir): 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900 y 1:218700) y se incubó 1 h a 37 °C. Se lavaron los pozos con PBS-Tween 20 al 0.05 % y se secaron. Se adicionó a cada pozo 50 µL de anti-IgG conjugado a peroxidasa (SIGMA) en una dilución 1:20 y se incubó 40 min a 37 °C. Se lavaron los pozos con PBS-Tween 20 y se agregaron a cada pozo 100 µL de solución de sustrato (mezclando 25 mL de ácido cítrico 0.05 M, pH 4 / 150 µL de ABTS 40 mM y 125 µl de H₂O₂ 0.05 M). La placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA, se graficaron los datos y se obtuvo la dilución media.

5.12. Microscopía Electrónica

Se determinó la localización de lactadherina y acrosina por microscopía electrónica, en espermatozoides porcinos antes y después de 4 h de capacitación, con el uso de anticuerpos policlonales anti-acrosina y anti-lactadherina de leche porcina.

5.12.1. *Capacitación espermática*

Se colocó una muestra de 0.9 mL de medio de capacitación TALP-Hepes (ver 11.5.) en una caja de plástico de 4 pozos (NUNC, Dinamarca) [Betancourt y cols., 1993] y se incubó a 39 °C. Después, en un tubo de centrifuga se colocó 1 mL de semen y 2 mL de medio de capacitación previamente incubado a 39 °C, la suspensión se mezcló ligeramente con una pipeta Pasteur y se centrifugó a 320 x *g* durante 5 min. El sobrenadante fue removido y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de medio de capacitación. Se colocó una alícuota de 15×10^6 espermatozoides en cada pozo de 0.9 mL de medio previamente preparado. Los espermatozoides fueron incubados a 39 °C durante 4 h para la capacitación [Bonilla y cols., 1994].

5.12.2. *Preparación de las muestras para el microscopio electrónico*

Las muestras se prepararon de acuerdo al método reportado por Conteras y Fierro [2004] con ligeras modificaciones. Los espermatozoides sin capacitar, fueron incubados 1 h en solución de NaCl 0.157 M y en presencia de anticuerpos anti-acrosina y anti-lactadherina, respectivamente a una dilución final 1:50, lavados por centrifugación a 320 x *g* durante 5 min e incubados 1 h en presencia del segundo anticuerpo (IgG anti-ratón conjugado con partículas de oro de 10 nm) a una

dilución final 1:50. Los espermatozoides incubados 4 h en medio de capacitación, tuvieron el mismo proceso a partir de la tercera hora de capacitación. Ambos tratamientos (espermatozoides capacitados y sin capacitar) fueron fijados en glutaraldehído al 0.5 % en amortiguador de cacodilatos (ver 11.6.) 1 h en hielo, se lavaron 3 veces en amortiguador de cacodilatos pH 7.4 por centrifugación a 500 x g durante 5 min, lavados en amortiguador de fosfatos 0.1 M, incubados 1 h en tetróxido de Osmio al 1% en amortiguador de fosfatos y deshidratados con dos cambios de etanol absoluto (al 30%, 50% y 70%) de 15 min cada uno. Después, las muestras se incubaron en una mezcla de Epón—óxido de propileno (1:1) durante 48 h en un desecador. La inclusión se llevó a cabo en Epón en una cámara a 60 °C durante 48 h. Los cortes se hicieron de un grosor de 80 – 85 nm en un ultramicrotomo Leica *ultracut R* (Austria) y se contrastaron con acetato de uranilo (30 min) y citrato de plomo (15 min) sobre rejillas de cobre de 200 mesh (número de divisiones que tiene la rejilla). La observación de las muestras y la toma de fotografías se realizó en un microscopio electrónico Jeol 1200 Ex-II (Japón).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de las Proteínas Espermáticas Porcinas con Afinidad por la ZP Homóloga

Las proteínas espermáticas que en estudios previos mostraron tener afinidad por la ZP porcina [Zayas y cols., 1995], fueron aisladas del resto del extracto crudo por cromatografía de afinidad. La ZP solubilizada fue la molécula que se usó como ligando para retener a dichas proteínas espermáticas.

6.1.1. Análisis de la zona pelúcida porcina (ZP) utilizado como ligando inmovilizado en la columna de afinidad

Se obtuvieron 17 mg de ZP solubilizada de los ovocitos colectados de 15 kg de ovarios. La ZP que se acopló a la columna de afinidad fue primero analizada en SDS-PAGE en geles al 12 % en condiciones reductoras, para verificar la integridad de sus componentes o la presencia de algunas otras proteínas que pudieran interferir. En el análisis electroforético de la ZP se pudo observar la separación de los dos complejos glucoproteicos: ZP1 (90 kDa) y ZP3 (55 kDa) (Figura 1), reportados por Yurewicz y cols. [1983]. El componente de 55 kDa de la ZP está constituido por dos glicoproteínas, química e inmunológicamente diferentes, llamadas 55 kDa α (masa molecular de 37 kDa, sin carbohidratos) y 55 kDa β (masa molecular de 40

kDa, sin carbohidratos), que electroforéticamente comigran, pero que pueden distinguirse si se realiza una desglicosilación de la familia de 55 kDa [Hedrick y Wadrip, 1987].

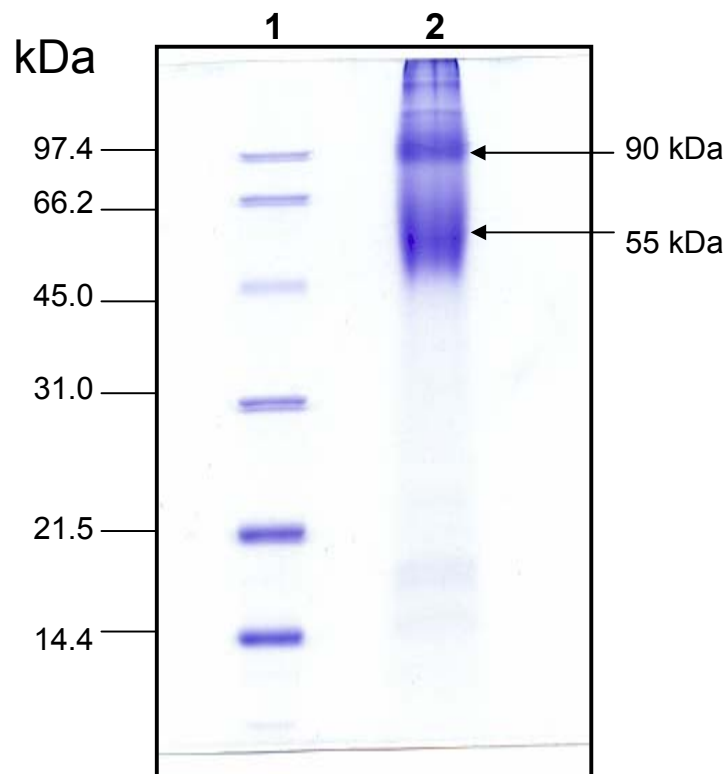


Figura 1. Análisis electroforético de la ZP solubilizada. Gel de acrilamida al 12 % en condiciones reductoras. Carril 1: marcadores de masa molecular; Carril 2: Componente ZP1 (90 kDa) y componente ZP3 (55 kDa). La tinción se realizó con azul de Coomassie.

6.1.2. Análisis de las fracciones de proteínas espermáticas separadas por cromatografía de afinidad

En la Figura 2 se muestra el cromatograma de afinidad del extracto crudo espermático. Se observa un pico de proteínas no retenidas (P_{NR}) y otro de proteínas retenidas (P_R). Se hizo una estimación de las proteínas recuperadas por medio de una cuantificación por el método de Peterson [1977]. El rendimiento de las proteínas recuperadas de la columna (P_{NR} y P_R) fue del 98 % (Tabla 1). Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE en geles al 8 %. Sólo dos proteínas mostraron afinidad por la ZP inmovilizada (Figura 3, carril 2).

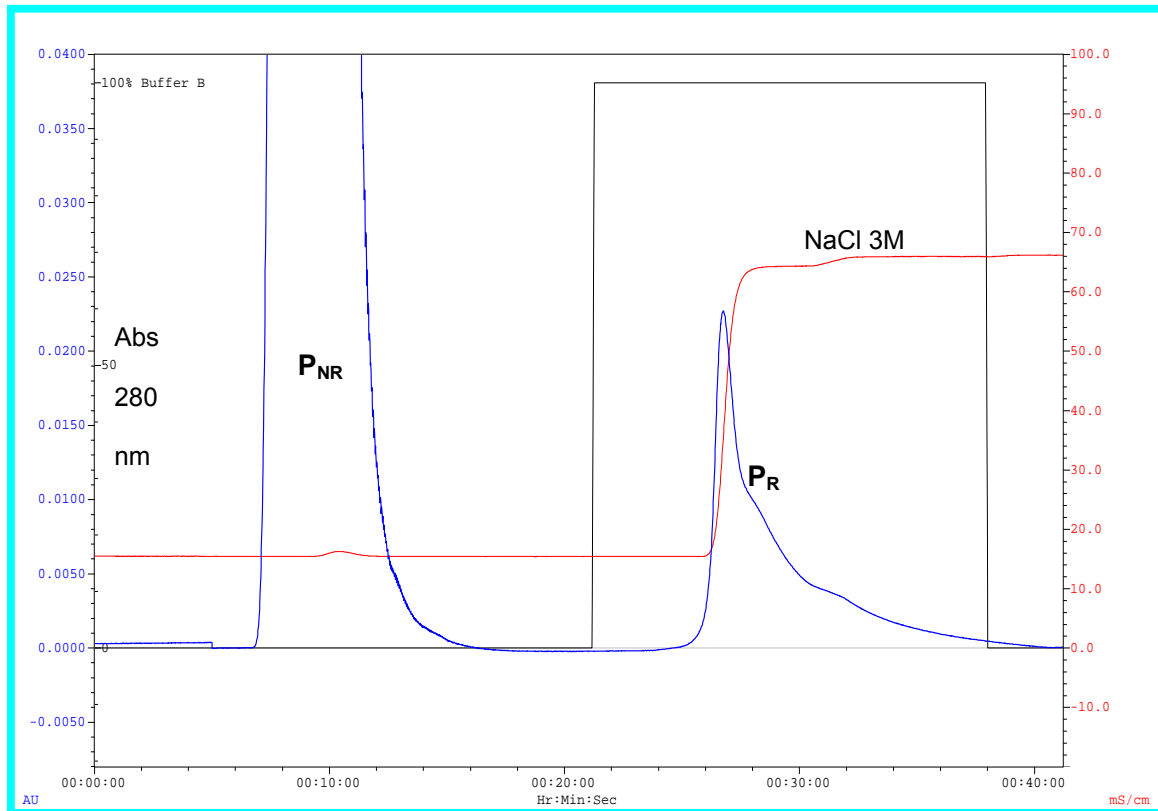


Figura 2. Cromatograma de afinidad de proteínas de espermatozoides porcinos. Las fracciones obtenidas se nombraron como: proteínas no retenidas (P_{NR}) y proteínas retenidas (P_R). La elución de P_R se realizó con NaCl 3 M amortiguado con $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, pH 7.8

Extracto crudo (mg)	P _{NR} (mg)	%	P _R (mg)	%	% total
1	0.98970	98.97	0.000274	0.0274	98.9974
1	0.97334	97.33	0.000496	0.0496	97.3836
1	0.98961	98.96	0.000356	0.0356	98.9956
Promedio	0.98430	98.42	0.000375	0.0375	98.4588

Tabla 1. Rendimiento de proteínas recuperadas de la columna de afinidad. P_{NR} y P_R fueron recuperadas en su totalidad, dializadas contra agua desionizada durante 48 h con cuatro cambios de agua y cuantificadas por el método de Peterson. Los cálculos se obtuvieron con un error de 0.00005.

6.1.3. Ensayo de afinidad por la ZP de la fracción proteínica retenida (P_R) determinada por western-blot

La fracción espermática retenida por cromatografía de afinidad, P_R, presentó dos proteínas. (Figura 3, carril 2). La fracción P_{NR} no contenía a estas dos proteínas por lo que no reconoció a la ZP en el mismo ensayo. Estas dos moléculas ya habían

sido observadas previamente [Zayas y cols., 1995] en un ensayo de afinidad por ZP solubilizada de componentes espermáticos (mismas bandas observadas en la Figura 3, carril 3), aunque no se sabía su identidad. Por esta razón, se esperaba obtener a estas dos proteínas en cantidades suficientes por cromatografía de afinidad para secuenciarlas y llevar a cabo estudios de carácter fisicoquímico, así como de inmunolocalización.

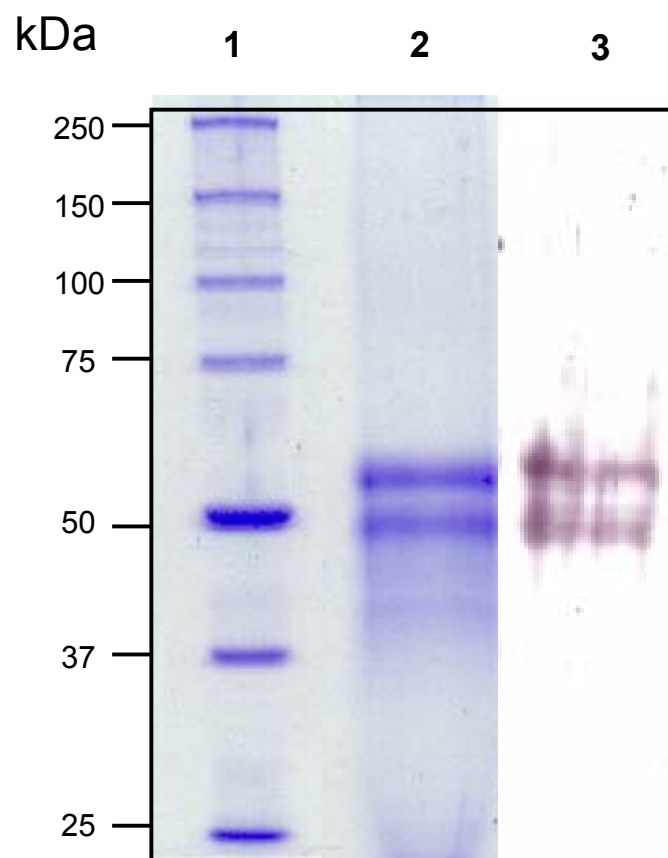


Figura 3. Análisis de las proteínas espermáticas porcinas que mostraron afinidad por ZP homóloga solubilizada: Carril 1: Marcadores de masa molecular. Carril 2: P_R recuperada de la columna de afinidad con NaCl 3 M. Carril 3: P_R (5 µg) incubada en presencia de ZP (*Western-blot*).

6.1.4. Análisis de secuencia de aminoácidos de los componentes de la fracción retenida

Se identificaron 10 residuos de la proteína superior y 13 de los primeros 16 residuos de la proteína inferior (bandas del carril 2, Figura 3). La secuencia identificada para la proteína superior fue: RDNAT CDGPC y para la proteína inferior: GDFXD SSLXL NGGTX L. La secuencia del fragmento de 10 residuos (banda superior) corresponde a la β -acrosina (E.C. 3.4.21.10). La comparación de los 13 aminoácidos de la secuencia de la segunda proteína (banda inferior) con una base de datos dio un alineamiento significativo (81% de identidad) con la secuencia de aminoácidos de la lactadherina (Swissprot: locus MFGM_pig access P79385). Los aminoácidos que no fueron identificados (X) por no haber sido modificados, corresponden a cisteínas en la secuencia de la lactadherina. Este análisis nos permite asegurar que las proteínas identificadas por Zayas y cols. [1998] corresponden a la acrosina y a la lactadherina.

6.2. Obtención de Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina como una Alternativa a su Baja Disponibilidad en Espermatozoides

Debido a la baja concentración de lactadherina en espermatozoides, se buscó otra fuente de esta proteína, se decidió tomar como fuente de lactadherina a la leche porcina por corresponder a la misma especie y a la leche bovina por razones de

cantidad y disponibilidad.

6.2.1. Obtención de las fracciones ricas en lactadherina porcina y bovina.

La grasa de la leche completa porcina y bovina mostraron proteínas asociadas a los glóbulos que la constituyen, y que pudieron ser separadas solo hasta que la grasa fue congelada y descongelada. Ésta última fue centrifugada, formándose tres fracciones, de las cuales la intermedia estaba reportada por Aoki y cols. [1994] como rica en lactadherina (Figura 5, carril 3).

6.2.2. Afinidad de las fracciones ricas en lactadherinas de leche porcina y bovina por ZP porcina determinada por western-blot

La fracción intermedia de cada una de las muestras de leche porcina y bovina (producto de congelar y descongelar la grasa de la leche), según el método de Aoki y cols. [1994], fue analizada la afinidad de alguno de los componentes de esta fracción por ZP a través de un ensayo de *dot-blot*. Ambas fracciones, tanto la porcina como la bovina, reconocieron a la ZP sobre la membrana de nitrocelulosa (Figura 4).



Figura 4. Ensayo de afinidad por la ZP porcina de lactadherinas porcina y bovina (dot-blot). Blot 1: 5 μ g de lactadherina porcina. Blot 2: 5 μ g de lactadherina bovina. La membrana fue bloqueada con BSA al 5% en TBS.

6.2.3. Purificación de las lactadherinas de leche porcina y bovina

Ya que la fracción intermedia, proveniente de la leche porcina y bovina mostró reconocimiento por la ZP porcina, los componentes de ambas fracciones se resolvieron por SDS-PAGE en geles al 6% a partir de los cuales fueron electroeluidas las bandas correspondientes a las lactadherinas porcina y bovina, respectivamente. Después de terminado el proceso de purificación, ambas lactadherinas fueron analizadas en un gel teñido con azul de Coomassie. La mayor

banda mostrada en los carriles 3 y 4 de la Figura 5 corresponde a la lactadherina porcina. En éstos, se puede apreciar que entre los componentes de la fracción, la lactadherina constituye el mayor componente, y ésta es relativamente fácil de recuperar por electroelusión.

La Figura 6 muestra la lactadherina bovina parcialmente pura (carril 3). La cantidad de leche bovina y su disponibilidad, representan ventajas respecto a la adquisición de leche porcina, para hacer de la lactadherina bovina una proteína modelo para estudiar la interacción entre gametos porcinos. La proteína electroeluída del carril 3 (Figura 6) fue dializada y utilizada para la obtención de los espectros de DC.

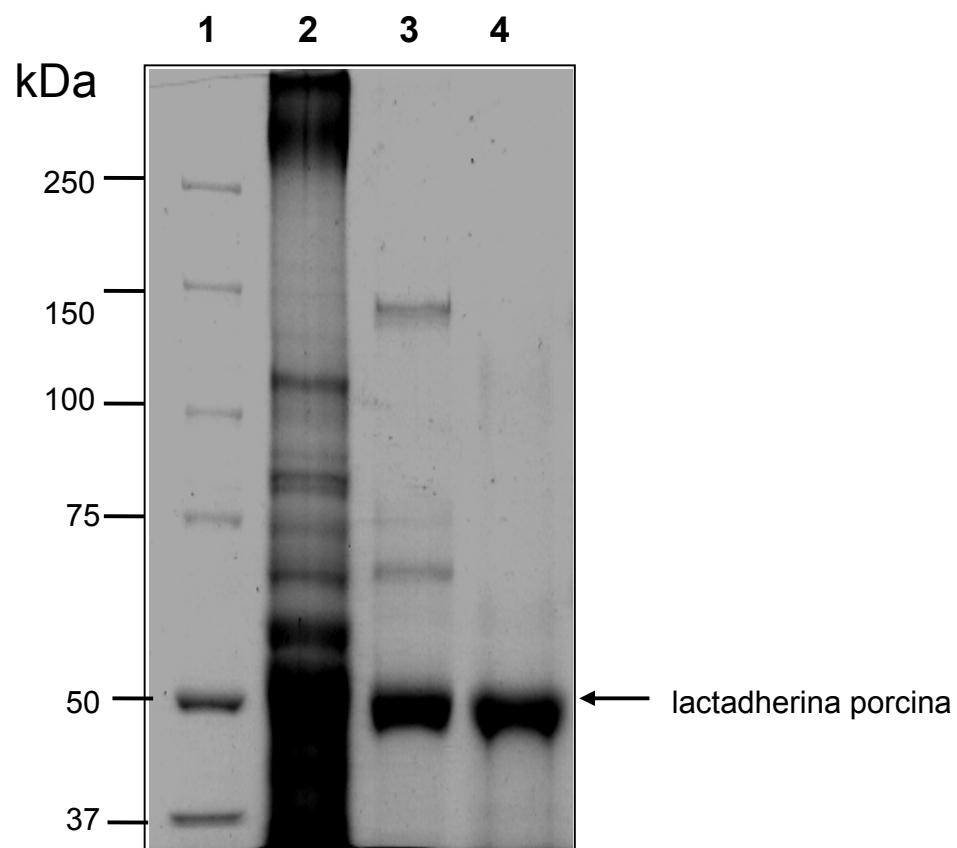


Figura 5. Análisis en SDS-PAGE de la lactadherina de leche porcina en los diferentes pasos de purificación. Carril 1: Estándares de masa molecular. Carril 2: Proteínas de leche completa (40 µg). Carril 3: Fracción rica en lactadherina obtenida de la grasa (20 µg). Carril 4: Lactadherina purificada (20 µg).

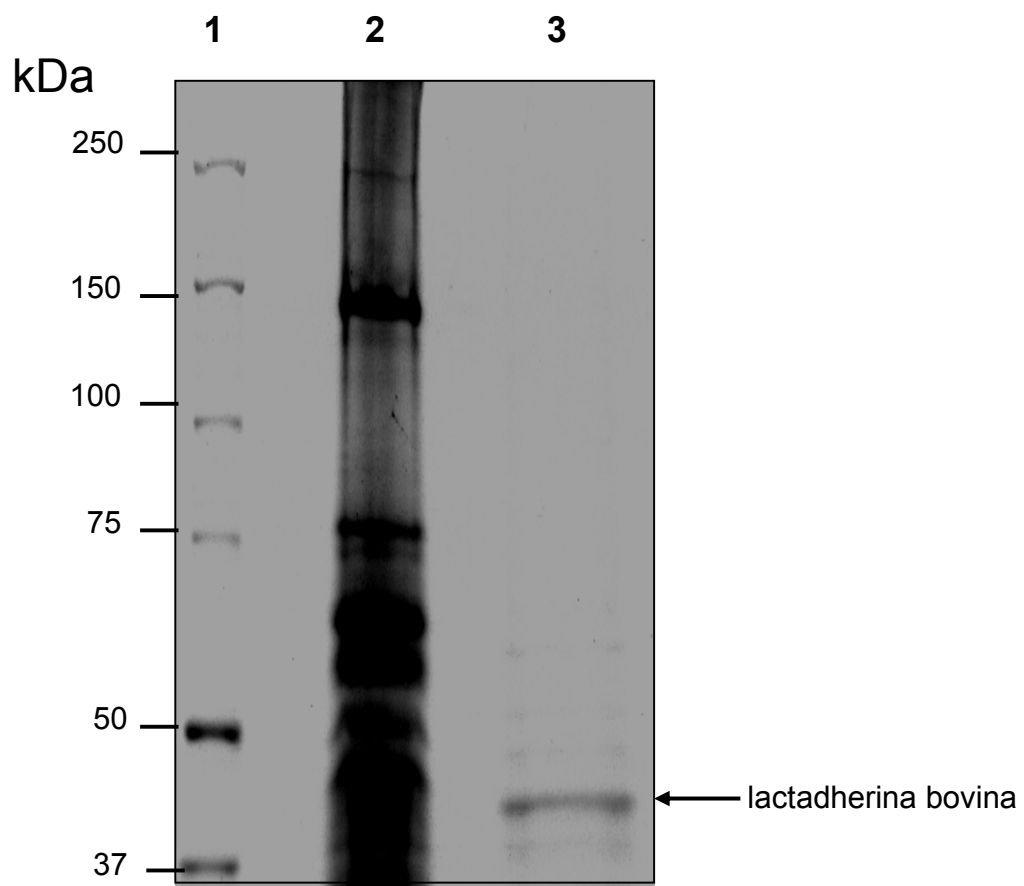


Figura 6. Análisis en SDS-PAGE de la lactadherina de leche bovina después de la purificación. Carril 1: Estándares de masa molecular. Carril 2: Proteínas de leche completa (40 µg). Carril 3: Lactadherina purificada (10 µg).

6.2.4. Análisis de las secuencias de las lactadherinas porcina y bovina

Se identificaron 13 de los primeros 16 residuos de la banda de 47 kDa aislada de la leche porcina. La secuencia del N-terminal determinada fue la siguiente: GDFXD SSLXL NGGTX L. El análisis comparativo de este fragmento en una base de datos dio un alineamiento significativo (identidad del 81 %) con la secuencia de aminoácidos reportada para la lactadherina de porcina (SPERM SURFACE PROTEIN SP47; PP47). Swissprot: locus MFGM_PIG, registro P79385. Por otro lado, fueron identificados 16 residuos para la banda correspondiente a la leche bovina: SGDFC DSSLC LGGTC L (bP47), identidad del 85.3 % con respecto a la lactadherina porcina. La comparación de las secuencias completas entre las lactadherinas porcina (cuya secuencia está reportada como la misma para la lactadherina proveniente de espermatozoides de la misma especie) y bovina dio una identidad del 85.3 % (Figura 7). La diferencia de aminoácidos entre ambas lactadherinas puede ser la causa de pequeñas diferencias entre los espectros obtenidos en los estudios de DC (Figura 8).

En conclusión, se confirmó la hipótesis de la presencia de dos proteínas espermáticas que fueron retenidas por la ZP porcina. Una de ellas —la acrosina— ya había sido reconocida por anticuerpos monoclonales anti-acrosina en un trabajo previo [Zayas y cols., 1998]. La lactadherina, de la que hasta ahora se tiene poca

información respecto a su función en los espermatozoides, fue la segunda proteína identificada y secuenciada.

```

(*) MPCPRLAAL FCSSGLFAAS GDFCDSSLCL HGGTCLLNED RTPPFYCLCP EGFTGLLCNE
(**)          FS GDFCDSSLCL NGGTCLLDQD POKPFHCLCP EGFTGLICNE

                                         102
TEHGPCFPNP CHNDAECQVT DDSHRGDVFI QYICKPLGY VGIHCETTCT SPLGMQTGAI
TEKGPCFPNP CHNDAECEVI DDAHRGDVFT EYICKCPHGY TGIHCEIICN APLGMETGAI

                                         162
ADSQISASSM HLGFMGLQRW APELARLHQT GIVNAWTSN YDKNPWIQVN LMRKMWVTGV
ADFQISASSM HLGFMGLQRW APELARLHRA GIVNAWTASN YDRNPWIQVN LLRRMRVTGV

                                         222
VTQGASRAGS AEYLKTFKVA YSTDGRQFQF IQVAGRS GDK IFIGNVNNSG LKINLFDTPL
VTQGASRAGS AEYMKTFKVA YSTDGRKFQF IQGAEEESGDK IFMGNLDNSG LKVNLFVPL

                                         282
ETQYVRLVPI ICHRGCTLRF ELLGCELNGC TEPLGLKDNT IPNKQITASS YYKTWGLSAF
EVQYVRLVPI ICHRGCTLRF ELLGCELSGC AEPLGLKDNT IPNKQITASS FYRTWGLSAF

                                         342
SWFPYARLD NQGKFNAWTA QTNSASEWLQ IDLGSQKRVG GIITQGARDF GHIQYVAAYR
SWYPFYARLD NQGKFNAWTA QSNSASEWLQ IDLGSQRVGT GIITQGARDF GHIQYVAAYK

                                         402
VAYGDDGVTW TEYKDPGASE SKIFPGNMDN NSHKKNIFET PFQARFVRIQ PVAWHNRITL
VAYSDDGVSW TEYRDQGALE GKIFPGNLDN NSHKKNMFET PFLTRFVRIL PVAWHNRITL

409
RVELLGC
RVELLGC

```

Figura 7. Alineamiento entre las secuencias de la lactadherina de leche porcina (**) (misma que la secuencia de la lactadherina espermática) y la lactadherina de leche bovina (*). Las letras en color rojo indican los residuos diferentes en las secuencias comparadas. Las secuencias fueron obtenidas del National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Los fragmentos resaltados en verde corresponden a los residuos secuenciados en esta tesis.

6.3. Identificación de Acrosina y Lactadherina en Extracto Crudo Espermático Determinada por *Western-Blot*

Se analizó el extracto crudo en presencia de diferentes anticuerpos: anti-acrosina y anti-lactadherina de leche porcina. La membrana de PVDF con proteínas espermáticas totales transferidas de la Figura 8 fue cortada en tres segmentos. El primero (carriles 1 y mitad del 2) fue incubado con anticuerpos anti-acrosina. El segundo segmento (mitad del carril 2, carril 3 y 4) fue incubado en presencia de anticuerpos anti-lactadherina de leche porcina. El tercer segmento (carril 5 y 6) fue teñido con azul de Coomassie después de la transferencia. La intención de cortar deliberadamente a la mitad el carril 2 fue para observar si la banda con afinidad a ZP porcina, observada en un estudio previo [Zayas y cols., 2004] era reconocida por anticuerpos anti-acrosina y/o anti-lactadherina. Puede notarse que los dos tipos de anticuerpos reconocieron a diferentes componentes del extracto crudo por la diferencia en el patrón de revelado y como los muestra la secuencia primaria obtenida de cada una de ellas más adelante. Es importante destacar que la sobreposición de dichas proteínas explica por qué Zayas y cols. [2004] observan un bloqueo de la unión entre gametos porcinos al coincubarlos con una banda identificada en ese trabajo —que ahora sabemos que es una mezcla de acrosina y lactadherina—, mientras que Crosby y cols. [1998] niegan que la acrosina tenga capacidad de bloquear dicha unión.

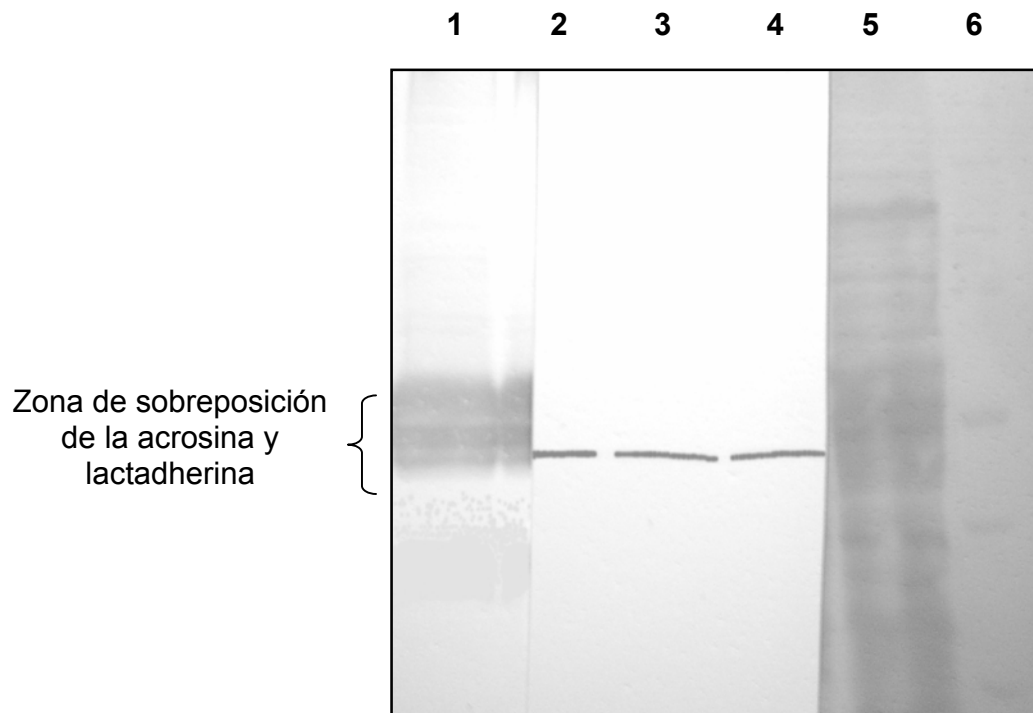


Figura 8. *Western-blot* de extracto crudo espermático porcino. Carril 1: anti-acrosina. Carril 2: Segmento cortado deliberadamente a la mitad e incubado una parte con anti-acrosina y otra parte con anti-lactadherina de leche porcina. Carriles 3 y 4: Segmento de membrana incubado con anticuerpos anti-lactadherina de leche porcina. Carril 5: Segmento teñido directamente con Azul de Coomassie. Carril 6: Marcadores de masa molecular.

6.4. Estudios Fisicoquímicos de las Lactadherinas de Leche Porcina y Bovina

6.4.1. Afinidad de las lactadherinas (sometidas a DC) por la ZP porcina determinada por western-blot

Las lactadherinas de leche fueron dializadas al menos por 48 h para eliminar los componentes del amortiguador de elusión, y posteriormente filtradas con membranas de 45 μm antes de ser sometidas a la espectroscopía de DC. Las lactadherinas purificadas de leche porcina y bovina aun después de ser sometidas a estudios de DC mostraron afinidad por la ZP porcina. La razón por la que se realizó este ensayo, fue para verificar el mantenimiento de la estructura, y con ello la afinidad que tienen ambas lactadherinas por la ZP porcina después de 72 h de tenerlas en solución (sin congelar). Como control, en una membrana de nitrocelulosa ambas lactadherinas fueron incubadas con anti-ZP porcina y con el anticuerpo secundario, respectivamente; ninguna banda fue observada, lo que demuestra que la ZP se unió específicamente a ambas lactadherinas.

6.4.2. Análisis de la estructura secundaria de las lactadherinas de leche porcina y bovina, y acrosina espermática por DC.

Las Figuras 9A y 9B muestran los espectros de DC correspondientes a las lactadherinas de leche porcina y bovina. Cada espectro de DC es el resultado de promediar tres experimentos. Ya que la región espectral en la que se realizaron estos estudios, 190 a 240 nm, corresponde la zona en la que el espectro de DC de una proteína es un reflejo de su estructura secundaria, podemos establecer que la semejanza entre las curvas mostradas en las Figuras 9A y 9B, indican que las dos proteínas presentan un patrón similar de plegamiento, debido posiblemente a que tienen su origen en un gen ancestral común. Las principales características espectrales de las lactadherinas son: dos extremos negativos, uno alrededor de 208 nm y otro centrado entre 220–222 nm, y un pico positivo en la región de 190 a 195 nm. De acuerdo a Manavalan y Johnson [1983], estas características son consistentes con los patrones de plegamiento del tipo $\alpha + \beta$ (regiones separadas ricas en α -hélice y hoja β). La curva de DC de la lactadherina porcina se parece a la curva reportada para la ribonucleasa A [Hennessey y Johnson, 1982] y la curva de DC de la lactadherina bovina se parece a la reportada para la actinidina [Tello-Solís y cols., 1995].

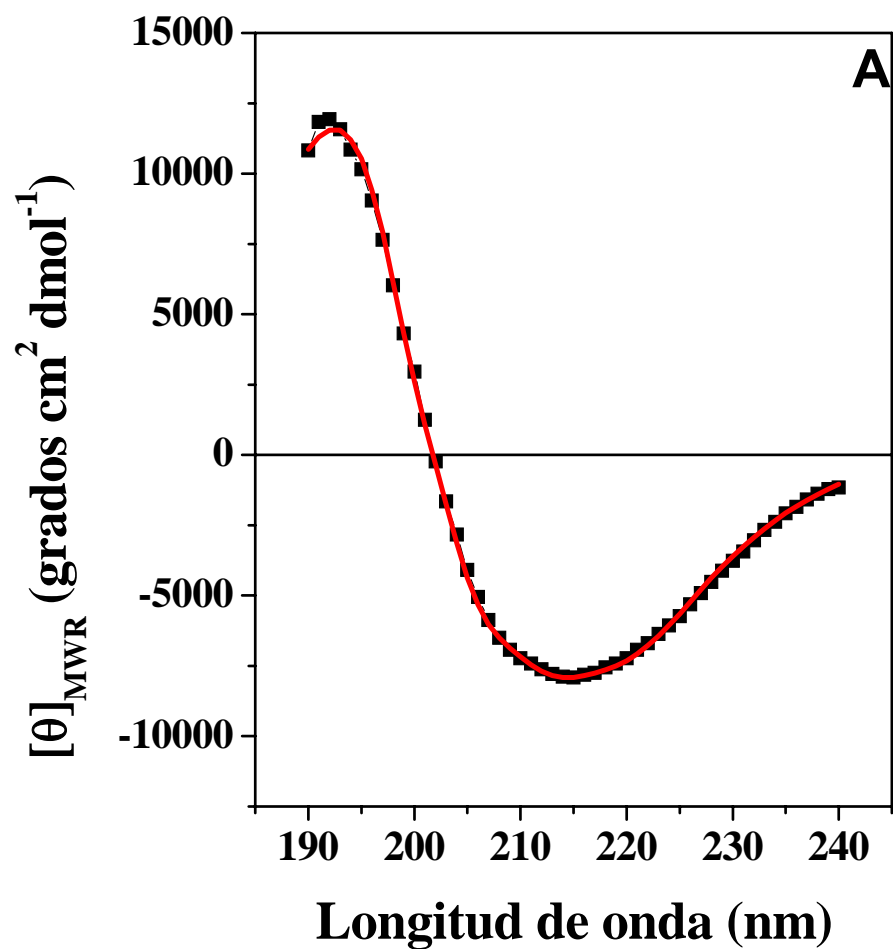


Figura 9A. Espectro de DC de la lactadherina de leche porcina. El espectro fue obtenido a 25 °C. La curva experimental (■) y la curva calculada (—) fueron analizadas por el método de CONTIN.

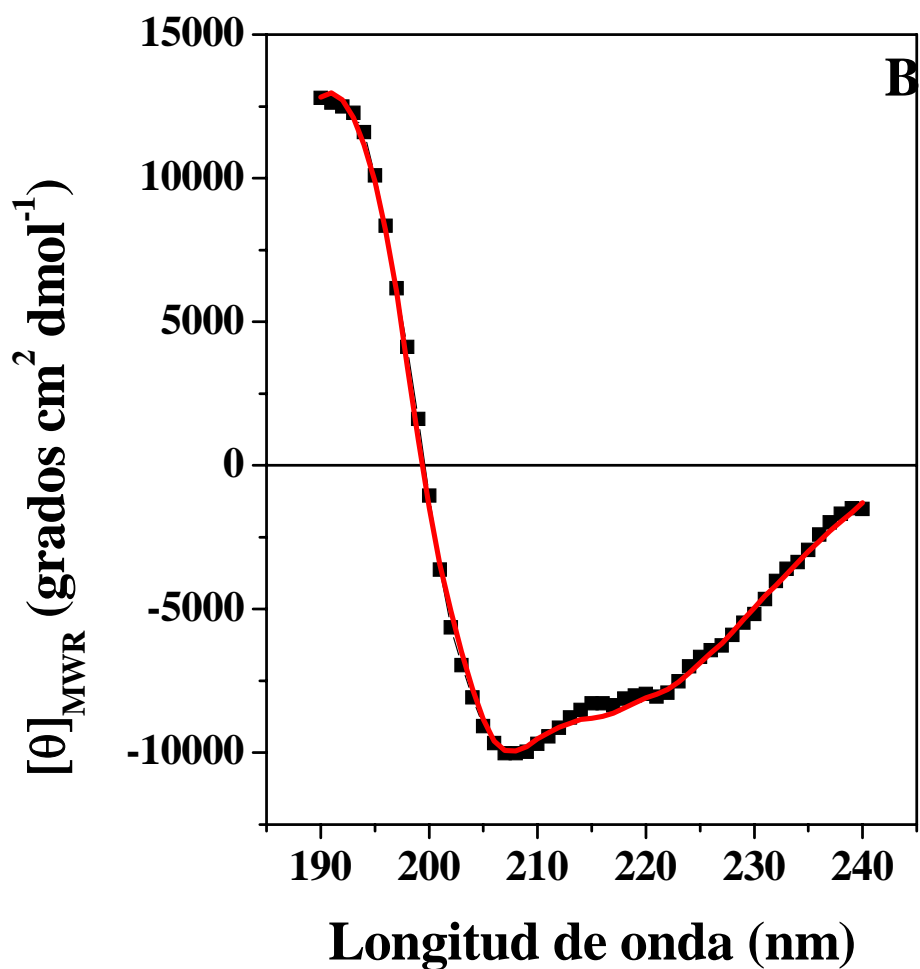


Figura 9B. Espectro de DC de la lactadherina de leche bovina. El espectro fue obtenido a 25 °C. La curva experimental (■) y la curva calculada (—) fueron analizadas por el método de CONTIN.

La Figura 10 muestra el espectro de DC correspondiente a la acrosina porcina obtenida de espermatozoides. Las principales características espectrales de la acrosina son: dos picos negativos, uno alrededor de 207 nm y otro que se ubica entre 220 a 224 nm, y un pico positivo en la región de 190 nm. Las características son consistentes con proteínas del tipo preferentemente α de acuerdo a la clasificación de Manavalan y Johnson [1983].

Para estimar el contenido de estructura secundaria, los espectros de DC fueron analizados por el algoritmo de CONTIN de Provencher y Glonker [1981], Van Stokkum y cols. [1990] y Grennfield [2004]. Los resultados de este análisis describen curvas calculadas (Figuras 9A, 9B y 10) que reproducen los puntos experimentales con un error de no sobreposición de ajuste (nrmsd) aceptable [Mao y cols., 1982], donde el valor de dicho error para la lactadherina porcina fue de 0.028, para la lactadherina bovina de 0.036 y de 0.067 para la acrosina espermática. La Tabla 2 muestra el contenido de estructura secundaria para ambas lactadherinas y para la acrosina. Los contenidos estructurales son expresados como fracciones y fueron derivados del análisis de los espectros de DC mostrados en las Figuras 9A, 9B y 10, utilizando el método de CONTIN. En todos los casos, la suma de las fracciones de la estructura fue de 1.00, lo cual indica que el análisis fue satisfactorio.

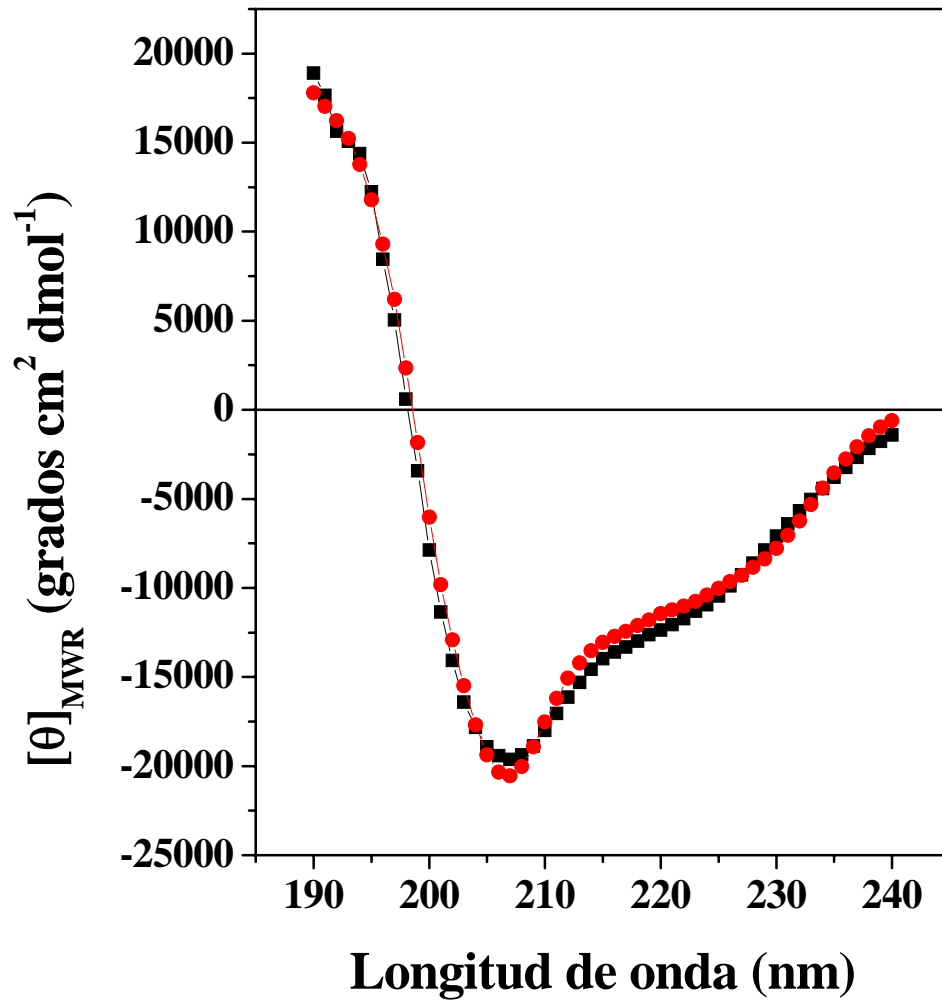


Figura 10. Espectro de DC de la acrosina de espermatozoides porcinos: El espectro fue obtenido a 25 °C Las curvas experimentales (■) y las curvas calculadas (●) fueron analizadas por el método de CONTIN.

Proteína	α -hélice	Hoja β antiparalela	Hoja β paralela	Giros β	Otros	Total
Lactadherina de leche porcina	0.168	0.200	0.115	0.226	0.297	1
Lactadherina de leche bovina	0.245	0.144	0.100	0.236	0.275	1
Acrosina de espermatozoides porcinos	0.387	0.035	0.051	0.175	0.352	1

Tabla 2. Contribución de la estructura secundaria de lactadherina porcina, de lactadherina bovina y acrosina. Nótese que ambas lactadherinas tienen estructuras del tipo $\alpha+\beta$, mientras que la acrosina espermática tiene estructura principalmente α [Manavalan y Johnson, 1983].

6.4.3. Contenido de carbohidratos de las lactadherinas de leche porcina y bovina.

El análisis de carbohidratos determinado por el método de Dubois y cols. [1956] y por el método descrito por Kapitany y Zebrowsky [1973] revelaron que la lactadherina de leche porcina contiene aproximadamente el 31 % de hexosas neutras (tomando como referencia a la glucosa), mientras que la lactadherina bovina no mostró contener estos azúcares. Tal diferencia en el contenido de azúcares es sorprendente si consideramos que la función de ambas lactadherinas en la leche es la misma (ver 1.4.5.), aunque es posible que los carbohidratos de la lactadherina bovina, según Egito y cols., [2001], puedan estar constituidos por azúcares no detectados por el método de Dubois y cols. [1956] y/o Kapitany y Zebrowsky [1973]. Esta diferencia en la cantidad o tipo de carbohidratos entre ambas lactadherinas pueden explicar también la diferencia de afinidad por la ZP porcina observada en los ensayos de *dot-blot*.

6.5. Dinámica de Migración de la Lactadherina y la Acrosina Espermáticas sobre la Membrana de Espermatozoides, Analizada por Microscopía Electrónica

Una vez que se purificó la lactadherina de leche porcina, y con la información de que ésta y la lactadherina de origen espermático presentan la misma secuencia de aminoácidos, se produjeron anticuerpos contra la lactadherina de

leche porcina para observar cambios en su localización antes y después de la capacitación. El mismo estudio se realizó para la acrosina, por medio de anticuerpos contra ésta.

6.5.1. Titulación de los anticuerpos

El título de los anticuerpos anti-acrosina y anti-lactadherina, definido como el 50 % del decaimiento de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, se determinó por el método de ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) a una absorbencia de 405 nm. El título de tres antisueros (tres ratones) anti-acrosina fue superior a una dilución 1:900. El título de tres antisueros anti-lactadherina de leche porcina también fue superior a 1:900. Los sueros preinmunes no mostraron afinidad por los antígenos.

6.5.2. Localización de la lactadherina y de la acrosina en la membrana del espermatozoide durante la capacitación in vitro

La distribución de la acrosina y de la lactadherina en espermatozoides vivos se observó por microscopía electrónica. No se observó marcaje para la acrosina en espermatozoides sin capacitar, solo excepcionalmente se observó alguna partícula de oro, como lo muestra la Figura 11. Después de 4 h de incubación de los espermatozoides en medio de capacitación, la ausencia de marcaje

se mantuvo en un 60 % de los espermatozoides (Figura 12 a); mientras que los espermatozoides restantes mostraron un marcaje abundante (Figura 12 c). Esto último, como producto del daño de las membranas y con ello la liberación del contenido acrosomal, a pesar de no usar inductor de la RA. La Figura 12 b, muestra daño de las membranas plasmáticas y acrosomales externas observadas en la Figura 12 c, al mostrar en el mismo espermatozoide, parte de la membrana plasmática íntegra y parte con daño evidente, por lo que el contenido acrosomal (entre el que se cuenta la acrosina), comenzó a ser reconocido por anticuerpos anti-acrosina.

La inmunolocalización de la lactadherina, antes y después de 4 h de incubación en medio de capacitación mostró patrones de marcaje no reproducibles, por lo que no se muestran en el trabajo. A pesar de la prueba de ELISA, en la que se mostró que el título de los anticuerpos anti-lactadherina de leche porcina reconocieron a dicha lactadherina; *in situ*, el marcaje se mostraba en ocasiones abundante en la membrana acrosomal y a veces escaso, aún después de la incubación en medio de capacitación.

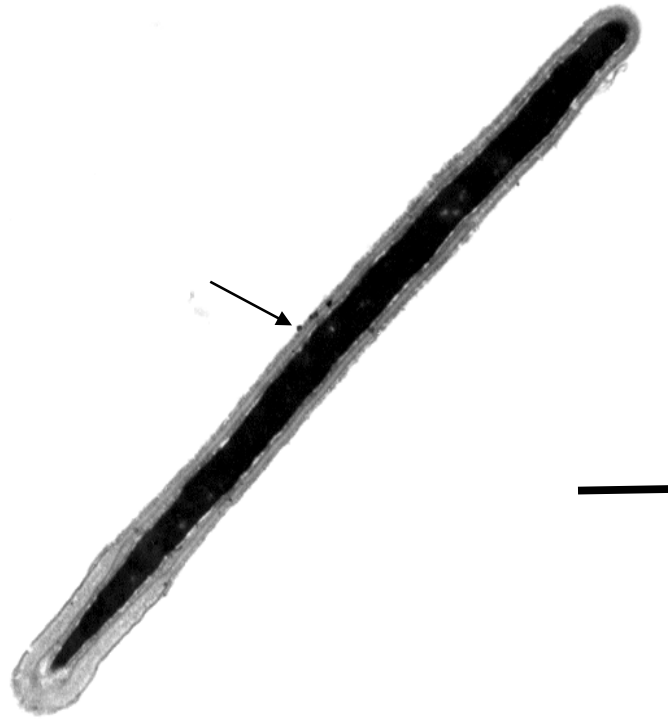


Figura 11. Espermatozoide sin capacitar e incubado con anticuerpos anti-acrosina (2500X). El total de los espermatozoides bajo estas condiciones carecieron de marcaje. Excepcionalmente se observaba alguna partícula de oro, como en esta figura. La barra indica 200 nm

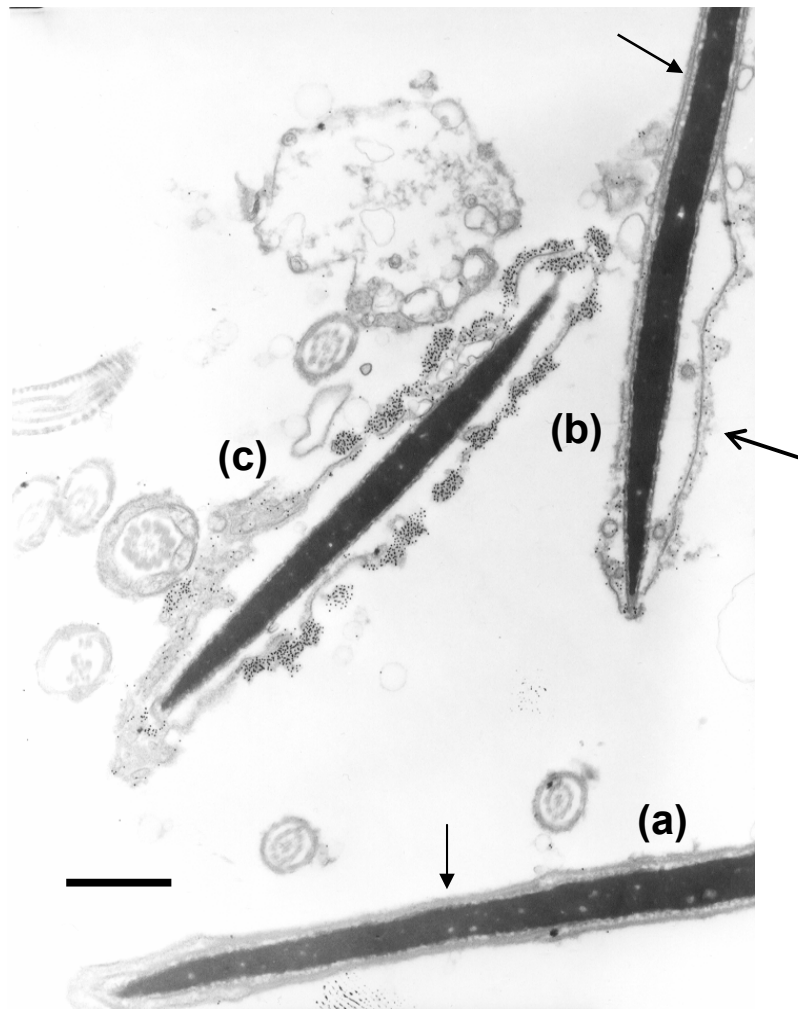


Figura 12. Espermatozoides después de 4 h en medio de capacitación e incubados en presencia de anticuerpos anti-acrosina (3500X). (a) Espermatozoide con la membrana íntegra (flecha con cabeza negra) y sin marcaje. (b) Espermatozoide con parte de la membrana plasmática dañada (flecha con cabeza abierta) con lo que el marcaje comienza a notarse, y parte de la membrana íntegra (flecha con cabeza negra). (c) Espermatozoide con la membrana plasmática dañada. La barra indica 500 nm

7. DISCUSIÓN GENERAL

Previamente, identificamos dos proteínas espermáticas porcinas que en geles de poliacrilamida preparados al 12 % en condiciones reductoras, reconocieron a ZP solubilizada homóloga [Zayas y cols., 1995]. Estas proteínas fueron aisladas y recuperadas por electroelusión del gel. En ensayos de competencia, estas moléculas aisladas —en lo que parecía ser una sola banda presente de manera abundante— fueron capaces de bloquear directamente la unión de gametos cuando fue coincubada con ovocitos madurados y de manera indirecta cuando a espermatozoides capacitados se le adicionaban anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. En un ensayo de reconocimiento, un anticuerpo monoclonal anti-acrosina, solamente reconoció la banda correspondiente a 55 kDa [Zayas y cols., 1998].

Para obtener la identidad de estas proteínas y caracterizarlas, se purificaron e identificaron sus secuencias amino terminales. La purificación por cromatografía de afinidad, usando ZP solubilizada como ligando, mostró dos proteínas cuando la fracción retenida por el ligando fue analizada por SDS-PAGE. Ambas moléculas mantuvieron su afinidad por la ZP después de ser eluídas, dializadas y liofilizadas. Los análisis de secuencia mostraron que la proteína de 55 kDa corresponde a la acrosina, mientras que la otra corresponde a la lactadherina (de quien se había estimado una Mr de 52 000).

Aunque se ha mostrado que el zimógeno de la acrosina porcina (la

proacrosina) tiene afinidad por el componente de 90 kDa de la ZP [Mori y cols., 1995], no está claro si este sistema es capaz de bloquear la unión de gametos en ensayos de competencia, debido al hecho de que esta afinidad se pierde después de la activación de la proenzima dada por cambios en el pH. Basados en estas observaciones, es posible especular que ocurre una unión firme del espermatozoide con el acrosoma reaccionado a la ZP, en un primer momento por la proacrosina y una vez que ésta ha sido activada, ocurren una serie de interacciones dadas por otros tipos de moléculas [Mori y cols., 1995]. Crosby y Barros [1999] demostraron que la β -acrosina recombinante, así como una mutante (β -acrosina Ser/Ala²²²) son capaces de unirse a la ZP de una manera no enzimática. Aunque este reconocimiento fue específico, saturable y estable con respecto al tiempo, la unión de estas β -acrosinas recombinantes no bloquearon la penetración del espermatozoide, sugiriendo que existen otras proteínas que participan en la unión de gametos y que estas son capaces de reconocer diferentes ligandos de aquellos que son bloqueados por las β -acrosinas recombinantes. La razón por la que estos autores no usan proacrosina nativa como una molécula de competencia es que, se sabe que cuando la proacrosina nativa se coincuba con ZP, esta mezcla influye en las tasas de fertilidad debido a la modificación proteolítica de la ZP y no por la capacidad de la acrosina de bloquear la unión [Crosby y Barros, 1999].

La lactadherina identificada en leche, inicialmente llamada P47 tiene secuencias tanto de su N-terminal como de algunas secuencias internas, que revelan una semejanza estructural entre esta proteína y la O-acetil gangliosido

sintasa de rata (rAGS), una proteína de glándula mamaria bovina (MPG) de 57 kDa y la proteína E8 de la fracción grasa de la leche murina [Stubbs y cols., 1990]. Estas dos últimas son polipéptidos secretados por las células epiteliales de la glándula mamaria en ambas especies. Los roedores, y el cerdo expresan lactadherina, que es producto del mismo gen en diferentes tejidos. La rAGS es una molécula que participa en la O-acetilación del gangliósido GD3 del ácido siálico. La glicoproteína y los gangliósidos O-acetilados de los ácidos siálicos son altamente específicos en algunas células y en la expresión regulada de algunas proteínas durante el desarrollo [Ensslin y cols., 1998]. La mayoría de las proteínas de la leche son componentes de la superficie de las células apicales de la glandula mamaria lactante, además de una porción de la membrana plasmática que es secretada con gotas citoplasmáticas que durante la lactogénesis forma las membranas globulares de la grasa de la leche (MFGM) [Larocca y cols., 1991]. A pesar de la información anterior, la función y características de la lactadherina en espermatozoides de cerdo son todavía desconocidas.

El conocimiento que se tiene acerca de la acrosina y la reciente identificación de la lactadherina en espermatozoides porcinos, permite suponer que en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio [Zayas y cols., 2004] la gruesa banda eluída de geles para los ensayos de competencia, contenía realmente a dos proteínas que al ser analizadas en grandes cantidades en SDS-PAGE, son capaces de co-migrar (ver Figura 3; carril 2). Por las evidencias presentadas por Crosby y Barros [1999] y por nuestros hallazgos [Zayas y cols., 2004], es razonable asegurar que se

trata de la lactadherina espermática que es capaz de unirse a ligandos en la ZP de ovocitos madurados y con ello evitar la unión posterior de espermatozoides capacitados y no la acrosina, presente como proteína soluble del acrosoma, quien si bien tiene la capacidad de unirse a la ZP para degradarla, no lo hace en etapas iniciales del reconocimiento entre gametos.

La descripción de la estructura secundaria por medio del contenido de α -helicoidal, hoja β antiparalela, hoja β paralela, giros y otros, como parte de la descripción de la lactadherina de leche porcina [Zayas y cols., 2005] es una reciente aportación que abre la posibilidad de describir los fenómenos que participan en el plegamiento de proteínas de adhesión. Este tipo de estudios solamente se habían descrito en espermadhesinas; sin embargo, la mayoría de estas moléculas que cubren al espermatozoide son liberadas durante la capacitación *in vitro* [Dostálová y cols., 1994], por lo que su participación en la unión primaria con el ovocito queda poco clara.

En el presente trabajo hemos encontrado, una dinámica de migración claramente opuesta a la descrita por Petrunkina y cols. [2003], quien trabajando con marcaje inmunofluorescente, sugiere que durante la capacitación, la lactadherina parece desenmascarse por la liberación de proteínas que la cubren y hacen visible a nivel de microscopía óptica, la migración del borde apical de la cabeza del espermatozoide, hacia la región acrosomal completa, al observar un patrón de intensa fluorescencia después de 3 h de capacitación *in vitro*. Con marcaje

de oro coloidal a un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón, se observó marcaje distribuido homogéneamente en la membrana plasmática de la región acrosomal completa en espermatozoides recién eyaculados y lavados, antes de la capacitación. Después de 4 h de capacitación *in vitro*, la señal se localizó únicamente en la región apical de la cabeza. Las diferencias encontradas entre Petrunkina y cols. [2003] y las nuestras en el presente trabajo pueden ser debidas inicialmente al nivel de resolución entre la microscopía de fluorescencia empleada en el primer caso y la microscopía electrónica usada por nosotros. Como parte de la comprensión del papel de estas proteínas, se requiere más investigación acerca de las vías de transducción de señales que inducen la migración de la lactadherina.

8. CONCLUSIONES

La cromatografía de afinidad facilitó la purificación de proteínas espermáticas que muestran funciones de receptores —con el uso de su ligando en el ovocito (ZP)— sobretodo al tratarse de proteínas presentes en baja cantidad. No obstante, se obtuvo lactadherina de fuentes alternativas por razones de cantidad y que mostró tener la misma secuencia de aminoácidos que la presente en espermatozoides.

El análisis de los datos conformacionales obtenidos para la estructura secundaria de las lactadherinas de leche porcina y bovina muestra un patrón de plegamiento del tipo $\alpha + \beta$. Por otro lado, las características espectrales de la acrosina sugieren un patrón de plegamiento del tipo α .

La migración que muestra la lactadherina espermática (con el uso de anticuerpos policlonales contra lactadherina de leche porcina), antes y después de la capacitación, sugiere que durante el remodelamiento de la membrana plasmática hay una relocalización de ésta, orientado a garantizar la unión entre gametos, aunque es posible que esta molécula no sea la única que participa en el reconocimiento.

Las lactadherinas porcina y/o bovina que se encuentran abundantemente en la fracción grasa de la leche podrían ser usadas como análogas de la lactadherina de origen espermático para futuros estudios como molécula de reconocimiento entre gametos porcinos por las siguientes evidencias: (1) Su afinidad por la ZP, (2) la secuencia primaria de ambas lactadherinas de leche es idéntica a

la encontrada en espermatozoides en más de un 90 % y (3) la estructura secundaria para ambas lactadherinas de leche presentan el mismo patrón de plegamiento (tipo $\alpha+\beta$).

9. PERSPECTIVAS

No hay duda de que comparar y pretender sustituir las lactadherinas de leche porcina y bovina con aquella proveniente de los espermatozoides porcinos —aunque sea por razones de disponibilidad— en estudios de reconocimiento de gametos, es un tema que origina polémica. Hasta el momento, se ha logrado establecer la alta identidad entre las lactadherinas de leche con la de origen espermático en términos de la secuencia de aminoácidos, así como el reconocimiento por la ZP que tienen las lactadherinas estudiadas en esta tesis. Sin embargo, harán falta estudios orientados a confirmar la posibilidad de emplear la lactadherina de leche porcina y/o bovina como molécula modelo de adhesión en el campo de la fertilización en mamíferos. Dichos estudios pueden estar orientados a determinar posibles cambios conformacionales debidos a la interacción de ZP-lactadherina de leche porcina y/o bovina; determinar la termodinámica de desplegamiento—replegamiento de dichas lactadherinas, entendido esto como cambios en la estabilidad en función de una desnaturalización química o térmica. Adicionalmente, deberá estandarizarse la técnica para la obtención de lactadherina espermática a través de métodos de biología molecular para el aislamiento del gen por el que podamos obtener cantidades importantes de esta proteína para el análisis de DC y posterior comparación con los datos conformacionales que se obtuvieron en esta tesis.

10. REFERENCIAS

- Adham IM, Nayemia K, Engel W (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Rep. Dev.* 46: 370–376.
- Andersen MH, Berglund L, Rasmussen JT, Petersen TE (1997). Bovine PAS-6/7 binds $\alpha_v\beta_5$ integrins and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry.* 36: 5441-5446.
- Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT (2000). Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry.* 39: 6200-6206.
- Andrade MA, Chacon P, Merelo JJ, Moran F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* 6: 383-390.
- Aoki N, Kuroda H, Urabe M, Taniguchi Y, Adachi T, Nakamura R, Matsuda T. (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine milk fat globule membrane (MFGM). *Biochim. Biophys. Acta* 1199: 87-95.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 269: 31845–31849.
- Betancourt M, Fierro R, Ambriz D. (1993). In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology.* 40: 1155-1160.

- Bonilla E, Amador A, Betancourt M. (1994). In vitro capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med. Sci. Res.* 22: 725-726.
- Brewis IA, Clayton R, Browes CE, Martin M, Barratt CLR, Hornby DP, Moore HD. (1998). Tyrosine phosphorylation of 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa in response to recombinant human ZP3. *Mol. Hum. Rep.* 4: 1136–1144.
- Brewis IA, Wong CH H (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev. Reprod.* 4: 135–142.
- Butler JE, Pringnitz DJ, Martens CL, Crouch N (1980). Bovine-associated mucoprotein: I. Distribution among adult and fetal bovine tissues and body fluids. *Differentiation.* 17: 31-40.
- Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E (1992). Carbohydrate-binding proteins involved y gamete interaction in the pig. En: *Spermatogenesis, Fertilization, Contraception: Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*, Nieschlag, E. y Habernicht (eds.) Springer-Verlag, Berlín, pp 395-417.
- Capková J, Pekniková J (1997). Binding of boar spermatozoa to porcine oocytes: Effect of low molecular weight 17 kDa protein. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 168–175.
- Compton LA, Johnson WC Jr. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem.* 155: 155-167.

- Contreras JL, Fierro R. (2004). Ultrastructural morphology and morphometry of epididymal sperm in the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). *Arch. Androl.* 50: 359-65.
- Couto JR, Taylor MR, Godwin SG, Ceriani RL, Peterson JA (1996). Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol.* 15: 281-286.
- Crosby JA, Jones R, Barros C, Carvallo P (1998). Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol. Rep. Dev.* 49: 426–434.
- Crosby JA, Barros C. (1999). Effect of recombinant boar beta-acrosin on sperm binding to intact zona pellucida during in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 61: 1535-1540.
- Darszon A, Liévano A, Beltran C (1996). *Ion channels: key elements in gamete signaling*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 34: 117–167.
- DICHROWEB: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html>, at Birkbeck College, UK.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer–Petersen E (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accesory sex gland fluids and on the surface epididymal, eyaculated and capacitated spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta.* 1200: 48–54.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956). Colorimetric method

- for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Dunbar BS, Prasad SV, Timmons TM (1991). Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. En Dunbar, B.S. y O’Rand, M.G. (eds.), *A comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York, pp. 97–114.
- Egito AS, Girardet JM, Miclo L, Gaillard JL. (2001). Highly sensitive periodic acid/Schiff detection of bovine milk glycoproteins electrotransferred after nondenaturing electrophoresis, urea electrophoresis, and isoelectric focusing. *Lait*. 81: 775-785.
- Ensslin M, Calvete JJ, Thole HH, Sierralta WD, Adermann K, Sanz L, Töpfer–Petersen E (1995). Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane–associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorilcholine–binding region of spermadhesin AWN. *Biol. Chem.* 376: 733–738.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer–Petersen E (1998). Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar semen–associated zona pellucida–binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol. Reprod.* 58: 1057–1064.
- Gao Z, Garbers DL (1998). Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm–specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule–like domains. *J. Biol. Chem.* 273: 3415–3421.
- Greenfield NJ (2004). Analysis of Circular Dichroism Data, En *Methods*

- in Enzymology, Numerical Computer Methods, Parte D., (Johnson ML and Brand L, eds.). Academic Press. Methods Enzymol. 383: 282-317.
- Greve JM, Wassarman PM (1985). Mouse extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. J. Mol. Biol. 181: 253–264.
- Hardy DM, Garbers DL (1994). Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. J. Biol. Chem. 269: 19000–19004.
- Hardy DM, Garders DL (1995). A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. J. Biol. Chem. 270: 26 025–26 028.
- Hedrick, J.L., Wadrip, N.J. (1986). Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. Anal Biochem. 157: 63–70.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. (1987). On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. Dev Biol. 121: 478-488.
- Hedrick JL, Urch UA, Hardy DM (1989). Structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. En: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. Whitaker JR, Sonnet PE (eds). American Chemical Society, 215-229.
- Hennessey JP Jr, Johnson WC Jr. (1982). Experimental errors and their effect on analyzing circular dichroism spectra of proteins. Anal. Biochem. 125: 177-188.
- Hinsch E, Hägele W, Bohle RM, Schill WB Hinsch KD (1998). Evaluation of ZP2 domains of functional importance with antisera against

- synthetic ZP2 peptides. *J. Rep Fert.* 114: 245–251.
- Hvarregaard J, Andersen MH, Berglund L, Rasmussen JT, Petersen TE (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* 240: 628-636.
- Jansen S, Quigley M, Reik W Jones R (1995). Analysis of polysulphate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 501-510.
- Jansen S, Ekhlasi-Hundrieser M Töpfer-Petersen E (2001). Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tiss Organs.* 168: 82-92.
- Kapitany RA, Zebrowsky EJ. (1973). A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 56: 361-369.
- Keefe D, Tran P, Oldenberg R (1996). Polarization microscopy and digital image processing improves non-invasive imaging of oocytes and identifies bilaminar structure of the zona pellucida. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 3 (Suppl.) 182A.
- Kiani FN, Barratt CLR, Hornby DP, Moore HDM (1994). Characterisation of human sperm surface receptors involved in sperm-egg interactions using recombinant ZP3. *En 7th International Symposium on Spermatology* p. 1024. Bradley M, Cummins J (eds). Cairns, Queensland.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Larocca D, Peterson JA, Urrea R, Kuniyoshi R, Bistrain AM, Ceriani RL. (1991). A Mr=46000 human milk fat globule protein that is highly

- expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains. *Cancer Res.* 51: 4994–4998.
- Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG (2001). Zonadhesin: Characterization, localization, and Zona Pellucida Binding. *J. Biol. Chem.* 65: 1691–1700.
- Liang LF, Chamow SM, Dean J (1990). Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol. Cell Biol.* 10: 1507–1515.
- Listcher ES, Juntunen K, Seppo A, Penttila L, Niemela R, Renkonen O, Wassarman PM (1995). Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs *in vitro*. *Biochemistry.* 34: 4662–4669.
- Lobley A, Wallace BA. (2001). DICHROWEB: A web site for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Biophys. J.* 80: 373a.
- Lobley A, Whitmore L, Wallace BA. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics.* 18: 211-212.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Manavalan P y Johnson C. (1983). Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class . *Nature* 305: 831-832.
- Manavalan P, Johnson WC Jr. (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism

- spectra. *Anal Biochem.* 167: 76-85.
- Mao D, Wachter E, Wallace BA. (1982). Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. *Biochem.*21: 4960-4968.
- Maymon BBS, Maymon R, Ben-Nun I, Ghetler Y, Shalgi R, Skutelsky E (1994). Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 102: 81–86.
- Menéndez M, Gasset M, Laynez J, Lopez-Zumel C, Usobiaga P, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ (1995). Analysis of the structural organization and thermal stability of two spermadhesins. Calorimetric, circular dichroic and Fourier-transform infrared spectroscopic studies. *Eur. J. Biochem.* 234: 887-896.
- Miller DJ, Gong X, Decker G, Shur BD (1993). Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.* 123: 1431–1440.
- Miller DJ, Shi X, Burkin H (2002). Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 37-73.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD (1992). Complementarity between sperm surface β -1, 4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357: 589–593.
- Moos J, Pekniková J, Surneva-Nakova TN, Pavlík M (1990). Identification of 17–18 kDa zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa. *FEBS Lett.* 264:

243–245.

Moreno RD, Sepulveda MS, De Ioannes A, Barrios C (1998). The polysulphate binding domain of human proacrosin/acrosin is involved in both the enzyme activation and spermatozoa–zona pellucida interaction. *Zygote*. 6: 75–83.

Mori E, Shin–Ichi K, Baba T, Inagaki Y, Mori T (1995). Aminoacid sequences of porcine sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Develop. Biol.* 168: 575–583.

Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y, Noguchi S (1996). Structure and function of the N–linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod.Fertil.* 50: 25–34.

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shults J, Guerrero ML, Chaturvedi P, Newburg SO, Scallan CD, Taylor MR, Ceriani RL, Pickering LK (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*. 351: 1160-1164.

Nimtz M, Grabenhorst E, Conradt HS, Sanz L, Calvete JJ (1999). Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. *Eur. J. Biochem.* 265: 703-718.

Oehninger S, Mahony MC, Swason JR, Hodgen GD (1993). The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemizona assay conditions. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 57–61.

- O'Rand MG, Matthews JE, Welch JE, Fisher SJ (1985). Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J. Exp. Zool.* 235: 423-428.
- Parrish RF, Polakoski KL. (1978). Boar m_α-acrosin. Purification and characterization of the initial active enzyme resulting from the conversion of boar proacrosin to acrosin. *J. Biol. Chem.* 253: 8428-8432.
- Peterson GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
- Peterson RN, Campbell WP, Hunt WP, Bozzola JJ (1991). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins, *Mol. Reprod. Devel.* 28: 260-271.
- Peterson RN, Hunt WP (1989). Identification, isolation, and properties of a plasma membrane protein involved in the adhesion of boar sperm to the zona pellucida. *Gamete Res.* 23: 103–118.
- Petrunkina AM, Läkamp A, Gentzel M, Ekhlasi–Hundrieser M, Töpfer–Petersen E (2003). Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reprod.* 125: 377-387.
- Planchenault T, Cechova D, Keildlouha V (1991). Matrix degrading properties of sperm serine proteinase, acrosin. *FEBS Lett.* 294: 279–281.
- Provencher SW, Glockner J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* 20: 33-37.

- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida binding protein of the spermadhesin family. *Eur. J. Biochem.* 242: 636–640.
- Russell LD, Montag B, Hunt W, Peterson RN (1985). Properties of boar sperm plasma membrane (PM): Proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents, and sensitivity to surface radiolabelling. *Gamete Res.* 11: 237-252.
- Saxena N, Peterson RN, Sharif S, Saxena NK, Russell LD (1986a). Changes in the organization of surface antigens during capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies. *J. Reprod. Fertil.* 78: 601–614.
- Saxena N, Peterson RN, Saxena NK, Russell LD (1986b). Microfilaments appear in boar spermatozoa during capacitation. *J. Exp. Zool.* 239: 423–427.
- Sreerama N, Woody RW (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* 383: 318-351.
- Shalgi R, Maymon R, Bar-Shira B, Amihai D, Skutelsky E (1991). Distribution of lectin receptor sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29: 365–372.
- Shi J, Gilbert GE (2003). Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood.* 101: 2628-2636.
- Shimizu S, Tsuji M, Dean J (1983). Biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J. Biol. Chem.* 258: 5858–5863.

- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer–Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J (1995). Immunocytochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine genital tract. *Cell. Tissue Res.* 282: 175–179.
- Snell WJ, White JM (1996). The molecules of mammalian fertilization. *Cell.* 85: 629–637.
- Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 8: 370-380.
- Sreerama N, Woody RW. (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* 383: 318-351.
- Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U, Parry G (1990). cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87: 8417-8421.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm–zona pellucida interactions, and sperm–egg fusion. *Biol. Reprod.* 68: 1–9.
- Tello-Solís SR, Valle-Guadarrama ME and Hernández-Arana A. (1995) Purification and circular dichroism studies of multiple forms of actinidin from *Actinidia chinensis* (Kiwifruit). *Plant Sci.*, 106, 227-232.
- Thaler CD, Cardullo RA (1996a). Defining oligosaccharid specificity for initial

- sperm–zona pellucida adhesion in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 535–546.
- Thaler CD, Cardullo RA (1996b). The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J. Biol. Chem.* 271: 289–297.
- Thall AD, Malý P, Lowe JB (1995). Oocyte Gal α 1, 3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J. Biol. Chem.* 270: 21437–21440.
- Töpfer–Petersen E, Calvete JJ (1995). Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *Inter. J. Androl.* 18, Suppl. 2: 20–26.
- Töpfer–Petersen E, Calvete JJ (1996). Sperm–associated protein candidates for primary zona pellucida–binding molecules: structure–function correlations of boar spermadhesins. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50: 55–61.
- Töpfer–Petersen E, Henschen A (1988). Zona pellucida–binding and fucose–binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity. *Biol. Chem.* 369: 69–76.
- Töpfer–Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi–Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ (1998). Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Androl.* 30: 217–224.
- Töpfer–Petersen E (1999). Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update.* 5: 314–329.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Tranter R, Read JA, Jones R, Brady RL (2000). Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm β -acrosin. *Structure.* 8: 1179-1188.
- Urch UA, Wardrip NJ, Hedrick JL (1985). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233: 479-483.
- Van Duin M, Polman JEM, de Breet ITM, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 51: 607-617.
- Van Stokkum IHM, Spoelder HJW, Bloemendal M, Van Grondelle R, Groen FCA. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 191: 110-118.
- Varki A (1994). Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7390-7397.
- Veselský L, Jonáková V, Sanz ML, Töpfer-Petersen E, Cechová D (1992). Binding of a 15 kDa glycoprotein from spermatozoa of boars to surface of zona pellucida and cumulus oophorus cells. *J. Reprod. Fert.* 96: 593-602.
- Visconti PE, Kopf GS (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.

- Wallace BA. (2000). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures. *J. Synchrotron Radiat.* 7: 289-295.
- Wassarman PM (1999). Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* 96: 175–183.
- Wassarman PM, Albertini DF (1994). The mammalian ovum. En: *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edn pp. 79–122. Knobil E, Neill JD (eds). New York: Raven Press.
- Wassarman PM, Litscher ES (1995). Sperm–recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 1–19.
- Whitmore L, Wallace BA. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue): W668-W673.
- 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. *J. Biol. Chem.* 273: 10470–10474.
- Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD (eds) New York: Raven Press, pp. 189–317.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Subramanian MG (1983). Isolation and preliminary characterization of a purified pig zona antigen from porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 29: 511-519.
- Yurewicz EC, Pack BA, Armant DR, Sacco AG (1993). Porcine zona pellucida ZP3 α glycoprotein mediates binding of the biotin–labeled Mr 55 000 family

(ZP3) to boar sperm membrane vesicles. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 82–389.

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

Zayas H, Ducolomb Y, Casas E, Bonilla E, Betancourt M (1998). Inhibición de la unión in vitro de espermatozoides a la zona pelúcida de ovocitos de cerdo por una proteína espermática de 55 kDa. XXIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR). Cuernavaca, Mor. México.

Zayas-Pérez H, Casas E, Bonilla E, Metancourt M. (2004). Inhibition of sperm-zona pellucida binding by a 55 kDa pig sperm protein in vitro. *Arch. Androl.* (aceptado para su publicación).

Zayas-Pérez H, Tello-Solís SR, González-Márquez H, Bonilla-González E, Mendoza-Hernández G, Betancourt-Rule M. (2005). Circular dichroism of pig and bovine lactadherins and their affinity for the pig zona pellucida. *Protein and Peptide Letters.* 12: 299-303.

11. ANEXOS

11.1. Preparacion de Geles al 8 % para SDS-PAGE

Gel de Separación:

Acrilamida al 30 %	3.335 mL
Agua desionizada	5.850 mL
Tris-HCl 1.5 M; pH 8.8	3.125 mL
Desgasificar 30 min.	
SDS al 10 %	125 µl
Persulfato de Amonio (APS) al 10 %	63 µl
TEMED al 100 %	6µl

Gel de Compactación:

Acrilamida al 30 %	800 µL
Agua desionizada	2.8 mL
Tris-HCl 1.5 M; pH 8.8	2.5 mL
Desgasificar 30 min.	
SDS al 10 %	50 µl
Persulfato de Amonio (APS) al 10 %	30 µl
TEMED al 100 %	5µl

11.2. Western-Blot de Proteínas Resueltas en SDS-PAGE

Transferencia de la proteína a la membrana (nitrocelulosa o PVDF):

- (1) Resolver las proteínas en un gel de manera usual.
- (2) Colocar la membrana de nitrocelulosa a equilibrar en el amortiguador de transferencia (si se usa PVDF, humedecerla previamente en metanol al 100 %).
- (3) Colocar la membrana equilibrada en un "sandwich" elaborado de la siguiente manera: fibra porosa, papel filtro, gel, membrana, papel filtro, fibra porosa. Remover cuidadosamente cualquier burbuja que haya quedado entre los componentes del "sandwich".
- (4) Colocar adecuadamente el "sandwich" de manera que la membrana quede orientada hacia el ánodo (+) y el gel hacia el cátodo (-).
- (5) Transferir la proteína a 50 volts por 1 h aproximadamente
- (6) Si se requiere, teñir la membrana con Azul de Comassie por 5 min. y destañirla con metano al 50 % con los cambios necesarios hasta que las proteínas transferidas se vean claramente.

Solución Stock del amortiguador de transferencia (10X):

Tris 250 mM

Glicina 1.92 M

11.3. Prueba de Inmunoreactividad

Visualización con Peroxidasa/cloronaftol

- (1) Bloquear los sitios no ocupados en la membrana (blot) en una solución al 5% de leche descremada, en TBS-A o bien, en BSA al 3% en el mismo amortiguador por 3 h o toda la noche.
- (2) Lavar la membrana 1/2 h con 4 cambios de TBS-T.
- (3) Incubar la membrana en el 1^{er} anticuerpo diluido en TBS-T o solución de bloqueo, de preferencia toda la noche para lograr una mayor sensibilidad.
- (4) Lavar la membrana 1/2 h con 4 cambios de TBS-T.
- (5) Incubar 1 - 2 h con el 2^{do} Anticuerpo diluido en TBS-T o BSA al 1% (sin azida, pues la azida inhibe la peroxidasa).
- (6) Lavar la membrana 1/2 h con 2 cambios de TBS-T.
- (7) Incubar la membrana en 4-cloro-1-naftol/TBS/H₂O₂ recién preparado, por aproximadamente 15 min. o hasta que el color de la(s) banda(s) sea suficiente sin que el resto de la membrana se manche.
- (8) Lavar la membrana dos min. en agua. Secar. Proteger de la luz excesiva.

Reactivos para PRUEBA DE INMUNOREACTIVIDAD:

TBS (Tris buffered-saline)

Tris 10 mM

NaCl 0.9%

HCl hasta pH 7.4

TBS-A (Tris buffered-saline-azida)

Igual que TBS más la adición de azida de sodio a una concentración final de 0.02%

TBS-T (Tris buffered-saline-Tween 20)

Igual que TBS más la adición de Tween 20 a una concentración final de 0.1%

Reactivo de cloronaftol:

Mezclar inmediatamente antes de usar:

3 mg/mL de 4-cloro-1-naftol en 10 ml de metanol al 100 %.

50 mL de TBS

50 µL de H₂O₂ al 30 %

11.4. Amortiguadores para Cromatografía de Afinidad

Amortiguador "A" (Amortiguador de equilibrio de columna)

Fosfato de sodio 20 mM

Cloruro de sodio 150 mM

PMSF 1 mM

Cocktail de antiproteasas 1mL

Colato de sodio 1%

Ajustar el pH a 7.8

Amortiguador "B" (Amortiguador para despegar proteínas)

Fosfato de sodio 20 mM

Cloruro de sodio 3 M

PMSF 1 mM

Cocktail de antiproteasas 1mL

Colato de sodio 1%

Ajustar el pH a 7.8

Notas:

- (1) El colato de sodio es insoluble al pH ácido al que se encuentran los amortiguadores antes de ajustarlo a 7.8, de modo que para lograr su solubilización se agrega paulatinamente NaOH hasta que el colato quede completamente soluble. Sólo hasta entonces se podrá ajustar el pH a 7.8, agregando HCl muy lentamente, ya que cada gota provocará la precipitación de colato nuevamente, para lo cual simplemente deberá esperar un poco a que se resolubilice.

- (2) El PMSF deberá solubilizarse en la menor cantidad de metanol antes de adicionarse a la mezcla de reactivos.

- (3) Ambos amortiguadores deberán filtrarse a través de una membrana de 0.45 μm o 0.22 μm .

- (4) Ambos amortiguadores deberán desgasificarse por 15 - 30 min. inmediatamente antes de usarse

11.5. Medio TALP-HEPES

Usado para el lavado, dilución y capacitación de espermatozoides.

Componente	PM	mg/100 ml	Concentración final (mM)
KCl	74.55	23	3.1
NaCl	58.44	584	100
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	137.99	4	0.29
HEPES	238.30	238	10
NaHCO ₃	84.01	210	25
Lactato de sodio	112.1	0.308 ml	21.6
Rojo fenol	----	1	----
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	31	2.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	30	1.5

Aforar a 100 ml con agua desionizada.

Comentarios:

1. Adicionar el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al final.
2. Ajustar el pH a 7.4
3. Si es necesario, ajustar la osmolaridad a 290 – 300 mOsm/kg con NaCl.
4. Esterilizar por filtración, con filtro de $0.22 \mu\text{m}$.
5. Suplementar el día de uso con:

Piruvato de sodio 1 mM (40 μl del stock/ml de medio)

Albúmina Sérica Bovina (fracción V) 6 mg/ml

Gentamicina 10 mg/ml (1 μl /ml de medio)

6. Esterilizar nuevamente por filtración, con filtro de $0.22 \mu\text{m}$.

Notas:

(1) Es suficiente preparar 15 ml para experimentos de capacitación e inmunolocalización de P47p.

(2) Hepes: ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N'*-2-etanosulfónico)

11.6. Preparación del Amortiguador de Cacodilatos (Ácido Dimetilarsínico)

11.6.1. Soluciones stock

A: Solución de cacodilato de sodio 0.2 M (42.8 g de $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml de agua desionizada).

B: NaOH 0.2 M (8g en 1000 ml de agua desionizada).

50 ml de **A** + x ml de **B**, aforados a 200 ml.

x	pH	x	pH
2.7	7.4	29.6	6.0
4.2	7.2	34.8	5.8
6.3	7.0	39.2	5.6
9.3	6.8	43.0	5.4
13.3	6.6	45.0	5.2
18.3	6.4	47.0	5.0
13.8	6.2		

11.7. Tinción de Carbohidratos con Ácido Periódico y Fuschina Básica de Schiff

Soluciones:

- Para fijar y desteñir: etanol al 40 % / ácido acético al 5 %.
- Reactivo de Schiff: Disolver 10 g de fuschina básica en 2 l de agua destilada con calentamiento. Después de enfriar, añadir 200 ml de HCl 1N y 17 g de bisulfito de sodio (metabisulfito); mezclar la solución hasta que esté decolorada (en su mayor parte). Filtrar y almacenar a 4 °C en un frasco ámbar.
- Ácido periódico: Disolver 1.4 g de ácido periódico en 200 ml de ácido acético al 5 %.
- Solución de bisulfito de sodio: Disolver 0.4 g de bisulfito de sodio en 200 ml de ácido acético al 5 %.

Procedimiento:

(1) Fijar el gel toda la noche en 500 ml de solución fijadora.

- (2) Incubar el gel 3 h en solución de ácido periódico.
- (3) Incubar el gel 30 min en solución de bisulfito.
- (4) Incubar nuevamente 3 h en solución nueva de bisulfito (proteger el gel de la luz durante y después de la tinción).
- (5) Incubar aproximadamente 18 h en el reactivo de Schiff.
- (6) Incubar 90 min en solución de bisulfito a 55 °C.
- (7) Desteñir con grandes cantidades de solución fijadora con al menos 4 cambios (toda la noche si es necesario para obtener un fondo claro).

12. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Zayas, H., González, H., Tello, S.R., Bonilla, E. y Betancourt, M. (2001). Purificación de una proteína espermática porcina de Mr=55, involucrada en la unión primaria a la zona pelúcida de ovocitos homólogos. VI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Zayas-Pérez, H., Tello-Solís, S.R., González-Márquez, H., Bonilla-González, E., Mendoza-Hernández, G. y Betancourt-Rule, M. (2004). *Dicroísmo circular de lactadherinas de leche porcina y bovina y su afinidad por la zona pelúcida porcina*. IX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Miguel Betancourt, **Héctor Zayas**, Eduardo Casas, Yvonne Ducolomb, Edmundo Bonilla. (1999). *A 55kDa pig sperm protein inhibits sperm-oocyte binding in vitro*. XXXII Reunión Anual de la Sociedad para el Estudio de la Reproducción. Center for Reproductive Biology. Washington State University/University of Idaho.

Zayas, H., Tello, S. R., González, H., Mendoza, G. y Betancourt, M. (2000). *Purificación de una proteína espermática porcina de 55 kDa involucrada en el reconocimiento de la zona pelúcida de ovocitos homólogos*. XXIII Congreso Nacional

de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Acapulco, Gro.

Héctor Zayas, Humberto González, Salvador Tello, Edmundo Bonilla, Guillermo Mendoza y Miguel Betancourt. (2002). *Purificación de dos proteínas espermáticas porcinas con afinidad por la Zona Pelúcida de ovocitos homólogos*. XXVII Reunión Anual de la AIBIR (Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C.). Morelia, Mich.

Zayas Pérez, H., Tello Solís, S.R., González Márquez, H., Mendoza Hernández, G., Bonilla González, E. Y Betancourt Rule, M. (2002). *Estrategia de purificación de dos proteínas espermáticas porcinas involucradas en la adhesión específica a ovocitos homólogos*. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Puerto Vallarta, Jal.

H. Zayas Pérez, S.R. Tello Solís, H. González Márquez, E. Bonilla González, G. Mendoza Hernández y M. Betancourt Rule. (2004). *Dicroísmo circular de lactadherinas de leche porcina y bovina y su afinidad por la zona pelúcida porcina*. XXIX Reunión Anual de la AIBIR (Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C.) y SMBRH (Sociedad Mexicana de Biología de la Reproducción Humana). Oaxaca, Oax.

Zayas Pérez, H., Tello Solís, S.R., González Márquez, H. y Betancourt Rule, M. (2004). Purificación, caracterización bioquímica y fisicoquímica de dos proteínas espermáticas involucradas en el reconocimiento ovocito-espermatozoide en cerdo. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ixtapa Zihuatanejo, Gro.

Héctor Zayas-Pérez, Salvador R. Tello-Solís, Humberto González-Márquez, Edmundo Bonilla-González, Guillermo Mendoza-Hernández and Miguel Betancourt-Rule. (2005). *Circular dichroism of pig and bovine lactadherins and their affinity for the pig zona pellucida*. Protein and Peptide Letters. 12: 299-303.

Programa de Investigación Multidisciplinario: “*Caracterización bioquímica, fisicoquímica y localización dinámica de una proteína espermática de 55 kDa durante la capacitación*” (1999 – 2004).