



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y
FUNCIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA
PELÚCIDA CON ESPECIAL REFERENCIA A LA
ESPECIE HUMANA.**

Por
MARIA JIMÉNEZ MOVILLA

Murcia, 2005



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Campus de Espinardo, E-30071 Murcia. Tlf: 968 36 39 43 / 44 Fax:968 36 43 23

D. José Ballesta Germán, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Celular, AUTORIZA:

la presentación de la Tesis Doctoral titulada "Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana" realizada por Dña. María Jiménez Movilla, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Biología Celular, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de Mayo de 2005



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Campus de Espinardo, E-30071 Murcia. Tlf: 968 36 39 43 / 44 Fax:968 36 43 23

D. Manuel Avilés Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Celular, AUTORIZA:

la presentación de la Tesis Doctoral titulada "Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana" realizada por Dña. María Jiménez Movilla, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Biología Celular, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de Mayo de 2005



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Campus de Espinardo, E-30071 Murcia. Tlf: 968 36 39 43 / 44 Fax:968 36 43 23

Dña. Concepción Ferrer Cazorla, Profesor Titular de Universidad y Directora del Departamento de Biología Celular. INFORMA:

que la Tesis Doctoral titulada "Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana", ha sido realizada por D^a. María Jiménez Movilla, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. José Ballesta Germán y D. Manuel Avilés Sánchez, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 30 de Mayo de 2005

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de una beca de Formación de Personal de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (referencia FP2000-5858).

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección General de Investigación (Proyectos PM1999-137, BFI2000-0156, BMC2003-03738, BFU2004-05568/BFI) y por la Fundación Salud 2000 (Proyectos 2000-2003 y 2004-2006).

Parte de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

P.J. Fernández-Colom, M. Jiménez-Movilla, M. Avilés, M.J. Gómez-Torres, M.T. Castells, J. De Juan, A. Romeu, J. Ballesta: Análisis citoquímico ultraestructural de los componentes glucídicos contenidos en la zona pelúcida y gránulos corticales de ovocitos humanos. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. 2002; Vol 18, nº 4, pp .152-157.

M. Jiménez-Movilla, M. Avilés, M.J. Gómez-Torres, P.J. Fernández-Colom, MT Castells, J. de Juan, A. Romeu, J. Ballesta: Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. Human Reproduction. 2004; 19: 1842-1855.

M. Jiménez-Movilla, M. Avilés, E. Martinez-Alonso, M.T. Castells, R. Fayrer-Hosken, J. Ballesta. Biochemical and cytochemical characterization of the hamster zona pellucida. En preparación.

M. Jiménez-Movilla, M. Avilés, A. Gutiérrez-Adán, M.A. Ramírez de Paz, J.L. Girela, M.J. Gómez-Torres, J. de Juan, J. Ballesta: Analysis of the carbohydrate residues contained in the recombinant human ZP3 glycoproteins expressed in CHO cells. Implication in the acrosome reaction. En preparación.

A mi abuela Sole
que nos ha inculcado
las ganas de luchar

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la realización de esta Tesis Doctoral deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

- Al profesor D. Manuel Avilés Sánchez por darme la posibilidad de realizar esta Tesis, por su dirección, supervisión y constante apoyo en todo momento y sobre todo por transmitirme su apasionada visión de la investigación y del tema que trata este trabajo. También quiero agradecer todos los consejos y apoyos recibidos por D. José Ballesta Germán que siempre ha estado cuando lo he necesitado.

- A D. José Ángel Martínez Menárguez por sus consejos precisos y darme su confianza que ha sido imprescindible para tener seguridad en mi trabajo. A Maria Teresa Castells Mora que siempre ha estado cuando la he necesitado y me ha enseñado y ayudado en todo lo que le he pedido. A Irene Abascal Ruiz por su importante apoyo en cualquier tema, tanto profesional como personal, y confiar en mi desde el primer momento.

- Quiero agradecer profundamente a Emma el ánimo, apoyo y ayuda que me ha ofrecido siempre, tanto en los buenos momentos como en los malos, y espero que sigamos siendo colaboradoras y sobretodo amigas toda la vida.

- A María de Carmen González por ser la "jefa" del departamento, sin su experiencia no podría haber realizado este trabajo y sobretodo por sus valiosos consejos.

- A mis compañeros de laboratorio María José, Julián, Guillermo y Jose les agradezco la ayuda que siempre me han ofrecido desinteresadamente y que hayan hecho entretenidas las horas de trabajo y últimamente a Irene y María José por el ánimo que me han dado.

- A los profesores Dña. Concepción Ferrer Cazorla, Dña. Adelina Zuasti Elizondo, D. Juan Francisco Madrid Cuevas, D. Francisco Hernández Calvo y D. Luis Miguel Pastor García por su ayuda y consejos profesionales que han encaminado mi trabajo.

- A María José Gómez Torres por ser una mujer luchadora que me ha servido de guía y por supuesto por sus consejos profesionales. A José Luis Girela que sin su ayuda no hubiese podido realizar parte de esta Tesis y espero que en el

futuro sigamos siendo colaboradores por que considero que es un gran investigador.

- Al Servicio Técnico de Microscopia Electrónica por su asistencia técnica y a D. Joaquín Moya por su excelente experiencia.

- A Dña. Pilar Coy por darme su confianza, a Sebastián por su apoyo y comentarios que me han sido muy útiles y a José Guillermo por los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio y encontrar un amigo para siempre. En general al Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria que me han ayudado en todo lo que he necesitado.

- A Isa con la que he compartido una de las mejores experiencias en Londres, por acogerme en su casa y poder compartir con ella cualquier problema, Elena por su simpatía y apoyo en la parte final de la Tesis y a Olga que cada vez que venía de Barcelona era como un suspiro de aire fresco para el departamento.

- A Viviana y Cárol las argentinas en Alemania que me acogieron y ayudaron en todo momento.

- También quiero agradecer el interés, preocupación y los consejos que me han dado mis amigos Guiomar, Paz, Petri, Santi, Olga, Jimmy, Irene, Ilu, David y Clem. A Monica y Misu que aunque estén lejos los he sentido cerca.

- Finalmente quiero hacer un agradecimiento muy especial y con todo mi corazón a mi hermana Pilar y a mis padres Nieves y Malaquias. Gracias por haber respetado y apoyado todas mis decisiones y sobre todo la confianza que habéis depositado en mi, y agradeceros todas las oportunidades que me habéis ofrecido y que me han permitido llegar hasta aquí. A Edu por haberme ayudado en los momentos más difíciles y estar conmigo en los felices, gracias por darme tu cariño y comprensión que han permitido que pudiera realizar esta Tesis.

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	11
III. OBJETIVOS.....	17
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. OVOCITOS DE MAMÍFEROS.....	20
1.1. Crecimiento del ovocito.....	20
1.2. Maduración del ovocito.....	27
1.2.1. Maduración nuclear.....	27
1.2.2. Maduración citoplasmática.....	28
1.3. Ovulación.....	30
2. ZONA PELÚCIDA.....	31
2.1. Origen y formación.....	32
2.2. Estructura.....	35
2.3. Composición de la zona pelúcida.....	37
2.3.1. Glicoproteínas.....	38
2.3.2. Dominios estructurales de las cadenas polipeptídicas.....	41
2.4. Secreción y procesamiento de las glicoproteínas de la zona pelúcida.....	43
2.5. Características moleculares de las glicoproteínas de la zona pelúcida de ratón, humano y hámster.....	47
2.5.1. Zona pelúcida de ratón.....	47
2.5.2. Zona pelúcida humana.....	48
2.5.3. Zona pelúcida de hámster.....	52
2.5. Funciones de la zona pelúcida.....	54
3. GLICOSILACIÓN.....	55
3.1. N-Glicosilación.....	56
3.2. O-Glicosilación.....	57
3.3. Tipos de oligosacáridos presentes en la zona pelúcida.....	60
3.3.1. Tipos de oligosacáridos presentes en la zona pelúcida humana.....	62
4. GRÁNULOS CORTICALES.....	64
4.1. Origen.....	65
4.2. Características morfológicas.....	65
4.3. Composición.....	66
4.4. Reacción cortical.....	68
5. UNIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO.....	69
5.1. Posibles receptores en la membrana del espermatozoide.....	70
5.2. Modelos de unión espermatozoide-zona pelúcida.....	73
5.2.1. Unión proteínas-carbohidrats.....	73
5.2.2. Modelo supramolecular.....	74

6. REACCIÓN ACROSÓMICA.....	76
6.1. Características morfológicas.....	76
6.2. Inducción de la reacción acrosómica por progesterona.....	78
6.3. Inducción de la reacción acrosómica por zona pelúcida.....	80
6.4. Inducción de la reacción acrosómica por otros mecanismos..	82
7. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	83
7.1. Expresión de proteínas recombinantes relacionadas con la fecundación.....	85
7.2. Generalidades de glicoproteínas recombinantes de la zona pelúcida humana.....	87
7.3. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes de la zona pelúcida.....	87
7.3.1. Expresión en <i>E.coli</i>	88
7.3.2. Expresión en cultivos de tejidos de insectos.....	89
7.3.3. Expresión en levaduras.....	89
7.4. Expresión de proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana en células de mamíferos.....	89
7.4.1. Expresión en células CHO.....	89
7.4.1.1. Características del modelos de expresión en células CHO.....	90
7.4.1.2. Glicosilación en células CHO.....	91
7.4.1.2.1. N-Glicosilación.....	91
7.4.1.2.2. O-Glicosilación.....	93
7.4.2. Expresión en células humanas.....	95
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
1. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL.....	98
1.1. Obtención de muestras.....	98
1.1.1. Obtención de ovarios.....	98
1.1.1.1. Ovarios de ratón.....	98
1.1.1.2. Ovarios de hámster.....	98
1.1.1.3. Ovarios de cerdo.....	98
1.1.2. Obtención de óvulos.....	99
1.1.2.1. Obtención de óvulos humanos.....	99
1.1.2.2. Obtención de óvulos de ratón.....	100
1.1.2.3. Obtención de óvulos de hámster.....	100
1.1.2.4. Obtención de óvulos de rata.....	100
1.2. Fijación y procesamiento para microscopia electrónica.....	101
1.2.1. Ovarios de hámster, cerdo y ratón.....	101
1.2.2. Ovocitos humanos.....	102
1.2.3. Ovocitos de hámster, rata y ratón.....	102
1.3. Estudio citoquímico de la zona pelúcida de ovocitos humanos.....	103
1.3.1. Citoquímica de lectinas.....	104
1.3.2. Inmunocitoquímica.....	105
1.3.2.1. Anticuerpos contra azúcares.....	105
1.3.2.2. Anticuerpos contra glicoproteínas.....	106

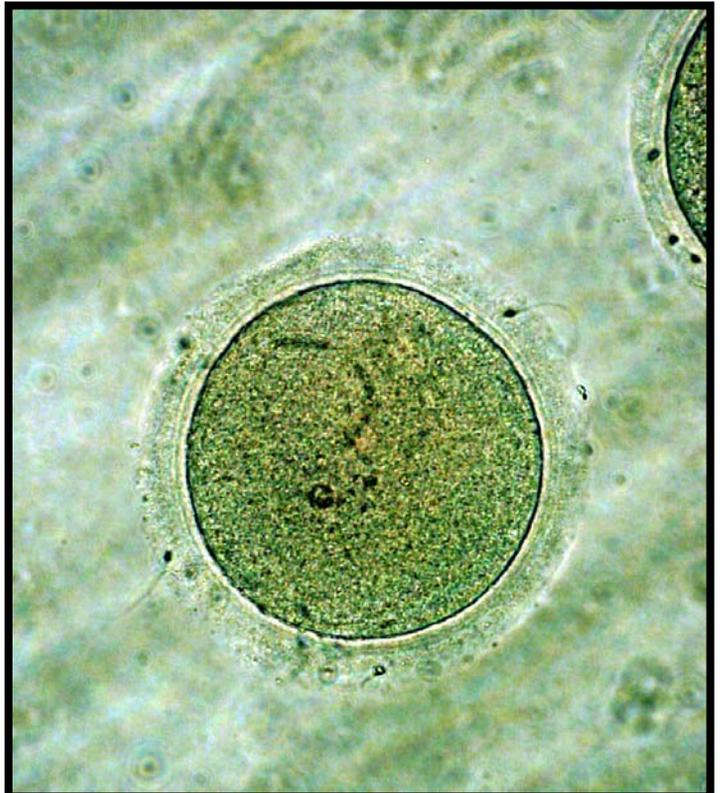
1.3.3. Tratamiento enzimático.....	106
1.3.3.1. Tratamiento con neuraminidasa.....	106
1.3.3.2. Tratamiento con galactosa oxidasa.....	107
1.3.4. Controles.....	107
1.3.4.1. Controles negativos.....	107
1.3.4.2. Controles positivos.....	108
1.3.5. Análisis cuantitativo.....	108
1.4. Estudio citoquímico de la zona pelúcida de hámster.....	109
1.4.1. Inmunocitoquímica.....	109
1.4.2. Citoquímica de lectinas.....	110
1.4.3. Controles.....	110
1.4.4. Análisis cuantitativo.....	110
1.5. Estudio ultraestructural de la síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida.....	111
1.5.1. Inmunocitoquímica de ovocitos humanos.....	111
1.5.1.1. Anticuerpos contra glicoproteínas de la zona pelúcida.....	111
1.5.1.2. Controles.....	111
1.5.2. Inmunocitoquímica de ovarios de ratón.....	112
1.5.2.1. Anticuerpos.....	112
1.5.2.2. Medidas morfométricas.....	112
2. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA.....	113
2.1. Obtención de las glicoproteínas de la zona pelúcida.....	113
2.1.1. Zona pelúcida humana.....	113
2.1.2. Purificación de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster, rata y ratón.....	113
2.1.3. Purificación de la banda de 56 kDa de la zona pelúcida de hámster.....	114
2.2. Análisis de la banda de 56 kDa mediante espectrometría de masas.....	115
2.2.1. Electroforesis.....	116
2.2.2. Digestión con tripsina.....	116
2.2.3. MS/MS.....	116
2.3. Inmunoprecipitación.....	117
2.4. Digestión con N-glicosidasa F.....	118
2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida sodio-dodecil sulfato (SDS-PAGE) e inmunotransferencia.....	119
2.5.1. Electroforesis analítica.....	119
2.5.2. Transferencia a membrana o western-blot.....	119
2.5.3. Inmunodetección.....	120
2.5.3.1. Inmuno-blot.....	120
2.5.3.2. Lectin-blot.....	121
3. EXPRESIÓN DE ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES HUMANAS EN CÉLULAS CHO.....	121
3.1. Transfección.....	121
3.2. Cultivo de células.....	122
3.3. Características bioquímicas de ZP2 y ZP3 recombinantes.....	123
3.3.1. SDS-PAGE e inmunotransferencia.....	124

3.3.2. Inmunodetección.....	124
3.4. Inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos.....	125
3.4.1. Capacitación espermática.....	125
3.4.2. Ensayos de reacción acrosómica.....	126
3.4.3. Evaluación de la reacción acrosómica.....	127
4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ZP3 RECOMBINANTE SIN LAS CADENAS N-UNIDAS.....	130
4.1. Digestión con N-glicosidasa F.....	130
4.2. Ensayo de reacción acrosómica.....	131
VI. RESULTADOS.....	133
1. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ZONA PELÚCIDA Y GRÁNULOS CORTICALES DE OVOCITOS HUMANOS.....	134
1.1. Citoquímica de la zona pelúcida de ovocitos humanos en metafase II y vesícula germinal.....	134
1.1.1. Inmunocitoquímica.....	134
1.1.2. Citoquímica de lectinas.....	134
1.1.3. Tratamiento con neuraminidasa.....	135
1.1.4. Controles.....	135
1.1.4.1. Controles negativos.....	135
1.1.4.2. Controles positivos.....	136
1.2. Análisis cuantitativo.....	142
1.3. Citoquímica de los gránulos corticales de ovocitos humanos.....	143
2. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA....	146
2.1. Inmunocitoquímica de ovocitos humanos.....	146
2.2. Inmunocitoquímica de ovocitos de ratón.....	150
3. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER.....	155
3.1. Análisis inmunocitoquímico de ovocitos ováricos y ovulados.....	155
3.2. Análisis cuantitativo.....	159
3.3. Análisis bioquímico de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster.....	160
3.4. Inmunoprecipitación de la ZP de hámster con el anticuerpo anti-ZP de cerdo.....	163
3.5. Caracterización de las glicoproteínas de la ZP de hámster mediante deglicosilación enzimática.....	164
3.6. Análisis por espectrometría de masas de la banda de 56 kDa de la ZP de hámster.....	165
4. ANÁLISIS DE LA ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES EXPRESADAS EN CÉLULAS CHO.....	168
4.1. Caracterización mediante western-blot de la ZP2 y ZP3 recombinantes humanas.....	168
4.1.1. Caracterización de la ZP3 recombinante humana....	168
4.1.2. Caracterización de la ZP2 recombinante humana....	170

4.2. Estudio de la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos por ZP2 y ZP3 recombinantes humanas.....	171
4.3. Estudio de la ZP3 recombinante digerida con N-glicosidasa F	172
4.3.1. Caracterización mediante western-blot de la ZP3 recombinante digerida con N-glicosidasa F.....	172
4.3.2. Inducción de la reacción acrosómica por ZP3 recombinante digerida con N-glicosidasa F.....	173
VII. DISCUSIÓN.....	175
1. ANÁLISIS CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CARBOHIDRATOS PRESENTES EN LA ZONA PELÚCIDA Y GRÁNULOS CORTICALES DE OVOCITOS HUMANOS.....	176
1.1. Composición de los carbohidratos presentes en la zona pelúcida de ovocitos humanos.....	177
1.1.1. Residuos de Ácido siálico.....	177
1.1.2. Residuos de Fucosa.....	178
1.1.3. Residuos de N-acetilgalactosamina.....	178
1.1.4. Residuos de Manosa.....	180
1.1.5. Residuos de Galactosa.....	181
1.1.6. Residuos de N-acetilglucosamina.....	182
1.2. Heterogeneidad de la zona pelúcida humana.....	182
1.3. Composición de los gránulos corticales de ovocitos humanos	184
2. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA....	186
2.1. Síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida humana....	187
2.2. Síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida de ratón....	189
3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER.....	193
3.1. Organización estructural de la zona pelúcida de hámster.....	193
3.2. Estudio de la composición de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster.....	196
4. ESTUDIO DE ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES HUMANA.....	199
4.1. Caracterización bioquímica de ZP2 y ZP3 recombinante humana.....	199
4.2. Análisis de la actividad biológica de ZP3 recombinante.....	203
4.3. Actividad de la ZP3 recombinante sin las cadenas N-oligosacarídicas.....	206
VIII. CONCLUSIONES.....	210
IX. SUMMARY.....	215
1. INTRODUCTION.....	216
2. METHODS, RESULTS AND CONCLUSIONS.....	219
2.1. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry.....	219

2.1.1. Methods.....	219
2.1.2. Results and conclusions.....	221
2.2. Biosynthetic pathway of zona pellucida: an ultrastructural study.....	224
2.2.1. Synthesis of human ZP.....	224
2.2.1.1. Methods.....	224
2.2.1.2. Results and conclusions.....	225
2.2.2. Synthesis of mouse ZP.....	226
2.2.2.1. Methods.....	226
2.2.2.2. Results and conclusions.....	227
2.3. Biochemical, biophysical and cytochemical characterization of the hamster zona pellucida.....	228
2.3.1. Methods.....	228
2.3.1.1. Cytochemistry analysis.....	228
2.3.1.2. Biochemical and biophysical analysis.....	229
2.3.2. Results and conclusions.....	230
2.4. Recombinant ZP2 and ZP3 expressed in CHO cells.....	233
2.4.1. Methods.....	233
2.4.2. Results and conclusions.....	234
X. ANEXOS.....	236
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	243

I. RESUMEN



En la presente tesis doctoral se han estudiados diferentes aspectos relacionados con la composición glucídica, estructura, formación y origen de la zona pelúcida y las glicoproteínas que la forman, poniendo especial interés en la especie humana. Para este propósito hemos desarrollado tres líneas principales de investigación, estudio ultraestructural de la zona pelúcida y gránulos corticales de ovocitos humanos y de la síntesis de las glicoproteínas de la ZP humana y de ratón, análisis bioquímico y biofísico de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster y análisis bioquímico y fisiológico de ZP2 y ZP3 recombinantes humanas expresadas en células CHO. A continuación se presenta un resumen de los experimentos realizados y datos obtenidos en la tres líneas de investigación.

1. Se ha realizado un estudio ultraestructural de la zona pelúcida y gránulos corticales de ovocitos humanos para determinar su composición glucídica y estructura. Igualmente hemos investigado, a nivel ultraestructural, la posible ruta de síntesis de las glicoproteínas que forman la ZP humana y la estructura de las organelas implicadas en la síntesis de glicoproteínas en los diferentes estados de desarrollo de los folículos de ovocitos de ratón. Para ello hemos utilizado técnicas citoquímicas a nivel de microscopia electrónica aplicando lectinas conjugadas con peroxidasa, digoxigenina y oro coloidal en combinación con tratamientos enzimáticos. También se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas constituyentes de la ZP humana y contra proteínas marcadores de organelas presentes en el citoplasma de ovocitos de ratón. Los estudios comparativos cuantitativos se han realizado mediante análisis de imagen. Los principales resultados obtenidos en el presente estudio pueden ser agrupados en los siguientes apartados:

A.- La ZP humana de ovocitos en VG y MII presenta afinidad por las siguientes lectinas: AAA, AIA, ConA, DSA, LFA, MAA, PHA-E, PHA-L, RCA-I y WGA. Sin embargo, no encontramos marcaje en la ZP cuando incubamos las secciones ultrafinas de ovocitos humanos con las siguientes lectinas: BSA-I-B₄, DBA, GNA, HPA, LTA, PNA, SBA, SNA, STA o UEA-I. El anticuerpo anti-ZP3 humano presenta una fuerte reactividad en todo el

espesor de la ZP humana tanto en ovocitos en VG como en ovocitos en MII. La ZP humana también fue marcada intensamente con los anticuerpos anti-sialil-Lewis^a y anti-sialil-lewis^x en los dos estadios analizados en este estudio. No fue detectada reactividad alguna con los anticuerpos anti- α -Gal, anti-Lewis^a, anti-Lewis^b, anti-Lewis^x y TEC-02 en la ZP. Cuando las secciones ultrafinas fueron tratadas con la enzima neuraminidasa y eliminamos los residuos de ácido siálico, las lectinas LTA, PNA y SBA presentaron reactividad por la ZP de ovocitos humanos. Este tratamiento también expone los sitios de unión que reconocen los anticuerpos anti-Lewis^a y anti-Lewis^x. El análisis cuantitativo se realizó con las lectinas WGA y AAA, los anticuerpos anti-sialil-Lewis^a y anti-sialil-lewis^x y un anticuerpo anti-ZP3 humano. Con estos resultados hemos demostrado que los glicanos de la ZP humana presentan como azúcares terminales las secuencias sialil-lewis^a, sialil-lewis^x y Neu5Ac α 2-3Gal β 1,4GlcNAc. También, hemos demostrado la presencia de las secuencias Neu5Ac-Gal β 1,3GalNAc y Neu5Ac-GalNAc. Los datos obtenidos también nos indican que la secuencia polilactosamina se encuentra presente en la ZP humana y la expresión de cadenas biantenarias y triantenarias tipo N-glicanos. Hemos detectado fucosa unida α 1,6 a GlcNAc (AAA) y las fucosas contenidas en las secuencias del lewis a y el lewis x. Por último y a diferencia de otras especies hemos demostrado la presencia en la ZP humana del antígeno Tn (GalNAc α -Ser). Mediante el análisis cuantitativo del marcaje obtenido sugerimos una distribución heterogénea de los carbohidratos en la ZP humana. Los análisis cuantitativos indican que algunas secuencias de carbohidratos como sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x se encuentran principalmente localizados en la región externa de la ZP.

B.- Los gránulos corticales fueron marcados intensamente con la lectinas: AAA, AIA, DSA, LFA, MPA, PHA-E y WGA. La lectina MAA y el anticuerpo anti-sialil-Lewis^x mostraron una débil reactividad. El marcaje observado en los gránulos corticales no fue uniforme. Los gránulos corticales no fueron reactivos a las lectinas: BSAI-B₄, ConA, DBA, GNA, HPA, LTA, PHA-L, PNA, RCA-I, SBA, SNA, STA, UEA-I y los otros anticuerpos empleados en este estudio. Después del tratamiento con neuraminidasa, los

gránulos corticales mostraron una intensa reactividad a la lectina PNA. En este estudio, hemos demostrado la presencia de los siguientes residuos de carbohidratos mediante citoquímica de lectinas unidas a partículas de oro coloidal: GlcNAc, Fuc, Gal β 1,4GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc, Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc y N-glicanos tipo complejo con cadenas biantenarias y/o triantenarias. También hemos detectado que lectinas que se unen específicamente a la ZP humana no tienen afinidad por los gránulos corticales confirmando que la composición de la ZP no coincide con la composición de los gránulos corticales. Por otro lado también sugerimos que en los ovocitos humanos existen poblaciones diferentes de gránulos corticales.

C.- Los ovocitos humanos en vesícula germinal (profase I) y metafase II, fueron incubados con los anticuerpos anti-ZP3 humana, anti-ZP total de cerdo y anti-ZPC de cerdo mostrando una fuerte afinidad por la ZP humana. En el oolema de los ovocitos en profase I podemos observar un marcaje moderado con los anticuerpos anti-ZP3 humana, anti-ZP de cerdo y anti-ZPC de cerdo. Sin embargo, en los ovocitos en metafase II no observamos este marcaje. Estos datos demuestran que anticuerpos contra glicoproteínas de la ZP humana y la ZP de cerdo reconocen epitopos presentes en la ZP humana y estas glicoproteínas se encuentran a nivel de la membrana plasmática del ovocito sugiriendo que el procesamiento de esta glicoproteínas se produciría a nivel del oolema en ovocitos en profase I puesto que en ovocitos en metafase II no encontramos marcaje. En el ooplasma de los ovocitos en profase I se observa un marcaje específico con estos tres anticuerpos en cuerpos multivesiculares y las cisternas del aparato de Golgi. En los ovocitos que se encontraban en metafase II no encontramos estas estructuras específicamente marcadas. Esto nos sugiere que las glicoproteínas de la ZP son sintetizadas y endocitadas o degradadas por el ovocito.

D.- Las secciones ultrafinas de ovarios de ratón fueron inmunomarcadas con anticuerpos específicos contra organelas citoplasmáticas como el anticuerpo anti-PDI, que reconoce el retículo

endoplasmático, y el anticuerpo anti-GM130 que reconoce el aparato de Golgi. El estudio se realizó en folículos unilaminares, bilaminares y multilaminares. Hemos podido observar que en folículos unilaminares el retículo endoplasmático presenta una disposición en cisternas apiladas formando una estructura lineal. En ovocitos de folículos bilaminares en el ooplasma encontramos una elevada cantidad de estructuras circulares marcadas específicamente con el anticuerpo anti-PDI que no fueron marcadas con el anticuerpo anti-GM130. En ovocitos que se encontraban en folículos multilaminares no detectamos la presencia de estructuras circulares. Sin embargo, detectamos, con el anticuerpo que reconoce la proteína del retículo endoplasmático, la presencia de pequeñas vesículas electrodensas marcadas específicamente. Los resultados obtenidos nos sugieren que el ovocito que se encuentra en folículos primarios bilaminares soporta un importante tráfico de proteínas que repercute en la alta presencia de las organelas implicadas en la síntesis de proteínas como es el retículo endoplasmático y éste presenta una forma circular con un diámetro medio de 1,5 μm . Sin embargo, el ovocito multilaminar, una vez que tiene completas sus necesidades proteicas para enfrentarse a la fecundación, reorganiza el RE para servir como reservorio de Ca^{2+} y regular los diferentes tránsitos de Ca^{2+} que ocurren durante la fecundación pudiendo observar la presencia, en el ooplasma del ovocito, de unas vesículas de diámetro medio de 100 nm.

2. Para realizar el estudio bioquímico de las glicoproteínas de la ZP hemos usado como modelo de experimentación la ZP de hámster. En este estudio hemos realizado, primeramente, un estudio inmunocitoquímico a nivel ultraestructural de la ZP de hámster con un anticuerpo anti-ZP de cerdo que reconoce epitopos de la región externa de la ZP y comparamos este patrón en diferentes especies. Para ello utilizamos técnicas inmunohistoquímicas a nivel de microscopía electrónica y los estudios comparativos cuantitativos se han realizado mediante análisis de imagen. Posteriormente, realizamos la purificación y caracterización de las glicoproteínas de la ZP de hámster mediante técnicas de electroforesis SDS-PAGE y western-blot con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Para determinar

cuales son los epitopos reconocidos por este anticuerpo realizamos inmunoprecipitación y la digestión con la enzima N-glicosidasa F. Por último secuenciamos la banda que reconoce el anticuerpo anti-ZP de cerdo mediante espectrometría de masas. Los resultados obtenidos se reflejan a continuación.

A.- La ZP de los ovocitos de los diferentes folículos ováricos de hámster, cerdo, rata y ratón fue específicamente marcada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Observamos que el inmunomarcaje fue distribuido por todo el espesor de la ZP de los folículos de ovarios de cerdo, rata y ratón, sin embargo, observamos un patrón diferente en la distribución del marcate obtenido en la ZP de ovarios de hámster. Los folículos ováricos preantrales mostraron un marcate uniforme por toda la ZP mientras que el inmunomarcaje observado en los folículos más grandes (folículos multilaminares y antrales) fue distribuido heterogéneamente con mayor intensidad de marcate en la zona externa. El patrón heterogéneo observado en los folículos antrales del ovario de hámster también fue observado en los ovocitos ovulados. Sin embargo, en ovocitos de rata y ratón observamos un marcate distribuido por todo el espesor de la ZP. Con estos datos demostramos que un epitopo presente en la ZP de cerdo y que se encuentra también en la ZP de rata ratón y hámster, se encuentra principalmente distribuido en la región externa de la ZP de hámster.

B.- Mediante electroforesis y western-blot de las glicoproteínas de la ZP de hámster observamos que el anticuerpo anti-ZP de cerdo reconoce específicamente la banda de 56 kDa donde se ha descrito que se encuentra la ZP3 de hámster. La lectina WGA reconoce dos bandas una inferior de 56 kDa y otra bastante ancha comprendida entre 90 y 200 kDa. Realizamos la inmunoprecipitación de las glicoproteínas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo observando que la banda de 56 kDa se encontraba totalmente precipitada y la banda restante en el sobrenadante. Este resultado demostraría la diferente estructura de la ZP a lo largo de su espesor puesto que mediante microscopía electrónica observamos el marcate exclusivamente en la parte externa de la ZP, sin embargo, mediante el ensayo de inmunoprecipitación

observamos que el anticuerpo tiene afinidad por la totalidad de la banda donde se encuentra la ZP3 de hámster y esta se encuentra en todo el espesor de la ZP. La presencia de una estructura supramolecular a lo largo de la ZP compuesta por las diferentes glicoproteínas puede hacer que la región interna sea inaccesible al anticuerpo mientras que en la región externa queden expuestos los epitopos que reconoce el anticuerpo.

C.- Aislamos la banda de 56 kDa y realizamos la digestión con la enzima N-glicosidasa F de esta banda y de la ZP total de hámster. Analizamos la muestra obtenida mediante electroforesis y western-blot incubando las membranas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Con estos experimentos pudimos observar que la deglicosilación de la ZP total de hámster mostró la presencia de cuatro bandas de peso molecular aproximado 67 kDa, 58 kDa, 48 kDa y 38 kDa y en la banda de 56 kDa digerida observamos la presencia de dos bandas de peso molecular aproximado 48 y 38 kDa. Estos datos nos sugieren dos cosas; 1) que el anticuerpo reconoce la parte proteica de todas las glicoproteínas pero estas se encuentran inaccesibles debido a la presencia de la estructura molecular formada por la proteína y las cadenas glicosídicas. 2) En la banda de 56 kDa de la ZP de hámster se encuentran presentes dos glicoproteínas que pueden ser detectadas después del tratamiento con N-glicosidasa F. La banda de 38 kDa pertenecería a la ZP3 sin las cadenas N-unidas y la banda superior de 48 kDa podría corresponder a una nueva glicoproteína que no había sido descrita hasta ahora, por lo tanto, la ZP de hámster, al igual que la ZP humana y de rata, puede estar constituida por cuatro glicoproteínas

D.- La banda de 56 kDa detectada con el anticuerpo fue purificada y secuenciada mediante espectrometría de masas pudiendo determinar la presencia de dos péptidos que corresponden a los aminoácidos 334-344 (YQAHGVSQWPT) y 285-297 (VTPANQTPDELNK) pertenecientes a la secuencia descrita para la ZP3 de hámster. Con estos datos pudimos demostrar la presencia de ZP3 de hámster en la banda de 56 kDa.

3. A partir de tres líneas de células CHO, dos de ellas transfectadas y otra línea parental control, obtuvimos tres muestras. 1) Una muestra que contenía ZP3 recombinante secretada por las células CHO que habían sido transfectadas con el plásmido ZP3 humano. 2) Otra muestra con ZP2 recombinante secretada por las células CHO transfectadas con el plásmido de ZP2 humano. 3) Una tercera muestra con el sobrenadante de células CHO parentales sin transfectar. Estas muestras fueron caracterizadas bioquímicamente mediante electroforesis y western-blot. Caracterizamos la proporción de cadenas N-oligosacáridicas mediante tratamiento enzimático. Una vez que la ZP2 y ZP3 fueron caracterizadas realizamos los ensayos de inducción de la reacción acrosómica con las dos glicoproteínas recombinantes. La ZP3 recombinante sin las cadenas N-glicosídicas también fue ensayada como inductor de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. Los datos obtenidos los desarrollamos a continuación:

A.- Células CHO transfectados con el plásmido de ZP3 humana fueron cultivadas y posteriormente recogimos el sobrenadante, lo diluimos y concentramos. Esta muestra que contenía ZP3 recombinante humana secretada fue caracterizada con los anticuerpos anti-ZPC de mono y el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Los anticuerpos reconocieron específicamente una banda de 60 kDa en la muestra recogida del sobrenadante de células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humano. Esta banda tuvo un peso molecular semejante a la ZP humana cuando la ZP humana y la ZP3 recombinante fueron detectadas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. No observamos reactividad en el sobrenadante recogido de células CHO sin transfectar que hemos usado como control. Con estos datos concluimos que la ZP3 recombinante que expresamos en células CHO presentó un peso molecular de aproximadamente 60 kDa sugiriendo que la proteína había sido altamente glicosilada puesto que el peso molecular de la proteína ZP3 humana secretada sin glicosilar es de 36,39 kDa. Con estos datos podemos concluir que la ZP3 recombinante bajo estudio tiene un peso molecular semejante a la ZP3 nativa y a la expresada por otros grupos. La ZP3 recombinante fue digerida con la enzima N-glicosidasa F. La glicoproteína sin las cadenas N-oligosacáridica presentó un brusco descenso en su peso

molecular, de 60 kDa a 38 kDa. Con este resultado podemos concluir que con la liberación de las cadenas N-unidas se produce la eliminación de la mayoría de los carbohidratos que componen la molécula y por lo tanto sugerimos que la ZP3 humana se encuentra más fuertemente N-glicosilada que O-glicosilada.

B.- Células CHO transfectados con el plásmido de ZP2 humana fueron cultivadas y posteriormente recogimos el sobrenadante, lo diluimos y concentramos. Esta muestra que contenía ZP2 recombinante humana secretada fue caracterizada con los anticuerpos anti-ZP2 humano y el anticuerpo anti-ZP de cerdo. El anticuerpo anti-ZP2 humano reconoció específicamente dos bandas cuyos pesos moleculares aproximados fueron de 110 kDa la superior y 90 kDa la inferior. El anticuerpo no reconoció ninguna proteína en el sobrenadante de las células CHO cultivadas que no habían sido transfectadas. El anticuerpo anti-ZP de cerdo presentó afinidad por dos bandas de peso molecular aproximado 110 kDa y 90 kDa en la fracción de células transfectadas. Pudimos observar como este anticuerpo presentó afinidad por una banda de peso aproximado de 110 kDa en la ZP humana. Con estos datos sugerimos que las células CHO han expresado la ZP2 recombinante humana con dos niveles de glicosilación, una menos glicosilada de 90 kDa y otra de 110 kDa más parecida a la ZP2 humana nativa. Las dos clases de ZP2 expresadas se hayan glicosiladas puesto que el peso molecular de la proteína secretada sin las glicosilaciones es de 67,44 kDa.

C.- Para determinar la actividad de las glicoproteínas recombinantes obtenidas realizamos ensayos de inducción de la reacción acrosómica con espermatozoides humanos. Los ensayos se realizaron en siete pacientes. La ZP3 recombinante mostró la capacidad de inducir reacción acrosómica en 72.6% de los espermatozoides humanos, ligeramente más bajo que los niveles de inducción mostrados por el ionóforo de calcio. La ZP2 recombinante y el sobrenadante recogido de células sin transfectar mostraron semejantes niveles que la inducción espontánea observada en los espermatozoides humanos. Con estos datos

concluimos que hemos obtenido una ZP3 recombinante biológicamente activa y sugerimos que la expresión de ZP3 recombinante humana, biológicamente activa, en células CHO, es un sistema muy eficiente pudiendo obtener una glicoproteína recombinante con niveles de actividad semejantes a la nativa. Aunque la maquinaria de glicosilación de las células CHO sea diferente al sistema humano, sugerimos que las células CHO tienen la capacidad de sintetizar la glicoproteína ZP3 recombinante humana con las secuencias de azúcares necesarias para producir una glicoproteína capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. La ZP2 no induce la reacción acrosómica en espermatozoides humanos probablemente debido a su papel de receptor secundario descrito anteriormente. Con la glicoproteína recombinante ZP3 digerida con la enzima N-glicosidasa F realizamos los ensayos de la inducción acrosómica. Con este experimento observamos que la proporción de espermatozoides reaccionados con la glicoproteína tratada y con la glicoproteína control sin tratar fueron los mismos. Estos datos sugieren, que las cadenas N-oligosacáridicas de la glicoproteína recombinante ZP3 no están involucradas en la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. Estos datos indicarían que en la especie humana, ZP3 y probablemente los azúcares O-unidos estarían involucrados en la inducción de la reacción acrosómica como ha sido descrito en el ratón.

II. INTRODUCCIÓN



La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que recubre los ovocitos ováricos, óvulos y el embrión preimplantado. Esta matriz extracelular está involucrada en el reconocimiento y unión del espermatozoide, en la reacción acrosómica, bloqueo de la poliespermia y en la protección del embrión durante su tránsito por el oviducto (Yanagimachi, 1994). La ZP de ovocitos de la mayoría de los mamíferos está constituida por tres o cuatro glicoproteínas altamente glicosiladas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 que forman una estructura tridimensional compleja (Wassarman, 1999; Conner *et al.*, 2005). En el ratón, y quizás en la especie humana, la glicoproteína ZP3 es el ligando primario que interacciona con la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto mientras que se considera que ZP2 es el ligando secundario que reconocería a la membrana acrosómica interna de espermatozoides que han experimentado la reacción acrosómica (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1994). A pesar de los numerosos estudios realizados todavía son desconocidos los mecanismos moleculares responsables del reconocimiento y unión específica entre gametos.

En un principio se sugirió que la ZP estaría formada por las tres glicoproteínas dispuestas en filamentos (Green, 1997; Wassarman *et al.*, 2001a). Sin embargo, gracias al desarrollo de técnicas moleculares, ha sido replanteada esta hipótesis. Así, ratones incapaces de expresar ZP1, ZP2 o ZP3 sugieren que ZP3 es necesaria para la formación de la matriz de ZP y que una de las dos glicoproteínas, ZP1 o ZP2, son suficientes para formar la matriz extracelular (Dean, 2004). Por otro lado, recientemente, se ha descrito que en algunas especies como el humano, el chimpancé y la rata, la envoltura extracelular está formada por cuatro glicoproteínas diferentes (Lefievre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Conner *et al.*, 2005). Otros estudios realizados en el laboratorio de Dean y col. muestran que ovocitos de ratón con ZP humanizada, incluyendo ZP2, o ambos, ZP2 y ZP3, son fecundados *in vitro* por espermatozoides de ratón pero no por espermatozoides humanos. Estos ovocitos muestran un efectivo bloqueo de la poliespermia pero una alta cantidad de espermatozoides aparecen unidos a la ZP de estos ovocitos fecundados (Rankin *et al.*, 2003; Dean, 2004).

Estos autores sugieren un nuevo modelo para los procesos tempranos de fecundación en donde una estructura supramolecular de la ZP sería la responsable de estos procesos. Todos estos datos, presentados recientemente por distintos grupos, hacen replantearse la estructura molecular de la ZP descrita hasta ahora y la necesidad de clarificar las glicoproteínas que componen la ZP de diferentes especies y su función en los procesos de fecundación.

Para conocer con precisión el proceso por el que se produce el reconocimiento entre gametos es importante conocer la estructura molecular de las glicoproteínas de la ZP. Se ha demostrado en diferentes especies, incluido el hombre, que las cadenas de carbohidratos ancladas a la proteína juegan un papel importante durante la unión primaria entre el espermatozoide y el ovocito (Chapman y Barratt, 1996; Ozgur *et al.*, 1998; Benoff, 1997a; Dell *et al.*, 1999; Primakoff y Myles, 2002; Talbot *et al.*, 2003a). Esta unión esta mediada probablemente por proteína localizadas en la región de la cabeza de espermatozoides capacitados que unen oligosacáridos específicos expresados en la superficie externa de la ZP (Nixon *et al.*, 2001). La caracterización molecular de los componentes involucrados en la interacción entre gametos humanos está sujeta a una fuerte controversia y todavía debe ser resuelta. La determinación de la composición de la secuencia de carbohidratos contenida en las glicoproteínas de la ZP humana proporcionaría importante información sobre la identidad de los responsables de la interacción específica entre el espermatozoide y el ovocito. Sin embargo, estos estudios están muy limitados debido a la poca disponibilidad de gametos humanos. Por ello, se han desarrollado técnicas de ingeniería genética para poder expresar las glicoproteínas recombinantes de la ZP humana en diferentes líneas celulares (van Duin *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2001; Martic *et al.*, 2004). La obtención de una glicoproteína recombinante humana con actividad biológica y la posibilidad de obtenerla en grandes cantidades facilitaría el estudio de su estructura molecular y aclarar la implicación de las cadenas glicosacarídicas en el proceso de reconocimiento entre gametos.

La disposición de las glicoproteínas a lo largo de la ZP es importante para conocer la estructura molecular que reconoce el espermatozoide. En estudios previos, gracias a la utilización de técnicas citoquímicas ultraestructurales, se ha demostrado que las glicoproteínas ZP2 y ZP3 se hallan distribuidas en todo el espesor de la ZP de ovocitos de ratón (Avilés *et al.*, 1997a). Sin embargo, el uso de lectinas y anticuerpos específicos a nivel ultraestructural nos demuestra que la composición glucídica de la ZP de ratón es heterogénea (Avilés *et al.*, 1997b, 1999, 2000a,b). Estos resultados junto con los realizados con microscopia de barrido nos permiten distinguir dos regiones en la ZP de ratón: una interna que está próxima al ovocito y una externa que contacta con las células del cúmulo (Familiari *et al.*, 1992). Esta heterogeneidad podría ser la responsable de la diferente capacidad de unión a los espermatozoides que presenta la región externa y la región interna de la ZP de diferentes especies (Philips y Shalgi, 1980a,b; Ahuja y Bolwell, 1983; Burkman *et al.*, 1988; Fazeli *et al.*, 1997). En la especie humana se ha observado un proceso similar puesto que los espermatozoides se unen principalmente a la ZP externa (Burkman *et al.*, 1988). Sin embargo, se desconocen cuales son las causas y si la ZP humana presenta una composición glucídica heterogénea a lo largo de la ZP.

Algunos otros aspectos de la biología celular de la ZP, como la síntesis de las glicoproteínas que la forman, son actualmente un importante tema de discusión en la comunidad científica. La formación de la matriz extracelular, ZP, de los ovocitos, es crítica para la fecundación y el desarrollo de los embriones en crecimiento. Las diferentes glicoproteínas de la ZP poseen una estructura similar incluyendo un dominio ZP, un sitio consenso de corte furina y un dominio transmembrana. En principio, se ha sugerido, que la escisión de las glicoproteínas de la ZP se produce por una convertasa y que es un paso esencial para la secreción e interacción de estas glicoproteínas para formar la ZP (Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002). Sin embargo, diferentes aspectos de este proceso tales como su localización celular y la ruta de secreción no han sido despejados (Zhao *et al.*, 2003). La ruta secretora y endocítica del ovocito humano es poco conocida debido en gran medida a la escasa accesibilidad de estas

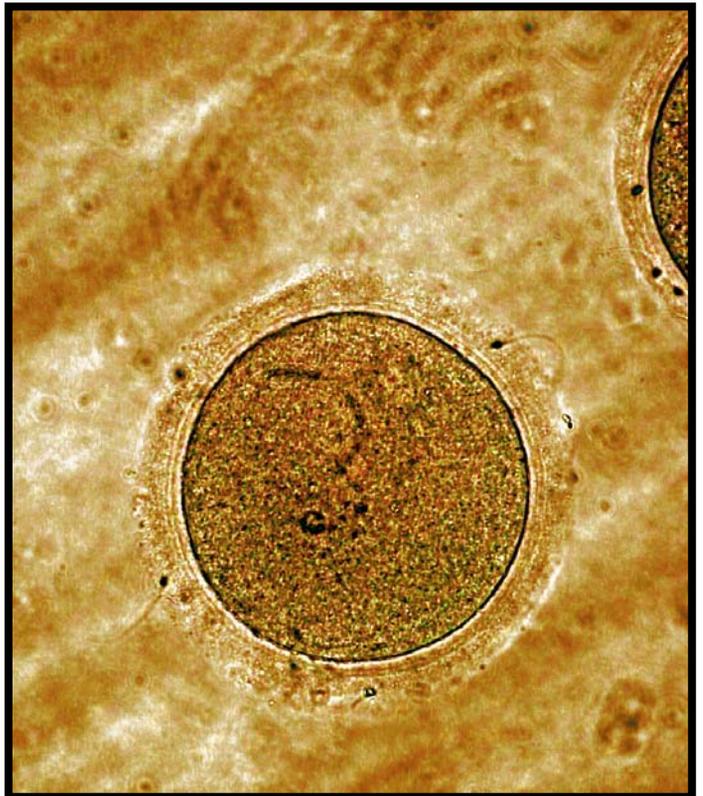
muestras. Caracterizar la posible ruta de síntesis de las glicoproteínas, principalmente de la ZP humana, y donde se produce la escisión del dominio transmembrana que permite su liberación al espacio extracelular, es importante para conocer con mayor exactitud cómo son las moléculas responsables de los fenómenos tempranos de fecundación.

Una de las estructuras más características de los ovocitos de la mayoría de las especies son los gránulos corticales presentes en el cortex del ovocito. Tras la fecundación, los gránulos corticales son liberados al espacio perivitelino e inducen una serie de cambios en la ZP responsables del bloqueo de la poliespermia. Así, ZP3, pierde su actividad biológica, es decir, ya no tiene capacidad para unirse a los espermatozoides ni es capaz de inducir la reacción acrosómica (Bleil y Wassarman, 1988; Miller *et al.*, 1994). Algunos estudios bioquímicos han analizado la movilidad electroforética de estas glicoproteínas de la ZP antes y tras la fecundación. Estos estudios demuestran que se produce una proteólisis en la glicoproteína ZP2 mientras que aparentemente no está modificada la glicoproteína ZP3 (Bleil *et al.*, 1981; Shabanowitz y O´Rand, 1988). Diferentes estudios sugieren que se podrían producir cambios sutiles a nivel de la glicoproteína ZP3 que podrían ser debidos a la acción de unas glicohidrolasas específicas presentes en los gránulos corticales, que modificarían algún carbohidrato no viéndose afectada sustancialmente su movilidad electroforética (Miller *et al.*, 1994; Wassarman *et al.*, 2001). El gránulo cortical, por lo tanto, puede tener un contenido bastante heterogéneo y sus componentes pueden ser responsables de diferentes modificaciones en la ZP una vez producido el reconocimiento del espermatozoide. Estas modificaciones pueden ser debidas tanto a enzimas proteolíticas como a moléculas liberadas de los gránulos corticales que se adhieran a la ZP (Hoodbhoy y Talbot, 2001). La caracterización de los componentes de los gránulos corticales es esencial para determinar la importancia del proceso de la reacción cortical en el trascurso del espermatozoide a través de la ZP, su interacción con el oolema del ovocito y el bloqueo de la poliespermia.

Los avances realizados en los últimos años en el campo de la fecundación en humanos y especialmente las investigaciones que pretenden aclarar los mecanismos moleculares responsables de la interacción espermatozoide-ZP son bastante restrictivos comparados con el modelo de ratón. Esto es debido a diferentes razones, principalmente la cantidad de ZP humana que podemos obtener es mucho más limitada que en otras especies. De esta manera, la posibilidad de obtener un material humano biológicamente activo y en grandes concentraciones dará un impulso importante para despejar las claves de la interacción del ovocito con el espermatozoide en humanos.

La determinación y caracterización del proceso global que conlleva la fecundación del ovocito sería importante para diagnosticar posibles fallos en ovocitos humanos que no pueden ser fecundados, siendo hasta ahora imposibles de detectar. La necesidad vital de perpetuar la especie hace que los fallos en fecundación sean un importante problema en la sociedad actual. Conocidos los diferentes procesos que llevan al reconocimiento entre gametos se abriría la posibilidad de diseñar diferentes soluciones a los fallos en fecundación que hoy en día preocupan seriamente al conjunto de la sociedad.

III. OBJETIVOS



Consecuentemente con lo expuesto anteriormente la presente tesis doctoral se plantea los siguientes objetivos:

1. Realizar un estudio citoquímico ultraestructural de la zona pelúcida de ovocitos humanos no fecundados para conocer la distribución de los carbohidratos presentes y su posible implicación en los procesos de reconocimiento espermatozoide-ovocito.
2. Analizar la composición de los gránulos corticales de ovocitos humanos no fecundados mediante estudio citoquímico ultraestructural y profundizar, así, en las posibles moléculas involucradas en los procesos de reacción cortical.
3. Conocer la ruta de síntesis de las glicoproteínas de la zona pelúcida humana y de ratón mediante el estudio citoquímico ultraestructural de los ovocitos de estas especies.
4. Realizar un análisis citoquímico y bioquímico de la zona pelúcida de hámster y caracterizar la ZP3 de hámster mediante espectrometría de masas (MS) para determinar las glicoproteínas involucradas en los procesos de fecundación.
5. Llevar a cabo la caracterización bioquímica y análisis fisiológico de las glicoproteínas recombinantes ZP2 y ZP3 humanas expresadas en células CHO con el objeto de determinar las similitudes moleculares y funcionales con las glicoproteínas de la zona pelúcida humana nativa.
6. Analizar el papel fisiológico de la ZP3 recombinante humana sin las cadenas oligosacáridicas N-unidas dada su importancia en los procesos de reconocimiento entre gametos demostrado en otras especies.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Para poder entender los mecanismos involucrados en la interacción entre gametos es importante conocer con precisión algunos aspectos estructurales y funcionales de las células que participan en dicho proceso, el ovocito y el espermatozoide. Nuestras investigaciones se centran en el estudio del ovocito y las estructuras que intervienen en la interacción con el espermatozoide, zona pelúcida y gránulos corticales. En la presente tesis doctoral vamos a describir, en profundidad, esta dos estructuras en diversas especies principalmente el ratón y la especie humana.

1. OVOCITO DE MAMÍFEROS

El formación del ovocito involucra cambios relevantes desde su origen en la vida embrionaria hasta años después en el adulto sexualmente maduro. En este transcurso, el crecimiento y la maduración, especialmente en la etapa final de preparación nuclear y citoplasmática, constituyen un requisito importante para la fecundación y el desarrollo embrionario normal (Hafez y Hafez, 2002) cuyo fin primordial es la perpetuación de la especie (Mc Gee y Hsueh, 2000).

1.1. CRECIMIENTO DEL OVOCITO.

El crecimiento del ovocito se inicia en la vida embrionaria con la formación de las células germinales primordiales (Picton y Gosden, 1999). Las células germinales femeninas inmaduras se denominan ovogonias, y se dividen activamente por medio de mitosis en el feto femenino. Cuando se produce la diferenciación sexual, tiene lugar la primera meiosis y las ovogonias se transforman en ovocitos, lo que significa el inicio de la diferenciación hacia una célula única: el ovocito maduro. La meiosis consiste en 4 etapas diferentes de división: profase, metafase, anafase y telofase. Estas fases son posiblemente estimuladas por una sustancia inductora de la meiosis secretada por el mesonefros antes de que la ovogonia sea rodeada por las células pregranulosas (inhibidoras de la meiosis), que la aíslan en un futuro del contacto directo con el mesonefros. En esta etapa, las células son llamadas ovocitos primarios (Moor y Warnes, 1979; Picton y Gosden, 1999;

Picton, 2001), proceso que en algunos mamíferos ocurre durante la fase final de la vida prenatal (Picton, 2001).

Los ovocitos primarios están situados en la corteza del ovario en una zona relativamente avascular (Picton, 2001; Picton *et al.*, 2003) y los rodean células foliculares planas formando los **folículos primordiales**. El inicio de la meiosis coincide con el inicio de la foliculogénesis (Picton y Gosden, 1999; Picton 2001), la cual *in vivo* está gobernada por FSH (Sebon *et al.*, 2003), y actualmente se involucra a una hormona proteica de 16kDa codificada por el gen *ob* sintetizada por el tejido adiposo y placenta denominada leptina, que actúa indirectamente vía LH y FSH (Brannian y Hansen, 2002; Williams *et al.*, 2002). La meiosis iniciada queda detenida (primera detención meiótica) al alcanzar la fase de diplotene difuso de la profase I. Este estado es denominado como dictiatio (dictiotene). En él, los folículos primordiales mantienen la supervivencia del ovocito (Picton, 2001; Miyano, 2003) e inician su crecimiento en forma paralela (Hafez y Hafez, 2002). Durante el crecimiento folicular, el volumen del ovocito se incrementa unas 300 veces y las células foliculares se dividen de 18 a 25 veces. Observaciones en la que roedores presentaban ausencia de ovocitos mediante mutaciones genéticas son también deficientes en folículos (Hirshfield, 1994) lo que sugiere que el ovocito juega un papel crítico en el crecimiento y desarrollo del folículo.

En humanos, al nacer, una niña puede albergar en sus ovarios más de un millón de óvulos inmaduros, los llamados **folículos primordiales** (Fig. 1). Es un folículo con un diámetro de 40 a 50 μm . En la menarquia existen alrededor de 400.000 folículos primordiales.

En la profase de la primera división meiótica, el proceso se detiene, y el ovocito permanece en este estado desde la vida fetal hasta que tiene lugar la pubertad, donde se completa la primera división meiótica momentos antes de que tenga lugar la ovulación. La detención de la meiosis al parecer está asociada con la variación de la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) del ovocito que se encuentra regulado por la

actividad de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (Thibault *et al.*, 1987; Mattioli, 1994; Picton y Gosden, 1999; Aktas *et al.*, 2003).

Cuando las ovogonias entran en meiosis, el número total disminuye con el tiempo. Por eso el número de ovocitos desciende a lo largo de la vida, aunque la bajada más dramática tiene lugar en los estados transitorios de la profase meiótica. En el ovario humano, el máximo número de ovogonias se alcanza hacia el 5º mes de vida fetal, y es alrededor de 7 millones. Durante el último mes de vida fetal, tiene lugar una brusca disminución y la recién nacida tendrá aproximadamente un millón y medio de ovocitos. Así, en el feto hembra, sólo 1 de cada 10 ovocitos que sufren meiosis sobreviven. Durante la infancia desaparecen otros ovocitos, alcanzándose hacia los 20 años unos 200-300.000 en total (en la especie humana, aproximadamente 15 folículos inician su crecimiento diariamente en una mujer de 20 años y aprox 1 en una de 40 años). Durante la vida fértil sólo unos 500 ovocitos del total que había inicialmente se ovularán. Los otros desaparecerán. Quizás, este sea el resultado de una selección de ovocitos de buena calidad.

En la pubertad, los folículos continúan su crecimiento y suministran la estructura de soporte necesaria para el desarrollo del ovocito (Sebon *et al.*, 2003). Este crecimiento es atribuido a las hormonas FSH y LH (Fanchin, 2002). La hormona LH es indispensable por suministrar el sustrato andrógeno para la síntesis de estrógenos que contribuye a la maduración del ovocito (Filicori, 1999). Los folículos primordiales son convertidos en **folículos primarios** (Fig. 1), que se distinguen como resultado de los cambios en el ovocito primario, las células foliculares y el tejido de estroma circulante.

El ovocito primario crece hasta alcanzar un diámetro 100 µm con un núcleo aumentado de tamaño que se denomina **vesícula germinal**. Las células foliculares adoptan una forma cuboidea. En tanto el ovocito se encuentre rodeado por una sola capa de células foliculares, el folículo se denomina **folículo primario unilaminar**. Cuando proliferan las células

foliculares y forman varias capas alrededor del ovocito primario se denomina **folículo primario multilaminar**, y las células foliculares se conocen como **capa granulosa**.

Al mismo tiempo, entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa adyacentes se originan espacios donde se deposita un tipo de material fibrilar que representa el inicio de la **zona pelúcida** (ZP) (Wassarman, 1988; Totzauer *et al.*, 1998; Sinowatz, 2001a). Los folículos primarios representan un reservorio de gametos durante el periodo fértil de la hembra (Miyano, 2003). El período de crecimiento del folículo ovárico y del ovocito se caracterizan por ser una fase de síntesis proteica intensiva y de almacenamiento de macromoléculas (Miyano, 2003).

Las células del estroma empiezan a organizarse alrededor del folículo primario multilaminar, y forman una **teca interna** compuesta principalmente por una capa celular ricamente vascularizada, y una **teca externa** compuesta principalmente por tejido conectivo fibroso.

En este estadio de desarrollo folicular, el ovocito depende de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y en especial de sus miembros factor 9 de crecimiento diferencial (GDF-9) y la proteína morfogenética del hueso (BMP-15) también designada como GDF-9B, entre otros (Otsuka *et al.*, 2000; Erickson y Shimasaki, 2000; Knight y Glister, 2003; Miyano, 2003; Sebon *et al.*, 2003).

Los folículos primarios se transforman en **folículos secundarios** (Fig. 1) debido a modificaciones morfológicas del folículo primario. El ovocito adquiere mayor volumen en completa ausencia de división celular, acompañado de una hiperplasia e hipertrofia de las células granulosas, las cuales poseen conexiones estrechas que son importantes en el metabolismo del ovocito (Picton y Gosden, 1999; Sebon *et al.*, 2003; Miyano, 2003). También se tiene evidencia de que FSH promueve el desarrollo de los folículos primarios a secundarios (Sebon *et al.*, 2003).

Los folículos secundarios presentan un diámetro de 300 μm . En esta etapa el ovocito alcanza un tamaño máximo de 90 a 130 μm de diámetro, pero permanece detenido en profase meiótica y está rodeado por 5 a 6 capas de células de la granulosa. La proliferación sostenida de las células de la granulosa depende de la FSH, de manera que se forma un gran folículo esférico con numerosas capas de células de la granulosa alrededor del ovocito primario. Se desarrollan varios espacios intercelulares dentro de la masa de las células de la granulosa que quedan llenos de un líquido conocido como **líquido folicular**. Este líquido, exudado del plasma, contiene glucosaminglucanos y hormonas fijadoras de esteroides producidas por las células de la granulosa. Conforme se produce más líquido, entran en coalescencia gotitas individuales de líquido folicular para formar una sola cavidad llena de líquido llamada **antro**.

Las células de la granulosa se redistribuyen, de modo que el ovocito primario se encuentra en estos momentos rodeado por un pequeño grupo de células de la granulosa que se proyectan desde la pared hacia el antro lleno de líquido. Esta estructura se llama **cumulus oophorus** (cúmulo ovífero). La capa de células de granulosa que rodean de manera inmediata al ovocito se denomina **corona radiada**.

En el estadio del folículo secundario, las células de la granulosa adquieren receptores de alta afinidad para FSH y hormonas esteroideas (Tisdall *et al.*, 1995; Sebon *et al.*, 2003). Además, proveen de nutrientes y señales que regulan la actividad del ovocito (Barnes y Sirad, 2000). Sin embargo se ha visto que, posiblemente, el ovocito es el factor dominante que determina la función de las células de la granulosa asociadas a él (Eppig, 2001).

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa de desarrollo experimentan atresia, persisten unos cuantos que siguen desarrollándose para convertirse en folículos maduros **folículos maduros o de Graaf**. La proliferación sostenida de las células de la granulosa y la formación también sostenida del líquido folicular da como resultado la

formación de un folículo maduro cuyo diámetro llega a ser de 2,5 cm en el momento de la ovulación. Puede observarse al folículo maduro como un abombamiento transparente sobre la superficie del ovario y la producción de estos folículos está directamente relacionada con la fertilidad de los mamíferos (Erickson y Shimasaki, 2000).

La formación sostenida del líquido folicular hace que la colina germinal, compuesta por ovocito primario, corona radiada y células foliculares acompañantes se desprenda de su base para flotar libremente dentro del líquido folicular. Estos folículos presentan receptores de LH en las células de la granulosa, alta producción de inhibida y alto flujo sanguíneo (Thibault *et al.*, 1987).

Hasta aquí, la cromatina ovocitaria no ha sufrido grandes modificaciones, pues aún no se ha reiniciado la meiosis y el ovocito se mantiene en dictioteno, detenido en la profase de la primera división meiótica. En las primeras teorías, se consideraba que en cada ciclo ovárico, un grupo de 15 a 20 folículos iniciaba su crecimiento y que uno de estos folículos sería el que ovularía. Posteriormente, se ha determinado que esto no ocurre, ya que un folículo ovárico demora 85 días en alcanzar un diámetro de 16 mm, desde un diámetro inicial de 50 μm (F. Primordial) (Gougeon, 1981).

Las células del "cumulus oophorus" desarrollan procesos citoplasmáticos atravesando la ZP y formando zonas de contacto con la membrana plasmática del ovocito mediante las uniones de tipo gap también llamadas de nexo, de acoplamiento o de hendidura (Anderson y Albertini, 1976; Eppig, 1977; Sebon, 2003). Estas uniones facilitan el abastecimiento de nutrientes y el aporte de pequeñas moléculas reguladoras procedentes de las células de la granulosa en un proceso de cooperación metabólica (Canipari, 1994). Este paso intercelular se incrementa durante la fase de crecimiento folicular (Lazzari *et al.*, 1994; Picton, 2001).

En el estado de folículo de Graaf, los ovocitos han completado su crecimiento, han adquirido una ZP bien desarrollada y su competencia para reiniciar la meiosis (McGee y Hsueh, 2000).

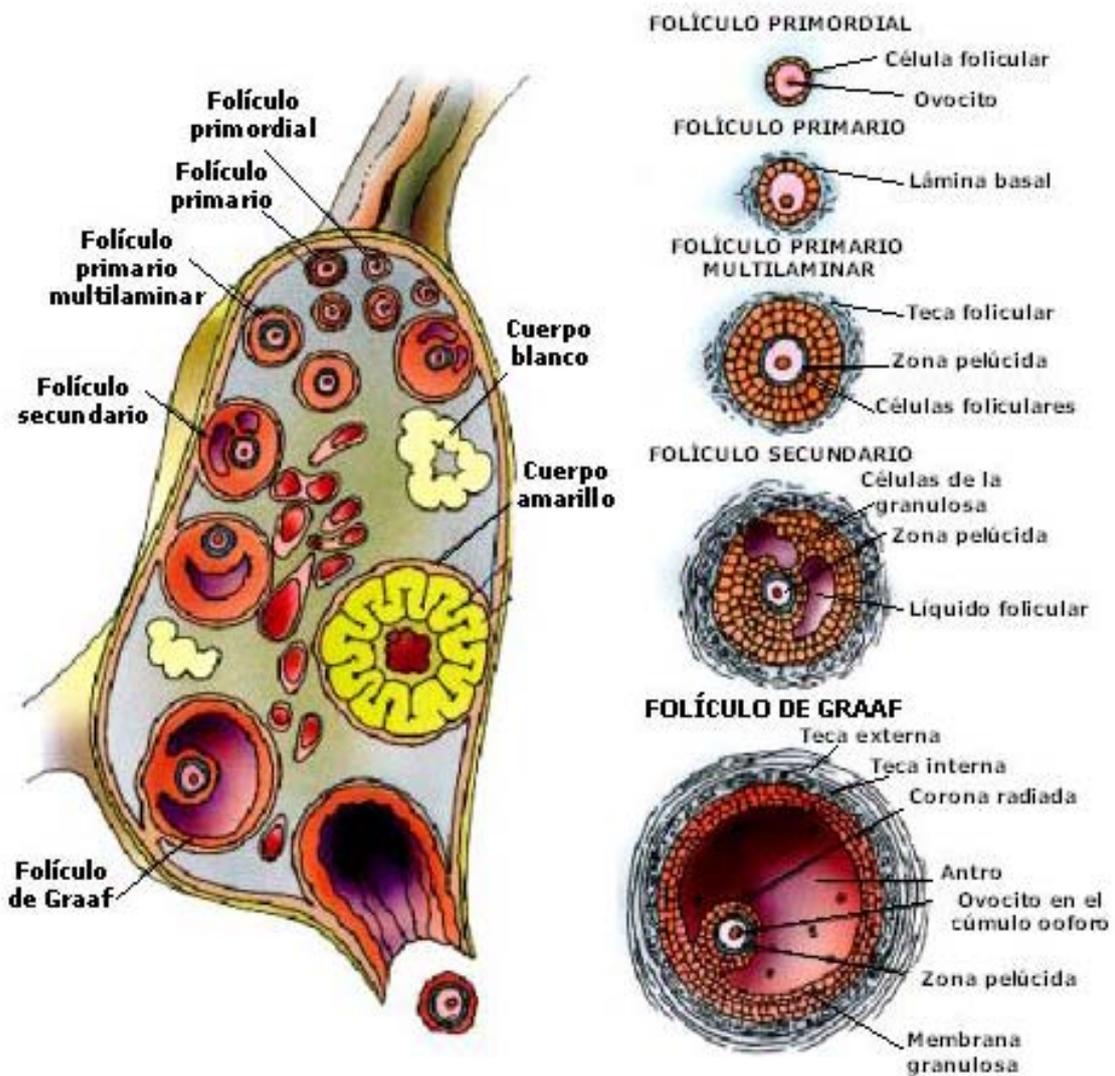


Figura 1. Esquema de la estructura del ovario y del desarrollo del folículo (Tomado de Gartner y Hiatt).

1.2. MADURACIÓN DEL OVOCITO.

El período de maduración del ovocito consiste a su vez en la maduración nuclear y citoplasmática indispensable para la futura fecundación e inicio del desarrollo embrionario.

1.2.1. Maduración nuclear.

Los ovocitos adquieren la competencia meiótica y potencial fertilidad durante el desarrollo del folículo de Graaf (Picton y Gosden, 1999). Este desarrollo está favorecido por los niveles preovulatorios de gonadotropinas y en especial de LH, que promueven la producción de señales para la rotura de la envoltura nuclear del ovocito y la producción de ácido hialurónico por parte de las células foliculares. Este último interviene en la mucificación y expansión del "cumulus oophorus" (Picton y Gosden, 1999; Eppig, 2001). Además, se suprime el contacto entre las células granulosas del "cumulus" y el ovocito, disminuyendo la comunicación intercelular y eliminando el efecto inhibitorio de las células foliculares (Thibault, 1987; Hafez y Hafez, 2002), lo que provoca la caída de los niveles de AMPc en el interior del ovocito y la reanudación de la meiosis (Picton y Gosden, 1999; Eppig, 2001). En este proceso participa un factor promotor de maduración (MPF) compuesto de una subunidad reguladora (ciclina B) y una subunidad catalítica proteína quinasa (p34) (Picton y Gosden, 1999; Fissore, 1996; Carabatsos, 1998; Miyano, 2003). Reanudada la meiosis en el ovocito se incrementa la síntesis de macromoléculas que sirven para su desarrollo y maduración, y la síntesis y almacenamiento de RNA y proteínas, que proveerán información y material estructural requerido para soportar el futuro desarrollo embrionario temprano (Picton y Gosden, 1999).

La meiosis continúa desde la etapa de vesícula germinal, profase de la primera división meiótica, hasta la metafase de la segunda división meiótica. La vesícula germinal (VG) en humanos consiste en una envuelta rodeada de poros que contiene uno o dos nucléolos asociados con complejos de cromatina granular (Szollosi *et al.*, 1990). En el momento de la reanudación de la meiosis, la VG migra a la periferia del ovocito y la cromatina comienza a condensarse (Chen y Sathananthan, 1986). Por fin,

el colapso de la VG ocurre, cuando la envoltura nuclear comienza a fragmentarse y los nucléolos desaparecen. Cuando esto ocurre los microtúbulos invaden el dominio nuclear hacia los cromosomas, mientras otras organelas citoplasmáticas invaden el territorio nuclear. En la primera división, el huso se encuentra dirigido hacia el oolema, antes de la expulsión del primer cuerpo polar (PC1), mientras que en la segunda división, el huso puede estar perpendicular al oolema u orientado en varios ángulos en relación a la superficie (Pickering *et al.*, 1988). Después de que haya ocurrido el colapso de la vesícula germinal, la maduración continúa hacia la metafase, anafase y telofase hasta completar la primera división y expulsar el PC1. En el PC1 encontramos un número haploide de cromosomas junto con microtúbulos residuales que no llegarán a formar un núcleo propiamente dicho. El PC1 contiene gránulos corticales en su periferia puesto que se han formado antes de la fertilización. Comienza inmediatamente la segunda división meiótica sin pasar por una interfase hasta que el ovocito es detenido de nuevo en el estado de metafase II cuando es ovulado. La segunda división se completará cuando el ovocito ha sido fecundado (Chen y Sathananthan, 1986; Sathananthan *et al.*, 1989 1991). En la anafase II, las cromátidas hermanas se separan y ocurre la expulsión del segundo cuerpo polar (PC2) (Picton y Gosden, 1999; Hafez y Hafez, 2002; Okitsu, 2001). Los cromosomas se descondensan y se forma un pronúcleo femenino en el ooplasma mientras se forma también un núcleo en el PC2. El retículo endoplasmático rugoso forma la envoltura nuclear mientras que los microtúbulos se encuentran anclados a los cromosomas (Sathananthan, 1985).

1.2.2. Maduración citoplasmática.

El otro aspecto importante de la maduración del ovocito es la maduración citoplasmática, para lo cual es crucial la organización de las organelas citoplasmáticas durante la ovogénesis, especialmente las mitocondrias y sus moléculas de DNA, (Picton y Gosden, 1999) y la redistribución de los gránulos corticales (Guraya, 1982; Cran y Esper, 1990; Sun *et al.*, 2001a; Hoodbhoy *et al.*, 2001; Rekkas *et al.*, 2002). Las mitocondrias tienen una morfología característica en los ovocitos pues son esféricas u ovaladas con un estroma bastante denso. Se encuentran

distribuidas homogéneamente en el citoplasma de los ovocitos en el estadio de VG se agregan alrededor del núcleo en el momento de la rotura de la envoltura nuclear de la VG (Thibault et al., 1987). Posteriormente, las mitocondrias se dispersan en el estadio de anafase y telofase, lo que contribuye a la progresión de la maduración del ovocito. Durante la maduración del ooplasma también ocurre la reorganización del retículo endoplasmático. En el ooplasma encontramos predominantemente retículo endoplasmático liso (REL) formando vesículas redondeadas o pequeños agregados tubulares (Sathananthan, 1994). Los agregados de REL forman complejos con las mitocondrias que se encuentran en la periferia del ovocito humano (Dvorak *et al.*, 1989) y se vuelven evidentes en metafase I e incrementan su distribución en metafase II (Sathananthan, 1994).

Cuando el ovocito se encuentra en el estadio de VG podemos encontrar típicos complejos de Golgi con sus cisternas apiladas y asociados a pequeñas vesículas pero en el estadio de metafase II es raro encontrar este tipo de organela (Pilka *et al.*, 1985). En ovocitos humanos se ha visto que los GC se originan a partir de las membranas de las cisternas del complejo de Golgi cuando el ovocito se encuentra en VG (Sathananthan, 1994).

Durante la maduración citoplasmática se produce una acumulación de lípidos como fosfolípidos, triglicéridos y fracciones de otros lípidos que son importantes en el desarrollo del ovocito (McEvoy *et al.*, 2000).

Al final de la etapa de maduración en condiciones fisiológicas se produce la ovulación. En este proceso hay cambios que se suceden especialmente después de la oleada ovulatoria de las gonadotropinas, como es un aumento del flujo sanguíneo hacia todas las clases de folículos y en especial al destinado a ovular. La ovulación marca el punto final de la foliculogénesis y ovogénesis (Hess *et al.*, 1999; Eppig, 2001).

1.3. OVULACIÓN.

El proceso de la ovulación es el resultado de un conjunto de mecanismos interrelacionados, algunos de los cuales siguen siendo hoy en día meras hipótesis.

La producción continua de fluido folicular hace que la presión en el interior del folículo vaya aumentando y que la pared comience a deteriorarse en una zona conocida como estigma que hace relieve en el ovario. También se observa que cerca del momento de la ovulación se desarrollan áreas hemorrágicas en el tejido conectivo de las capas tecales y la pared folicular se estira y adelgaza, pero al parecer todos estos hechos no ocurrirían sin la participación de diversos procesos bioquímicos promovidos por LH (Hess *et al.*, 1999; Eppig, 2001)

Según un modelo propuesto, el aumento de esteroides producidos en las células tecales (proceso estimulado por LH) transforma los fibroblastos de la etapa estacionaria a proliferativa de modo que empiezan a producir colagenasa. La colagenasa comienza a lisar la pared folicular y las proteínas modificadas que libera este proceso de degradación inducen una reacción inflamatoria aguda con liberación de histamina, migración de leucocitos y liberación posterior de prostaglandinas. Estas últimas aumentan el flujo sanguíneo en la zona inflamada. Además, las propias células de la granulosa producen grandes cantidades de activador del plasminógeno (Murdoch y McDonnel, 2002), el cual transforma el plasminógeno del fluido folicular en plasmina. Esta enzima proteolítica actúa por sí misma sobre la pared del folículo pero también parece estar implicada en la activación de la procolagenasa para transformarla en colagenasa (Murdoch y McDonnel, 2002).

Un aspecto importante a resaltar en este período es que recientemente se ha evidenciado que los leucocitos son células efectoras que intervienen en los procesos fisiológicos del tracto reproductor. Algunas subclases específicas de leucocitos parecen estar involucradas críticamente en el proceso de la ovulación, participando en los eventos de degradación de la

matriz extracelular en el ápice folicular y en los cambios en la vascularización del folículo.

La participación de las células mioides y la contracción del folículo en la ovulación es un tema controvertido, pero es posible que estas células al contraerse puedan ser una fuerza que contribuya a la disociación del tejido techal y a la ruptura mecánica de la pared folicular. Además los elementos mioides podrían también participar en el proceso postovulatorio de reparación del tejido.

Cuando está próxima la rotura del folículo, la actividad enzimática ha despolimerizado también la sustancia básica en el "cumulus", de manera que el ovocito y las células que lo rodean se desprenden de la pared y se encuentran flotando en el fluido folicular. Cuando se produce la rotura, el complejo "cumulus"-ovocito junto con el fluido folicular es expelido hacia la cavidad abdominal para ser captado por las fimbrias del oviducto.

2. ZONA PELÚCIDA (ZP).

La ZP es una capa extracelular transparente compuesta por una matriz de glicoproteínas que rodea los ovocitos de mamíferos. Tiene un papel fundamental durante la fecundación incluyendo la unión especie-específica del espermatozoide-ovocito, la inducción de la reacción acrosómica, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión (Dunbar *et al.*, 1991, Epifano, 1994; Benoff, 1997a; Wassarman, 1998; Denker, 2000; Herrler y Beier, 2000; Sinowatz *et al.*, 2001b; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004).

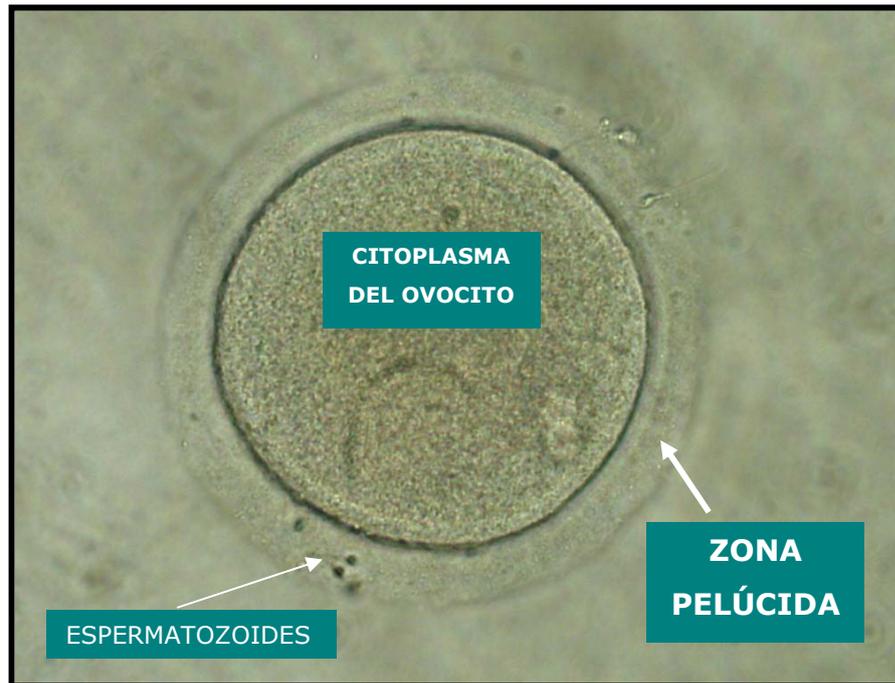


Figura 2. Ovocito humano visto en microscopio óptico en campo claro.

En otros vertebrados como los peces, anfibios y reptiles, las capas que rodean al ovocito son el corion, la membrana vitelina y la membrana perivitelina, respectivamente. Estas estructuras son similares en grosor y función a las de los mamíferos, por lo que pueden ser referidas colectivamente como ZP (Spargo y Hope, 2003).

2.1. ORIGEN Y FORMACIÓN.

La síntesis y secreción de las glicoproteínas de la ZP comienza tan pronto como el ovocito se rodea por las células foliculares y empieza su crecimiento. La síntesis y secreción continua hasta que se acerca el momento de la ovulación con un pico de actividad cuando el ovocito alcanza su tamaño máximo (Bleil y Wasarman, 1980b; Liang *et al.*, 1990; Philpott *et al.*, 1987). Se ha visto que los factores $FIG\alpha$ y bHLH están implicados en la expresión coordinada de los tres genes (ZPA, ZPB y ZPC) que transcriben las tres glicoproteínas que forman la ZP de ratón (Liang, 1997; Soya *et al.*, 2000; Dean, 2002).

Las glicoproteínas de la ZP son expresadas y sintetizadas de forma secuencial durante la ovogénesis en diferentes especies (Roller *et al.*, 1989; Epifano *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 2000). En ratón, ZPA, ZPB y ZPC se expresan coordinadamente durante la fase de crecimiento del ovocito alcanzando el máximo de expresión en ovocitos de 50 μm (Epifano *et al.*, 1995). En el gato doméstico, ZPB es expresada en los folículos primarios en crecimiento y las otras glicoproteínas son expresadas en folículos secundarios (Jewgenow y Fickel, 1999). En el macaco del sureste asiático (*Macaca fascicularis*), ZPC es expresada en los estadios tempranos de los folículos, ZPA se detecta en los folículos primarios y ZPB aparece en los folículos secundarios mientras que en el ovario del macaco "titi" (*Callithrix jacchus*), ZPA, pero no ZPC, aparece en folículos primordiales. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la expresión de ZP durante la ovogénesis es especie-específica (Kölle *et al.*, 1996;1998; Bogner *et al.*, 2004)

Los estudios realizados sobre el proceso de formación de la ZP no son claros y generan bastante polémica. En este aspecto, se han planteado tres teorías: 1) El ovocito es el único participante de la síntesis de glicoproteínas de la ZP, 2) Las células foliculares son las responsables de la síntesis de las glicoproteínas de la ZP y 3) Las células foliculares y el ovocito sintetizan las glicoproteínas de la ZP (Sinowatz *et al.*, 2001a).

Con respecto a las tres teorías varios estudios señalan que las glicoproteínas de la ZP de ratón son exclusivamente sintetizadas y secretadas por el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980b; Skinner y Dunbar, 1992; Kimura *et al.*, 1994; Epifano *et al.*, 1995; Sinowatz *et al.*, 2001a; El Mestrah *et al.*, 2002). En otros mamíferos estudiados, aunque el ovocito siempre está involucrado, se han detectado expresiones adicionales de uno o más genes de la ZP encontramos en las células foliculares (Sinowatz *et al.*, 2001a). Lee y Dunbar (1993) demostraron que en conejo, la proteína de 55 kDa, homólogo a la ZPB de ratón, se expresa tanto por el ovocito como por las células de la granulosa (Lee y Dunbar, 1993). Durante el desarrollo folicular de ovario porcino y bovino, la proteína ZPC se encuentra

localizada principalmente en los ovocitos de folículos primarios y primordiales (Sinowitz *et al.*, 1995; Kölle *et al.*, 1996; Totzouer *et al.*, 1998). Sin embargo, en ovocitos secundarios, tanto el ovocito como las células foliculares contribuyen a la síntesis de ZPC. Mientras que el ovocito bovino se encuentra involucrado en la síntesis de la ZP en todos los estados del desarrollo folicular, en porcino, el ovocito de folículos terciarios para de sintetizar ZPC (Sinowitz *et al.*, 2001a). En especies avícolas como el pollo, la síntesis de una proteína homóloga a la ZPC se expresa únicamente por las células de la granulosa (Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999). Investigaciones con ovarios de mono del sureste asiático muestran una posible contribución de las células de la granulosa para la transcripción de los genes de ZPA y ZPC mientras que la distribución de ZPB, en esta especie, fue restringida al ovocito (Martinez *et al.*, 1996). Sin embargo, en ovarios de macaco "titi" la expresión de ZPA, ZPB y ZPC tienen lugar tanto en el ovocito como en las células de la granulosa (Bogner *et al.*, 2004).

El sitio preciso de la síntesis de las glicoproteínas de la ZP en ovocitos humanos está siendo objeto de debate. Las proteínas de la ZP pueden ser sintetizadas exclusivamente por el ovocito (Bousquet *et al.*, 1981; Eberspaecher *et al.*, 2001) o pueden ser sintetizadas por ambos, ovocito y células de la granulosa que lo rodean (Hinsch *et al.*, 1994; Lee y Dunbar, 1993)

La información sobre las diferencias especie-específica de la expresión de las proteínas de la ZP durante la oogénesis no es sólo importante para conocer los mecanismos celulares y moleculares de estos eventos que regulan el desarrollo del ovocito sino también tienen fuertes implicaciones en los sistemas de cultivo a largo tiempo de los ovocitos (procesos de fecundación *in vitro*) así como en el diseño de vacunas inmunococeptivas.

2.2. ESTRUCTURA.

Las características estructurales y morfológicas de la ZP de mamíferos han sido estudiadas mediante el uso del microscopio óptico y electrónico (Wassarman y Mortillo, 1991). La mayor información acerca de estas características de la ZP de los mamíferos es obtenida de ratón (Green, 1997; Miller, 2002; Dean 2004).

Una de las mayores diferencias entre especies la podemos observar en el diferente grosor de la ZP, que varía desde 1-2 μm en el oposum, 5 μm en ratón, 15-20 μm en la mujer y el cerdo y 27 μm en la vaca (Dunbar *et al.*, 1994; Pelletier *et al.*, 2004). El peso de la ZP de ratón es de aproximadamente unos 5 ng, 30-33 ng la de mujer y de 30 ng en la vaca (Yonezawa *et al.*, 2001; Topper *et al.*, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001).

En la mayoría de las especies la ZP es secretada morfológicamente en capas y encontramos distinta asimetría entre una capa interna y una capa externa (Philips y Shalgi, 1980; Ahuja y Bolwell, 1983; Shalgi y Raz, 1997). La zona interna estaría localizada cerca del ovocito, desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, en cuanto a la zona externa sería la que se encuentra localizada cerca de las células del cúmulo y mediaría la interacción con el espermatozoide. Mediante microscopía de luz polarizada se distinguen por su morfología tres capas, una zona interna donde los filamentos se orientan radialmente, una zona externa donde los filamentos se orientan tangencialmente y una zona intermedia que exhibe un cierto desorden (Pelletier *et al.*, 2004). La diferente organización de la capa interna y externa pudo ser definida gracias al uso de lectinas (Aviles *et al.*, 1997a) y anticuerpos contra la ZP (Sinowatz *et al.*, 2001b). Mediante microscopía electrónica de barrido podemos observar como la ZP de mamíferos está compuesta por una red dispersa de numerosos poros (Vanroose *et al.*, 2000) y encontramos diferencias morfológicas entre la superficie externa e interna (Fig. 3).

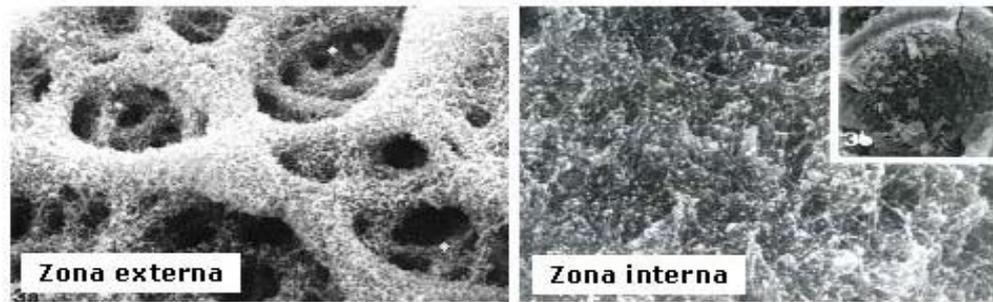


Figura 3. Zona externa y zona interna de la ZP vista por microscopía de barrido (modificado de Familiari, 1992).

La superficie externa de la ZP presenta una apariencia de “queso suizo” mientras que la superficie interna muestra una apariencia regular y rugosa (Philips y Shalgi, 1980a; Keefe *et al.*, 1997). Existen variaciones en la arquitectura morfológica de la ZP de diferentes especies (Vanroose *et al.*, 2000). Si comparamos la superficie porosa encontramos que los poros más pequeños pertenecen a la ZP de vaca mientras que los poros de mayor tamaño aparecen en la ZP de ratón y gato. Pero en general, los poros son mayores en la superficie externa de la ZP y van decreciendo de tamaño centrípetamente hacia la zona interna (Nikas *et al.*, 1994). En la mayoría de las especies, los poros presentan una forma más elíptica que circular. La naturaleza porosa de la ZP permite la penetración de un relativo número de moléculas grandes como las inmunoglobulinas. Por otro lado pequeñas moléculas como la heparina no son capaces de penetrar la ZP de tal manera que la habilidad de las moléculas para pasar esta matriz extracelular no depende principalmente del tamaño de la molécula sino de otras propiedades bioquímicas y fisicoquímicas como por ejemplo la carga que presente la superficie de la molécula (Shivers y Dunbar, 1977).

En los ovocitos humanos y mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica de barrido encontramos diferencias en la estructura de la ZP de ovocitos no fecundados y ovocitos fecundados. En ovocitos no fecundados, la ZP tiene una apariencia porosa, compuesta por un gran número de estructuras en forma de anillos llamados aros, aleatoriamente superpuestos en diferentes capas. Los poros superficiales tienen un

diámetro de 4 micrómetros que van decreciendo en los poros interiores. En los ovocitos fertilizados, la ZP es más compacta, los anillos aparecen fundidos y los poros son borrados por un material amorfo emergente de la zona interna de la ZP (Nikas *et al.*, 1994; Magerkurth *et al.*, 1999).

Para definir la microestructura de la ZP en ovocitos humanos, este material amorfo fue retirado mediante detergentes y tratamientos químicos. Estos métodos nos permitieron visualizar una red organizada por filamentos. Estos filamentos fueron rectos o curvados, con una longitud de 0,1-0,4 μm y un grosor de 10-14 nm (Familiari *et al.*, 1992). Estos filamentos son diferentes en la superficie externa e interna de la ZP. Los filamentos de la superficie externa son largos y presentan una apariencia tirante. En los puntos de intersección de los filamentos encontramos unas pequeñas estructuras globulares con un diámetro de 80-120 nm mientras que los filamentos de la superficie interna se caracterizan por estructuras repetitivas de filamentos cortos y rectos. También encontramos las estructuras globulares en los puntos de intersección. Después de la fecundación la superficie interna presenta numerosas áreas donde los filamentos aparecen fusionados (Familiari *et al.*, 1992).

También encontramos diferencias en el grosor de la ZP de humanos, de manera que los embriones tienen una ZP más fina ($15,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$) que los ovocitos inmaduros ($20,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$) y los ovocitos maduros ($19,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$). Este cambio en el grosor de la ZP se debe a la disminución de la capa externa (Pelletier *et al.*, 2004). De todas formas las características morfológica tanto en embriones como en ovocitos varía considerablemente en los diferentes pacientes estudiados (Pelletier *et al.*, 2004)

2.3. COMPOSICIÓN DE LA ZP

En la especie mejor conocida hasta la fecha, el ratón, la ZP presenta una estructura amorfa con un aspecto de un entramado fibrilar. Estas fibras o filamentos están constituidos por las distintas glicoproteínas (Wassarman y Mortillo, 1991; Wassarman *et al.*, 1996). Así, la ZP estaría formada por

filamentos compuestos de dímeros de las glicoproteínas ZP2:ZP3 y estos filamentos estarían unidos entre sí por dímeros de la glicoproteínas ZP1 (Fig. 4).

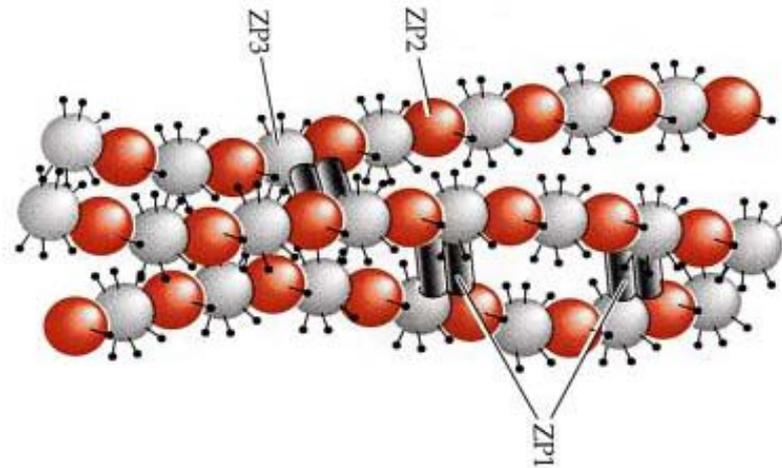


Figura 4. Modelo de la estructura de la ZP de ratón (modificado por Wassarman, 1992).

Sin embargo, estudios recientes realizados por el grupo del Dr. Dean utilizando animales con diferentes modificaciones genéticas en las glicoproteínas de la ZP han aportado nuevas evidencias. Estos estudios han demostrado que los filamentos que constituyen la ZP están formados por dímeros ZP1:ZP3 y ZP2:ZP3. Estos resultados implican que el modelo de estructura de la ZP propuesto para el ratón deba ser reconsiderado (Rankin *et al.*, 1998, 1999, 2001; Dean, 2004).

El descubrimiento reciente de la existencia de cuatro glicoproteínas en la especie humana y muy probablemente en la rata nos indica que el modelo de estructura de la ZP descrito para el ratón no es extrapolable a estas especies (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005).

2.3.1. Glicoproteínas.

La ZP de mamíferos fue y sigue siendo referenciada y definida principalmente por su número reducido de proteínas (Wassarman, 1988; Wassarman y Mortillo, 1991; Dunbar *et al.*, 1994; Sinowatz *et al.*, 2001b; Hoodbhoy y Dean, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005). Estas proteínas suelen

estar altamente glicosiladas denominándose glicoproteínas. Estas glicoproteínas se encuentran presentes en un número de tres en la mayoría de especies estudiadas hasta la fecha. Sin embargo, recientemente gracias al uso de técnicas muy sensibles como el MALDI-TOF se ha descrito la presencia de cuatro proteínas en la ZP humana (Lefièvre et al., 2004; Tabla I). El gen que expresaría una cuarta proteína ha sido recientemente descrito en la rata y estudiado por MS/MS (Hoodbhoy *et al.*, 2005). La terminología usada para denominar cada una de estas proteínas es confusa y está siendo tema de debate en la actualidad. Las glicoproteínas fueron clasificadas originalmente como ZP1, ZP2 y ZP3 de acuerdo a su masa molecular estimada por la movilidad tras su separación mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). Así, la glicoproteína ZP1 es la de menor movilidad y la glicoproteína ZP3 la de mayor movilidad.

Tabla I. Clasificación de las glicoproteínas de la ZP de diferentes especies.

Especie	ZP1	ZPA	ZPC	ZPB
	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Cerdo		+	+	+
Codorniz	+		+	
Conejo		+	+	+
Gallina	+	+	+	+
Gato		+	+	+
Hombre	+	+	+	+
Chimpace	+	+	+	+
Macaco	+	+	+	
Mono Titi		+	+	+
Rata	+	+	+	+
Ratón	+	+	+	
Vaca		+	+	+
Perro		+	+	
Hámster			+	
<i>Xenopus</i>		+	+	+

El aspecto mostrado por estas glicoproteínas en un gel es el de bandas que pueden ser muy anchas debido a la heterogeneidad existente en cuanto al grado de glicosilación. Sin embargo, en otras especies no se observaba la presencia de estas tres glicoproteínas e incluso se detectaba una única banda muy ancha. Esto implica que estas glicoproteínas mostraban una gran heterogeneidad en su grado de glicosilación y que además resultaba diferente entre las distintas especies. Así, por citar un ejemplo en la especie humana se detectaban tres bandas que se denominaron por semejanza al ratón ZP1, ZP2 y ZP3 (Yonezawa et al., 2001). La identificación de las diferentes proteínas de la ZP de algunas especies, cerdo y vaca, ha sido realizada gracias a la utilización de procesos de deglicosilación (Hedrick et al., 1987; Mori et al., 1991; Kudo et al., 1998; Takasaki et al., 1999; Amari et al., 2001, Nakano y Yonezawa, 2001; Yonezawa et al., 2003).

Gracias a los avances de la biología molecular se ha podido clarificar en gran parte cual es la composición de la ZP en diferentes especies (Tabla II). Así, se han clonado los genes que expresan ZP1, ZP2 y ZP3 en diferentes mamíferos (Harris et al., 1994; Epifano et al., 1995). Estos estudios moleculares demostraron la existencia de tres genes de diferente tamaño que denominaron ZPA, ZPB y ZPC siendo el primero de mayor tamaño mientras que ZPC es el más pequeño.

Estos tres genes ZPA, ZPB y ZPC codificarían las proteínas ZP2, ZP1 y ZP3 respectivamente (Harris et al., 1994; Spargo y Hope, 2003).

Recientemente, vista la confusa nomenclatura usada para la ZP, Spargo y Hope (2003) mediante un estudio filogenético proponen unificar el sistema de nomenclatura, en donde las 3 subfamilias ZPA, ZPB, ZPC serían identificadas numéricamente como ZP2, ZP1 y ZP3. Desafortunadamente, en este trabajo no consideraron la existencia de un nuevo gen responsable de la presencia de una proteína adicional descrita en diferentes especies lo que hace que la terminología usada todavía en nuestros días sea confusa.

Tabla II. Peso molecular de las glicoproteínas de la ZP de diferentes especies.

	Gen ZP/ proteína ZP	Peso Molecular kDa	Referencias
Hombre	ZP1	64-76	Gupta, <i>et al.</i> (1998)
	ZPA/ZP2	90-110	Bauskin <i>et al.</i> (1999)
	ZPC/ZP3	54-62 (58-72)	Lefièvre <i>et al.</i> (2004)
	ZPB/ZP4	Desconocido	
Cerdo	ZPA/ZP1	80-90	Hedrick y Wardrip. (1986)
	ZPA/ZP2	60-65	Harris <i>et al.</i> (1994)
	ZPB/ZP3 α	55	
	ZPC/ZP3	55	
	ZPA/ZP4	20-25	
Conejo	ZPB	68-125	Dunbar <i>et al.</i> (1989)
	ZPA/ZP2	81-100	Harris <i>et al.</i> (1994)
	ZPC/ZP3	100-132	
Ratón	ZP1	200	Bleil y Wassarman. (1980b)
	ZPA/ZP2	120	Harris <i>et al.</i> (1994)
	ZPC/ZP3	83	
Vaca	ZPA/ZP2	102	Noguchi <i>et al.</i> (1994)
	ZPB/ZP3 α	88	Harris <i>et al.</i> (1994)
	ZPC/ZP3	73	Yonezawa <i>et al.</i> (2001)

2.3.2. Dominios estructurales de las cadenas polipeptídicas.

Los patrones basados en análisis de secuencias de las cadenas de DNA y de las proteínas revelan varios dominios dentro de las glicoproteínas de la zona (McLeskey *et al.*, 1998) (Fig. 5).

El dominio ZP consiste en una secuencia de 260 aminoácidos y fue identificado por primera vez en la glicoproteína ZP2 y ZP3 de ratón (Bork y Sander, 1992). Este módulo contiene 8 residuos de cisteína y se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Sin embargo, este dominio ZP se encuentra presente en otras muchas proteínas extracelulares como la proteína Tamm-Horsfall, glicoproteína-2, α y β -

tectorina, TGF- β , y endogлина entre otras. En un estudio reciente se ha demostrado que el dominio ZP es un módulo conservado que permite la polimerización de proteínas extracelulares (McLeskey *et al.*, 1998; Wassarman *et al.*, 2001a; Jovine *et al.*, 2002). Demostrando que una vez que las glicoproteínas ZP2 y ZP3 son secretadas necesitan este dominio ZP para realizar el ensamblaje entre los filamentos. Con este estudio también sugieren que los filamentos de proteínas que presentan dominios ZP deben tener una arquitectura tridimensional semejante (Jovine *et al.*, 2002)

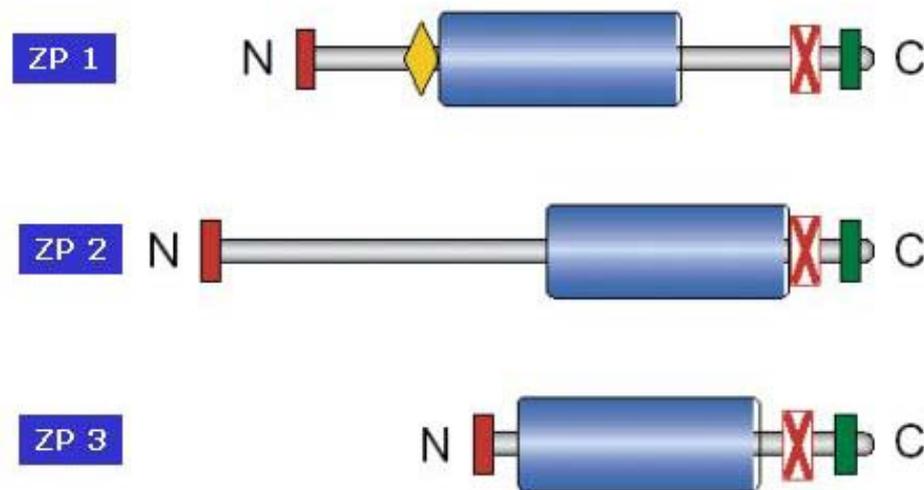


Figura 5. Descripción esquemática de los diferentes dominios presentes en las glicoproteínas de la ZP. Color verde: Dominio transmembrana; Cruz roja: Sitio de corte de furina; Color azul: Dominio ZP; Color amarillo: Dominio "Trefoil"; Color rojo: Péptido señal. (Modificado de Wassarman, 2001a).

Adicionalmente, todas las familias de ZP poseen una secuencia hidrofóbica en posición N-terminal y C-terminal. El dominio hidrofóbico situado en posición C-terminal se corresponde con el dominio transmembrana (Bork y Sander, 1992; McLeskey *et al.*, 1998; Sinowitz *et al.*, 2001a; Jovine, 2002). Inmediatamente adyacente al dominio transmembrana encontramos un tallo citoplasmático de naturaleza hidrofílica (Boja *et al.*, 2003). Estos dominios además se hallan bien conservados en otras proteínas de la envoltura del ovocito o de otras estructuras (Wassarman *et al.*, 2001a). El dominio transmembrana de ZP2

y ZP3 debe ser requerido para la colocación de estas glicoproteínas en la membrana del ovocito, donde se procederá al procesamiento del carbono terminal y la incorporación de las glicoproteínas a la ZP (Jovine *et al.*, 2002).

El dominio Trefoil se encuentra únicamente en la familia ZPB y se corresponde con una región de 45 aminoácidos que es rica en aminoácidos cisteína. Se cree que este dominio provee de una mayor resistencia a la degradación proteolítica frente al ataque de enzimas acrosómicas o de los gránulos corticales durante la fecundación (McLeskey *et al.*, 1998).

En la secuencia clonada de todas las ZP de mamíferos descritas hasta la fecha aparece conservado un dominio con la secuencia RXK/RR↓ situado en posición previa al dominio transmembrana. Esta secuencia se encuentra alterada en las proteínas de la ZP de diferentes mamíferos (no está presente en gato y ZPB humana), pero todas las proteínas de la ZP de mamíferos contienen un motivo dibásico en la misma región (Zhao *et al.*, 2003). La secuencia RXK/RR es un sitio consenso para un procesamiento proteolítico mediado por una endoproteasa del tipo proproteína convertasa siendo la más conocida el enzima furina. Este procesamiento proteolítico parece ser necesario para la secreción de las glicoproteínas de la ZP aunque diversos estudios indican que se produce justo antes de este dominio para furina (Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002; Boja *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2003, 2004).

2.4. SECRECIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP.

Estudios ultraestructurales de ovocitos de ratón en fase de crecimiento revelan que el aparato de Golgi del ovocito cambia la estructura de sus cisternas apiladas que contienen escasas vesículas o gránulos, en los primeros estadios de crecimiento, a unas cisternas que aparecen más engrosadas y con una gran cantidad de vacuolas en estadios tardíos del crecimiento del ovocito (Wassarman y Josefowicz, 1978). Los cambios

morfológicos observados en las organelas del ooplasma del ovocito en crecimiento sugieren el aumento del tráfico de glicoproteínas en el citoplasma del ovocito, incluyendo las glicoproteínas de la ZP.

El proceso por el cual las glicoproteínas de la ZP son sintetizadas, secretadas e incorporadas por el ovocito en la matriz de la ZP está siendo una importante materia de debate.

El tráfico intracelular de la ZP3 ha sido monitorizado mediante la expresión de ZP3 unida a EGFP (proteína fluorescente verde) en ratones transgénicos. La visualización de esta glicoproteína anclada al fluorocromo indica que la ZP3 es conducida por el péptido señal en la ruta de síntesis del ovocito desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi donde es glicosilada (Zhao *et al.*, 2003). En el citoplasma de ovocitos en crecimiento encontramos unas estructuras inusualmente grandes (0,5-3,0 μm) en las que encontramos anclada ZP3-EGFP (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). La localización periférica de ZP3-EGFP en estas estructuras circulares ancladas a lípidos de membrana y la copresencia de synaptobrevina (VAMP), proteína de membrana asociada a vesículas (Lin y Scheller, 2000), sugirieron que estas estructuras surgirían del compartimento post-Golgi como vesículas secretoras (Qi *et al.*, 2002). Sin embargo, estas estructuras circulares surgen en etapas más tempranas en la ruta de síntesis puesto que se observó mediante microscopía electrónica en ovocitos de rata que estas formaciones concéntricas pertenecían a retículo endoplasmático (Kang, 1974) y mediante microscopia de fluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-PDI (proteína disulfuro isomerasa) localizada en membranas de retículo endoplasmático, se pudo determinar que estas "mega-vesículas" en realidad eran retículo endoplasmático rugoso circular (Zhao *et al.*, 2003). Aunque podemos determinar una progresión lineal del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y a la membrana plasmática mediante la visualización de proteínas de secreción también existe la hipótesis de un retículo endoplasmático "especializado" en el acortamiento y salida de proteínas del trans-Golgi (Litscher *et al.*, 1999). Mediante microscopía electrónica en ovocitos de ratón han sido visualizadas unos agregados vesiculares que

podrían participar en el tráfico de estas glicoproteínas tras su paso por el Aparato de Golgi y su llegada al oolema (Avilés *et al.*, 1999).

Durante la síntesis y antes de la incorporación en la ZP extracelular, la ZP3 sufre importantes modificaciones. El péptido señal que se encuentra formado por los 22 primeros aminoácidos es cortado y resulta un extremo N-terminal de la proteína donde la glutamina es ciclada a pyroglutamina (Ringuette *et al.*, 1988; Boja *et al.*, 2003). También son cortados o procesados el dominio transmembrana y el tallo citoplasmático puesto que anticuerpos que reconocen estas secuencias no reaccionan contra la ZP secretada (Eveline *et al.*, 1999; Boja *et al.*, 2003). Hasta hace unos años, se pensaba que este procesamiento se realizaba en un dominio bastante conservado RXK/RR reconocido por furina que cortaría esta secuencia y liberaría la glicoproteína a la matriz a nivel de la membrana plasmática del ovocito (Yurewicz *et al.*, 1993; Williams y Wassarman, 2001; Kiefer y Saling, 2002). Estudios recientes presentados por el laboratorio del Dr. Dean revelan que el C-terminal de la ZP3 madura y secretada acabaría en el aminoácido Asn³⁵¹ que se encuentra dos aminoácidos por delante al sitio consenso de corte para la convertasa furina (Zhao *et al.*, 2003), y el hecho de que la mutación del motivo RNRR a ANAA o RNGE no impida la secreción o incorporación de la ZP3 en la ZP sugiere que tiene que haber un sitio alternativo de procesamiento (Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002). El mecanismo adicional por el cual el ectodominio de la ZP3 es liberado del dominio transmembrana en la superficie celular no ha sido clarificado. Alternativamente hay evidencias del papel de secretasas en la liberación de ectodominios en diferentes proteínas (Hooper *et al.*, 1997; Primakoff y Myles, 2000). Dado que el acortamiento de las proteínas para entrar en la ruta regulada de secreción ocurre a nivel del trans-Golgi (Donaldson y Lippincott-Schwartz, 2000; Marsh y Howell 2002), el grupo del Dr. Dean sugiere que la proteínas progresan hasta la membrana plasmática vía una ruta regulada por secretasas donde estas proteínas podrían viajar tanto separadas o en conjunción con las otras glicoproteínas de la ZP (Zhao *et al.*, 2002, 2003). La exposición de las glicoproteínas al medio extracelular, podría resultar en cambios en la conformación que

llevaría al corte del ectodominio por una endoproteasa anclada a la membrana que facilitaría su incorporación en la matriz.

Por otro lado la presencia del dominio transmembrana y del tallo citoplasmático, detectado por los anticuerpos que reconocen estas secuencias en las glicoproteínas que se encuentran en la ruta de síntesis en el ooplasma del ovocito (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003), sugieren que el procesamiento de la glicoproteína tiene lugar una vez que la glicoproteína se encuentra en la membrana plasmática del ovocito. Sin embargo, también es posible que el procesamiento tenga lugar en las vesículas secretoras pero que la región transmembrana quede asociada con el resto del polipéptido o con componentes de la membrana y sea igualmente detectado (Qi *et al.*, 2002).

Recientemente también se ha observado la presencia de una región hidrofóbica que se encuentra entre el dominio furina y el dominio transmembrana. Esta región se encuentra bien conservada en los mamíferos y su posición es semejante en las tres glicoproteínas. La mutación de esta zona hidrofóbica (VTVGPLIFL) impide la incorporación de ZP3 dentro de la ZP (Zhao *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel de este pequeño dominio debe ser determinado. Se ha propuesto que podría servir como un sitio de unión a chaperonas importantes en el tráfico intracelular, otra posibilidad es que podría servir como un sitio estequiométrico donde se produjese el ensamblaje de las tres proteínas de la ZP para formar complejos siempre que este fuese un prerrequisito para el tráfico a la superficie de la célula (Zhao *et al.*, 2003). No estaría claro cual sería la señal que transmitiera el tráfico a la superficie por las vesículas, puede ser que el tallo citoplasmático que consta de 14 aminoácidos hidrofílicos podría estar involucrado en la unión con un adaptador u organizados macromolecular crítico para el transporte a la superficie celular.

En conclusión, todos estos datos nos sugieren que las glicoproteínas de la ZP necesitan ser proteolíticamente procesadas en los ovocitos en crecimiento para que la secreción y ensamblaje ocurra en la ZP.

2.5. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP DE RATÓN, HUMANA Y HÁMSTER.

A continuación voy a pasar a describir con mayor detalle las características moleculares de la ZP de ratón que es la especie más conocida y que nos sirve de modelo general. Igualmente entraremos en detalle acerca la ZP humana y de hámster.

2.5.1. Zona pelúcida de ratón.

La secuencia primaria de ZP1 (623 aminoácidos), ZP2 (713 aminoácidos) y ZP3 (424 aminoácidos) fue deducida a partir de la cadena de cDNA (Ringuette *et al.*, 1988; Liang *et al.*, 1990; Epifano *et al.*, 1995). Cada proteína de la ZP es sintetizada a partir de un precursor peptídico con una secuencia señal N-terminal y un C-terminal que corresponde al dominio transmembrana seguido por un corto tallo citoplasmático. La secuencia señal se corta en el retículo endoplasmático generando las proteínas maduras ZP1, ZP2 y ZP3 (Liang *et al.*, 1990; Boja *et al.*, 2003). Estas proteínas son fuertemente glicosiladas procesando las cadenas de carbohidratos que resultarán la mitad de la masa de cada una de las glicoproteínas (Nagdas *et al.*, 1994; Easton *et al.*, 2000). Mediante espectrometría de masas han sido definidos los sitios de glicosilación por cadenas de carbohidratos en la ZP nativa (Boja *et al.*, 2003). En la secuencia de estas proteínas encontramos varias Asn susceptibles a ser glicosiladas del tipo N-glicosilación. Concretamente en ZP1 hay 4 sitios (Asn⁴⁹, Asn⁶⁸, Asn²⁴⁰, Asn³⁷¹), en ZP2 hay 6 sitios (Asn⁸³, Asn¹⁷², Asn¹⁸⁴, Asn²¹⁷, Asn²⁶⁴, Asn³⁹³) y en ZP3 hay 6 sitios potenciales y en todos ellos, excepto para uno (Asn²²⁷), están ocupados por cadenas de azúcares (Asn¹⁴⁶, Asn²⁷³, Asn³⁰⁴, Asn³²⁷, Asn³³⁰). Por otro lado, no se han detectado O-glicosilaciones en ZP2, y pocos O-glicanos son detectados en ZP3. Por ejemplo, de los 58 residuos serina o treonina en ZP3 sólo 5 parecen ser glicosilados (Boja *et al.*, 2003). Las O-glicosilaciones de la ZP3 de ratón aparecerían como en dos parches, uno en el extremo amino terminal de la proteína con tres sitios de O-glicosilación (Thr³², Thr³⁴, Ser³⁹) y un segundo

en medio del dominio ZP con dos sitios de o-glicosilación (Thr¹⁵⁵, Thr¹⁶²). En estos sitios no se incluyen Ser³³² y Ser³³⁴ previamente implicadas como sitios de O-glicosilación involucrados en la interacción con el espermatozoide (Chen *et al.*, 1998). Debido a estas modificaciones post-transcripcionales la ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón tienen un peso molecular de 180-200, 120-140 y 83 kDa respectivamente (Bleil y Wassarman, 1980; Shimizu *et al.*, 1983).

Experimentos realizados con ratones con mutaciones genéticas en las tres glicoproteínas indican que la ZP puede estar formada tanto por ZP1 y ZP3 o ZP2 y ZP3 aunque la forma de la matriz es más delgada y no persiste en la oogénesis (Rankin *et al.*, 1999, 2001). También hay evidencias de que el dominio ZP formado por 260 aminoácidos con 8 residuos de cisteína (Bork y Sander, 1992) juega un papel importante en la polimerización de las glicoproteínas de la ZP (Jovine *et al.*, 2002). Estos datos, y la observación de que los puentes disulfuro presentes en el dominio ZP de ZP1 y ZP2 parecen ser diferentes a los de ZP3 (Boja *et al.*, 2003), son consistentes en un modelo en el cual los filamentos de la ZP estarían compuestos por heterodímeros de ZP1/ZP3 y ZP2/ZP3.

2.5.2. Zona pelúcida humana.

El cDna de los homólogos de las glicoproteínas de la ZP de ratón en humanos han sido aislados; hZP1 (Harris *et al.*, 1994), hZP2 (Liang y Dean, 1993) y hZP3 (Chamberlain y Dean, 1990). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las proteínas nativas de la ZP humana (hZP) debido a las dificultades de obtención de material y existe gran controversia.

En un principio, se determinó el peso molecular de las tres glicoproteínas mediante SDS-PAGE, donde ZP1 tendría un peso molecular de 90-110 kDa siendo la más grande, ZP2 64-78 kDa y ZP3 57-73 kDa la más pequeña y una banda de 90-110 kDa que desaparecía después de la fecundación (Shabinowitz y O'Rand, 1988; Bercegeay *et al.*, 1995). Posteriormente en el laboratorio del Dr Gupta y utilizando anticuerpos

sintetizados contra las tres glicoproteínas obtuvieron diferentes resultados (Gupta *et al.*, 1998). ZP humana solubilizada y resuelta en una gel SDS-PAGE de una dimensión bajo condiciones no reductoras reaccionaban tres bandas ZP1, ZP2 y ZP3 con pesos moleculares de 60, 100 y 53 kDa respectivamente. Bajo condiciones reductoras, una reactividad dominante de ZP1, ZP2 y ZP3 fue localizada a 63, 65 y 58 kDa y también aparecen unas bandas con débil reactividad a 53, 96 y 138 kDa respectivamente. La conclusión de este trabajo refleja que ZP3 aparece como una banda ancha comprendida entre 68-58 kDa y están en desacuerdo con el hecho de que hubiese dos productos genéticos de ZP3 (ZP3H y ZP3L) o que resulten de modificaciones post-transcripcionales diferentes, tal y como sugería Shabanowitz (1990). Este hecho se justifica en que en un gel de dos dimensiones e incubado con el anticuerpo anti-ZP3 se reconoce una sola mancha. También demuestran como ZP1 aparece como un banda superpuesta con ZP3 de manera que la ZP2 había sido malinterpretada como ZP1, puesto que el componente de mayor peso molecular en la ZP humana es ZP2 (Gupta *et al.*, 1998).

Trabajos posteriores usando anticuerpos contra los péptidos de las proteínas de la ZP humana han corroborado los datos aportados por el laboratorio del Dr Gupta. Bauskin *et al.* (1999) realiza un estudio de la ZP2 y la ZP3 a partir de ZP aisladas de ovocitos expuestos a espermatozoides y de ovocitos en profase que no habían sido expuestos a espermatozoides mediante electroforesis en SDS-PAGE. Este trabajo demuestra que la ZP2 tiene un peso molecular de 105-110 kDa en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras la ZP2, pasa de una banda de 105-110 kDa a una de 60-73 kDa en la ZP aislada de ovocitos expuestos a espermatozoides, pero principalmente como 105-110 kDa en ZP no expuesta a espermatozoides. El péptido generado por proteólisis quedaría unido por puentes disulfuro en condiciones no reductoras. Estudios previos (Shabinowitz y O'Rand, 1988; Bercegeay *et al.*, 1995) indicaban que ZP1 y ZP2 co-migraban a una banda de 92- 110 kDa y bajo condiciones reductoras aparecían como dos bandas de 90-110 kDa y 64-78 kDa que fueron identificadas como ZP1 y ZP2 respectivamente. Sin embargo, este estudio refleja como las dos bandas

pertenecerían a ZP2 debido a la proteólisis del péptido del amino terminal (Bauskin *et al.*, 1999). La ZP1, que había sido caracterizada como una glicoproteína de 60 kDa (Gupta *et al.*, 1998) co-migraría con el péptido de ZP2 surgido de la proteólisis. Similar proteólisis se ha observado en la ZP2 de ratón y hámster en los ovocitos que habían sido fertilizados. Esta ha sido atribuido a la liberación de una proteasa específica de ZP2 por parte de los gránulos corticales en el bloqueo de la poliespermia (Bleil *et al.*, 1981; Moller y Wassarman, 1989; Moller *et al.*, 1990).

Con estos trabajos podemos concluir que mediante un análisis bioquímico de la ZP humana aparecen tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 cuyos pesos moleculares corresponderían a 64-78 kDa, 90-110 kDa y 57-73 kDa respectivamente.

Una aportación muy importante ha sido el trabajo realizado, recientemente, por el laboratorio del Dr Dean (Zhao *et al.*, 2004). En él, se realiza un estudio biofísico mediante espectrometría de masas de ZP3 recombinante humana expresada en células CHO deficientes en glicosilación (CHO-Lec3.2.8.1) para minimizar la heterogeneidad y facilitar el análisis por MS. Estas investigaciones se realizaron con el fin de comparar la ZP3 de humano y de ratón y el posible papel que desempeñaría la estructura de estas glicoproteínas en la interacción con el espermatozoide. Ambos, ZP3 humana y de ratón están formadas por 424 aminoácidos y tienen una homología del 67%. La ZP3 humana tiene un péptido señal que finalizaría en el N-terminal de 22 aminoácidos y la glutamina del N-terminal se cicla a piroglutamina similar a la ciclación que ocurre en la ZP1 y ZP3 de ratón. Encontramos 12 residuos cisteína capaces de formar 6 puentes disulfuro. Cuatro de estos, se encuentran localizados en el dominio ZP semejante a los determinados en la ZP3 de ratón. Estas cisteínas conservadas en las dos glicoproteínas nos sugieren una estructura tridimensional parecida (Zhao *et al.*, 2004). En el extremo C-terminal encontramos el dominio transmembrana comprendido por los residuos 386-408 (Zhao *et al.*, 2004). Como en la ZP3 de ratón, el ectodominio de la ZP debe ser liberado del dominio transmembrana para que la glicoproteína sea incorporada en ZP

extracelular. En la ZP3 recombinante humana se ha determinado que el último aminoácido sería la Asn³⁵⁰ (Zhao *et al.*, 2004) por lo que el procesamiento se realizaría dentro de la secuencia RN↓RR semejante a la de ratón. En cuanto a la glicosilación, la ZP3 humana tiene 3 sitios de N-glicosilación de los 4 potenciales que presenta (Asn¹²⁵, Asn¹⁴⁷ y Asn²⁷²) (Zhao *et al.*, 2004). Los 5 sitios de N-glicosilación encontrados en la ZP3 de ratón nos daría la explicación del diferente peso molecular de estas dos glicoproteínas (ZP3 de ratón 83 kDa y ZP3 humana 64 kDa). De los 52 sitios potenciales para O-glicosilación que presenta la ZP3 sólo se encontraron dos regiones O-glicosiladas, residuos del 156-173 y 260-281 (Zhao *et al.*, 2004). Ni Ser³³¹ ni Ser³³², homólogas a las de ratón y supuestamente implicadas en la interacción con el espermatozoide (Chen *et al.*, 1998) están ocupadas por O-glicanos.

De este estudio se concluye que las estructuras de la ZP3 de ratón y humana son bastante semejantes por lo que ésta no sería la razón de la especificidad de especie de la interacción del ovocito con el espermatozoide.

La aportación más importante ha sido la realizada por el grupo del Dr Barratt en el 2004 que demuestra la expresión de 4 genes (ZP1, ZP2, ZP3 y ZPB) en los ovocitos humanos (Lefièvre *et al.*, 2004). Este mismo grupo, en 1999, ya puso de manifiesto que en la especie humana el gen que había sido propuesto como ZPB para al glicoproteína ZP1 era muy diferente del de ratón tanto en secuencia, como en tamaño de intrones y exones. En este trabajo sugieren la existencia de un cuarto gen expresado en humano llamado ZPB pero diferente al gen que expresa ZP1 (Hughes y Barratt, 1999). De manera que la ZP humana estaría compuesta por 4 glicoproteínas que representa la diferencia fundamental con el modelo murino. La demostración de la existencia de 4 proteínas en la ZP humana requiere la reinterpretación de los datos obtenidos en numerosos estudios electroforéticos. Aunque solamente tres bandas se observaban en geles de 1 dimensión cuando aumentábamos la resolución en geles de 2 dimensiones se apreciaba un aumento de la complejidad. En el caso de la ZP3 humana podemos observar una banda pero con mayor resolución se observan dos

bandas que podrían pertenecer a ZP3 y ZPB (Yurewicz *et al.*, 1987 en cerdo; Topper *et al.*, 1997 en vaca; Gupta *et al.*, 1998 en humano).

La presencia del gen ZPB se encuentra en un gran número de especies (ver tabla I) (Lefièvre *et al.*, 2003) y análisis bioinformáticos demuestran que, como en humanos y ratas, el ratón tiene 4 genes ZP, sin embargo, comparando las secuencias genéticas, la ZPB de ratón habría adquirido un número de cambios que hacen que no se exprese una ZPB de ratón funcional (Lefièvre *et al.*, 2004). Estos resultados sugerirían que el espermatozoide humano interaccionaría con una ZP compuesta por 4 glicoproteínas, no con tres, y tanto ZPB como ZP3 podrían ser requeridos para la unión con el espermatozoide. Este hecho ha sido descrito para otras especies como el conejo, vaca, cerdo y mono, donde la ZPB muestra propiedades de unión al espermatozoide (Prasad *et al.*, 1996; Topper *et al.*, 1997; Yurewicz *et al.*, 1998; Govind y Gupta, 2000).

2.5.3. Zona pelúcida de hámster.

La ZP de hámster no ha sido muy estudiada debido a que la ZP de ratón es la que se ha utilizado más ampliamente como modelo para el estudio de la fecundación. La ZP de hámster está compuesta de un pequeño número de glicoproteínas. Cada una de estas proteínas presenta una extensa heterogeneidad en SDS-PAGE, coincidiendo con el comportamiento que presentan las glicoproteínas de la ZP de otros mamíferos (Dunbar y Wolgemuth, 1984; Wassarman, 1988). La ZP de hámster esta compuesta por tres glicoproteínas, ZP1, ZP2 y ZP3 y tienen un peso molecular de 103, 208 y 56 kDa respectivamente en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (Moller *et al.*, 1990).

Los resultados de ensayos de competición *in vitro* sugieren que la ZP3 de hámster es el receptor primario del espermatozoide (Moller *et al.*, 1990) al igual que su análogo en la ZP3 de ratón. La ZP3 de hámster se identificó y caracterizó (Moller *et al.*, 1990) demostrando la diferencia en el peso molecular que tiene con la ZP3 de ratón, 56 kDa el hámster, 83 kDa ratón.

Esta diferencia se debe a la desigual glicosilación que presentan estas dos glicoproteínas puesto que el peso del RNAm es semejante y el peso de los dos péptidos sin glicosilar es de 44 kDa. El polipéptido de la ZP3 de hámster tiene un 81% de identidad con el polipéptido de la ZP3 de ratón y solamente una pequeña región de la ZP3 de hámster (residuos 318-356) es significativamente diferente a la ZP3 de ratón (Kinloch *et al.*, 1990). El hecho más importante es que el espermatozoide de hámster es capaz de unirse al ovocito de ratón y el espermatozoide de ratón es capaz de unirse al ovocito de hámster (Schmell y Gulyas, 1980a; Moller *et al.*, 1990). Esto sugiere que los determinantes de las cadenas oligosacáridicas responsables de la interacción entre estos gametos son comunes.

La información bioquímica que se tiene de las glicoproteínas de la ZP de hámster es bastante escasa. Hasta el momento solo ha sido clonada la proteína ZP3. Las otras componentes, tanto ZP2 y ZP1 como una posible cuarta glicoproteína, como pasa en rata, no han sido clonados.

La ZP de ratón solubilizada induce la reacción acrosómica en el espermatozoide de ratón pero no en el de hámster *in vitro*. Sin embargo, la ZP solubilizada de hámster induce la reacción acrosómica de ambos espermatozoides, ratón y hámster (Moller *et al.*, 1990). De manera que la ZP de hámster retiene los determinantes moleculares para inducir la reacción acrosómica en el espermatozoide de ratón. También es interesante resaltar que el espermatozoide de hámster se une y penetra la ZP humana, mientras que el espermatozoide humano no es capaz de unirse a la ZP de hámster (Yanagimachi *et al.*, 1994).

Como hemos especificado anteriormente, la ZP2 de ratón esta sujeta a proteólisis después de la activación del ovocito, pasando de ZP2 a ZP2_f (Moller y Wassarman, 1989). En hámster, también se ha demostrado que ocurre este procesamiento proteolítico de la ZP2 después de la activación de los ovocitos (Moller *et al.*, 1990). Ovocitos activados de ratón causan la conversión de ZP2 a ZP2_f de hámster, y ovocitos activados de hámster convierten la ZP2 a ZP2_f en ratón, indicando que ambas especies poseen

una proteasa para ZP2 con un sustrato específico muy similar y que ZP2 de hámster y de ratón son muy similares (Moller *et al.*, 1990).

2.6. FUNCIONES DE LA ZONA PELÚCIDA.

La ZP está involucrada en diferentes etapas críticas durante el proceso de la fecundación. Así, esta matriz extracelular provee los receptores para el proceso relativamente especie-específico de la adhesión y la unión de los espermatozoides capacitados. La eliminación de la ZP tiene como consecuencia el derribo de una de las barreras para que se produzca la fecundación *in vitro* del ovocito por espermatozoides de otras especies (Yanagimachi, 1994). Además en la ZP encontramos aquellos componentes responsables de la inducción de la reacción acrosómica. Tras la penetración del primer espermatozoide se produce un cambio a nivel de la ZP, reacción zonal, siendo responsable en parte del bloqueo de la polispermia. Además se ha observado que la ZP tiene un importante papel en la organización y diferenciación de las células de la granulosa y la foliculogénesis siendo igualmente destacado su papel protector en el desarrollo embrionario temprano.

Algunas de las funciones descritas anteriormente han podido ser asignadas a alguna de las glicoproteínas que componen la ZP. Así el receptor primario es decir la macromolécula presente en la ZP responsable de la unión primaria con la membrana de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto ha sido identificada en distintas especies. Cabe destacar que esta glicoproteína es diferente según la especie. En el ratón, el hámster y la especie humana entre otras esta función ha sido asociada a la glicoproteína ZP3 (ZPC) sin embargo en otras especies, como el cerdo y la vaca, este papel lo juega ZPB (Wassarman, 1990; Dunbar *et al.*, 1994; Topper *et al.*, 1997; Yurewicz *et al.*, 1998; Amari *et al.*, 2001; Sinowitz *et al.*, 2001; Wassarman, 2002; Dean, 2004).

En el ratón hay evidencias de que otra glicoproteína, ZP2 (ZPA), actúa como receptor secundario. Es decir que es responsable de la unión del

espermatozoide reaccionado a la ZP (Bleil et al., 1988; Wassarman, 1988; Kopf, 1990; Yanagimachi, 1994; Topper, 1997; Sinowatz et al., 2001b; Dean, 2004). En cuanto a la glicoproteína ZP1 de ratón parece jugar un papel importante en la organización de la matriz de la ZP (Rankin et al., 1999). Sin embargo es importante destacar que sin la presencia de la glicoproteína ZP3 no se produce la formación de la ZP durante la foliculogénesis siendo por lo tanto el papel de la ZP3 clave en la fecundación al actuar como receptor primario, inductor de la reacción acrosómica (en el ratón) y estructural (Rankin et al., 1998,1999; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004).

Finalmente destacar que en la especie humana, en la rata y no se descarta que en otros mamíferos se ha detectado la presencia de una glicoproteína adicional, es decir que existen 4 glicoproteínas. Sigue siendo todavía desconocida su implicación en la interacción con el espermatozoide y en las relaciones existentes con el resto de glicoproteínas en la formación de la ZP (Lefièvre *et al.*, 2003, 2004).

3. GLICOSILACIÓN.

Estas glicoproteínas adquieren estas cadenas de carbohidratos, los oligosacáridos, mediante un proceso conocido como glicosilación. Este proceso es una forma de modificación covalente de las proteínas sintetizadas por la adición de carbohidratos. Ésta se inicia en el retículo endoplásmico rugoso y se completa en el aparato de Golgi (Kobata, 1992; Roth, 1996; Benoff, 1997a; Berger y Roth, 1997; Dennis *et al.*, 1999). Estos oligosacáridos actúan como señales en fenómenos de reconocimiento a nivel de la superficie celular. Así por citar un ejemplo son responsables de la expresión del grupo sanguíneo A, B y 0 en la especie humana.

Los oligosacáridos contienen de 2 a 10 unidades de monosacáridos o azúcares sencillos que cuando se agrupan en gran cantidad son denominados glicanos.

Las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas se clasifican en dos familias dependiendo de la naturaleza de la unión entre los oligosacáridos y la cadena polipeptídica, en N- y O- unidos (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Roth, 1996; Benoff, 1997; Berger y Roth, 1997; Dennis *et al.*, 1999).

3.1. N-GLICOSILACIÓN.

En los **oligosacáridos del tipo N-unidos** (Fig. 6) se establece una unión de tipo N-glicosídico entre el carbohidrato GlcNAc y el grupo amino del aminoácido asparagina de la proteína. Este proceso ocurre en el retículo endoplásmico rugoso (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Benoff, 1997; Berger y Roth, 1997; Dennis *et al.*, 1999). La característica principal de estos oligosacáridos es que tienen en común los cinco residuos iniciales de su cadena (Fig. 6). Esta estructura es denominada "core".

Existen tres tipos de N-oligosacáridos: **los ricos en manosa, los complejos y los híbridos** (Kornfeld y Kornfeld, 1985). Los ricos en manosa contienen únicamente residuos manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc). Sus residuos externos son Man. Los complejos pueden contener, además de los azúcares anteriores, Neu5Ac, Gal, GlcNAc y Fuc. Suelen estar formados por 2, 3, 4 ó 6 ramas. La secuencia más común de estas ramas externas es Gal β 1,4GlcNAc. Este disacárido se llama N-acetil-lactosamina, por lo cual este grupo suele denominarse tipo lactosamina (Staneloni y Leloir, 1982). Frecuentemente, el azúcar terminal es Neu5Ac. Los residuos Fuc pueden aparecer al final de la cadena o unidos al primer GlcNAc del "core". Unido al primer residuo Man del "core" puede aparecer GlcNAc; éste es el denominado residuo bisector.

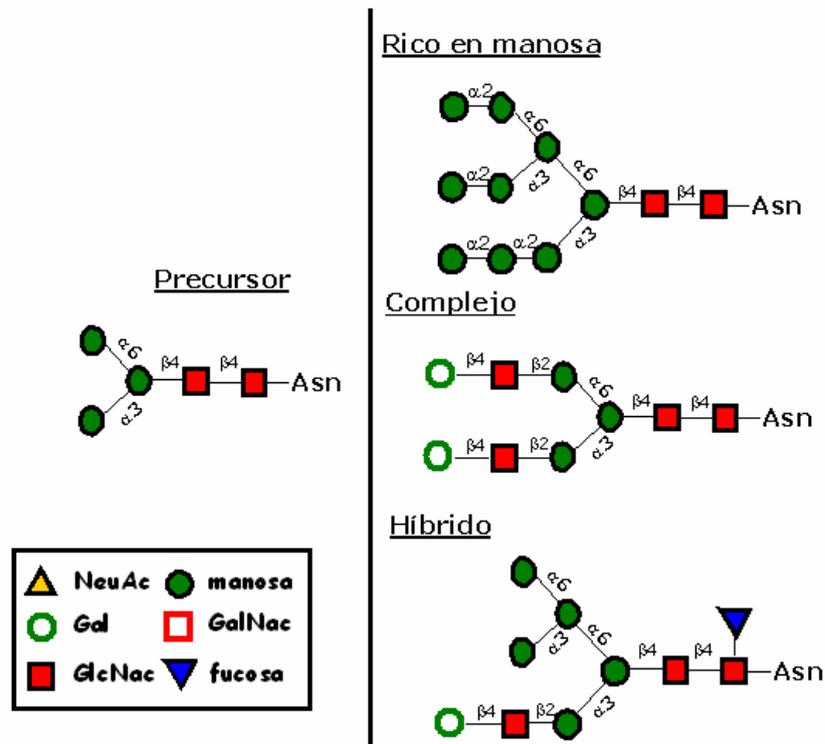


Figura 6. Estructura de los N-oligosacáridos. Precursor o "core" y los tres tipos de estructuras de N-oligosacáridos presentes en las glicoproteínas.

3.2. O-GLICOSILACIÓN.

La **glicosilación del tipo O-unidos** comienza, normalmente, en el aparato de Golgi, concretamente con una N-acetil galactosaminiltransferasa que transfiere un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNac) a la cadena polipeptídica en los residuos serina o treonina. Posteriormente se produce la elongación enzimática mediante transferasas específicas que llevará a la formación de diferentes estructuras definidas llamadas "core". Estas estructuras pueden ser modificadas por adición de grupos sulfato, siálico, acetilo, fucosa y extensiones de polilactosamina.

Como "core" se han descrito 8 estructuras bien definidas (Fig. 7) (Yamashita *et al.*, 1995; Hounsell *et al.*, 1996). A parte de estos oligosacáridos tipo O-unidos que comienzan con GalNac, llamados oligosacáridos tipo-mucina, también se han descrito otros como los que

comienzan con fucosa (O-fucosa) (Harris y Spellman, 1993) y aquellos que comienzan con GlcNAc (O-GlcNAc) que han sido identificados en glicoproteínas nucleares (Hart, 1997).

Por definición, los glicanos tipo-mucina (comúnmente los encontramos en mucinas pero también en otras glicoproteínas) tienen GalNAc en el residuo reductor y los podemos encontrar en glicoproteínas secretadas y glicoproteínas ancladas a la membrana en eucariota. A diferencia de la N-glicosilación, la O-glicosilación no comienza con la transferencia de un oligosacárido, sino con la adición de un único monosacárido, que en este caso sería la GalNAc, transferida por una UDP-GalNAc dentro de la cadena polipeptídica en un hidroxilo de los residuos serina o treonina una vez que la proteína se encuentra totalmente plegada.

Para la unión del monosacárido a la cadena polipeptídica se forma un complejo ternario entre la proteína, UDP-GalNAc y la GalNAc transferasa. La localización del compartimento subcelular donde se produce la O-glicosilación no está bien definida y puede depender del tipo de GalNAc transferasa, pero está ampliamente aceptado que se produce en la cara cis del aparato de Golgi (Haslam *et al.*, 2001). La elongación de esta GalNAc genera 8 estructuras diferentes denominadas "core" y una mayor elongación y modificación se puede producir en los "core". Si esta elongación no se produce se genera el antígeno Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) que puede ser modificado por un grupo de ácido siálico unido por enlace α 2-6 generando el sialil-Tn. La adición de residuos monosacáridicos a GalNAc tiene lugar en el complejo de Golgi, mientras que la localización de las glicosil transferasas pueden ser específicas del tipo celular (Roth *et al.*, 1986) y depende del estado de diferenciación de la célula (Perez-Vilar *et al.*, 1991).

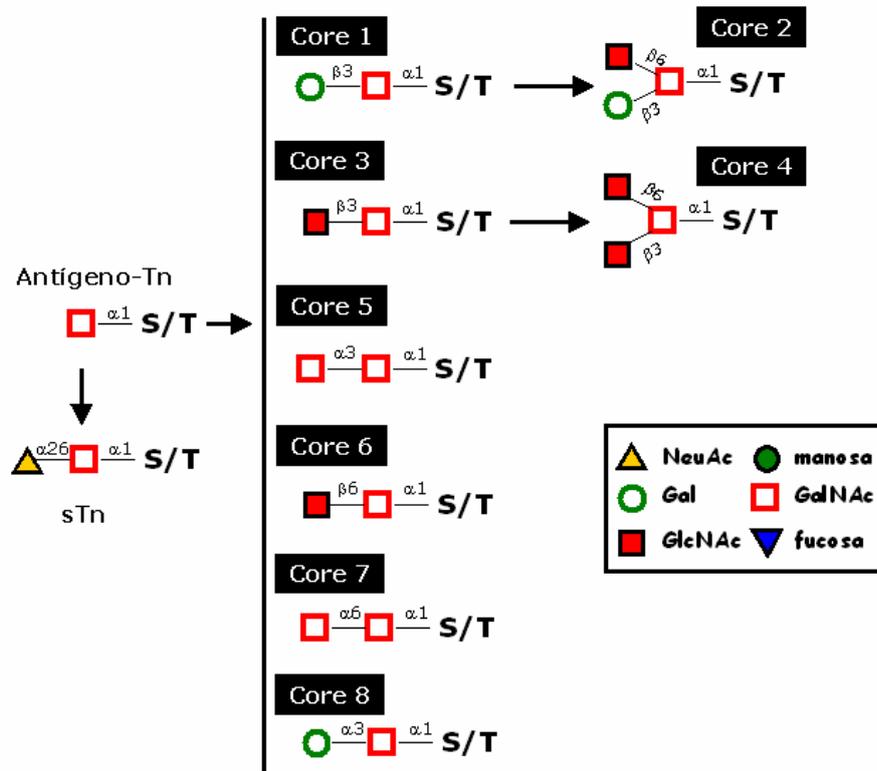


Figura 7. Estructura de los O-oligosacáridos. Composición de los 8 "core" descritos en las glicoproteínas compuestas por O-oligosacáridos.

Comparada con las estructuras N-unidas, el análisis de las O-glicosilaciones es más complicado debido en primer lugar a que la incorporación de oligosacáridos N-unidos tiene lugar en un residuo Asn que se encuentre dentro de una secuencia específica (-Asn-Xaa-Ser/Thr- o raramente -Asn-Xaa-Cys-; si Xaa es cualquier aminoácido menos la Pro). Por otro lado, cualquier Ser o Thr es susceptible a ser O-glicosilada. Segundo, en el caso de los azúcares N-unidos en una glicoproteína se encuentran normalmente separados unos de otros en secciones características del péptido mientras que los azúcares O-unidos se encuentran localizados en parches o pequeñas regiones de la cadena peptídica que contiene repeticiones de Ser, Thr y Pro. Para el análisis de los azúcares N-unidos podemos realizar la liberación mediante la enzima N-glicosidasa-F dejando intacto el péptido, mientras que para el estudio de los azúcares O-unidos no existe una enzima específica que pueda liberarlos. La Endo- α -N-acetilgalactosaminidasa puede cortar los O-glicanos unidos a

Ser/Thr pero es específica de la secuencia Gal β 1-3GalNAc, si la elongación es diferente o ésta tiene otras modificaciones no reconoce la secuencia.

3.3. TIPOS DE OLIGOSACÁRIDOS PRESENTES EN LA ZP.

Las proteínas de la ZP se encuentran de un modo general altamente glicosiladas y por ello se denominan glicoproteínas. Este componente glucídico puede llegar a constituir el 50% de la masa de algunas de estas proteínas como ocurre en ZPC de la especie murina, bovina y humana. Además, estos carbohidratos parecen jugar un papel importante en la interacción espermatozoide-ovocito (Benoff, 1997a; Shalgi y Raz, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001; Dell *et al.*, 1999, 2003).

El estudio de los componentes de la ZP ha sido muy complejo debido a la dificultad para obtener cantidades suficientes de ZP purificadas. Este hecho se acentúa mucho más cuando se pretende analizar los oligosacáridos presentes en cada una de las distintas glicoproteínas de la ZP. Estos estudios se han realizado fundamentalmente en especies de fecundación externa como el erizo de mar y los anfibios. En los mamíferos la mayoría de estos estudios se ha limitado al cerdo y la vaca. Gracias al desarrollo de técnicas analíticas mucho más sensibles y a la obtención de proteínas recombinantes este tipo de estudios se ha ampliado muy recientemente al ratón y la ZP3 humana (Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003 ; Boja *et al.*, 2003).

La ZP de ratón ha sido secuenciada y sus cadenas oligosacáridicas caracterizadas mediante técnicas muy sensibles como FAB y MALDI-TOF (Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003). La ZP de ratón en sus cadenas N-unidas contiene principalmente estructuras tipo **rico en manosa y tipo complejo** de cadenas biantenarias y presenta una menor proporción de cadenas triantenarias y tetrantenarias de oligosacáridos tipo complejo. Las estructuras terminales que encontramos en la ZP de ratón confirman estudios realizados anteriormente indicando la presencia de repeticiones de polilactosamina y galactosa (Gal) terminal unida por enlace de tipo α

(Noguchi y Nakano, 1993). Sin embargo, en este trabajo, se determina la presencia de la secuencia GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4GlcNAc que hasta ahora no había sido descrita (Easton *et al.*, 2000).

Los oligosacáridos tipo O-unidos secuenciados en la ZP de ratón presentan estructuras heterogéneas pero llevan el mismo rango de estructuras terminales que están presentes en los oligosacáridos del tipo N-unido. La mayoría de los glicanos son estructuras del tipo core 2 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6[Gal β 1-3]GalNAc) extendidos con uno o dos residuos de ácido siálico (N-Acetil o N-glicolilneuramínico), N-Acetilactosamina (Gla β 1-4GlcNAc) con uno o dos residuos de ac. siálico, Gal α 1-3Gal y GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4GlcNAc (Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003).

Las cadenas oligosacáridica de la ZP de cerdo también han sido secuenciadas (Katsumata *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1996; Yonezawa *et al.*, 1999). La mayoría de los oligosacáridos tipo O y N unidos son extensiones de repeticiones de lactosamina con un tamaño heterogéneo y con gran cantidad de grupos sulfato y ácido siálico como residuos terminales. En el cerdo, ambos tipos de oligosacáridos han sido propuestos para actuar como ligandos en la interacción con el espermatozoide (Yurewicz *et al.*, 1991; Noguchi *et al.*, 1992). Sin embargo, Bleil y Wassarman (1988), inicialmente sugirieron que en la ZP de ratón, la unión con el espermatozoide estaría mediada por los O-glicanos cuyo residuo terminal era la secuencia Gal α 1-3Gal. Se ha visto que esta secuencia se encuentra en la ZP de ratón, pero ratones transgénicos que no presentan la actividad α 1-3galactosiltransferasa son fértiles (Thall *et al.*, 1995) y la interacción entre gametos se realiza de forma normal (Liu *et al.*, 1997) por lo tanto esta secuencia no es indispensable para la interacción entre gametos.

Shur y sus colaboradores en 1992, propusieron que la β 1-4 galactosiltransferasa específica del espermatozoide, mediaba el reconocimiento con los residuos terminales de GlcNAc de los O-glicanos presentes en la ZP3 (Miller *et al.*, 1992). Pero en trabajos posteriores se ha visto que hay una cantidad pequeña de GlcNAc en las cadenas de N-

glicanos e inexistente en las cadenas de O-glicanos (Easton *et al.*, 2000). Este dato y el hecho de que ratones “knock out” que no expresan actividad β 1-4galactosiltransferasa aumenta la unión entre gametos (Lu y Shur, 1997) lleva a la conclusión de que la enzima galactosiltransferasa no juega un papel significativo en los procesos iniciales de interacción entre gametos.

Johnston y sus colaboradores (1998) propusieron que aquellas cadenas que terminan en $\text{Gal}\alpha$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc o la secuencia tipo Lewis x podrían actuar como ligandos de alta afinidad que median la interacción inicial con la proteína sp56 del espermatozoide involucrada en la interacción con el ovocito (Bookbinder *et al.*, 1995). Pero los estudios realizados por Easton (2000) demuestran que la secuencia $\text{Gal}\alpha$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc y $\text{Gal}\beta$ 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc no se encuentra en la ZP de ratón. En el ratón se encuentra fucosa unida por enlace α 1-6 a GlcNAc del core de las cadenas N-glicosiladas mientras que los O-glicanos no aparecen fucosilados.

Tulsiani y colaboradores (1991) sugieren que la unión espermatozoide-ovocito está mediada por el reconocimiento de un residuo terminal de α manosa (Cornwall *et al.*, 1991). La presencia de glicanos tipo rico manosa en la ZP apoya esta teoría.

Cahová y Dráber (1992) informaron de que el anticuerpo (Tec-02) que reconoce la secuencia terminal $\text{GalNAc}\beta$ 1-4Gal inhibe la fecundación de manera dependiente de la concentración (Cahova y Draber, 1992). Sin embargo, este anticuerpo no interfiere en la interacción inicial del espermatozoide con la ZP por lo que ellos proponen que el disacárido $\text{GalNAc}\beta$ 1-4Gal media un segundo paso en la interacción entre gametos de ratón.

3.3.1. Tipos de oligosacáridos presentes en la ZP humana.

El resultado de experimentos realizados recientemente mediante manipulación genética en los que las glicoproteínas de ratón fueron sustituidas por sus homólogas en humanos (ZP2 humana, ZP3 humana o

ambas) demuestran que estas ZP humanizadas unen espermatozoides de ratón pero no humanos, reteniendo la especificidad taxonómica de unión (Rankin *et al.*, 2003). Por esto, se acepta generalmente, que la interacción específica entre el espermatozoide y la ZP es un evento mediado por carbohidratos en diferentes especies incluyendo los humanos (Chapman y Barrat, 1997; Benoff, 1997a; Ozgur *et al.*, 1998; Dell *et al.*, 1999; Primakoff y Myles, 2002; Talbot *et al.*, 2003).

El análisis de los azúcares de la ZP humana está siendo muy complicado principalmente por la dificultad para obtener una muestra suficiente para su análisis.

El análisis bioquímico de ZP2 y ZP3 humana tratado con diferentes enzimas glicolíticas demuestran que el contenido de N-glicanos es mucho más alto que el de los O-glicanos. Las cadenas N-unidas son de tipo complejo principalmente y no aparecen cadenas tipo rico en manosa (Bauskin *et al.*, 1999). Estudios previos habían demostrado que el espermatozoide humano capacitado expresa en la superficie de la membrana plasmática un receptor para manosa (Benoff, 1998) y el pretratamiento del espermatozoide con D-manosa bloquea la unión con la ZP humana indicando que el residuo manosa podría ser importante en la interacción entre gametos. El hecho de que no se encuentren estructuras rico en manosa en la ZP humana, sugiere que tanto la secuencia de azúcares del core, como los azúcares terminales, pueden jugar un papel en la unión ovocito espermatozoide.

Experimentos de competición en la interacción ovocito espermatozoide con diferentes azúcares, el uso de lectinas que interaccionan con la ZP humana y la detección de moléculas que interaccionan con carbohidratos en la membrana plasmática del espermatozoide indican que el espermatozoide humano expresa receptores superficiales para una variedad de oligosacáridos tanto simples como complejos, incluyendo fucoidin (Oehninger *et al.*, 1990, 1991), fucosa (Tesarik *et al.*, 1993b; Lucas *et al.*, 1994), fructosa (Mori *et al.*, 1993), GlcNAC (Brandelli *et al.*, 1994) y

manosa (Mori *et al.*, 1989; Oehninger *et al.*, 1991; Brandelli *et al.*, 1994; Maymon *et al.*, 1994; Benoff *et al.*, 1997b).

En el caso de los residuos fucosa se ha visto que podrían mediar en la interacción de diferentes especies (Ahuja, 1982; Tesarik *et al.*, 1993b; Miranda *et al.*, 1997). En la especie humana concretamente se ha visto que la fucosa que se encuentra en la secuencia del antígeno Lewis estaría involucrada en la interacción debido a la capacidad que tiene el espermatozoide humano a unirse a los ovocitos del molusco bivalvo *Unio elongatulus* que contiene esta secuencia (Focarelli *et al.*, 2003).

Los residuos de galactosa (Gal) terminal también han sido involucrados en la interacción entre gametos de diferentes especies (Benoff, 1997a; Tulsiani, 1997; Shalgi and Raz, 1997). En el humano la unión del espermatozoide a la ZP se inhibe *in vitro* con la presencia de altas concentraciones de Gal o de la lectina RCA-I (Mori *et al.*, 1989; Miranda *et al.*, 1997). Esta lectina reconoce los residuos terminales de Gal unido por enlace β 1-4 a GINAc, secuencia conocida como N-Acetilactosamina.

El análisis de los azúcares presentes en la ZP3 humana expresada en ratones determina que las cadenas de O-glicanos son idénticas a las de la ZP3 de ratón (Dell *et al.*, 2003) y por lo tanto diferentes a las que contiene la ZP3 humana nativa. La ZP3 humana expresada en ratón contiene el carbohidrato NeuGc y el disacárido Gal α 1-3Gal que no se encuentran en las glicoproteínas expresadas en células humanas debido a la pérdida de la glicosiltransferasa específica para este proceso (Galili y Swanson, 1991; Chou y Jungalwala., 2002).

4. GRÁNULOS CORTICALES.

El análisis de gránulos corticales (GC) genera bastante inquietud en la investigación actual. Su conocimiento aún deja lagunas en el entendimiento de la composición y la función que tienen en los procesos de fecundación de los mamíferos, especialmente en el humano, donde la información existente

es mínima. La escasa información que poseemos se debe a la dificultad para obtener suficiente material para analizar. Este hecho es muy patente en los mamíferos y sobre todo en especies como la humana.

4.1. ORIGEN.

Diferentes estudios han evidenciado que los GC provienen del complejo de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso y su formación se produce durante el crecimiento folicular. El desarrollo de los GC puede producirse en los pequeños folículos unilaminares (Szöllösi, 1967; Kang y Anderson, 1975), en los folículos multilaminares (Guraya, 1962) o bien en el momento antes de la ovulación (Mate *et al.*, 1992).

Estos GC son estructuras rodeadas de una membrana que se localizan principalmente debajo de la membrana plasmática de los ovocitos detenidos en metafase II (Guraya, 1982; 1985; Cran, 1989; Cran y Esper, 1990, Hafez *et al.*, 2004).

4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

Los GC se caracterizan por ser estructuras esféricas de tamaño variable, entre 0,2 y 0,6 micrómetros de diámetro y por su similitud entre especies. Son una de las organelas más importantes dentro del citoplasma por el papel que desempeñan tras la entrada del espermatozoide previniendo la polispermia (Gulyas, 1979; 1980; Guraya, 1982; 1985; Schmell *et al.*, 1983; Cherr *et al.*, 1988, Hinduja *et al.*, 1990; Longo, 1991; Green, 1997; Gwatkin y Williams, 1974; Liu *et al.*, 2003).

El uso de diferentes técnicas citoquímicas parece haber demostrado la existencia de diferentes tipos de GC; sin embargo, se desconoce cual es su significado biológico. El uso de técnicas de microscopía electrónica de transmisión convencionales ha demostrado la presencia de dos tipos de GC en base a su electronodensidad. Así, aparecen unos GC densos y otros

claros a los electrones (Cherr *et al.*, 1988; Nicosia *et al.*, 1977; Hinduja *et al.*, 1990).

Recientemente gracias al uso de técnicas de microscopía confocal se ha observado en ratón que existen dos tipos de GC con una diferente distribución en el ooplasma. Estos tipos de GC han sido diferenciados debido a su diferente afinidad por la lectina *Lens culinaris* (LCA) y al anticuerpo ABL2 (Liu *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que estas diferentes propiedades de los GC podría estar relacionada con los diferentes grados de maduración del ovocito (Guraya, 1985; Liu *et al.*, 2003).

4.3. COMPOSICIÓN.

La información existente sobre composición y función de los GC en mamíferos es aún escasa (Gulyas, 1979; Guraya, 1982; Hoodbhoy y Talbot, 1994; 2001; Sun, 2003).

Las primeras evidencias sobre GC en mamíferos fueron presentadas en la década de los 50 en ovocitos de hámster (Austin, 1951). Posteriormente, en la década de los 60, los estudios se focalizaron hacia los componentes de los GC, en donde ya se establecía con ayuda del microscopio óptico su naturaleza glicoproteica en ovocitos de hámster, mono y hombre (Yanagimachi y Chan, 1961). En la década de los 70, con el uso del microscopio electrónico y la histoquímica (Kang, 1974; Selman y Anderson, 1975) se dio confirmación a lo descubierto anteriormente. Actualmente, con el uso de la histoquímica de lectinas, se ha logrado con mayor precisión la identificación del contenido de los GC (Hoodbhoy y Talbot, 1994).

En los GC de ovocitos de ratón y hámster se han encontrado residuos **α -L-Fuc y Neu5Ac** mediante el uso de lectinas como *Tetragonolobus purpureas* (LTA) y *Ulex europaeus* (UEA I) (Lee *et al.*, 1988). En rata, se evidencia la existencia del **Neu5Ac** con *Limax flavus* (LFA). De igual forma,

este azúcar fue detectado en ratón con la lectina *Maackia amurensis* (MAA). Sin embargo, las lectinas *Sambucus nigra* (SNA) y MAA fueron negativas en la rata. El disacárido **Gal β 1, 4GlcNAc** se demostró en rata, ratón y hámster con *Ricinus communis* (RCA I) y *Datura stramonium* (DSA) (Kan et al., 1990; Roux et al., 1991; Avilés, 1997). El carbohidrato **GalNAc** fue puesto de manifiesto con las lectinas *Dolichos biflorus* (DBA) y *Glycine max* (SBA), y el azúcar **GlcNAc**, detectado al introducir una sialidasa (Aviles et al., 1997) o por *Triticum vulgare* (WGA), fueron detectados tanto en ratón como en rata (Roux et al., 1991). La Lectina *Aleuria aurantia* (AAA) reacciona con los GC de ovocitos de ratón, sugiriendo la presencia de la **Fuc** en el "core" de los N-oligosacáridos (Avilés et al., 1997) y la lectina LCA reacciona con los GC de ovocitos tanto de ratón como de hámster determinando residuos **α -D-Man** (Ducibella et al., 1988; 1990; Cherr et al., 1988; Byers et al., 1992). En el cerdo, se detecta la presencia del disacárido **Gal β 1,3GalNAc** con la lectina PNA (Yoshida et al., 1993). En los GC de ovocitos de hámster se han determinado residuos de Gal, Neu5Ac y GlcNAc usando las lectinas RCA I, LFA y WGA (Kan et al., 1990; Roux et al., 1991). Recientemente, se han encontrado en GC de ovocitos no fecundados 12 componentes heterólogos glicosilados mediante las lectinas PNA, DBA, WGA, RCA, LCA y *Canavalia ensiformis* (Con A). Nueve de estos componentes glicosilados están asociados con la envoltura de los GC y/o ZP después de la fecundación y 7 de ellos se han detectado en embriones en el estado de 8 células (Hoodbhoy y Talbot, 2001).

El contenido de los GC en ovocitos de ratón incluye proteínas de peso molecular de 32 kDa (p32), que parecen estar relacionadas con el bloqueo de la polispermia (Gross et al., 2000), proteínas de 75 kDa (p75) (Pierce et al., 1990) y proteínas de peso molecular de 62 kDa (p62) y 56kD (p56) tanto en ratón como en hámster, cerdo y vaca (Hoodbhoy et al., 2001). También se ha determinado una proteína de peso molecular de 60 kDa (p60), que juega un papel importante en la prevención de la polispermia (Muñoz-Gotera et al., 2001) y una proteína placentar que liga heparina específicamente en hámster (Sinosich et al., 1990a,b).

El contenido enzimático de los GC involucra en ovocitos de vaca un activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) que puede desempeñar, por mecanismos aún no conocidos, un papel importante en la maduración y fecundación del ovocito, como también en eventos de reacción de zona, bloqueo polispermico y endurecimiento de la ZP (Rekkas *et al.*, 2002). En ratón, se han determinado enzimas proteasas tipo tripsina, que se caracterizan por que inducen la reacción zonal eliminando los receptores en la ZP (Gwatkin *et al.*, 1973; Wolf y Hamada, 1977). Con respecto a la proteasa, ésta ha sido detectada también en hámster (Gwatkin *et al.*, 1973; Moller 1990) y transforma ZP2 en ZP2f (Moller y Wassarman 1989) y es inhibida por fetuina que previene la conversión de ZP2 en ZP2f causando endurecimiento de la ZP. Esta fetuina constituye la mayor proteína del suero fetal bovino (Schroeder *et al.*, 1990). En el ratón se ha descrito igualmente la presencia de una ovoperoxidasa (Gulyas y Schmell, 1980; Schmell y Gulyas, 1980b) y la exoglicosidasa β -N-acetilglucosaminidasa (Miller *et al.*, 1993). Esta última enzima está relacionada con el bloqueo de la penetración polispermica (Miller *et al.* 1993).

4.4. REACCIÓN CORTICAL.

La reacción cortical es el proceso por el cual el contenido de los GC es liberado mediante exocitosis al espacio perivitelino. Este espacio perivitelino queda delimitado por la membrana del oocito (oolema) y la ZP. La reacción cortical se produce como respuesta a la acción de la unión y penetración del espermatozoide (Branden *et al.*, 1954, Gulyas, 1980; Guraya, 1982; Green, 1997) o bien por activación partenogenética, lo cual produce una alteración de las características estructurales y bioquímicas de la ZP y/o membrana plasmática y ocasiona una inhibición de la penetración polispermica (Szollosi, 1967, Nicosia *et al.*, 1977; Gwatkin *et al.*, 1973; Schmell y Gulyas 1980, Schmell *et al.*, 1983, Hoodbhoy y Talbot, 1994; Sun, 2003).

Mediante la exocitosis de los GC (Fig. 8) se liberan enzimas que participan en la eliminación de los receptores superficiales para los espermatozoides en la glicoproteína ZP3, lo cual previene la unión e inicio

de la reacción acrosómica en la superficie externa de la ZP (Florman y Wassarman, 1985; Yanagimachi, 1994; Litscher y Wassarman, 1996; Green, 1997).

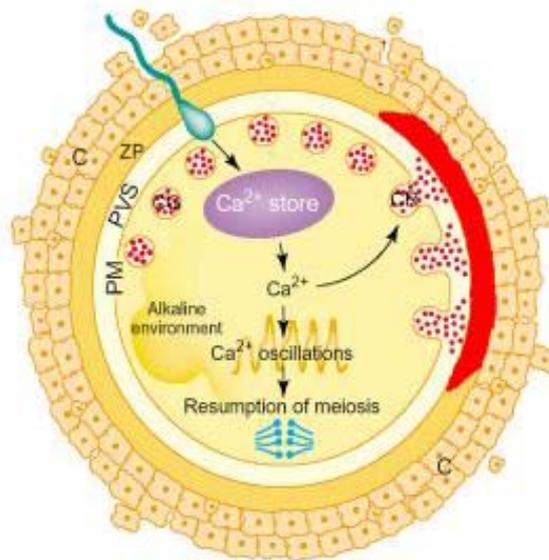


Figura 8. Activación del ovocito y exocitosis de los gránulos corticales.

Hay evidencia de que la reacción cortical también modifica la estructura de la ZP para prevenir la penetración espermática por un proceso llamado endurecimiento de zona o "zona hardening" (Ducibella et al., 1990; Green, 1997; Sun, 2003).

5. UNIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO.

Del eyaculado depositado dentro del tracto reproductivo, solamente un pequeño grupo de espermatozoides capacitados alcanzan al ovocito después de pasar a través del "cumulus oophorus" formado principalmente por células de la granulosa y ácido hialurónico (Yanagimachi, 1994). Este último paso lo logran gracias a la motilidad hiperactivada adquirida durante la capacitación y por la acción de la proteína PH-20 localizada en la membrana plasmática del espermatozoide que posee un dominio con actividad hialuronidasa (Primakoff y Myles, 2002). El debate actual en la comunidad

científica es saber como se produce la penetración del espermatozoide a través de la ZP; mediante liberación enzimática o por la movilidad que lleva el espermatozoide una vez capacitado. Recientes estudios caracterizan un canal de cationes llamado CatSper que se encuentra localizado en la pieza principal del tallo de espermatozoides de ratón maduros (Ren *et al.*, 2001). Ratones "Knock out" que no expresan este canal, tienen una motilidad muy pobre y son completamente infértiles, a menos que se retire la ZP del ovocito (Ren *et al.*, 2001). Estos estudios sugieren que para que se produzca la penetración de los espermatozoides por la ZP es necesario una motilidad vigorosa por parte del espermatozoide.

La interacción entre gametos y su posterior fusión es un proceso secuencial como se describe a continuación.

5.1. POSIBLES RECEPTORES EN LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE.

Los eventos que se desarrollan en el proceso de unión a las glicoproteínas de la ZP provienen en su mayor parte de estudios basados en el modelo murino (Wassarman *et al.*, 1995; 2001b, 2002; Dean, 2004; Hoodbhoy y Dean, 2004). Después de haber atravesado el "cumulus oophorus" el espermatozoide con acrosoma intacto se dispone a unirse a la ZP. Inicialmente la adhesión del espermatozoide es mediada por la glicoproteína ZPC y/o ZPB (receptor primario), que une a receptores de la parte anterior de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto. Esta unión se conoce como **reconocimiento primario o unión primaria** (Yurewicz *et al.*, 1998; Wassarman, 2001b; Yonezawa *et al.*, 2001; Evans y Florman, 2002; Breitbart, 2003). La unión del espermatozoide a la ZP de ratón parece estar basada en procesos de reconocimiento proteínas-carbohidratos, concretamente oligosacáridos O-unidos de la ZP3 (ZPC) (Florman y Wassarman, 1985; Wassarman *et al.*, 2001). En la actualidad, se sugiere que podrían estar implicadas diferentes proteínas al mismo tiempo formando un complejo multiproteico (Shur, 1998). Lo que sí se sabe

es que estas proteínas espermáticas serían del tipo lectina o enzima que reconocerían azúcares de la glicoproteína ZP3.

1) **β 1,4-Galactosiltransferasa (GalT)** identificada en ratón (Shur *et al* 1982; Miller *et al.*, 2002) fue una de las proteínas del espermatozoide candidata a interaccionar con la ZP (Shur y Hall, 1982). La GalT pertenece a un grupo de enzimas involucradas con la síntesis intracelular de los carbohidratos complejos en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Mc Leskey *et al.*, 1998). Una isoforma de la GalT está presente en la superficie del espermatozoide de ratón sobre la región de la cabeza y se cree que está asociado al reconocimiento específico del tipo lectina con el azúcar GlcNAc terminal presente en los oligosacáridos O-unidos que se encuentran en la ZP3 (Miller *et al.*, 1992). No se ha visto su presencia en el espermatozoide humano (Benoff, 1997b) y sorprendentemente, muchos "knock out" son fértiles pero son incapaces de inducir la reacción acrosómica en respuesta a la ZP3 (Lu y Shur, 1997).

2) La **SP56**. Este fue otro candidato para interaccionar con la ZP3. Esta proteína fue identificada originalmente en el espermatozoide de ratón por su habilidad a asociarse covalentemente con ZP3 purificada de ratón (Bleil y Wassarman, 1990). Análisis de la interacción de anticuerpos monoclonales específicos para sp56 usando microscopía óptica y electrónica sitúan la proteína en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide, apropiada para su papel de primera interacción. Además, sp56 purificada se une a la ZP de ovocitos de ratón, pero no a los embriones e inhibe la interacción del espermatozoide y el ovocito en ensayos *in vitro* (Bookbinder *et al.*, 1995). Se ha identificado en hámster y ratón pero no en el cerdo y el humano (Bookbinder *et al.*, 1995).

3) El **receptor tirosina kinasa de 95 kDa**. Este receptor fue caracterizado primeramente en ratón y se ha visto que es fosforilado mediante la unión directa de ZP3 (Leyton y Saling, 1989a). En humanos, un anticuerpo monoclonal que muestra inhibición a la interacción espermatozoide ovocito ha sido inmunoprecipitado determinando que reconoce una proteína de 95

kDa fosofotirosina (Moore *et al.*, 1987; Burks *et al.*, 1995). Este receptor tirosina kinasa de 95 kDa encontrado en humanos se ha llamado **ZRK (receptor de ZP)** y es presumiblemente similar a la proteína de ratón (Burks *et al.*, 1995). El hecho, es que la ZP3 recombinante humana, causa un incremento en la fosforilación de tirosina en la proteína de 95 kDa del espermatozoide humano que esta involucrada en el reconocimiento inicial entre gametos (Brewis *et al.*, 1998).

4) Las **espermadhesinas** son una familia de proteínas de adhesión espermática de bajo peso molecular (12-16 kDa) caracterizada parcialmente en cerdo que se unen específicamente a las glicoproteínas de la ZP (Töpfer-Petersen *et al.*, 1995; 1998; Brewis y Wong, 1999).

5) Las **zonadhesinas** son proteínas de la membrana y su aislamiento está dado por su afinidad a la ZP (Jansen *et al.*, 2001). Han sido caracterizadas en cerdo y presentan múltiples zona de unión a carbohidratos. Esta proteína transmembrana se ha mostrado que presenta una interacción altamente específica a la zona pelúcida y es un candidato en el que se ha comprobado la especie especificidad de interacción a nivel molecular (Hardy y Garbers, 1995)

6) **SED1** (p47) ha sido primeramente descrita en el espermatozoide de cerdo y recientemente también en el ratón (Ensslin *et al.*, 1998; Ensslin y Shur, 2003; Shur *et al.*, 2004) como una proteína que participa en el reconocimiento y unión del espermatozoide a la ZP. Parece que esta proteína del espermatozoide tiene capacidad de unirse a la glicoproteína ZP2 y ZP3 al menos en el ratón. El hecho de unirse a la ZP2 resulta novedoso puesto que hasta la fecha sólo se había relacionado a ZP3 con el reconocimiento primario en el ratón.

La glicoproteína mZP2 en ratón (Wassarman *et al.*, 2001b) está involucrada en la **unión secundaria** como **ligando** a través de su interacción con componentes intraacrosomales (acrosoma reaccionado), muy posiblemente por acción de la enzima acrosina, que se encuentra en la

membrana acrosomal interna (Miller *et al.*, 2002). Se han descrito otras proteínas que podrían ejercer este papel como la **PH-20**, inicialmente identificada en espermatozoide de cobayo, que además de participar como ligando, tiene el papel de la digestión de la matriz del "cumulus", dada su actividad hialuronidasa y su localización en la membrana plasmática del espermatozoide en la región posacrosomal (Hunnicuttt *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2002). La **acrosina**, enzima hidrolítica del acrosoma liberada durante la RA (Tsubamoto *et al.*, 1996). Las **P-selectina, P95 y sp38**, proteínas que se han encontrado dentro del acrosoma y son liberadas en la reacción acrosómica (RA), pueden estar involucradas como segundos receptores (Miller *et al.*, 2002). Otro tipo de proteínas como **P34H** que es una proteína epididimária, están involucradas en la adquisición de la capacidad de fecundación por el espermatozoide humano (Boue *et al.*, 1996).

5.2. MODELOS DE UNIÓN ESPERMATOZOIDES-ZONA PELÚCIDA.

Hoodbhoy y Dean, (2004) sugieren modelos de reconocimiento del espermatozoide-ovocito que pueden dilucidar el proceso de unión.

5.2.1. Unión proteína-carbohidratos.

Diferentes estudios utilizando experimentos de inhibición de la unión del espermatozoide a la ZP han observado que los carbohidratos juegan un papel importante en la unión espermatozoide-ZP (Benoff, 1997a; Shalgi y Raz, 1997; Oehninger, 2001). El estudio realizado en diferentes especies ha mostrado que existen diferencias importantes. Así, diferentes evidencias muestran que las cadenas glucídicas del tipo O-unidas presentes en ZP3 tienen un papel fundamental en el reconocimiento entre gametos en el ratón (Florman y Wassarman, 1985; Miller *et al.*, 1992; Wassarman *et al.*, 2001). En cambio, otros estudios demuestran que este papel lo juegan las cadenas glucídicas del tipo N-unidas presentes en ZPB en las especies bovina y porcina (Amari *et al.*, 2001; Yonezawa *et al.*, 2001; Yurewicz *et al.*, 1998; Nakano y Yonezawa, 2001). De todos modos existe una gran controversia sobre cual es el tipo de carbohidrato implicado en este

reconocimiento primario en general y sobre todo en el ratón puesto que algunos de los carbohidratos sugeridos como α -Gal y GlcNAc no parecen ser claves cuando se emplean animales knock-out (Nixon *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003; Dean, 2004)

Fijando nuestra atención en el carbohidrato presente en posición terminal de la cadena glucídica se ha postulado la participación de diferentes tipos en una misma especie. Estos pueden o no coincidir en las distintas especies estudiadas. Así, los carbohidratos α -Gal, GlcNAc, Fuc y Man han sido propuestos como responsables del reconocimiento primario en el ratón (Benoff, 1997; Talbot *et al.*, 2003). Igualmente se ha sugerido la participación del trisacárido Lewis^X. Este trisacárido que contiene Fuc es un potente inhibidor en la unión del espermatozoide-ZP en el ratón (Johnston *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 2004) y en el cerdo (Mori *et al.*, 2000). Sin embargo, este trisacárido no ha podido ser identificado en la ZP murina mediante técnicas citoquímicas ni biofísicas poniendo en duda su participación in vivo (Avilés *et al.*, 2000b; Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003).

Este modelo de unión mediado por carbohidratos implica que tras la fecundación se produciría la liberación de diferentes exoglicosidasas contenidas en los gránulos corticales del ovocito. Estas enzimas serían los responsables de la eliminación de los carbohidratos específicos y se produciría el bloqueo de la polispermia. Estudios preliminares han demostrado la existencia de un enzima hexosaminidasa en los gránulos corticales de ratón (Miller *et al.*, 1993) siendo esta glicosidasa la única descrita hasta la fecha en los mamíferos.

5.2.2. Modelo supramolecular.

Este modelo se podría definir del siguiente modo "La estructura supramolecular de la ZP es modificada por una proteasa liberada desde los gránulos corticales después de la fecundación que determina la unión espermática"

Este modelo supramolecular (Fig. 9) trata de explicar el proceso de unión entre el espermatozoide y la ZP mediante unos resultados obtenidos recientemente con animales modificados genéticamente (Rankin *et al.*, 2003; Dean 2004). En este estudio, los autores producen un ratón que posee una ZP humanizada es decir que las glicoproteínas ZP2 y/o ZP3 del ratón son sustituidas por sus homólogas humanas (Rankin *et al.*, 2003). Tras la fecundación, estos ovocitos con ZP humanizada son capaces de unir los espermatozoides de ratón a pesar de haberse producido la reacción cortical. Cabe destacar igualmente que la glicoproteína ZP2 de estos ovocitos no sufre proteólisis. Este fenómeno es contrario al observado normalmente en el ratón.

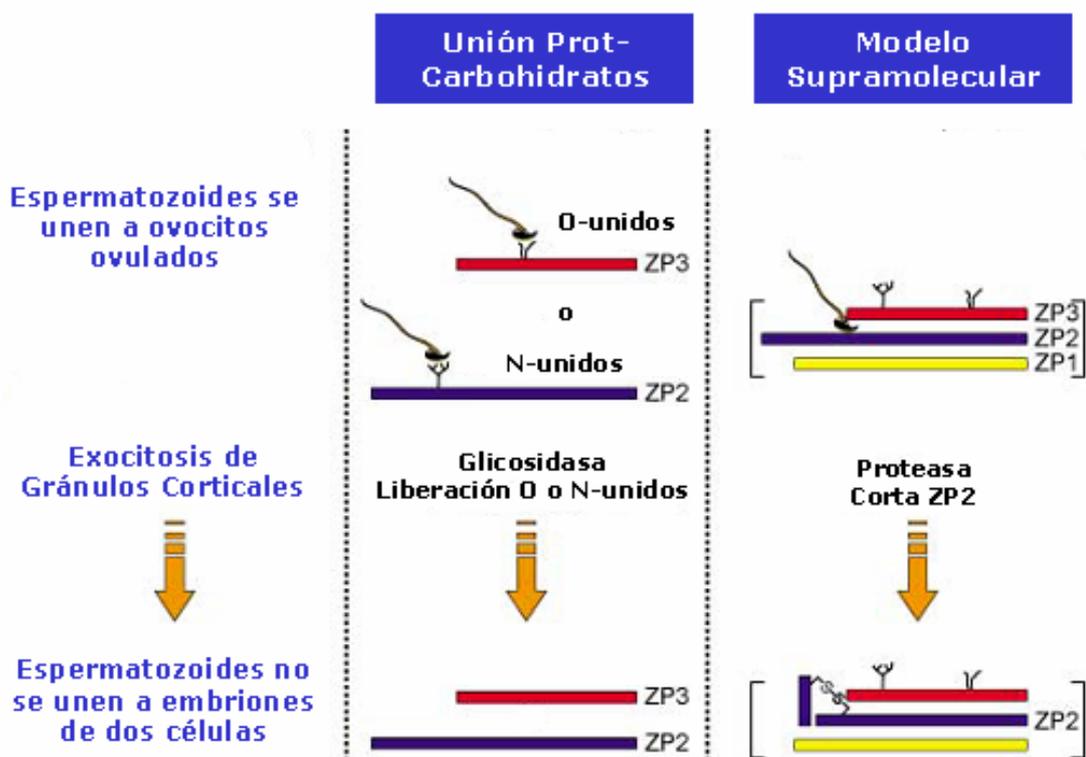


Figura 9. Esquema de los modelos propuestos de unión del espermatozoide al ovocito (modificado de Hoodbhoy y Dean, 2004).

El modelo de unión a carbohidratos no puede explicar los resultados descritos anteriormente puesto que es realmente complicado pensar que un

determinado carbohidrato pueda ser accesible a un espermatozoide y no lo sea a una exoglicosidasa de los gránulos corticales. De este modo se sugiere que tras la fecundación, la exocitosis de los GC libera una proteasa que provoca una rotura de la ZP2 (Barros y Yanagimachi, 1971, Gwatkin *et al.*, 1973). Esta rotura modificaría la estructura supramolecular de la matriz de la zona que hace imposible el anclaje del espermatozoide a su ligando presente en la ZP. De esta forma se hace posible la unión de un único espermatozoide (Hoodbhoy y Dean, 2004). Sin embargo, este modelo no aclara que molécula de la ZP está implicada en la unión del espermatozoide a la ZP.

6. REACCIÓN ACROSÓMICA (RA).

6.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

El acrosoma es una estructura vesicular que cubre el núcleo en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Aunque su forma y tamaño varían de especie a especie, su estructura básica es similar en los mamíferos euterios (Yanagimachi, 1994). La reacción acrosómica en mamíferos es la fusión, en diferentes puntos, de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide. Esta fusión causa la liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosómica interna del espermatozoide. La fusión entre membranas en el espermatozoide humano se realiza de diferente manera que en roedores y otros mamíferos, pero el resultado final es el mismo (Morales *et al.*, 1994). La RA es un evento secretor que involucra una variedad de componentes incluidos enzimas hidrolíticas como proteasas (acrosina) (De los Reyes y Barros, 2000). La liberación de las enzimas acrosomales (incluyendo hialuronidasa y acrosina) combinado con la movilidad vigorosa del espermatozoide, permiten al espermatozoide atravesar la ZP para posteriormente interactuar con el oolema del ovocito (Talbot, 1985).

La RA esta mediada por una interacción compleja de respuestas celulares, que incluye activación de kinasas con la consecuente vía de

fosforilación (Ward y Kopf, 1993; Aitken, 1997; Breitbart y Spungin, 1997). Sin embargo, la secreción del contenido acrosomal, que es activado por progesterona o zona pelúcida, está íntimamente mediado por una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Thomas y Meizel, 1989; Blackmore *et al.*, 1991; Florman, 1994; Arnoult *et al.*, 1996; Kirkman-Brown *et al.*, 2000).

Debido a la significado funcional de la reacción acrosómica, el análisis de la habilidad de los espermatozoides humanos para experimentar este cambio debe tener cierto valor diagnóstico. Desafortunadamente, la vesícula acrosómica del espermatozoide humano es tan pequeña que la reacción acrosómica no se puede detectar con el microscopio normal. Como consecuencia se ha hecho necesario el desarrollo de reactivos que se puedan utilizar para detectar esta estructura, pudiéndose monitorizar fácilmente su integridad. Se han introducido dos clases de ensayo, los que se realizan con anticuerpos monoclonales y los que utilizan lectinas de plantas, unidas normalmente a una tinción como la fluorescencia. Tanto los anticuerpos monoclonales como las lectinas se pueden dirigir contra el contenido acrosómico o contra la membrana externa del acrosoma. Con estos ensayos, la región acrosómica de los espermatozoides acrosómicamente intactos presentan una fluorescencia brillante y uniforme. Sin embargo, cuando ocurre la reacción acrosómica, desaparece gradualmente la fluorescencia sobre la región acrosómica. En el caso de la tinción usada más comúnmente, la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) asociada al isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC), la reacción acrosómica se asocia con la aparición de un modelo punteado de tinción sobre el acrosoma, seguido por la restricción de la tinción a una banda alrededor de la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide que se va estrechando hasta desaparecer totalmente. La PSA interactúa con los grupos carbohidratos de la membrana externa del acrosoma, dando una indicación del destino de esta estructura durante la reacción acrosómica. En estudios en los cuales se ha comparado la habilidad para detectar mejor el estado del acrosoma de la lectina o de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el contenido de la vesícula acrosómica se ha llegado a la conclusión de que el

primer sistema es el ensayo más sensible, ya que la membrana del acrosoma se pierde antes de que se disperse totalmente el contenido de la vesícula (Aitken, 1990).

6.2. INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA POR PROGESTERONA.

El espermatozoide antes de ponerse en contacto con el ovocito tiene que atravesar las células de cúmulo. El efecto de las células del cúmulo en el espermatozoide in vivo, no ha sido todavía establecido, sin embargo, parece ser que el paso a través de esta barrera prepara a los espermatozoides para la RA (Tesarik *et al.*, 1988). Se ha visto que la reacción espontánea de los espermatozoides aumenta sensiblemente cuando son incubados con células del cúmulo (Carrell *et al.*, 1993). La principal causa de que el cúmulo tenga la actividad de inducir la RA es debido a la producción de progesterona por estas células. Las células del cúmulo durante la ovulación son capaces de sintetizar 5-10 μM de progesterona (Osman *et al.*, 1989). El efecto de la progesterona en el espermatozoide es principalmente una rápida activación del influjo de Ca^{2+} .

Se ha visto que el efecto de la progesterona en la RA de espermatozoide humano, no sigue el mecanismo de acción clásico ejercido por las hormonas esteroideas, que implica la entrada de la hormona en la célula, uniéndose a receptores nucleares con la consiguiente modulación de la transcripción. En realidad, la transcripción es inactivada en espermatozoides maduros y los flujos de calcio inducidos por progesterona, se producen a los pocos segundos tras la adicción de la hormona. Por otro lado, si la progesterona se encuentra conjugada con una proteína que impida la rápida penetración de este esteroide a través de la membrana del espermatozoide, se observa que se produce una respuesta semejante a la ejercida por la hormona libre (Osman *et al.*, 1989; Meizel y Turner, 1991; Blackmore *et al.*, 1991). Todos estos datos sugieren que la progesterona induce la RA por un mecanismo no genómico, probablemente implicando a un receptor presente en la superficie del espermatozoide.

Cuando el espermatozoide es tratado con progesterona hay una rápida elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular (1 o 2 minutos) que ha sido observado mediante fluorimetría (Meizel *et al.*, 1997; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). El aumento del Ca^{2+} intracelular lleva consigo un descenso del Ca^{2+} en el medio, indicando un influjo de Ca^{2+} del exterior al interior de la célula (Plant *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1996) y esto va acompañado con una despolarización del potencial de membrana (Foresta *et al.*, 1993). La inducción de la reacción acrosómica por la progesterona es sensible a la modulación de canales de calcio regulados por voltaje (Shi y Roldan, 1995; Kirkman-Brown *et al.*, 2000). La inducción del flujo de Ca^{2+} y la RA mediada por progesterona parece estar involucrado el receptor de GABA. GABA induce la RA en espermatozoide humano de manera dependiente y esta respuesta aparece inhibida con la utilización de antagonistas del receptor GABA tales como bicucullina (Wistrom y Meizel, 1993; Calogero *et al.*, 1999). Espermatozoides incubados con progesterona más GABA muestran un significativo incremento en la RA comparado con espermatozoides incubados solo con progesterona (Roldan *et al.*, 1994). Por otra parte, también se ha visto que la incubación de espermatozoides con progesterona (simulando el efecto de las células de la granulosa) potencia la capacidad de estos a interaccionar con la ZP (experimentos realizados mediante ensayos de hemizona) y a penetrar los ovocitos de hámster (Sueldo *et al.*, 1993; Oehninger *et al.*, 1994).

Aunque la progesterona es un efectivo inductor de la RA, se acepta generalmente, que la función de este esteroide es secundaria o es un co-inductor debido principalmente a que la vía por la que progesterona es capaz de inducir la exocitosis acrosomal es diferente a la vía que utiliza la ZP (Tesarik *et al.*, 1993a; Hirsch *et al.*, 2005). El papel central de inductor de la RA sería la ZP, basado en el concepto de que proveería de la especie especificidad en fecundación.

6.3. INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA POR ZONA PELÚCIDA.

El estudio de la inducción de Ca^{2+} por la ZP se ha realizado principalmente en el modelo murínico, donde hay una primera despolarización, seguida por un segundo estado de influjo de Ca^{2+} (Florman *et al.*, 1998). El primer estado de influjo de Ca^{2+} es muy breve (200-300 ms; Arnoult *et al.*, 1999) y ocurre debido al acoplamiento con un canal de calcio regulado por voltaje. Esta señal inicial es seguida por una elevación sustancial de los niveles de Ca^{2+} intracelular, que es dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular pero que ocurre mediante rutas de influjo separadas (Florman *et al.*, 1998; Darszon *et al.*, 1999). Diferentes rutas celulares están involucradas en la estimulación de la RA. Ha sido demostrado que el heterodímero de proteína G sensible a la toxina pertussis es necesario para que la ZP induzca la RA en el modelo murínico (Kopf, 1990). La proteína G actúa como un elemento de traducción de la señal seguidamente a la interacción ZP3 con el receptor, produciendo cambios en la conductancia y/o una activación de sistemas en cascada de segundos mensajeros intracitoplasmáticos que resulta en la liberación del contenido acrosomal (Kopf, 1990). De forma muy simple, el aumento inicial de la concentración de Ca^{2+} activa una fosfolipasa C que genera inositoltrifosfato y diacilglicerol que resultaría en la activación de diferentes rutas intracitoplasmáticas y el resultado final de la fusión de membranas (Kirkman-Brown *et al.*, 2002). Experimentos en humanos, roedores, y cerdos sugieren que el canal neuronal receptor de glicina regulado por Cl^- podría estar involucrado en la inducción de RA por la ZP (Melendrez y Meizel, 1995; Turner *et al.*, 1997; Llanos *et al.*, 2001). También, ha sido propuesto que la ZP activa un canal de calcio activado por bajo voltaje de tipo T y que es insensible a la toxina pertussis (Florman *et al.*, 1998; O'Toole *et al.*, 2000).

En ratón, la especie mejor estudiada, la exocitosis acrosomal esta fisiológicamente inducida por los componentes de la ZP, particularmente

ZP3 (Bleil y Wassarman, 1980a; Florman y Storey, 1982; Florman y Wassarman, 1985; Ward *et al.*, 1992). En los primeros ensayos, en ratón, se observó ciertos motivos de carbohidratos (oligosacáridos O-unidos) de la ZP3 se encuentran implicados en la inducción de la RA (Beebe *et al.*, 1992) y que un pequeño péptido obtenido de la digestión con pronasa de la ZP de ratón tiene capacidad de inducir la RA (Litscher y Wassarman, 1996).

En humanos, la activación de la RA por la ZP es menos conocida debido, probablemente, a la escasez de material (ovocitos) para realizar los experimentos. Cross, 1988 fueron los primeros en demostrar que el tratamiento de espermatozoides humanos en suspensión con ZP humana disgregada (2-4 ZP/ μ l) incrementa la incidencia de espermatozoides reaccionados (Cross *et al.*, 1988). Se sabe desde hace tiempo, que la zona solubilizada induce la RA en humanos (De Jonge, 1996; Liu y Baker, 1996; Henkel *et al.*, 1998; Sabeur *et al.*, 1998). Y también está claro, que está asociado con un aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático (Patrat *et al.*, 2000). Estudios usando ZP3 recombinante humana tiene la capacidad de inducir RA en espermatozoides humanos (Brewis *et al.*, 1996). También es importante considerar que la RA en espermatozoide humano puede ser inducida por ZP solubilizada de ratón (Lee *et al.*, 1987). Sin embargo, no se sabe cómo se produce el flujo de calcio en espermatozoides humanos y ratones de la misma manera. Lee, 1992, demostraron que el tratamiento de espermatozoides humanos con toxina pertussis inhibe la inducción de la RA por la ZP (Lee *et al.*, 1992). Sin embargo, la inducción de la RA por el ionóforo A-23187 no es inhibido por el pre-tratamiento con la toxina. En el laboratorio del Dr Franken mostraron que la ZP induce la RA de manera dependiente en un rango de 0.25-1 ZP/ μ l y también confirmaron que la proteína G está involucrada en la inducción de la RA por la ZP en espermatozoides humanos (Franken *et al.*, 1996).

factores de crecimiento (Lax *et al.*, 1994; Breitbart, 2003), factores de activación plaquetaria (Krausz *et al.*, 1994), ácido gamma-amino butírico (Shi *et al.*, 1997), péptido natriurético auricular (Rotem *et al.*, 1998), neoglicoproteínas (Brandelli, 1997) y la β 1,4-galactosiltransferasa (GalT), que actúa como activador de la señal de traducción y la RA (Miller *et al.*, 2002).

En diversos trabajos se han presentado algunos de los cambios fisiológicos producidos en el espermatozoide que se requieren para la reacción acrosómica. Por ejemplo, en la capacitación espermática en ausencia de calcio, la reacción acrosómica no se realiza de forma adecuada. Si subsecuentemente se le adiciona calcio, la reacción acrosómica se realiza de forma sincronizada (Fraser, 1998). El ionóforo de calcio A23187 ha sido ampliamente utilizado para inducir RA en espermatozoides *in vitro*. De igual forma, la lisofosfatidilcolina en espermatozoides de cobayo, toro y hombre es un efectivo inductor de la RA (Parrish *et al.*, 1988; Zini *et al.*, 1995). El mecanismo por el cual se regula el calcio dentro del espermatozoide involucra a la membrana plasmática y al calcio intracelular, que es unido al acrosoma y a la mitocondria. En el espermatozoide capacitado, la unión del receptor del espermatozoide a la ZP alcaliniza el pH citosólico. Tras ello se produce la apertura voltaje sensitiva de los canales de calcio y el consecuente incremento de calcio induciendo la RA. Este mecanismo se ha evidenciado en la RA de espermatozoides de toro (Breitbart, 2002; 2003).

La inducción de la RA mediante el ionóforo de calcio y la detección de los cambios fisiológicos mediante PSA-FITC es el método óptimo mas recomendado para el estudio de la RA en espermatozoides humanos (Cummins *et al.*, 1991; ESHRE Andrology Special Interest Group, 1996; Kohn *et al.*, 1997; Oehninger *et al.*, 2000).

7. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

La biotecnología ha sido una herramienta importante en el desarrollo científico de nuestros tiempos. En el último cuarto del siglo XX, el estudio

de los mecanismos de funcionamiento de la célula, en las áreas de microbiología, fisiología celular y bioquímica se consolidaron aceleradamente gracias al progreso de una nueva disciplina: la biología molecular. La explotación del potencial industrial del cultivo de células alcanza un nivel imprevisto cuando las herramientas de la biología molecular se incorporan a los procesos biotecnológicos. Surge así la biotecnología moderna, cuyo ámbito de aplicación se ha extendido rápidamente a células de seres de todo tipo, incluyendo las de organismos pluricelulares como las plantas, los animales y el ser humano mismo. La tecnología de ADN recombinante consiste en la aplicación de técnicas de biología molecular para transferir genes que codifican para nuevas características de un organismo a otro. El organismo donador no necesariamente debe estar filogenéticamente relacionado con el receptor o huésped, que una vez generado se denominará organismo manipulado genéticamente (OMG). Los genes transferidos codifican para la síntesis de proteínas que no se producían anteriormente en el huésped, éstas se denominan proteínas recombinantes.

Las ventajas que presenta la producción de una proteína bajo la forma de proteína recombinante son:

- Permite obtener a partir de un microorganismo, cultivo de células, planta o animal una proteína completamente ajena, tal es el caso de la producción de insulina en bacterias, anticuerpos humanos en plantas y vacunas en levaduras.
- Se obtienen grandes cantidades del producto, fácil de purificar y más barato, en comparación con el purificado a partir de su fuente natural (en el caso de la insulina, se obtenía a partir de páncreas de animales).
- Se obtienen productos libres de patógenos y otros riesgos potenciales. Esto es particularmente importante en el caso de los productos farmacéuticos, ya que mucha gente ha contraído enfermedades como SIDA y hepatitis B o C por empleo de hormonas o factores derivados de suero o sangre (por ejemplo, los factores de coagulación para el tratamiento de la hemofilia ahora pueden

administrarse como proteínas recombinantes, libres de contaminación).

- Pueden producirse proteínas que no existen en la naturaleza, como ciertas estructuras de anticuerpos denominadas "anticuerpos de cadena simple", útiles en el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades.

Los avances realizados en los últimos años en el campo de la fecundación en humanos y especialmente las investigaciones que pretenden aclarar los mecanismos moleculares responsables de la interacción espermatozoide-ZP son bastante restrictivos comparados con el modelo de ratón. Esto es debido a diferentes razones. La primera es que la cantidad de ZP humana que podemos obtener es mucho más limitada que en otras especies. La segunda es que las modificaciones que se pueden realizar con este material y los ensayos de fecundación están sometidos a fuertes controles legislativos debido a razones bioéticas. De esta manera, la posibilidad de obtener un material humano biológicamente activo y en grandes concentraciones dará un impulso importante para despejar las claves de la interacción del ovocito con el espermatozoide en humanos.

7.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES RELACIONADAS CON LA FECUNDACIÓN.

Hasta la fecha, la expresión de las proteínas recombinantes de la ZP de diferentes mamíferos ha facilitado el estudio de la interacción entre gametos. Kinlock *et al* (1991) fueron los primeros en demostrar que es posible la expresión de ZP3 recombinante de ratón biológicamente activa. Entendemos esto como la capacidad de la ZP recombinante para inducir la reacción acrosómica. Además, experimentos de exon swapping y mutagénesis con genes de ZP3 demostraron que una región dentro del C-terminal sería la responsable de iniciar la reacción acrosómica y que los carbohidratos del tipo O-unidos dentro de esta región serían importantes para esta actividad (Kinloch *et al.*, 1995). Importantes avances en fecundación han sido desarrollados con otro tipo de proteínas recombinantes implicadas en la fecundación, como con la proteína de

espermatozoide acrosina. La síntesis de proacrosina recombinante mutada por delección en una zona central, ponía en relevancia esta zona en la interacción con grupos polisulfato de la zona pelúcida nativa y la importancia del plegamiento y la conformación expuesta por la proteína para el reconocimiento entre proteínas (Jansen *et al.*, 1995).

Las proteínas recombinantes de la ZP no han sido expresadas solamente en ratón sino también en otras especies. Por ejemplo, Prasad *et al.* (1996) usaron la proteína recombinante de conejo de 55 kDa (homóloga a la ZP1 de ratón) para generar un antisuero policlonal y localizar la proteína nativa de 55 kDa. La ZP3 de hámster ha sido expresada en células de carcinoma embrionario (Kinloch *et al.*, 1991); La ZP3 de mono ha sido expresada en *Escherichia Coli* (Kaul *et al.*, 1997); La ZP2 de cerdo ha sido expresada en *E. Coli* (Tsubamoto *et al.*, 1999), en células CHO y células 293T (Yamasaki *et al.*, 1996), mientras que ZP1 de cerdo ha sido expresada como una proteína de fusión a β -galactosidasa en *E coli* (Gupta *et al.*, 1996).

La clonación del gen de la ZP3 humana (Chamberlin y Dean, 1990) ha facilitado el estudio de las glicoproteínas implicadas en la interacción de gametos en la especie humana. La ZP3 recombinante humana ha sido sintetizada en diferentes sistemas de expresión; en bacterias como *Escherichia coli* (Chapman y Barrat, 1996), en levaduras como *Pichia pastoris* (Harris *et al.*, 1999), en cultivos de tejidos de insectos como *Spodoptera frugiperda* (Harris *et al.*, 1999) y últimamente con más frecuencia debido a la semejanza de la maquinaria de síntesis de glicoproteínas, se está expresando en líneas celulares de mamíferos como células de ovario de hámster chino (CHO) (van Duin *et al.*, 1994; Barratt y Hornby, 1995; Brewis *et al.*, 1996) y concretamente en líneas celulares humanas como células de teratocarcinoma ovárico (PA-1) (Dong *et al.*, 2001) o líneas celulares de riñón embrionario (293T) (Martic *et al.*, 2004).

7.2. GENERALIDADES DE GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA HUMANA.

Van Duin y colaboradores (1994) expresaron ZP3 recombinante en células CHO (rhZP3). Esta proteína tiene un peso molecular aparente de 55-60 kDa ligeramente mas pequeña que la proteína nativa. Esta diferencia se debe probablemente al diferente patrón de glicosilación La rhZP3 induce la reacción acrosómica de los espermatozoides y promueve la fusión de espermatozoide humano con ovocitos de hamster libres de ZP (van Duin *et al.*, 1994). Estudios posteriores indicaron que rhZP3 induce cambios en los niveles de calcio intracelular en el espermatozoide humano activando la reacción acrosómica en un 59% de los espermatozoides (Brewis *at al.*, 1996). Con estos datos podemos concluir que ZP3 recombinante humana expresada en células CHO es biológicamente activa.

En el laboratorio de Sergio Oehninger (2001) realizaron la expresión de ZP3 recombinante humana en células de teratocarcinoma ovárico. Esta glicoproteína tiene un peso molecular de 65 kDa semejante al peso molecular de la ZP3 nativa. Mediante experimentos de hemizona demostraron que esta glicoproteína es un potente, específico y competitivo inhibidor de la interacción espermatozoide-zona pelúcida. También demostraron la capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos

Recientemente el laboratorio de Jurrien Dean (2004) ha realizado la expresión de ZP3 recombinante humana en células CHO con deficiencia de glicosilación para poder realizar el análisis mediante espectrometría de masas de la estructura proteica y poder determinar con exactitud los sitios de glicosilación, los puentes disulfuro y estructura secundaria de la proteína ZP3 humana.

7.3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA.

La producción de ZP humana recombinante con actividad biológica en los diferentes sistemas está cargado de dificultades técnicas. Debemos ser capaces de establecer sistemas fiables y repetitivos para poder obtener estas proteínas en concentraciones óptimas para la comunidad científica.

7.3.1. Expresión en *E. Coli*

La expresión de ZP recombinante en este sistema lleva principalmente a la producción de proteínas insolubles y deglicosiladas aunque podemos obtener pequeñas cantidades de proteína purificada y solubilizada mediante un limitado número de experimentos (Harris *et al.*, 1999). Los primeros experimentos para obtener la proteína en toda su longitud se realizaron usando los genes de conejo, cerdo y perro sin modificaciones, pero los resultados mostraron que estos productos aparecían totalmente degradados antes de poder realizar la purificación. El segundo paso fue modificar el gen que iba a ser expresado retirando el codón que codificaba para una zona hidrofóbica en el C-terminal pero esta modificación no llevo a diferencias significativas. Finalmente se optó por el uso de fragmentos de genes que fusionarían una cola de histidinas en el carbonilo terminal tal y como había desarrollado el grupo del Dr. Gupta (1996) para estudiar la rZP3 α de cerdo (Gupta *et al.*, 1996).

La expresión en *E. Coli* nos permite estudiar la contribución de la proteína frente a los carbohidratos. La expresión de ZP3 humana en bacterias hace que esta proteína no este glicosilada y es incapaz de inducir la RA en espermatozoides humanos (Barratt y Hornby, 1995). Estudios recientes revelan que las proteínas recombinantes de la zona pelúcida de primates expresadas en *E. Coli* (r-bmZP) tienen la capacidad de unirse a la cabeza de los espermatozoides capacitados y producen la inducción de la reacción acrosómica tras 18 h. de incubación del espermatozoide con r-bmZPC (ZP3) (Gahlay *et al.*, 2002). Mientras, que la síntesis de ZP2

recombinante humana expresada en *E coli* tiene la capacidad de unirse a los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica jugando un papel importante como receptor secundario de la interacción ovocito-espermatozoide y en la penetración del espermatozoide a través de la ZP (Tsubamoto *et al.*, 1999). Para delimitar el papel de los carbohidratos en la interacción de mayor afinidad con el ligando del espermatozoide y consecuentemente conocer con exactitud la ruta de transducción de la señal es importante realizar experimentos con proteínas recombinantes glicosiladas.

7.3.2. Expresión en cultivos de tejidos de insectos

Para la expresión de proteínas recombinantes se ha usado un sistema en el que un baculovirus es utilizado como vector infectando células de insecto (*Spodoptera frugiperda*, Sf9). Este sistema no es muy utilizado debido a la presencia de fracciones insolubles de proteína recombinante que conlleva importantes problemas de purificación de la proteína biológicamente activa (Harris *et al.*, 1999).

7.3.3. Expresión en levaduras

Este sistema de expresión ha sido ampliamente utilizado para obtener cantidades sustanciales de material (mg proteína recombinante/l medio de cultivo) de un amplio número de proteínas de interés comercial como el factor de necrosis tumoral y el factor de crecimiento epidermal (revisión Cregg *et al.*, 1993). Sin embargo, debemos remarcar el hecho de que la estructura de las cadenas oligosacáridicas ancladas a la proteína secretada en levaduras como *Pichia pastoris* no refleja exactamente los patrones de los glicanos anclados a las proteínas expresadas en células de mamíferos, de manera que tales diferencias deben alterar la actividad biológica de la ZP recombinante.

7.4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZP HUMANA EN LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS.

7.4.1. Expresión en células CHO

El estudio realizado por Harris et al, 1999 comparando los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes de la ZP nos indica que este sistema es el más favorable para la síntesis y purificación de proteína recombinante de la ZP humana con actividad biológica debido a varias razones. Solamente, de los sistemas descritos anteriormente, en células CHO la proteína recombinante es excretada en el medio de cultivo facilitando su recuperación. El peso molecular de las rhZP expresadas fue bastante semejante al de la ZP nativa en comparación con los otros sistemas.

7.4.1.1. Características del modelo de expresión en células CHO.

De la línea celular CHO, obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), existen múltiples variantes mutacionales, lo cual amplía las posibilidades de su uso en el estudio de la genética de eucariontes.

La línea original se caracteriza por ser aneuploides con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, su cariotipo no sólo tiene un número cromosómico moderado, sino que también es heteromórfico, por lo que se hace fácil la individualización de los tipos cromosómicos que lo integran. Como material de laboratorio es de fácil manejo, puede ser cultivada de diferentes formas y su mantenimiento es relativamente económico.

La síntesis de proteínas recombinantes en células CHO ha sido ampliamente utilizada. Existe una extensa bibliografía sobre las necesidades de crecimiento y proliferación de estas células y un conocimiento exhaustivo de la maquinaria de síntesis de proteínas ofreciéndonos importantes

ventajas a la hora de elegir este sistema de expresión. Por otro lado también es importante tener en cuenta que la maquinaria encargada de la síntesis de las cadenas oligosacáridicas difiere de la comprendida en células humanas de manera que la diferente glicosilación producida en una proteína puede modificar su actividad biológica.

Uno de los propósitos de la industria biotecnológica es producir glicoproteínas biológicamente activas tales como factores de crecimiento, hormonas, enzimas que lleven consigo carbohidratos que no sean inmunogénicos, que tengan la máxima actividad biológica, estabilidad, vida media y que les permita un óptimo reconocimiento célula-célula. Por esto es importante conocer los patrones de glicosilación de las proteínas expresadas por estas células.

7.4.1.2. Glicosilación en células CHO.

Mediante el estudio de los patrones de glicosilación producidos por las células CHO podemos predecir el conjunto de N- y O-glicanos expresados por estas células y la capacidad de unión a lectinas.

Es importante destacar que diferentes parámetros; el suero o las proteínas que contiene el medio de cultivo, los niveles de glucosa, el pH del cultivo, los niveles de amonio o la forma de crecimiento de las células, influyen significativamente en los patrones de glicosilación de las proteínas recombinantes, por ejemplo el grado de sialilación se ve afectado por las condiciones del medio de cultivo (Andersen y Goochee, 1994; Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004).

7.4.1.2.1. N-Glicosilación:

Las proteínas recombinantes expresadas en células CHO contienen los tres tipos de N-glicosilación; tipo híbrido, tipo rico en manosa y tipo complejo con repeticiones N-acetilactosamina (Spellman *et al.*, 1989; Aeed *et al.*, 1992; Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004). La proporción en la que encontramos estos tipos de N-glicosilación varía de unas proteínas a

otras pero el tipo complejo es el que aparece siempre en mayor proporción. En las estructuras tipo complejo podemos encontrar cadenas biantenarias, triantenarias o tetraantenarias y también en diferente proporción dependiendo de la proteína. Las proteínas recombinantes renina y el activador del plasmonógeno (tPA) contienen mayor proporción de cadenas biantenarias (Spellman *et al.*, 1989; Aeed *et al.*, 1992), mientras que el factor de estimulación de macrófagos y la eritropoyetina humana contienen mayor proporción de cadenas tetrantenarias (Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004). La mayoría de las cadenas tipo complejo tienen un residuo fucosa unido por enlace α 1,6 al residuo N-acetilglucosamina unido a Asn de la cadena peptídica (Spellman *et al.*, 1989; Aeed *et al.*, 1992; Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004); sin embargo, estas células, no presentan actividad α (1,3)fucosiltransferasa (Campbell y Stanley 1983) por lo tanto son incapaces de añadir fucosa a la secuencia N-acetilactosamina para formar las estructuras Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, sialil Lewis^a y sialil-Lewis^x determinantes de los grupos sanguíneos humanos.

Una característica general muy importante es que la mayor parte de las cadenas de azúcares se presentan grupos de ácido siálico y podemos encontrar tres tipos de ácido siálico diferentes unidos por enlace α 2-3, el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y el N-acetil-9-O-acetilneuramínico (Neu5,9Ac₂) (Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004). La mayor parte de los residuos de ácido siálico los encontramos unidos a galactosa (Gal) terminal unidos por enlace α 2-3. Esto es importante puesto que el carbohidrato Gal terminal puede ser uno de los azúcares determinantes en la interacción de glicoproteínas, pero se ha visto que no todas las Gal aparecen unidas a grupos de ácido siálico (Tsuda *et al.*, 1988). También es importante destacar que las células CHO no contienen β galactosa α 2-6 sialiltransferasa funcional por lo que ácido siálico terminal unido por enlace α 2-6 no lo vamos a encontrar en las cadenas de azúcares (Lee *et al.*, 1989; Minch *et al.*, 1995). Otra característica importante de la maquinaria de glicosilación de las células CHO es que no presentan actividad α 1-3galactosiltransferasa por lo tanto

nunca encontraremos la secuencia Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R (Smith *et al.*, 1990).

La producción de glicoproteínas con carbohidratos de estructura definida y una mínima heterogeneidad es importante para estudios funcionales de estos carbohidratos en mamíferos. Para facilitar tales estudios, diferentes mutantes se han desarrollado en las células CHO. Estos mutantes pueden expresar entre dos y cuatro mutaciones en su glicosilación y todos estas líneas pueden crecer óptimamente a pesar de la simplificación de sus estructuras glicosacarídicas. Un ejemplo claro lo encontramos en los mutantes LEC11 y LEC12 con capacidad de expresar actividad α (1,3)fucosiltransferasa no detectable en la células CHO parentales (Campbell y Stanley 1983). La enzima α (1,3)fucosiltransferasa transfiere fucosa a GlcNAc en las unidades de lactosamina generando los determinantes Le^a, Le^b, Le^x, sialil-Le^x, sialil-Le^a y sialil-Le^b secuencias glicosacarídicas críticas en el control específico de los eventos de adhesión célula-célula (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990). La expresión de proteínas recombinantes en estas líneas celulares nos ayudaría comprender el papel que juegan estas cadenas oligosacarídicas.

7.4.1.2.2. O-Glicosilación:

La glicosilación tipo O puede jugar un papel importante en la disposición de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína. Otvos *et al.* (1995) mostraron que la glicosilación, distorsionaba la hélice- α en péptidos sintéticos homólogos y que la glicosilación tipo O-unida en Treonina (Thr) es mas eficiente en conservar la estructura secundaria que la glicosilación tipo N. Por otra parte, los oligosacáridos tipo O son elementos cruciales en algunas interacciones glicoproteína-proteína, como se ha demostrado con la pérdida de reconocimiento entre diferentes proteínas después de la deglicosilación, un ejemplo típico son los ligandos tipo selectina.

Por todo esto es importante conocer cuales son los posibles oligosacáridos tipo O que podemos encontrar en las glicoproteínas expresadas en células CHO. La principal secuencia oligosacáridica encontrada en distintas proteínas es la del tipo core 1 (Gal β 1-3GalNAc) y en la mayoría encontramos uno o dos grupos de Neu5Ac unido por enlace α 2-3 a la Gal y por enlace α 2-6 a la GalNAc (Inoue *et al.*, 1993; Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004), en menor medida encontramos los azúcares; GalNAc-Ser/Thr y Neu5Ac α 2-6 GalNAc-Ser/Thr (Linsley *et al.*, 1994).

Una característica importante es que las células CHO expresan niveles muy bajos de la actividad enzimática Gal β 1-3GalNAc-R β 1-6-N-acetilglucosaminiltransferasa (core2 GlcNAc-T) (8-12 pmol/mg/h) para formar las estructuras core 2 de los oligosacáridos O unidos (Datti y Dennis, 1993). La enzima GlcNAc-T, localizada en el aparato de Golgi, se encarga de sustituir las estructuras tipo core 1 para producir las estructuras de tipo core 2 (Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc α). Esta enzima se ha visto que es importante para la extensión de las cadenas O unidas con repeticiones de polilactosamina (Yousefi *et al.*, 1991). Pero la adición de butirato en el medio de células CHO en proliferación aumentaban la actividad de la core 2 GlcNAc-T obteniendo un mayor número de cadenas tipo core 2 (Datti y Dennis, 1993). Esto refuerza la hipótesis de los efectos del medio en el que se produce el crecimiento celular en el grado de glicosilación de las proteínas expresadas.

La fucosa unida a Ser o Thr en una secuencia específica de la proteína es un tipo de O-glicosilación. Esta O glicosilación se ha descrito, principalmente, en el factor de crecimiento epidermal. En las células CHO se ha visto que tienen la capacidad de sintetizar glicoproteínas con fucosa O unida y además tienen la maquinaria para extender esta cadenas (Moloney *et al.*, 1997; Moloney y Haltiwanger, 1999), pero para que esta glicosilación ocurra, la proteína debe tener una secuencia consenso que marcará que se produzca dicha glicosilación.

Debido a la importancia que tiene la secuencia oligosacáridica en la actividad biológica de las glicoproteínas se han estudiado los carbohidratos de otras proteínas recombinantes expresadas en células CHO tales como; el interferón- β (Conradt *et al.*, 1987), interferon- γ (Mutsaers *et al.*, 1986), eritropoyetina (Sasaki *et al.*, 1987), la gp120 del HIV-1 (Mizuochi *et al.*, 1988). Los carbohidratos que encontramos en el rgp120 son bastante similares a los encontrados en el rt-PA. Comparando estas dos estructuras podemos decir que aunque los oligosacáridos unidos a Asn son cualitativamente similares, la proporción de estructuras individuales difiere significativamente entre las dos moléculas recombinantes y esto es debido a que el rgp-120 contiene 24 sitios potenciales de N-glicosilación y aproximadamente el 50 % de su peso está formado por oligosacáridos mientras que el rt-PA solo tiene tres sitios de glicosilación que supone menos de un 10% de su masa. De esta manera podemos concluir que los patrones de glicosilación de las glicoproteínas recombinantes expresadas en células CHO no solo depende de la maquinaria de glicosilación de estas células sino también de la propia molécula a glicosilar y por lo tanto de su secuencia proteica.

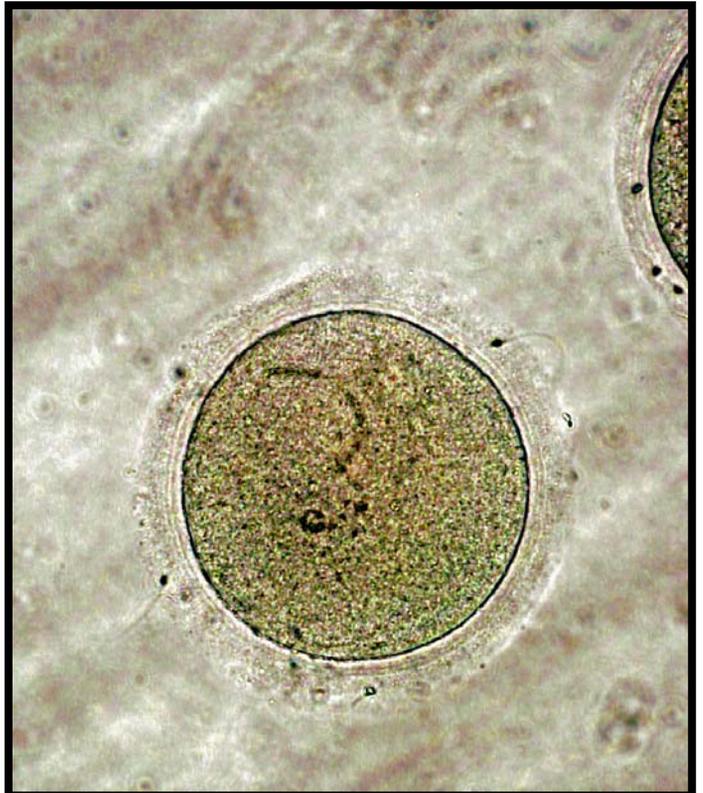
En la bibliografía encontramos muchas líneas celulares con diferentes mutaciones y patrones de glicosilación lo que abre una interesante vía para estudiar el papel de las cadenas glicosídicas en el reconocimiento ovocito espermatozoide.

7.4.2. Expresión en células humanas.

Evidencias considerables realizadas a lo largo de 20 años sugieren que la unión del espermatozoide a la zona pelúcida es un proceso mediado por carbohidratos (Nixon *et al.*, 2001; Wassarman and Litscher, 2001; Wassarman *et al.*, 2001b). Debido a esta teoría y a que cada especie tiene una maquinaria diferente para la síntesis de las cadenas polisacáridicas cada vez se recurre más a la utilización de sistemas en los que la expresión de la proteína recombinante se realice en líneas celulares humanas. ZP3 recombinante humana se ha expresado en células de teratocarcinoma

ovárico humano manifestando un largo espectro de actividades biológicas (Dong *et al.*, 2001). También se ha realizado la co-expresión de ZP1, ZP2 y ZP3 recombinantes en líneas celulares de riñón embrionario humano para el estudio de las características funcionales y estructurales de las proteínas de la ZP (Martic *et al.*, 2004).

V. MATERIALES Y MÉTODOS



1. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL.

1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1.1.1. Obtención de ovarios.

1.1.1.1. Ovarios de ratón.

Para la realización de nuestro estudio, hemos utilizado principalmente ratones CD1 hembras adultas de aproximadamente 8 semanas procedentes del animalario de la Universidad de Murcia. Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de CO₂. Se realizó una incisión abdominal procediéndose a la extracción del ovario para su posterior fijación e inclusión. Para este estudio también utilizamos ovarios de ratón de 18 días donados por el Dr. Dean del laboratorio de Biología Celular y del Desarrollo, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

1.1.1.2. Ovarios de hámster.

Para nuestro estudio hemos utilizado hembras adultas Golden hámster (*Mesocricetus auratus*) de aproximadamente 11 semanas. Las hembras fueron sacrificadas por sobredosis de CO₂. Los ovarios fueron obtenidos tras la apertura de la pared abdominal ventral y fueron colocados en una placa de petri que contenía tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4.

1.1.1.3. Ovarios de cerdo.

Los ovarios de cerdo fueron obtenidos a partir de hembras prepúberes sacrificadas en matadero. El transporte de los ovarios hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isoterma con solución salina (0,9% w/v de NaCl con 100 mg/l de sulfato de kanamicina) a 38°C en un plazo máximo de 1 hora desde el sacrificio de los animales. Una vez en el laboratorio fueron colocados en una placa petri con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4.

1.1.2. Obtención de óvulos.

1.1.2.1. Obtención de óvulos humanos.

Los ovocitos humanos en metafase II y profase I fueron obtenidos de pacientes incluidas en el *Programa de Fecundación In Vitro* del Hospital Universitario "La Fe" de Valencia, a las que se les estimuló la ovulación mediante FSH hasta el día de la administración de la gonadotrofina coriónica humana (hCG) que fue administrada cuando, al menos, tres folículos alcanzaron un diámetro mayor de 16 mm. Entre 34 y 36 horas después de la administración de la hCG, los ovocitos fueron obtenidos mediante punción-aspiración folicular por vía vaginal guiada por ultrasonidos. La donación de estos ovocitos fue realizada bajo el consentimiento de todos los participantes y mediante la aprobación del comité ético del hospital "La Fe" de Valencia.

Los ovocitos metafase II (MII) que no pudieron ser fecundados mediante técnicas de FIV fueron fijados 48-72 horas después de haber sido recuperados. Es importante tener en cuenta, como se ha descrito previamente, que existe la posibilidad de que los ovocitos se hayan detenido en diferentes estados y no se pueden detectar usando el microscopio óptico (Asch *et al.*, 1995). Nosotros consideramos que la mayoría de los ovocitos seleccionados se encuentran en metafase II debido a sus características morfológicas.

Los ovocitos que se encontraban en vesícula germinal (VG) fueron fijados 2 horas después de haber sido recuperados. Descartamos la posibilidad de modificaciones en la composición de los carbohidratos de la ZP de los ovocitos en VG debido al corto periodo de tiempo en el que fueron fijados una vez obtenidos. Descartamos, también, modificaciones en los carbohidratos de los ovocitos en MII, producidos por una posible reacción cortical parcial durante el periodo de cultivo, por la cantidad de gránulos corticales observados en los diferentes estudios.

1.1.2.2. Obtención de óvulos de ratón.

Para la obtención de óvulos tubáricos no fecundados se indujo la superovulación de 3 ratones hembra adultas mediante la inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) obtenida de Sigma y 48 horas más tarde se inyectó con 5 UI de hCG. Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de CO₂ 17 horas después de la inyección con hCG. Los oviductos fueron obtenidos tras la correspondiente incisión a nivel de la pared abdominal ventral y colocados en una placa de petri que contenía tampón cacodilato 0.1M pH 7.4. Para obtener los cúmulos ovígeros que contienen en su interior los óvulos, la región del oviducto conocida como ampolla fue identificada y gracias al uso de pinzas muy finas, y bajo la lupa de disección, fue abierta permitiendo la salida del cúmulo ovígero.

1.1.2.3. Obtención de óvulos de hámster.

La superovulación fue inducida mediante una inyección intraperitoneal de 15 UI de PMSG y 48 horas más tarde se inyectó con 15 UI de hCG. Los hámster fueron sacrificados por sobredosis con CO₂ 17 horas después de la inyección con hCG. Los oviductos fueron obtenidos tras la apertura de la pared abdominal y colocados en placa de petri con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4. Los cúmulos ovígeros fueron obtenidos del modo descrito anteriormente.

1.1.2.4. Obtención de óvulos de rata.

Utilizamos ratas Wistar hembras adultas procedentes del animalario de Murcia. Para la obtención de óvulos tubáricos se inyectó 25 UI de PMSG y trascurridas 48 horas se inyectó 25 UI de hCG. Las ratas fueron sacrificadas por sobredosis con CO₂ 17 horas después de la inyección con hCG. La obtención del oviducto y el cúmulo ovígero se realizó como ha sido descrito anteriormente.

1.2. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

1.2.1. Ovarios de cerdo, hámster y ratón.

Los ovarios de ratón hámster y cerdo fueron seccionados en cubos de aproximadamente un milímetro de arista. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 0,5% en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,4 durante 2 h a 4°C. Posteriormente las muestras fueron lavadas en dicho tampón.

Las muestras se procesaron para su inclusión en la resina **LR White** (Sigma, España) siguiendo el procedimiento descrito previamente (Newman, 1999). Las muestras fueron sometidas a una deshidratación con etanol al 50% durante 15 minutos y a continuación dos tiempos más de 15 minutos con etanol al 70%. Seguidamente, en ambiente oscuro se pasaron a una solución 2:1 (LR White:etanol 70%) durante una hora. A continuación se pasaron las muestras en cuatro tiempos de 1, 1, 12 y 1 hora a solución LR White pura respectivamente. Todos los pasos anteriores se hicieron en condiciones de agitación continua a temperatura ambiente, y en oscuridad. Tras este proceso, se depositaron en cápsulas completamente llenas de resina LR white pura (100g LR White mezcladas previamente con un catalizador 1,98g de Benzil peroxidasa ó B-5907 durante 24 horas en oscuridad). Se taparon con una laminilla y se dejaron polimerizar colocando los bloques en la estufa a 50°C durante 24 horas.

Tras la obtención de los bloques de microscopía electrónica, se realizaron cortes semifinos de 1 μm aproximadamente en un ultramicrotomo LKB III. Estos cortes fueron teñidos con azul de toluidina al 0,3% en solución acuosa. Tras la localización de los ovocitos se procedió a la obtención de secciones ultrafinas (aproximadamente 50 nm) en un ultramicrotomo (Microm) que fueron depositadas en rejillas de níquel de 100 y 150 mesh recubiertas con una película de formvar (Sigma, España).

1.2.2. Ovocitos humanos.

Los ovocitos en VG (nueve ovocitos de cinco pacientes) y los ovocitos en MII (28 ovocitos de 18 pacientes) fueron fijados en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,4 durante 2 h a 4°C. Después de ser fijados, las muestras fueron lavadas tres veces en tampón cacodilato. Las muestras de ovocitos fueron incluidas en bloques de agar al 2% en tampón cacodilato para facilitar su manipulación y evitar la pérdida de estos ovocitos.

Seguidamente las diferentes muestras obtenidas fueron procesadas para su posterior inclusión en **Lowicryl K4M** a baja temperatura según el procedimiento descrito por Carlemalm *et al.* (1982). Esta resina hidrófila polimeriza con luz ultravioleta a temperatura ambiente.

Para el estudio de las diferentes organelas del ooplasma del ovocito humano 5 ovocitos en VG y 5 ovocitos en MII fueron fijados en glutaraldehído al 0,5% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7.4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron los bloques de agar al 2% y las muestras fueron incluidas en la resina **LR-White** como ha sido descrito anteriormente. La resina LR-White tiene la capacidad de conservar mejor las membranas lipídicas de forma que la morfología de las diferentes organelas aparece mejor conservada (Drenckhahn y Dermietzel, 1988).

De los bloques se realizaron secciones ultrafinas y se depositaron en rejillas de níquel como se ha descrito anteriormente. Una vez realizadas las técnicas citoquímicas, las secciones fueron contrastadas y observadas en el microscopio electrónico Phillips Tecnai 12.

1.2.3. Ovocitos de hámster, rata y ratón.

El cúmulo ovígero de ratas, hámster y ratones fue fijado en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y finalmente incluidas en

la resina **Lowicryl K4M** como ha sido descrito anteriormente. Se realizaron las secciones ultrafinas, se depositaron en rejillas de níquel y una vez realizadas las técnicas histoquímicas las secciones fueron contrastadas y observadas al microscopio electrónico de transmisión.

1.3. ESTUDIO CITOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS HUMANOS.

Las secciones ultrafinas fueron teñidas mediante una técnica de flotación. Este método consiste en depositar las rejillas sobre unas gotas de los distintos tampones y reactivos. Así, en primer lugar los cortes ultrafinos fueron lavados durante 5 minutos en PBS. Seguidamente, se pasó la rejilla en la misma posición a una nueva gota para realizar un bloqueo de la posible unión inespecífica en PBS+1%BSA durante 10 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario o lectina diluido en PBS+1%BSA durante 60 minutos. Se lavó tres veces durante 5 minutos en PBS y se incubó con anticuerpo secundario diluido en PBS+1%BSA durante 60 minutos. Nuevamente se lavó tres veces 5 minutos con PBS. Cuando se utilizaron las lectinas conjugadas con digoxigenina (DIG) se bloqueó con PBS+1%BSA+10%NGS. Sin lavar se incubaron con una tercera capa durante 1 hora. Esta capa viene marcada con oro coloidal para la visualización del lugar de unión en el microscopio electrónico. Se lavaron con PBS tres veces 5 minutos y se lavaron con agua bidestilada. Finalmente se dejaron las rejillas secar al aire.

Una vez realizadas las diferentes técnicas citoquímicas ultraestructurales, las secciones ultrafinas fueron contrastadas en gotas con acetato de uranilo durante 8 minutos, tras ello fueron lavados con agua a chorro y secadas para colocarlos en gotas de citrato de plomo durante 4 minutos. Para evitar la formación de precipitados de carbonato de plomo se realiza el contraste en un recipiente cerrado donde se colocaron pastillas de NaOH próximas a las rejillas para retener el CO₂. Finalmente, las rejillas fueron lavadas a chorro con agua ultrapura, secadas y guardadas hasta su observación en el microscopio electrónico Phillips Tecnai 12.

Para la demostración citoquímica de los diferentes componentes de la ZP a nivel ultraestructural mediante la utilización de técnicas de "postembedding", se empleó el oro coloidal de 15 nm como marcador de los anticuerpos y proteína A. Para ello utilizamos un método indirecto (Fig. 1).

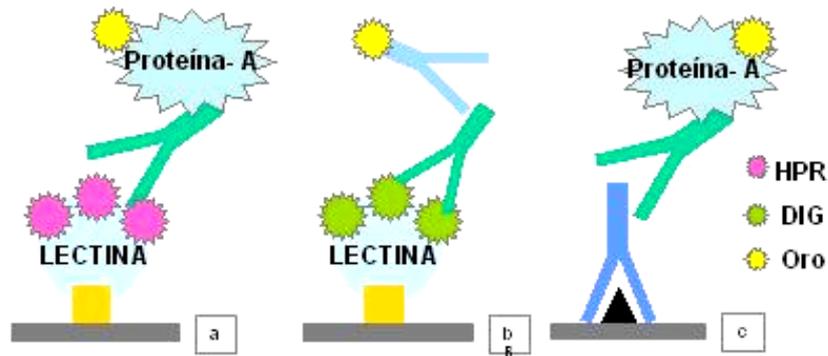


Figura 1. Esquema de las técnicas de método indirecto. Citoquímicas de lectinas (a, b) e inmunocitoquímica (c).

1.3.1. Citoquímica de lectinas.

Las secciones ultrafinas de óvulos humanos incluidas en la resina **Lowicryl K4M** fueron teñidas con una serie de lectinas cuya especificidad así como concentración y otros datos técnicos vienen detallados en los Anexos I y II, los anticuerpos y reactivos secundarios utilizados vienen especificados en el Anexo IV.

Esta técnica citoquímica ultraestructural fue realizada de acuerdo con el método desarrollado previamente por Martínez-Menárguez et al. (1992) para las lectinas conjugadas con digoxigenina (DIG) (AAA, DBA, DSA, GNA, LTA, MAA, MPA, PHA-L, PNA, SBA, SNA, WGA). Las secciones ultrafinas fueron incubadas durante 5-10 min en PBS con 1% de BSA y posteriormente fueron transferidas a una gota con las diferentes lectinas durante 1 h. Después de lavar con el tampón, las rejillas fueron incubadas durante 1 h con un anticuerpo monoclonal anti-DIG producido en ratón (2

µg/ml) diluido en PBS. Las rejillas se volvieron a lavar con el tampón incubándose nuevamente con la tercera capa que consiste en un anticuerpo anti-IgG + IgM de ratón (1:20) conjugado con oro coloidal de 15 nm de diámetro producido en carnero diluido en el correspondiente tampón (Avilés et al., 1994;1996; 1997; 2000).

Para las lectinas conjugadas con peroxidasa (HRP) (AIA, BSA-I-B₄, ConA, LFA, PHA-E, RCA-I, STA, UEA-I) también usamos un método indirecto de tres capas. Las secciones ultrafinas fueron incubadas durante 5-10 min en PBS con 1% de BSA posteriormente fueron transferidas a una gota con las diferentes lectinas durante 1 h. Después de lavar con el tampón, las rejillas fueron incubadas durante 1 h con un anticuerpo policlonal anti-HRP producido en conejo (1:400) diluido en PBS. Las rejillas se volvieron a lavar con el tampón, incubándose posteriormente con una tercera capa que consiste en la proteína A (1:70) conjugada con oro coloidal de 15 nm de diámetro (Departamento de Biología Celular, Universidad de Utrecht, Holanda) diluido en el correspondiente tampón.

1.3.2. Inmunocitoquímica.

Las secciones ultrafinas fueron incubadas con diferentes anticuerpos que viene detallados en el Anexo III y los anticuerpos y reactivos secundarios utilizados en el Anexo IV.

1.3.2.1. Anticuerpos contra azúcares.

Para los anticuerpos monoclonales de ratón contra los epitopos Lewis y sialil-Lewis utilizamos un método indirecto de dos capas. Las rejillas fueron incubadas con PBS complementado con 1% de BSA durante 10 minutos y posteriormente fueron incubadas con estos anticuerpos monoclonales producidos en ratón (1:30) complementado con 1% de BSA durante 1 h. Después de lavar en PBS, las rejillas se colocaron sobre una gota que contenía un anticuerpo policlonal anti IgG+IgM de ratón conjugado

con oro coloidal de 15 nm producido en el carnero (1:20) diluido en PBS, 1% BSA.

1.3.2.2. Anticuerpos contra glicoproteínas.

Para el anticuerpo monoclonal contra el péptido representado por los residuos 335-350 de la ZP3 humana localizado por encima de la secuencia consenso de furina usamos una técnica de tres capas. Las rejillas fueron incubadas con el anticuerpo primario (1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de varios lavados en PBS, las rejillas fueron depositadas sobre una gota que contenía un anticuerpo producido en conejo contra las IgG de ratón (1:400) y por último y después de los correspondientes lavados, las rejillas fueron incubadas con proteína A conjugada con oro coloidal (1:70) diluida en PBS.

1.3.3. Tratamiento enzimático.

Las diversas secciones fueron tratadas con diferentes enzimas para observar los cambios producidos con este tratamiento en las secuencias terminales de las diferentes glicoproteínas. Controles con secciones no tratadas con las enzimas fueron teñidos en paralelo con secciones tratadas.

1.3.3.1 Tratamiento con neuraminidasa.

El tratamiento con la enzima neuraminidasa obtenida de *Clostridium perfringens* (tipo V, Sigma, España) se empleó para retirar los residuos terminales de ácido siálico unido por enlaces $\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,8$ y de esta manera exponer los ligandos potenciales para lectinas o anticuerpos que se encontraban enmascarados por este azúcar. El tratamiento se usó para las lectinas: DBA, HPA, LFA, LTA, PNA, SBA, UEA-I y WGA y para los anticuerpos: Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x.

Las secciones fueron introducidas en tampón acetato pH 4,5 durante 10 minutos. Posteriormente fueron brevemente cubiertas con el mismo

tampón pero complementado con 1% de BSA. Finalmente, las secciones fueron incubadas con neuraminidasa a una concentración final de 1 UI/ml en tampón acetato pH 4.5 durante 3 horas a 37°C en cámara húmeda (Castells *et al.*, 1992) para eliminar los residuos de ácido siálico.

1.3.3.2. Tratamiento con galactosa oxidasa.

Este tratamiento se realizó como se ha descrito anteriormente (Avilés *et al.*, 1997). Las secciones ultrafinas fueron incubadas con galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (Sigma, España) a una concentración de 50 UI/ml diluida en PBS, pH 7,2 durante 12 h a 37°C en cámara húmeda.

Este tratamiento oxida los grupos hidroxilos presentes en el carbono 6 tanto de Gal como de GalNAc (Schulte y Spicer, 1983). La incubación con la enzima se realizó en combinación con el uso de las lectinas: AIA, MPA y PNA que utilizamos como control.

1.3.4. Controles.

Diferentes controles fueron realizados para la demostración de la especificidad de las técnicas empleadas en este estudio.

1.3.4.1. Controles negativos.

Se realizaron los siguientes controles: 1) Sustitución de los anticuerpo anti-ZP3 humano, anti-sialil-Lewis y lectinas por su correspondiente tampón. 2) Preincubación de las lectinas con su correspondiente azúcar inhibidor usado a 0,2 mol/l: D-GlcNAc (para WGA), N-acetilactosamina (para DSA), L-fucosa (para AAA), D-galactosa (para PNA y RCA-I) todos ellos obtenidos de Sigma (España). 3) Las rejillas se preincubaron con nueraminidasa para las lectinas MAA, LFA y los anticuerpos anti-sialil-Lewis. 4) Para el control negativo de los anticuerpos anti-sialil-Lewis usamos rejillas de ovario de ratón. No ha sido observado marcaje con estos anticuerpos en la ZP de ratón (Aviles *et al.*, 2000a) y los

epitopos que reconocen estos anticuerpos no han sido detectados en la secuencia de carbohidratos de las glicoproteínas de la ZP de ratón usando análisis biofísicos (Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003).

1.3.4.2. Controles positivos.

Como control positivo de la lectina se utilizó el marcaje obtenido en la ZP de ratón para las lectinas: BSAI-B₄, DBA, HPA, PNA, SBA y en oviducto de rata para las lectinas: GNA, LTA y UEA-I como ha sido descrito anteriormente (Avilés *et al.*, 1997; Avilés *et al.*, 2000ab). Usamos rejillas de estómago de rata para detectar marcaje con la lectina SNA (Toma *et al.*, 2001).

Las células Reed Sternberg de Hodgkin's y granulocitos humanos fueron usados como control positivo para la unión de los anticuerpos anti-Lewis^a, anti-Lewis^b y anti-Lewis^x como ha sido descrito previamente (Avilés *et al.*, 2000b). Realizamos un control adicional para los anticuerpos anti-Lewis^a y anti-Lewis^x consistente en la preincubación de las secciones ultrafinas de ovocitos humanos con la enzima neuraminidasa.

1.3.5. Análisis cuantitativo.

Para realizar el análisis cuantitativo de la densidad de marcaje de diferentes lectinas y anticuerpos, dividimos la ZP de ovocitos humanos en dos zonas de aproximadamente igual espesor: zona interna y externa. La zona interna esta localizada cerca del ovocito, desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, en cuanto a la zona externa es la que se encuentra localizada cerca de las células del cúmulo y mediaría la interacción con el espermatozoide. Estas dos regiones muestran diferencias morfológicas y citoquímicas. La ZP humana es relativamente ancha comparada con la ZP de otras especies como ratón, rata y hámster. Por este motivo, la zona interna y externa, fueron subdivididas en otras dos regiones que fueron llamadas como interna1, interna2, externa1 y externa2 de acuerdo a su proximidad al ovocito.

Para el análisis cuantitativo se fotografiaron cinco áreas de ZP de cada ovocito humano en MII (cinco ovocitos de cuatro paciente) en un microscopio electrónico Philips Tecnai, a 4500 aumentos. El aumento final de la fotografía en papel fue de 13500. En cada una de las fotografías se dibujaron las líneas de separación correspondientes a las 4 regiones analizadas: interna 1 y 2, externa 1 y 2, dividiéndose el grosor de la ZP en 4 regiones concéntricas iguales. Para la evaluación cuantitativa medimos entre 15-20 campos de cada una de las regiones de la ZP de cada ovocito (cuadrados de 2,5 μm de arista). La densidad de marcaje fue calculada mediante un analizador de imagen Q500MC (Leica, España).

La densidad de marcaje fue determinada mediante el recuento automático de las partículas de oro coloidal segmentadas por su nivel de gris comprendidas en las áreas seleccionadas manualmente con el ratón. Realizamos una comparación estadística entre el marcaje obtenido con las lectinas y los anticuerpos en las cuatro regiones de la ZP que anteriormente hemos descrito. La densidad de marcaje fue comparada usando el análisis de varianza ANOVA y la T3 del test de Dunnet y Games-Howell con una $P < 0,05$ realizada con SPSS v10.

1.4. ESTUDIO CITOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER.

Realizamos un estudio citoquímico de la ZP de hámster de ovocitos en diferente estadios del desarrollo folicular en el ovario y ovocitos ovulados. Los anticuerpos utilizados vienen especificados en el Anexo III y la anticuerpos secundarios en el Anexo IV.

1.4.1. Inmunocitoquímica.

Las secciones ultrafinas de ovocitos y ovarios de las diferentes especies fueron teñidas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Las rejillas fueron incubadas durante 10 minutos en una solución que contenía tampón PBS junto con de BSA. Posteriormente, las rejillas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-ZP de cerdo producido en conejo a una dilución

(1:1000) para hámster, rata y ratón y una dilución (1:10000) para cerdo. Después de tres lavados en PBS las rejillas fueron incubadas con proteína A conjugada con oro coloidal de 15nm (1:60).

1.4.2. Citoquímica de lectinas.

Realizamos la tinción mediante la técnica indirecta de tres capas con la lectina WGA conjugada con peroxidasa a una concentración de 10 µg/ml. La segunda y tercera capa se aplicaron como ha sido detallado anteriormente.

1.4.3. Controles

El control negativo del anticuerpo se llevo a cabo por sustitución del primer anticuerpo por el suero pre-inmune. Para la citoquímica de lectina se hicieron dos controles; 1) Sustitución de la moléculas conjugadas y no conjugadas por el correspondiente tampón. 2) Preincubación de la lectina conjugada con peroxidasa con el correspondiente azúcar inhibidor GlcNAc al 0,2 M.

1.4.4. Análisis cuantitativo.

En el presente estudio, la ZP de los ovocitos de cerdo, hámster, rata y ratón fue dividido en dos zonas de igual espesor: zona interna y externa. La zona interna es la que se localiza cerca del ovocito y la zona externa la que se encuentra cerca de las células del cúmulo y media la interacción con el espermatozoide. Estas dos regiones presentan diferentes características morfológicas y citoquímicas. Se fotografiaron cuatro áreas de ZP de cada ovocito (cinco ovocitos de cada especie) en el microscopio electrónico EM10 Zeiss a 4500 aumentos. Tras positivar y ampliar la imagen a 13500 aumentos, se dibujó una línea que dividía cada ZP en dos regiones de igual espesor. Se analizaron 15-20 campos de cada región de cada ovocito (cuadrados de 2,5 µm de arista) midiendo la densidad de marcaje. La

densidad de marcaje fue calculada mediante un analizador de imágenes Q500MC (Leica, España).

El parámetro fue calculado mediante el recuento automático de las partículas de oro coloidal comprendidas en las áreas seleccionadas manualmente con el ratón (zona interna o externa). Realizamos una comparación estadística entre el marcaje obtenido en la zona interna y la zona externa de las diferentes especies. Los datos fueron analizados aplicando la T de Student con una $P < 0,05$ realizada con SPSS v10.

1.5. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP.

1.5.1. Inmunocitoquímica de ovocitos humanos.

Para este estudio se utilizaron las secciones ultrafinas de ovocitos humanos en profase I y metafase II que fueron incluidas en la resina LR-White. Estas secciones se tiñeron con diferentes anticuerpos especificados en el Anexo III y los anticuerpos secundarios Anexo IV.

1.5.1.1. Anticuerpos contra glicoproteínas de la ZP.

Las secciones ultrafinas fueron incubadas con los anticuerpos policlonales contra ZP de cerdo (1:1000) y ZPC de cerdo (1:10) durante 1h, después de los correspondientes lavados, las secciones fueron incubadas con proteína A conjugada con oro diluido en el correspondiente tampón.

Estas secciones también fueron incubadas con el anticuerpo anti-ZP3 humana como ha sido descrito anteriormente.

1.5.1.2. Controles.

El control realizado para los anticuerpo anti-ZPC de cerdo y anti-ZP de cerdo fue llevado a cabo mediante la sustitución de este anticuerpo por

el suero pre-inmune. Los controles de los otros dos anticuerpos se realizaron como ha sido descrito con anterioridad.

1.5.2. Inmunocitoquímica de ovarios de ratón.

Para este estudio se utilizaron las secciones ultrafinas de ovario de ratón de 18 días para poder observar los ovocitos en diferentes estadios.

1.5.2.1. Anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal contra el enzima proteína disulfido isomerasa (PDI) y un anticuerpo monoclonal contra la proteína GM130 son marcadores del retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi respectivamente (Ferrari y Söling, 1999; Marínez-Alonso *et al.*, 2005). Para estos anticuerpos monoclonales se usó una técnica de tres capas como se ha explicado con anterioridad. La concentración utilizada para el anticuerpo PDI fue 2 µg/ml y para el anticuerpo GM130 fue 25 µg/ml.

El control para el anticuerpo anti-PDI y anti-GM130 se realizó por sustitución de estos anticuerpos por el tampón correspondiente.

1.5.2.2. Medidas morfométricas.

El análisis morfométrico correspondiente al diámetro medio de las estructuras circulares y las vesículas electrodensas marcadas con el anticuerpo anti-PDI se realizaron en un equipo de análisis de imagen empleando el software MIP4.5. Se hicieron 37 medidas de 10 estructuras circulares en 7 ovocitos de 3 animales diferentes y se midieron 75 vesículas electrodensas (150 mediadas) de 7 ovocitos de 3 animales diferentes.

2. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA.

2.1. OBTENCIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA.

2.1.1. Zona pelúcida humana.

Los ovocitos humanos usados en este estudio fueron donados por pacientes pertenecientes al programa de FIV de la clínica IVI de Murcia. Estos ovocitos representan el material que fue descartado en los diferentes tratamientos. La ZP humana fue obtenida a partir de estos ovocitos mediante el uso de pipetas de 80 μm de diámetro por la que pasamos los ovocitos y de manera mecánica separamos la ZP del ovocito. Las ZP obtenidas fueron lavadas en agua MilliQ y solubilizadas por calor en un baño a 60°C durante 45 min (Kiefer y Saling, 2002). Una vez solubilizado, este material fue guardado a -80°C.

2.1.2. Purificación de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster, rata y ratón.

Para la obtención de las ZP de estos roedores utilizamos hembras adultas de Golden hamster (n=6), hembras adultas de ratas Wistar (n=2) y hembras adultas de ratones CD1 (n=10), todos ellos del animalario de la Universidad de Murcia. Se procedió a la superovulación de los hámster y ratones como ha sido explicado anteriormente y a la rata con 15 UI de PMSG. Todos los animales fueron sacrificados 48 h después de la inyección de PMSG mediante sobredosis de CO₂. Una vez sacrificados se obtuvieron los ovarios mediante incisión abdominal procediéndose a la extracción del ovario y lavado en placa de petri con PBS. Bajo la lupa se retiró toda la grasa y el tejido conectivo que rodea el ovario.

Los ovarios se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Polytron. La homogeneización se realizó con el material en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra por fricción. Los ovarios fueron diluidos en 3 ml de tampón de homogeneización (25 mM triethanolamina

HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O y 1 mM CaCl₂·2H₂O, pH 8,5) mezclado con 12 mg de inhibidor de tripsina (Sigma, España), 4 mg de hialuronidasa bovina testicular (Sigma, España) y 1% del detergente NP40 (Sigma, España) y homogeneizados durante tres periodos de 5 segundos con intervalos de descanso de 1 minuto. Una vez homogeneizado, se añadió 0,4 ml de una solución de ácido deoxicólico (Sigma, España) 0.1 g/ml y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Esta solución fue de nuevo homogeneizada en un homogeneizador de cristal.

Obtuvimos unos 4 ml de homogeneizado que fueron repartidos en 4 viales y centrifugados a máxima velocidad en una centrífuga (labofuge 400R, Heraeus) durante 8 minutos a 4°C. El precipitado obtenido de la centrifugación fue lavado tres veces en tampón TEA (25 mM trietanolamina HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O y 1 mM CaCl₂·2H₂O, pH 8,5) y una vez más en tampón fosfato 10 mM complementado con 1M de NaCl, pH 7,0.

Las muestras fueron finalmente resuspendidas en 1 ml de tampón fosfato 10 mM y solubilizadas por calor en un baño a 65°C durante 45 minutos en continua agitación. Una vez terminado este proceso, las muestras fueron centrifugadas y recogimos unos 0,8 ml de sobrenadante. Medimos la concentración de proteínas con un bioanalizador Agilent 2100 acoplado a un Protein LabChip (Agilent Technologies) (Schmut *et al.*, 2002) en los Servicios Técnicos de Investigación en la facultad de Ciencias en la Universidad de Alicante. El sobrenadante de todas las muestras fue guardado a -80°C hasta su utilización. Tanto el precipitado como el sobrenadante fue analizado mediante western-blot para determinar la presencia de ZP en las diferentes especies.

2.1.3. Purificación de la banda de 56 kDa de la ZP de hámster.

Las glicoproteínas de la ZP de hámster presentan mediante un estudio de electroforesis y western-blot una banda ancha superior y otra banda inferior de un peso molecular medio de unos 56 kDa. La banda superior correspondería a ZP1, ZP2 y la banda inferior de 56 kDa a ZP3

según Moller *et al.*, 1990. Tanto la banda superior como la de 56 kDa fueron purificadas mediante electroelución de los geles de SDS/PAGE. La electroelución se realizó con el Electro-Eluter modelo 422 (Bio-Rad laboratorios) a una corriente constante de 8-10 mA/tubo de cristal durante 4 horas a temperatura ambiente en un tampón de elución que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% de SDS, pH 8,6.

Las fracciones electroeluidas fueron recogidas en un volumen de aproximadamente 800 μ l y diluidas usando filtros de centrífuga con una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa (Millipore Corporation, Bedford). Se realizó una centrifugación a 10000 g durante 30 minutos en la que fuimos añadiendo 4 ml de agua MilliQ. Al final obtuvimos un volumen de aproximadamente 300 μ l de las dos fracciones de glicoproteínas recogidas (banda superior y banda inferior de 56 kDa). Medimos la concentración de proteínas obtenida en la purificación de la banda de 56 kDa mediante el bioanalizador Agilent 2100. Las dos fracciones recogidas fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.

Estas fracciones se utilizaron para diferentes experimentos y para la identificación de la ZP3 de hámster en la fracción de 56 kDa mediante espectrometría de masas.

2.2. ANÁLISIS DE LA BANDA DE 56 kDa MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).

Para determinar que en la banda de 56 kDa se encuentra la glicoproteína ZP3 de hámster se realizó un análisis de esta fracción mediante MS/MS. Para realizar este estudio purificamos la ZP de hámster mediante solubilización por calor a partir de 60 ovarios de hámster en 4 procesos paralelos. La banda de 56 kDa fue electroeluida en cada una de las muestras a partir de electroforesis preparativa y las diferentes fracciones obtenidas fueron concentradas hasta obtener un sólo volumen con todas las fracciones y esta muestra fue guardada a -80°C y posteriormente liofilizada en un liofilizador (Virtis advantage, USA.).

2.2.1. Electroforesis.

El 5% de la muestra total obtenida fue detectada mediante SDS-PAGE. Esta fracción fue resuspendida en tampón de electroforesis (Laemmli, 1970) y corrida en un gel al 10% Bis-Tris con un tampón de recorrido Nu-Page que contiene MES y SDS (1,0 M MES, 1,0 M Tris Base, 20,5 mM EDTA y 69,3 mM SDS). La electroforesis se realizó durante 45 minutos a un voltaje constante de 200V y a temperatura ambiente.

El gel fue teñido con Azul Coomassie al 0,1% preparado en una mezcla metanol/ácido acético/agua en una proporción 2:3:35 en volumen. Una vez teñido, el gel se pasó a una mezcla metanol/ácido acético/agua en la misma proporción anterior para proceder al lavado del mismo, permitiéndose así una visualización correcta de la banda de 56 kDa. La banda teñida fue cortada y retirada del resto del gel para ser posteriormente liofilizada.

2.2.2. Digestión con tripsina.

Los trozos de gel fueron resuspendidos en tampón bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,4 y digeridos con 0,5 µg de tripsina de páncreas de porcino (Tipo IX-S, Sigma) durante toda la noche a 37°C. La muestra fue colocada en agua hirviendo durante 2 minutos para terminar la reacción y fueron nuevamente liofilizadas.

La digestión triptica fue lavada mediante una columna C₁₈ (Peptide Microtrap, Presearch). La muestra fue disuelta en 20 µl ácido trifluoroacético al 0,1% y eluida con acetonitrilo al 30%, acetonitrilo al 60% y acetonitrilo al 100% en ácido trifluoroacético al 0,1%.

2.2.3. MS/MS.

Las fracciones correspondientes a 30% de acetonitrilo y a 60% de acetonitrilo, en la fase móvil, fueron analizadas mediante espectrometría de masas en tandem, empleando ionización por electrospray (ESI-MS-MS). En

el espectro de masas se pudieron apreciar varios picos doblemente cargados que fueron seleccionados, aislados y analizados por MS-MS.

2.3. INMUNOPRECIPITACIÓN.

La ZP de hámster solubilizada por calor fue inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo y las bolitas de proteína A-agarosa (Santa Cruz, Biothecnology). Un volumen de 10 μ l de ZP de hámster fue diluido en 100 μ l de tampón PBS. Para descartar las uniones inespecíficas entre las glicoproteínas de la ZP y las bolitas de agarosa a esta solución añadimos 20 μ l de proteína A-agarosa que habían sido anteriormente lavadas en PBS y las incubamos durante 1 h a 4°C. Centrifugamos a 7000 g y recogemos el sobrenadante donde se encontrarán las glicoproteínas de la ZP.

Las glicoproteínas de la ZP de hámster, en un volumen de 100 μ l del sobrenadante recogido anteriormente, fueron incubadas durante 4 h a 4°C en presencia de 5 μ l del anticuerpo anti-ZP de cerdo. La inmunoprecipitación tuvo lugar una vez que se añadieron 20 μ l de proteína A-agarosa (Santa Cruz) a la solución que contenía las glicoproteínas y el anticuerpo y fue incubado 1h a 4°C. La inmunoprecipitación se realizó en continuo movimiento. Finalmente, la solución fue centrifugada a 7000 g durante 5 minutos a 4°C y recogimos tanto la fracción del sobrenadante como la del precipitado.

La fracción del precipitado fue lavada tres veces en tampón PBS para retirar el contenido residual del sobrenadante. El volumen obtenido de 100 μ l de sobrenadante fue concentrado mediante filtros de centrífuga con membrana de corte de peso molecular de 10 kDa. Tanto el sobrenadante como el precipitado fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE. En el caso del precipitado, después de incubar la muestra en agua hirviendo 5 minutos junto con el tampón de carga fue centrifugada para retirar las bolitas de agarosa.

Como control realizamos una inmunoprecipitación de las glicoproteínas de la ZP de hámster con WGA conjugada con agarosa (Sigma, España). Las glicoproteínas de la ZP fueron incubadas con 20 μ l de WGA-agarosa, que anteriormente había sido lavada en PBS, durante 1 h a 4°C en continuo movimiento. Centrifugamos la muestra a 7000 g, 5 min y retiramos el sobrenadante. El precipitado fue lavado tres veces en PBS. Tanto el precipitado como el sobrenadante concentrado fueron analizados mediante electroforesis SDS-PAGE.

2.4. DIGESTIÓN CON N-GLICOSIDASA F.

La banda de 56 kDa, aislada anteriormente y la ZP total solubilizada por calor de hámster fueron digeridas con la enzima N-glicosidasa F (EC 3.5.1.52) (Roche, Alemania). Esta enzima corta (GlcNAc-Asn) las cadenas N-glicosiladas de las glicoproteínas (Lemp *et al.*, 1990).

Las diferentes muestras con los siguientes volúmenes: 10 μ l de la banda de 56 kDa purificada y 10 μ l de ZP total de hámster fueron diluidas en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 que contenía 10 mM EDTA y 0,1% de SDS. Estas muestras fueron incubadas en un baño con agua hirviendo durante 5 minutos para desplegar las glicoproteínas y favorecer la digestión por la enzima.

Tras enfriar las muestras fueron incubadas con 6 UI de enzima para la banda de 56 kDa de hámster y 8 UI para la ZP total durante toda la noche en un baño a 37°C.

Las muestras control de cada uno de los ensayos fueron tratadas en las mismas condiciones excepto por la omisión de la enzima. Todas las muestras fueron analizadas mediante electroforesis y western-blot.

2.5. ELECTROFORÉISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SODIO-DODECIL SULFATO (SDS-PAGE) E INMUNOTRANSFERENCIA.

2.5.1. Electroforesis analítica.

Las muestras de ZP de ovarios de hámster y ratón, las fracciones electroeluidas de las glicoproteínas de la ZP de hámster, las muestras obtenidas de la inmunoprecipitación y los diferentes ensayos obtenidos de la digestión con N-glicosidasa F fueron analizados mediante electroforesis en SDS-PAGE.

Las diferentes muestras fueron diluidas en un volumen (1:2) de tampón de muestra que contenía 2% de SDS, 2,5% de mercaptoetanol, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 y 10% (v/v) de glicerol (Laemmli, 1970), bajo condiciones reductoras y sin mercaptoetanol bajo condiciones no reductoras. Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas.

Se prepararon geles de poliacrilamida discontinuos (Anexo V), en los que en la parte superior se colocaba el gel de concentración, con la poliacrilamida al 4% y en el inferior el de separación a una concentración dependiente de los pesos moleculares de la proteína que nos interesaba, siendo los más utilizados 10% y 12% siendo la proporción de acrilamida:bisacrilamida 29:1. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora a 150 V en tampón 25 mM Tris/0,2 M glicina de pH 8,6 con un contenido en SDS del 0,1% en cubetas de Bio-Rad, laboratorios. Para la determinación "correcta" de los pesos moleculares de las proteínas analizadas se corrieron, en paralelo a las muestras, estándares preteñidos de peso molecular conocido (Invitrogen).

2.5.2. Transferencia a membrana o Western Blot.

Los geles de electroforesis realizados como se ha descrito previamente, fueron equilibrados durante 30 minutos en metanol al 20%

(v/v) con una concentración 25 mM de Tris y 192 mM de glicina. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro (Millipore Corporation, Bedford), mediante la aplicación durante 1 hora de una corriente eléctrica de 100 V en una cámara a 4°C y en cubetas de Bio-Rad, Laboratorios.

2.5.3. Inmunodetección.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF fue sujeta a sucesivos lavados en tampón TBS-T (50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl y 0,1% de Tween 20). Las membranas fueron bloqueadas con tampón TBS-T complementado con 1% de BSA durante 1 hora.

Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, las membranas fueron incubadas con los diferentes anticuerpos y lectinas (Anexo III y IV) diluidos en tampón TBS-T más 1% BSA.

2.5.3.1. Inmuno-blot.

Las glicoproteínas de la ZP de hámster y ratón y los ensayos de digestión enzimática fueron analizadas mediante inmuno-blot con el anticuerpo policlonal anti-ZP de cerdo. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-ZP de cerdo (1:1000) producido en conejo. Después de tres lavados en tampón TBS-T y para la detección del anticuerpo policlonal las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP producido en carnero a una dilución (1:20000) durante 1 hora.

Para la caracterización de las glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón utilizamos los anticuerpos monoclonales de rata específicos contra estas tres glicoproteínas (cedidos amablemente por el Dr. Dean). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpo anti-ZP1, -ZP2 y -ZP3 una dilución (1:1000) durante 1 hora. Las membranas fueron lavadas tres veces en

tampón TBS-T e incubadas con el anticuerpo anti-IgG de rata conjugado con HRP a una dilución (1:500) durante 1 hora.

2.5.3.2. Lectin-blot.

Las glicoproteínas de la ZP de hámster y de ratón fueron caracterizadas con la lectina WGA conjugada con HRP. Incubamos las membranas con una concentración de la lectina de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 45 minutos a temperatura ambiente una vez que las membranas fueron bloqueadas con TBS-T más 1%BSA. Lavamos tres veces en tampón TBS-T.

Para la visualización de los anticuerpos y lectina usados en los diferentes ensayos incubamos las membranas con la solución de revelado ECL (Amersham, Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante preparada en el momento de uso. La señal de luminiscencia fue recogida en un película de autoradiografía Hyperfilm ECL (Amersham, Biosciences) en total oscuridad con una exposición de entre 15 segundos y 5 minutos. Para su revelado se emplearon líquidos de revelador y fijador de AGFA.

3. EXPRESIÓN ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES HUMANAS EN CÉLULAS CHO

3.1. TRANSFECCIÓN.

Las células CHO (ovario de hámster chino) (ECACC, the European Collection of Cell Cultures) fueron transfectadas con el Multiporator (Eppendorf, Hamburg, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La transfección de las células CHO se realizó en el laboratorio del Dr. Alfonso Gutiérrez Adan.

Dos plásmidos conteniendo el cDNA que codifica para las proteínas ZP2 y ZP3 humanas clonadas en pBluescript (KS) fueron donadas por el Dr. Dean (Laboratorio de Biología Celular y del Desarrollo, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Utilizando técnicas tradicionales

de biología molecular, los cDNAs se colocaron bajo la regulación de un promotor ubicuo de expresión, (promotor del citomegalovirus humano), y bajo el control de la señal de poliadenilación de SV40.

Finalmente realizamos el estudio con tres grupos de células; Células CHO que expresan ZP3 humana, células CHO que expresan ZP2 humana y células CHO sin transfectar que usamos como control.

3.2. CULTIVO DE CÉLULAS.

Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10% (inactivado a 57°C durante 30 minutos para eliminar el factor del complemento), 100 UI/ml de penicilina y estreptomina y 100 µg/ml de glutamina (Anexo VI). Las células se sembraron en frascos de cultivo (Iwaki, Japón) de 75 cm² con una capacidad de 16 ml y con una densidad de células aproximadamente de 16×10^6 células/frasco.

Los frascos con la suspensión celular se incubaron en una estufa de atmósfera húmeda 5% CO₂ y 95% de humedad relativa a 37°C. Cambiamos el medio a las 24 horas por medio nuevo para evitar la intoxicación de las células por dimetilsulfoxido (DMSO) que contenían las líneas celulares para protegerlas de la congelación, pero que una vez que han sido reactivadas, es tóxico.

Pasadas 24 horas y una vez que la confluencia de las células es de un 80%, el medio anterior se descartó por un medio específico de células CHO, CHO PF-AF Attachment Medium. Este medio también fue enriquecido con los antibióticos (penicilina y estreptomina) y el aminoácido glutamina a la misma concentración que en el medio descrito anteriormente (Anexo VI). Para la producción de las glicoproteínas de la ZP recombinante en células CHO se recomienda el uso de este tipo de medio (Harris *et al.*, 1999) de forma que podamos tener un buen nivel de células en crecimiento, niveles altos de proteínas recombinantes secretadas en el medio y una vez recogido

el sobrenadante la cantidad de contaminantes será mucho menor (Sinacora *et al.*, 2000).

Después 72 horas en la cámara de cultivo en condiciones estándar, retiramos el sobrenadante de los frascos de cultivo (16 ml aproximadamente) y los centrifugamos a una velocidad 4000 g a 4 °C en una centrífuga LoboFuge 400r para retirar los restos celulares.

El sobrenadante obtenido fue concentrado mediante filtros de centrífuga con membranas de corte de peso molecular de 10 kDa y volumen máximo de 15 ml (Millipore Corporation, Bedford). Mediante estos filtros de centrífuga realizamos el lavado de las muestras añadiendo agua pura bidestilada, centrifugando a 4000 g a 4°C y retirando el filtrado hasta diluir las muestras 100 veces. De esta manera retiramos posibles contaminantes disueltos en el medio y concentramos la muestra hasta un volumen final de 1 ml.

Finalmente obtuvimos un volumen de 1 ml a partir del sobrenadante recogido de las células CHO que expresan ZP2 y ZP3 humanas y de células CHO sin transfectar. Medimos la concentración de proteínas obtenido en cada fracción mediante un Bioanalizador Agilent 2100. Todas las fracciones se alicuotaron y se guardaron en cámara de -80°C hasta su uso inmediato

3.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES.

La caracterización de las glicoproteínas recombinantes ZP2 y ZP3 se realizó mediante análisis en electroforesis y transferencia a membranas que incubamos con diferentes anticuerpos específicos para estas glicoproteínas (Anexo III y IV).

3.3.1. SDS-PAGE e inmunotransferencia.

La electroforesis y la transferencia a membranas de PVDF se realizó en las mismas condiciones que hemos descrito anteriormente. La electroforesis se realizó, principalmente, en geles de acrilamida al 12% y en condiciones reductoras (Anexo V). Las calles se cargaron con 10 μ l del volumen que contenía ZP3 recombinante, con 15 μ l del volumen que contenía ZP2 recombinante y con 30 μ l del volumen obtenido de las células que no han sido transfectadas.

3.3.2. Inmunodetección.

Las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos contra las glicoproteínas de la ZP (Anexos III y IV). El proceso de incubación se realizó como ha sido detallado en los apartados anteriores. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Anticuerpos monoclonales de ratón anti-ZP3 humana y anti-ZP2 humana a una dilución (1:500) y (1:1000) respectivamente. Como segunda capa utilizamos un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (1:5000) de carnero.
- Anticuerpo monoclonal de ratón desarrollado contra ZPC de mono a una dilución (1:1000) utilizando como segunda capa el anticuerpo contra IgG de ratón (1:5000).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-ZP de cerdo a una dilución (1:1000). Como segunda capa utilizamos un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (1:20000) de carnero.

La visualización de las bandas se realizó mediante la incubación de las membranas con la solución ECL y revelado en películas fotográficas como ha sido detallado anteriormente.

3.4. INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Las muestras de semen fueron donadas por voluntarios que participan en un estudio sobre calidad seminal que se está realizando en el departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante bajo el consentimiento de los voluntarios y el visto bueno del comité de ética de la Universidad de Alicante. Una vez recibida las muestras, se realizó un seminograma según el "Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical" (OMS, 1999). Consideramos todas las muestras ensayadas normazoospermicas para todos los parámetros seminales; recuento, motilidad, viabilidad y morfología.

3.4.1. Capacitación espermática.

Los espermatozoides fueron capacitados mediante la técnica de "Swim up". Esta técnica es ampliamente utilizada en los laboratorios de Andrología con el objeto de preparar muestras para inseminaciones artificiales, fecundación *in vitro* (FIV) o FIV asistida por microinyección citoplasmáticas (ICSI).

Mezclamos el semen obtenido con medio de cultivo definido, HAM-F10 (Anexo VI). Tras homogeneizar la mezcla se centrifugó a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante (que contendrá el plasma seminal). Dependiendo del recuento y motilidad inicial de la muestra se realizó o no una segunda centrifugación. En cualquier caso se añadió muy cuidadosamente (para no perturbar las células depositadas en el fondo del tubo) un pequeño volumen (~0,5 ml) de medio sobre el sedimento final. A continuación se colocó en el incubador (37°C, 5% CO₂) durante 1 hora. Durante esta hora los espermatozoides con mejor motilidad serán capaces de "nadar" desde el precipitado hasta el medio (de ahí el termino "swim-up"). Al final de la incubación, en el sobrenadante,

recuperaremos la fracción de espermatozoides móviles (con velocidad progresiva, hiperactivados) libres de plasma seminal y células no espermáticas.

A partir de esta fracción comprobamos la calidad del semen y la cantidad de espermatozoides recogidos mediante la observación de una gota fresca en un placa de conteo (cámara Mackler) bajo microscopio óptico.

3.4.2. Ensayos de reacción acrosómica.

Se realizaron una serie de tratamientos que se describen a continuación para determinar la actividad biológica, en concreto, la inducción de la reacción acrosómica de ZP3 y ZP2 recombinante. La concentración óptima de espermatozoides utilizada para realizar los experimentos de reacción acrosómica fue de entre 1.000.000-10.000.000 espermatozoides/ml de volumen.

1. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM + 1 μ l de ZP3 recombinante. Dilución de ZP3 = 1:100.
2. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM + 1 μ l de ZP2 recombinante. Dilución de ZP2 = 1:100.
3. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM + 10 μ l de ZP2 recombinante. Dilución de ZP2 = 1:10.
4. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM + 10 μ l de sobrenadante expresado por células CHO sin transfectar. Dilución del medio recogido de células CHO = 1:10.
5. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM + 10 μ l de ionóforo 10 μ M.
6. 90 μ l de solución de espermatozoides + 10 μ l de CaCl₂ 220 mM

Como control de la posible actividad de las proteínas secretadas por las células CHO realizamos el ensayo de la reacción acrosómica con medio

recogido de células CHO sin transfectar (ensayo 4). Como control positivo de la reacción acrosómica inducida en los espermatozoides humanos utilizamos el ionóforo A23187 (Sigma, España) (ensayo 5) y realizamos un control de la reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides (ensayo 6).

Todas las muestras fueron incubadas a 37°C en una estufa con los viales sin tapar durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, añadimos 200 µl de tampón PBS y centrifugamos a 400 g a temperatura ambiente. Realizamos este paso tres veces. Finalmente resuspendemos cada muestra en 90 µl de tampón PBS. Para valorar la viabilidad de los espermatozoides ensayados y determinar correctamente los espermatozoides vivos reaccionados utilizamos el ensayo de HOS o prueba de la hinchazón de los espermatozoides en medio hipoosmótico (0,735 g de citrato de sodio y 1,351 g de fructosa en 100 ml de agua) (Jeyendran *et al.*, 1984). Los 90 µl fueron resuspendidos en 1 ml de medio hipoosmótico e incubados durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron centrifugados a 400 g a temperatura ambiente y resuspendidos nuevamente en 90 µl de PBS.

3.4.3. Evaluación de la reacción acrosómica.

La detección de la reacción acrosómica de los espermatozoides humanos fue detectada mediante la utilización de la lectina PSA-FICT. Los espermatozoides son previamente tratados con metanol para permeabilizar las membranas y marcados posteriormente con la lectina PSA unida al isocianato de fluoresceína (PSA-FITC) como colorante fluorescente. Dicho tratamiento corto con metanol, parece ser el apropiado para permitir una interacción limitada del PSA con los sitios de unión intracelulares y con una mayor afinidad por los componentes acrosómicos (Cross y Meizel, 1989) obteniéndose tres patrones diferentes (Fig. 2); acrosoma intacto (toda la región del acrosoma se encuentra marcado) (Fig. 2 patrón A), acrosoma reactivo (espermatozoides con marcaje en el segmento ecuatorial del acrosoma) (Fig. 2 patrón B) o espermatozoides sin marcaje alguno (Fig. 2 patrón C).

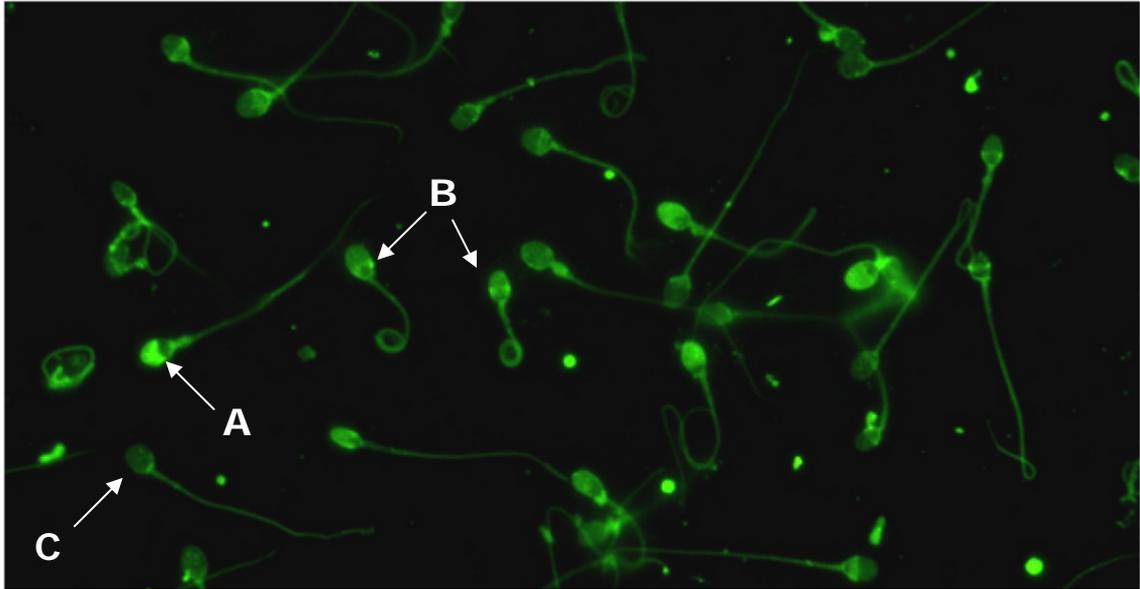


Figura 2. Espermatozoides humanos incubados con la lectina PSA-FITC. Podemos diferenciar diferentes patrones de fluorescencia; A: acrosoma intacto; B: acrosoma reactivo; C: acrosoma sin marcaje.

Para realizar la detección de la reacción acrosómica, 50 μ l de la solución obtenida en los ensayos de reacción acrosómica fueron depositados en cubreobjetos de vidrio y se dejaron secar durante 2 horas a temperatura ambiente. Con las muestras depositadas en los cubreobjetos se realizó el siguiente protocolo:

- Las muestras fueron fijadas con metanol a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Se lavaron tres veces en tampón PBS.
- Incubamos las muestras con la lectina PSA conjugada con FITC (Sigma, España) para su visualización en una concentración de 50 μ g/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
- Lavamos tres veces en tampón PBS.
- Finalmente los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando el medio de montaje para fluorescencia (Dako, España).

Las diferentes muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot y los datos obtenidos fueron analizados teniendo en cuenta los siguientes patrones de fluorescencia:

- **Espermatozoides no reaccionados** (Fig. 3A) = Fluorescencia intensa en toda la cabeza.
- **Espermatozoides reaccionados y vivos** (Fig. 3B,C) = Fluorescencia en el segundo segmento ecuatorial y sin presencia de fluorescencia en la cabeza y todos con las colas enroscadas.
- **Espermatozoides muertos** (Fig. 3D) = Colas estiradas.

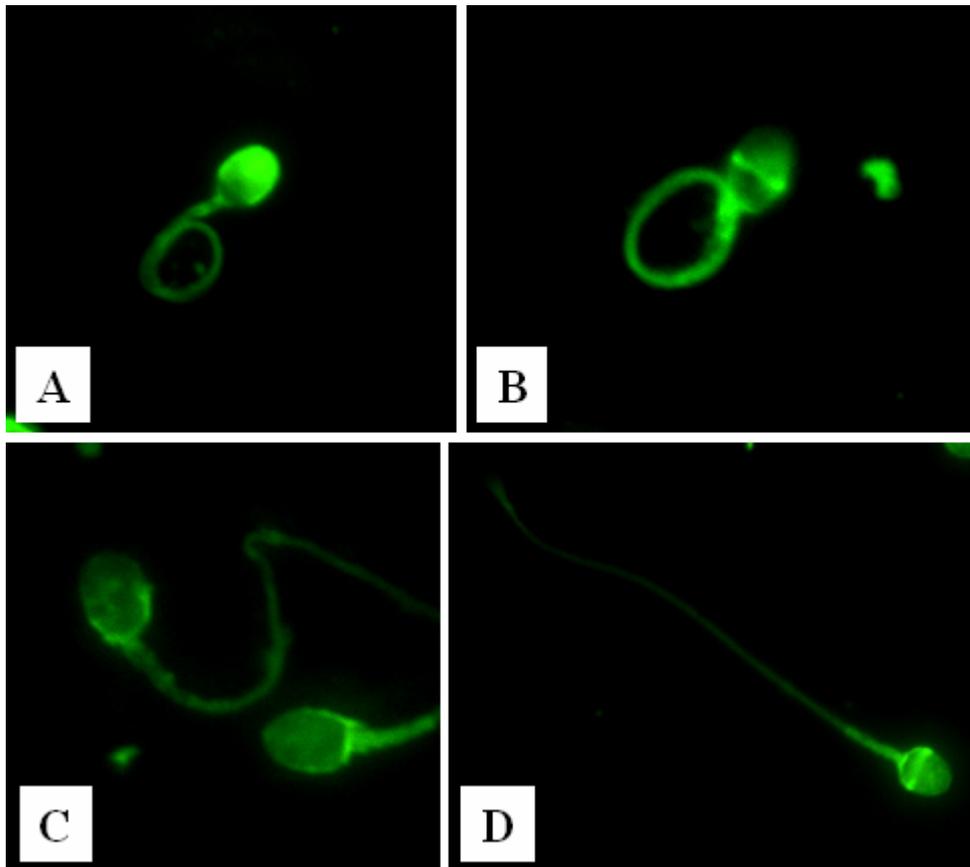


Figura 3. Patrones de fluorescencia analizados. (A). Espermatozoide no reaccionado. Observamos el material acrosómico marcado con la lectina por toda la cabeza. **(B). Espermatozoide vivo reaccionado.** Solamente aparece marcado el segmento ecuatorial, el resto del material acrosómico se ha desprendido. Notese como la cola aparece enroscada debido al tratamiento con el medio hiposmótico confirmándonos su viabilidad. **(C). Espermatozoide vivo reaccionado.** Todo el material acrosómico se ha desprendido y no se observa marcaje con la lectina. **(D). Espermatozoide reaccionado muerto.** Espermatozoide con la cola estirada debido a la ausencia de respuesta ante el medio hiposmótico y reaccionado probablemente debido a la disgregación del material.

Analizamos las proporciones de cada patrón de espermatozoides reaccionados vivos y espermatozoides no reaccionados de cada ensayo en cada uno de los pacientes. El número de pacientes incluido en este estudio fue de siete (n=7). La proporción de espermatozoides reaccionados y no reaccionados fue comparada usando el análisis de varianza ANOVA con una $P < 0,05$ realizada con SPSS v10.

4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ZP3 RECOMBINANTE SIN LAS CADENAS N-UNIDAS.

Para el estudio de la implicación de las cadenas de azúcares en la actividad de la ZP3 recombinante en la inducción de la reacción acrosómica esta glicoproteína fue digerida con la enzima N-glicosidasa F, para retirar las cadenas N-unidas. Una vez que la proteína fue tratada se realizaron los ensayos de reacción acrosómica.

4.1. Digestión con N-glicosidasa F.

La ZP3 recombinante fue digerida con la enzima N-glicosidasa F (EC 3.5.1.52, Roche). Esta enzima retira las cadenas N glicosiladas de las glicoproteínas.

Para este ensayo 10 μ l de ZP3 recombinante fue diluido en 9 μ l de tampón fosfato 50 mM pH 7,0 que contenía 10 mM EDTA y 0,1% de SDS concentrado tres veces. Esta dilución fue incubada en un baño con agua hirviendo durante 5 minutos para desplegar la glicoproteína y favorecer la digestión por la enzima. Una vez enfriada la muestra fue incubada con 8 UI de N-glicosidasa F en un baño durante toda la noche a 37° C.

Finalizado el proceso de incubación, se procedió a desactivar la enzima hirviendo las muestras durante 5 minutos para evitar que la actividad de la enzima intervenga en el ensayo de reacción acrosómica.

Para retirar las cadenas de azúcares que han sido liberadas y que no puedan afectar a los ensayos de reacción acrosómica, las muestras fueron lavadas mediante la utilización de filtros de centrífuga con corte de peso molecular de 10 kDa. Añadimos el volumen necesario de tampón PBS para diluir la muestra 100 veces y obtener volumen final de 100 μ l.

Como controles hemos realizado dos tipos de tratamientos. Una muestra con 10 μ l de ZP3 recombinante diluida en tampón pero sin añadir la enzima y otra muestra contenía la enzima que fue sometida al mismo proceso descrito anteriormente. Ambas muestra fueron incubadas el mismo tiempo, hervidas y lavadas con el filtro de cetrífuga y tampón PBS.

La muestra tratada con la enzima, la muestra control de ZP3 recombinante y la muestra control de enzima serán caracterizados mediante electroforesis y western-blot y se realizaran los ensayos de reacción acrosómica. De los volúmenes obtenidos, la mitad será usado para el análisis bioquímico y la otra mitad para los ensayos de reacción acrosómica.

4.2. Ensayo de reacción acrosómica.

Para la realización del ensayo de reacción acrosómica se utilizó la mitad del volumen obtenido en la digestión de la glicoproteína ZP3 de manera, que el volumen de la glicoproteína que tenemos en la solución será aproximadamente de 5 μ l, pudiendo realizar cinco ensayos diferentes a la misma dilución de glicoproteína recombinante que utilizamos para la caracterización biológica de la ZP3 en los ensayos de reacción acrosómica. El volumen total de ZP3 recombinante tratada químicamente fue de 50 μ l para realizar los ensayos de reacción acrosómica.

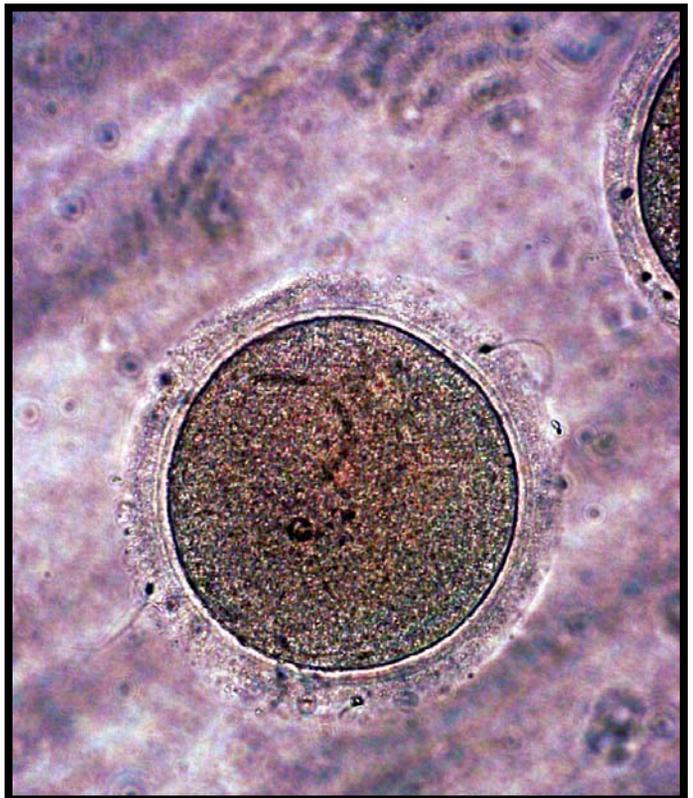
En general, los ensayos de reacción acrosómica se realizaron en cinco pacientes (n = 5) como ha sido detallado en el apartado anterior. Las muestras que utilizamos para este experimento fueron las siguientes:

1. 90 μ l de solución de espermatozoides capacitados + 10 μ l de CaCl_2 220 mM + 10 μ l de la solución que contiene la ZP3 recombinante digerida con la enzima. Dilución de ZP3 recombinante = 1:100.
2. 90 μ l de solución de espermatozoides capacitados + 10 μ l de CaCl_2 220 mM + 10 μ l de la solución que contiene la ZP3 recombinante control. Dilución de ZP3 recombinante = 1:100.
3. 90 μ l de solución de espermatozoides capacitados + 10 μ l de CaCl_2 220 mM + 10 μ l de la solución que contiene la enzima control.
4. 90 μ l de solución de espermatozoides capacitados + 10 μ l de CaCl_2 220 mM + 10 μ l de ionóforo 10 μ M.
5. 90 μ l de solución de espermatozoides capacitados + 10 μ l de CaCl_2 220 mM .

Todas estas muestras fueron incubadas a 37°C durante 1 hora. Para la visualización de la reacción acrosómica producida en los espermatozoides realizamos la técnica de inmunofluorescencia con la lectina PSA como ha sido descrito anteriormente.

Realizamos una comparación estadística entre los espermatozoides reaccionados y los espermatozoides no reaccionados siguiendo los patrones de fluorescencia descritos anteriormente. La proporción de espermatozoides reaccionados y no reaccionados fue comparada usando el análisis de varianza ANOVA con una $P < 0,05$ realizada con SPSS v10.

VI. RESULTADOS



1. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ZONA PELÚCIDA Y GRÁNULOS CORTICALES DE OVOCITOS HUMANOS.

1.1. Citoquímica de la zona pelúcida de ovocitos humanos en metafase II y vesícula germinal.

Para determinar la presencia y distribución de los diferentes carbohidratos en la ZP de ovocitos humanos utilizamos una batería de lectinas y anticuerpos específicos, que reconocen diferentes secuencias glucídicas. De igual modo hemos utilizado un anticuerpo específico contra la parte proteica de la glicoproteína ZP3 humana.

1.1.1. Inmunocitoquímica.

El anticuerpo anti-ZP3 humano presenta una fuerte reactividad en todo el espesor de la ZP humana tanto en ovocitos en VG como en ovocitos en MII (Fig. 1). La ZP humana también fue marcada intensamente con los anticuerpos anti-sialil-Lewis^a (Fig. 2) y anti-sialil-lewis^x (Fig. 3) en los dos estadios analizados en este estudio. No fue detectada reactividad alguna con los anticuerpos anti- α -Gal, anti-Lewis^a, anti-Lewis^b, anti-Lewis^x y TEC-02 en la ZP.

1.1.2. Citoquímica de lectinas.

La ZP humana de ovocitos en VG y MII presenta afinidad por las siguientes lectinas: AAA, AIA, ConA, DSA, LFA, MAA, PHA-E, PHA-L, RCA-I y WGA (Figs. 4,5a,b,6,7,8). Sin embargo, no encontramos marcaje en la ZP cuando incubamos las secciones ultrafinas de ovocitos humanos con las siguientes lectinas: BSA-I-B₄, DBA, GNA, HPA, LTA, PNA (Fig. 10a), SBA, SNA, STA o UEA-I.

1.1.3. Tratamiento con neuraminidasa.

Cuando las secciones ultrafinas fueron tratadas con la enzima neuraminidasa y eliminamos los residuos de ácido siálico, las lectinas LTA (Fig. 9), PNA (Fig. 10b) y SBA presentaron reactividad por la ZP de ovocitos humanos. Este tratamiento también expone los sitios de unión que reconocen los anticuerpos anti-Lewis^a y anti-Lewis^x. Cuando incubamos la ZP humana con la lectina WGA después del tratamiento con la enzima el marcaje observado desciende. La digestión con neuraminidasa abolió completamente el marcaje obtenido con las lectinas LFA y MAA y los anticuerpos anti-sialil-Lewis^a y anti-sialil-lewis^x.

No observamos modificaciones en el patrón de unión de las lectinas DBA, HPA y UEAI y los anticuerpos anti- α -Gal, anti-Lewis^b y TEC-02.

1.1.4. Controles

1.1.4.1. Controles negativos.

No observamos marcaje en la ZP de ovocitos humanos cuando sustituimos el anticuerpo por su correspondiente tampón. No observamos ningún tipo de marcaje en la ZP cuando incubamos las lectinas con su correspondiente azúcar inhibidor: D-GlcNAc (WGA), N-acetilactosamina (DSA), L-Fuc (AAA) (Fig. 5b), D-Gal (PNA y RCA I). La preincubación de las secciones ultrafinas con la enzima neuraminidasa abolió el marcaje obtenido con MAA, LFA y los anticuerpo anti-sialil-Lewis. Para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-sialil-Lewis usamos la ZP de ratón donde se ha descrito anteriormente que no se encuentran estas secuencias (Avilés *et al.*, 2000b; Easton *et al.*, 2000) y observamos un marcaje negativo.

Para determinar la especificidad de algunas lectinas por la Gal incubamos las secciones con la enzima galactosa oxidasa. Tras el tratamiento de las secciones ultrafinas con la enzima galactosa oxidasa el

marcaje observado con las lectinas AIA y MPA desapareció. Este tratamiento, también se realizó en secciones que habían sido digeridas previamente con la enzima neuraminidasa, siendo la afinidad por la lectina PNA totalmente abolida.

1.1.4.2 Controles positivos.

Observamos reactividad con las lectinas BSAI-B₄, DBA, HPA, PNA, SBA y el anticuerpo anti- α -Gal en la ZP de ratón y con las lectinas GNA, LTA y UEA-I en oviducto de rata, tal y como ha sido descrito anteriormente en trabajos que estudian la composición glucídica de la ZP mediante el uso de lectinas (Avilés *et al.*, 1997b; Avilés *et al.*, 2000a) y técnicas biofísicas (Easton *et al.*, 2000). De esta manera demostramos la funcionalidad de las lectinas y anticuerpo utilizados. Estomago de rata y ZP bovina presentaron reactividad a la lectina SNA como hemos observado en diferentes trabajos realizados en el laboratorio. Para demostrar la funcionalidad de los anticuerpos Lewis usamos diferentes tejidos. Las células Reed Sternberg de Hodgkin's y granulocitos humanos fueron positivos para la unión del anticuerpo anti-Lewis^x. Las células de adenocarcinoma de colon humano fueron marcadas con los anticuerpos anti-Lewis^a, anti-Lewis^b y anti-Lewis^x. Después del tratamiento de las secciones ultrafinas con la enzima neuraminidasa la ZP de ovocitos humanos fue reactiva a los anticuerpos anti-Lewis^a y anti-Lewis^x.

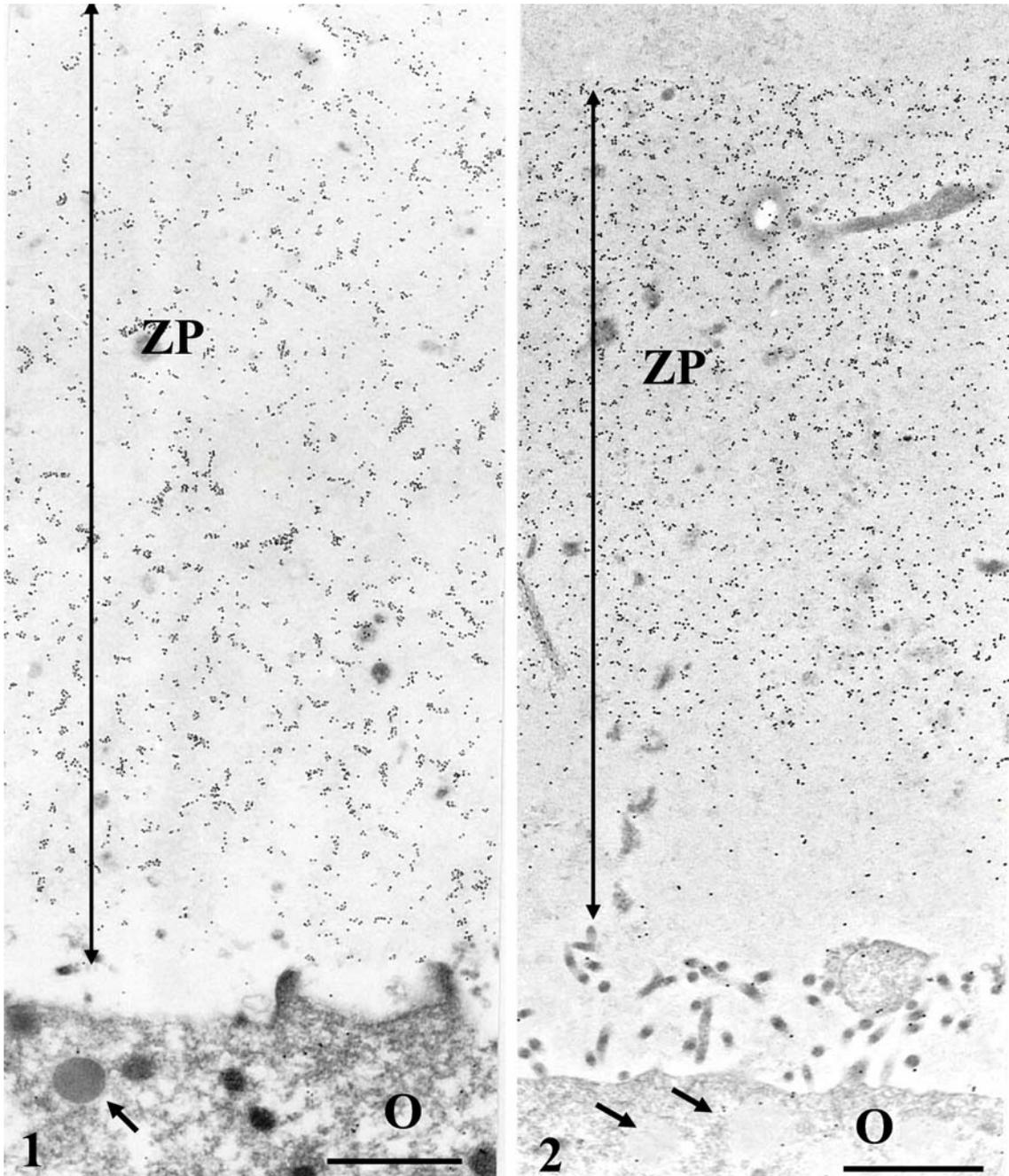


Figura 1. Anticuerpo anti-ZP3 humana. Ovocito humano en Metafase II. Observamos un intenso inmunomarcaje en toda la ZP. Nótese como los gránulos corticales (GC) situados cerca del oolema no fueron reactivos a este anticuerpo (flecha). Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

Figura 2. Anticuerpo anti-sialil-Lewis^a. Ovocito humano en metafase II. La mayor parte de la ZP se encuentra inmunomarcada; sin embargo, un débil marcaje fue detectado en la zona próxima al ovocito. Los GC no fueron marcados (flechas). Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

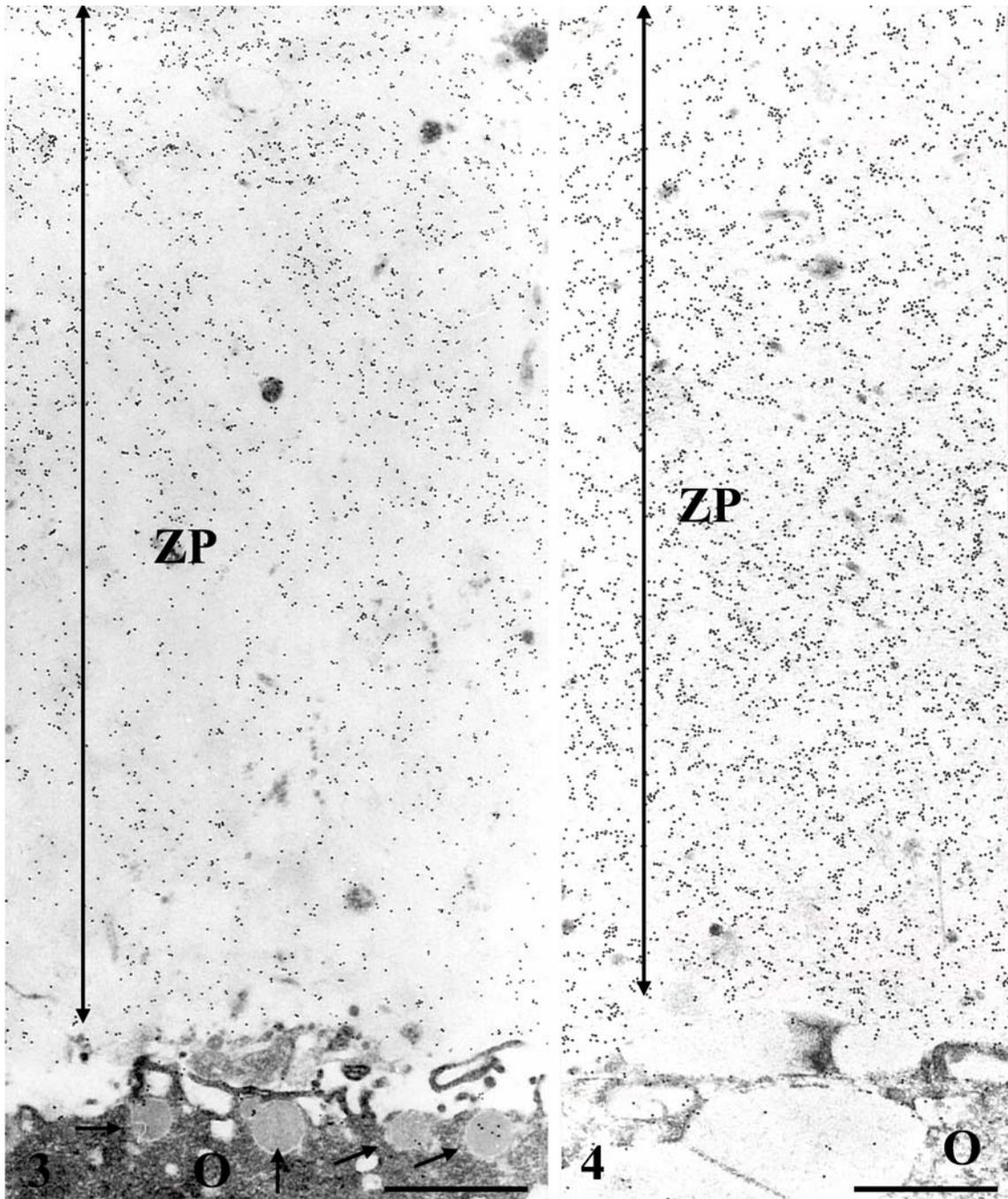


Figura 3. Anticuerpo anti-sialil-Lewis^x. Ovocito humano en metafase II. La ZP fue intensamente marcada con este anticuerpo pero observamos mayor reactividad en la zona más alejada del ovocito. Los GC no son reactivos a este anticuerpo (flechas). Ovocito: O. Barra= 1µm.

Figura 4. WGA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. Se observa un fuerte marcaje en todo el espesor de ZP. Ovocito: O. Barra= 1µm.

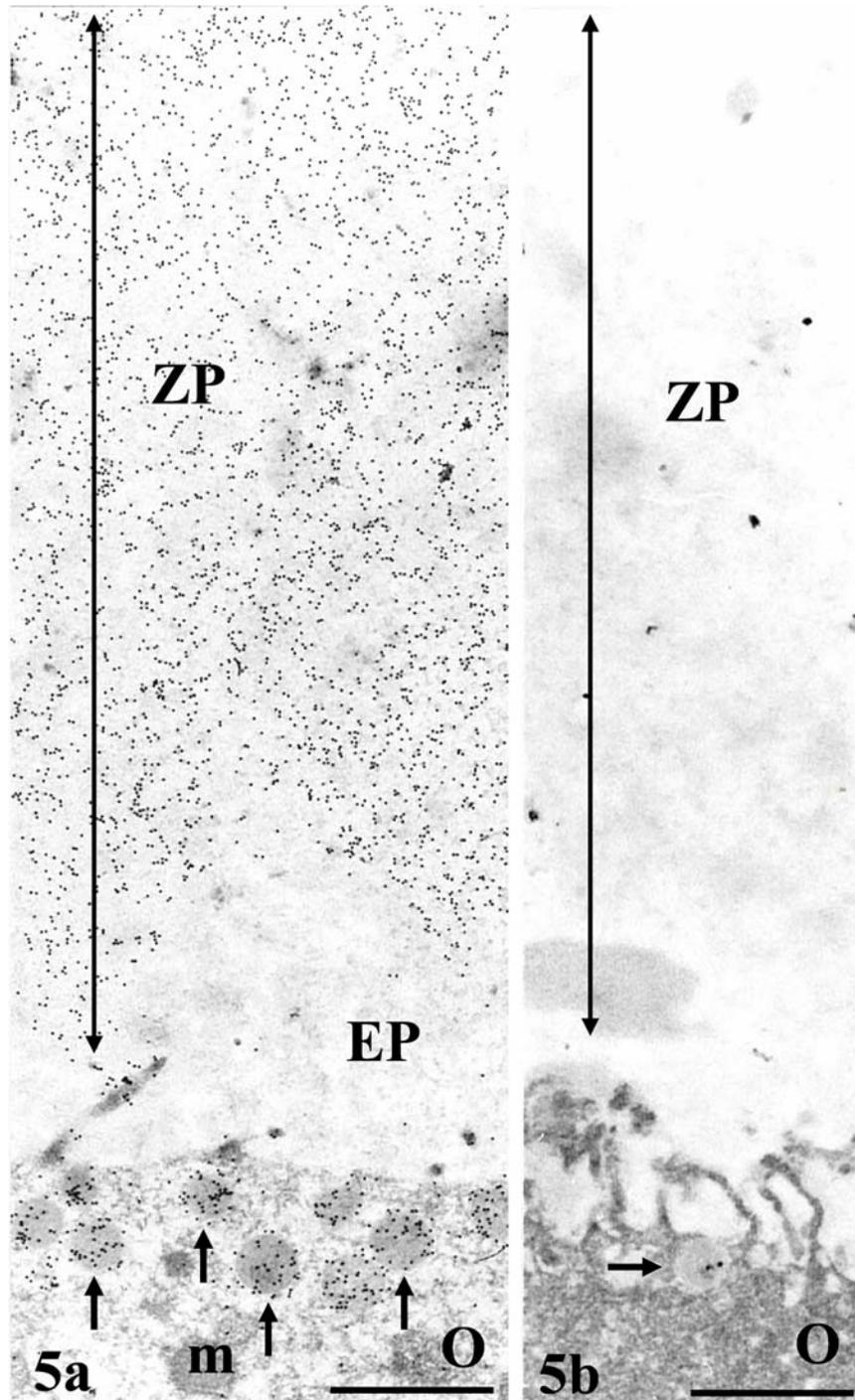


Figura 5. AAA conjugada con DIG. Ovocito en Metafase II. (a) La lectina muestra una afinidad homogénea e intensa por toda la ZP. Nótese la intensa reactividad que muestran los GC (flechas). (b) Sección control incubada con AAA en presencia de fucosa a 0,2 mol/l. El marcaje fue abolido en la ZP y los GC (flecha). Mitochondria: m; Ovocito: O; espacio perivitelino: EP. Barra= 1 μ m.

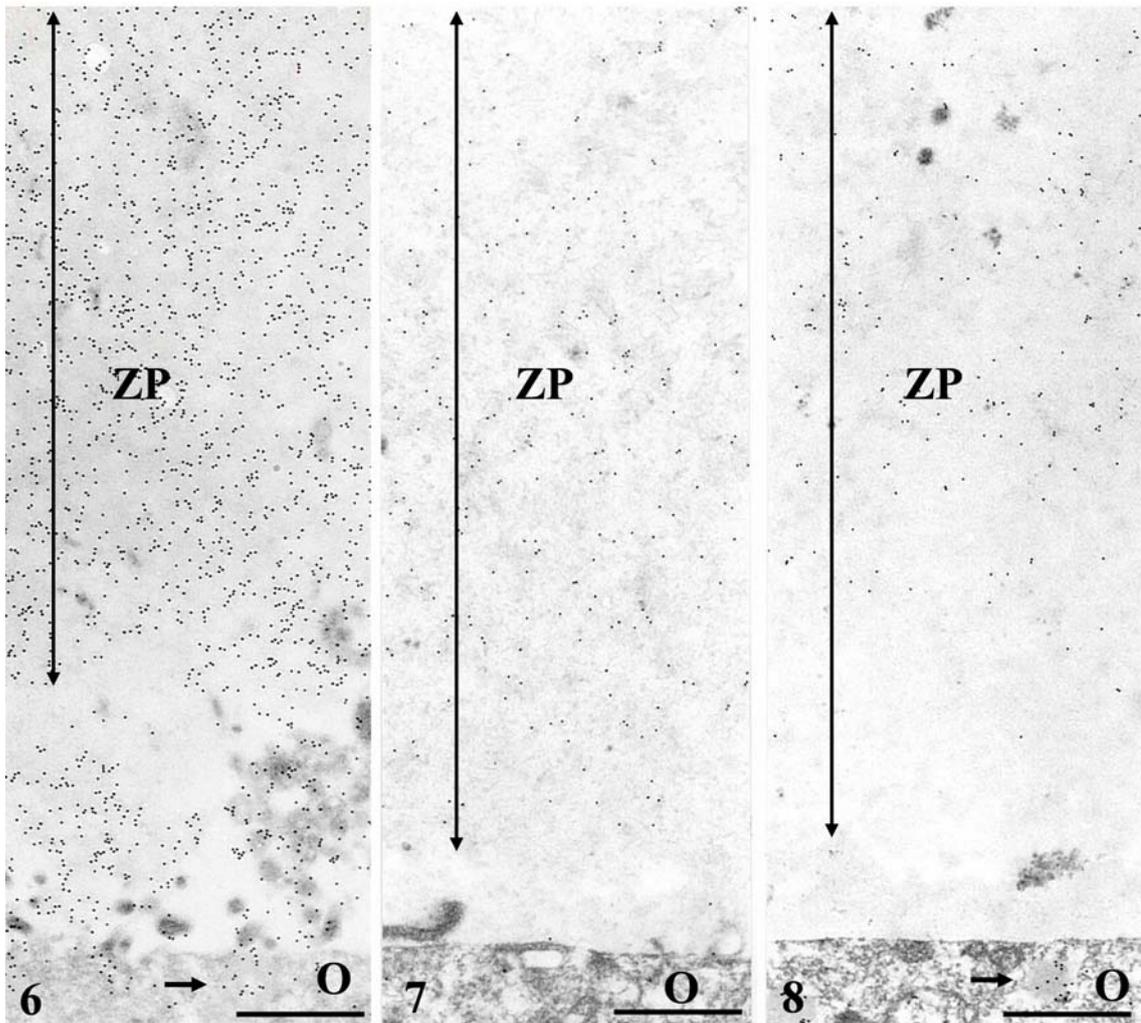


Figura 6. DSA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. Observamos un fuerte y uniforme marcaje por toda la ZP. Los GC que aparecen inmediatamente debajo de la membrana plasmática también aparecen marcados (flecha). Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

Figura 7. MAA conjugada con DIG. Ovocito en Metafase II. La ZP presenta un marcaje moderado. Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

Figura 8. MPA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. Observamos un marcaje moderado y principalmente localizado en la región externa de la ZP. Los GC aparecen específicamente marcados con esta lectina (flecha). Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

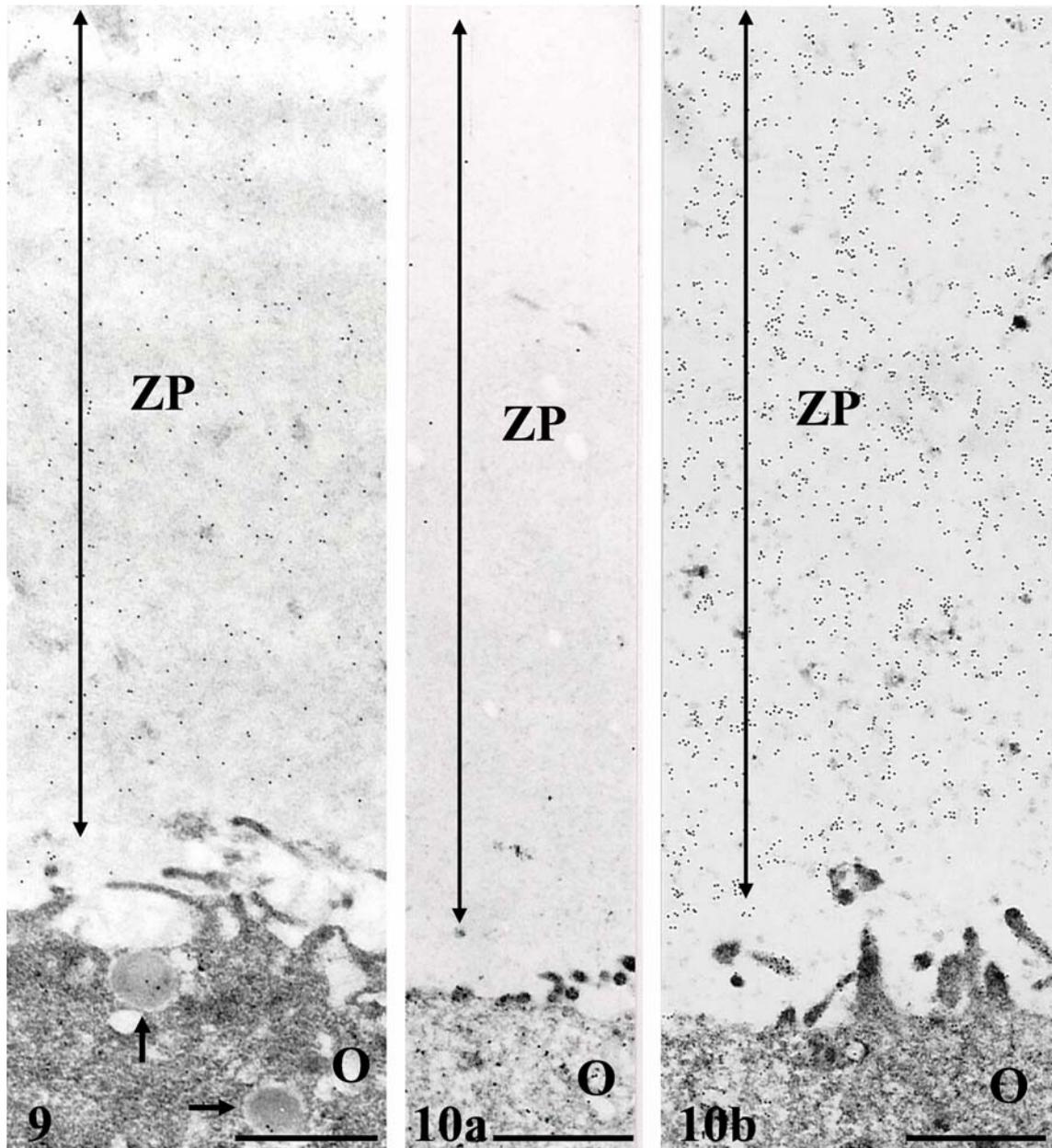


Figura 9. LTA conjugada con HRP incubada después del tratamiento con neuraminidasa. Ovocito en metafase II. La ZP muestra un marcaje moderado después de eliminar los residuos de ácido siálico. Un débil marcaje es observado en los GC (flechas). Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

Figura 10. PNA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. (a) La lectina no mostró afinidad por la ZP. **(b)** Después de la digestión con neuraminidasa, la ZP fue intensamente marcada en todo su espesor. Ovocito: O. Barra= 1 μ m.

1.2. Análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo se realizó con dos lectinas y dos anticuerpos que reconocen secuencias de carbohidratos en la ZP humana y un anticuerpo anti-ZP3 humano debido al limitado número de ovocitos disponible para este estudio. Los resultados que obtuvimos se encuentran detallados en la tabla I.

Las partículas de oro coloidal observadas en las secciones incubadas con las lectinas AAA y WGA se encuentran más densamente distribuidas en la zona interna de la ZP próxima al ovocito. Una distribución similar observamos con el anticuerpo anti-ZP3 humano. Sin embargo, el inmunomarcaje obtenido con los anticuerpos anti-sialil-Lewis^a y anti-sialil-Lewis^x fue más denso en la zona externa de la ZP humana. Las diferencias de densidad de marcaje observado entre las diferentes regiones de la ZP humana (zona interna 1,2 y zona externa 1,2) fueron estadísticamente significativas con las lectinas y anticuerpos utilizados.

Tabla I. Densidad de marcaje (partículas de oro/ μm^2) en las diferentes regiones de la zona pelúcida.						
		Ovocito	Regiones de la ZP			Células del cúmulo
			Interna 1	Interna 2	Externa 1	Externa 2
WGA	▲		58,3 ± 1,3	50,3 ± 1,3	34,5 ± 1,4	31,0 ± 2
AAA	■		79,8 ± 2,4	78,7 ± 2,4	72,7 ± 2,0	56,9 ± 2,4
SLA	●		23,3 ± 1,5	57,3 ± 2,2	59,8 ± 2,1	48,1 ± 2
SLX	●		20,7 ± 0,7	31,1 ± 1,0	31,5 ± 1,1	47,9 ± 2,9
Anti-ZP3	■		49,1 ± 1,5	51,6 ± 1,4	49,7 ± 1,2	18,5 ± 1,3

Las intensidades de marcaje vienen expresadas como media ± error estándar.

La ZP fue dividida en cuatro regiones que fueron llamadas interna 1, interna 2, externa 1 y externa 2 de acuerdo a su proximidad al ovocito.

▲ No existen diferencias estadísticas entre la región externa 1 y externa 2 de la ZP. Existen diferencias significativas entre el resto de las combinaciones ($P < 0,05$).

■ Existen diferencias significativas entre la región externa 2 y las otras regiones de la ZP ($P < 0,05$).

● No existen diferencias significativas entre la zona interna 2 y la zona externa 1 de la ZP. Existen diferencias significativas entre el resto de las combinaciones ($P < 0,05$).

1.3. Citoquímica de los gránulos corticales de ovocitos humanos.

Los gránulos corticales son estructuras que muestran una localización típica justo debajo de la membrana del ovocito. No encontramos diferencias cualitativas en los patrones observados con el marcaje de lectinas y anticuerpos entre los ovocitos en vesícula germinal y metafase II. Los gránulos corticales fueron marcados intensamente con la lectinas: AAA, AIA, DSA, LFA, MPA, PHA-E y WGA (Figs. 11,12a,b,13a,b,14,16,17). La lectina MAA (Fig. 15) y el anticuerpo anti-sialil-Lewis^x mostraron una débil reactividad. El marcaje observado en los gránulos corticales no fue uniforme, de modo, que en una misma sección podemos encontrar unos gránulos corticales marcados con la lectina y otros gránulos que no son reactivos a esta lectina (Fig. 13a).

Los gránulos corticales no fueron reactivos a las lectinas: BSAI-B₄, ConA, DBA, GNA, HPA, LTA, PHA-L, PNA (Fig. 18a), RCA-I, SBA, SNA, STA, UEA-I y los otros anticuerpos empleados en este estudio. Después del tratamiento con neuraminidasa, los gránulos corticales mostraron una intensa reactividad a la lectina PNA (Fig. 18b); sin embargo, no observamos cambios en la unión con las lectinas DBA, HPA, LTA (Fig. 9) y SBA.

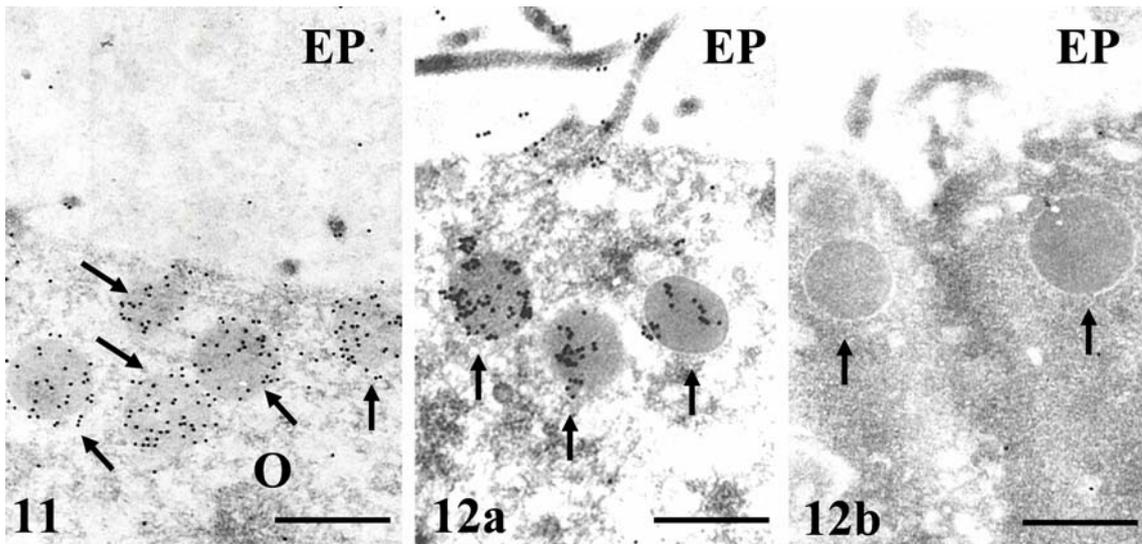


Figura 11. AAA conjugada con DIG. Ovocitos en metafase II. Observamos una fuerte reactividad en los gránulos corticales (flechas) con esta lectina. Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

Figura 12. AIA conjugada con DIG. Ovocitos en metafase II. (a) Se observa un evidente marcaje en los gránulos corticales (GC) (flechas). **(b)** Después del tratamiento con galactosa oxidasa el marcaje en los GC desaparece. Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

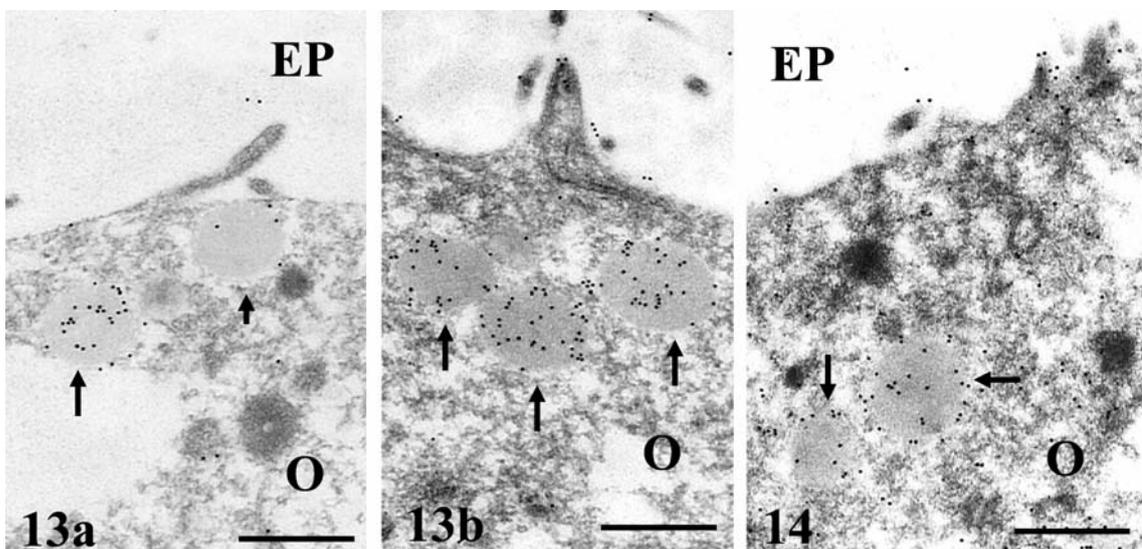


Figura 13. MPA conjugada con DIG. (a) Ovocito en metafase II. Los gránulos corticales (GC) (flecha) presenta afinidad por esta lectina; sin embargo, podemos observar como algunos GC no presentan marcaje (punta de flecha). **(b)** Ovocito en vesícula germinal (profase I). Los GC están fuertemente marcados (flechas). Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

Figura 14. DSA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. Los gránulos corticales presentan un marcaje moderado cuando son incubados con esta lectina. Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

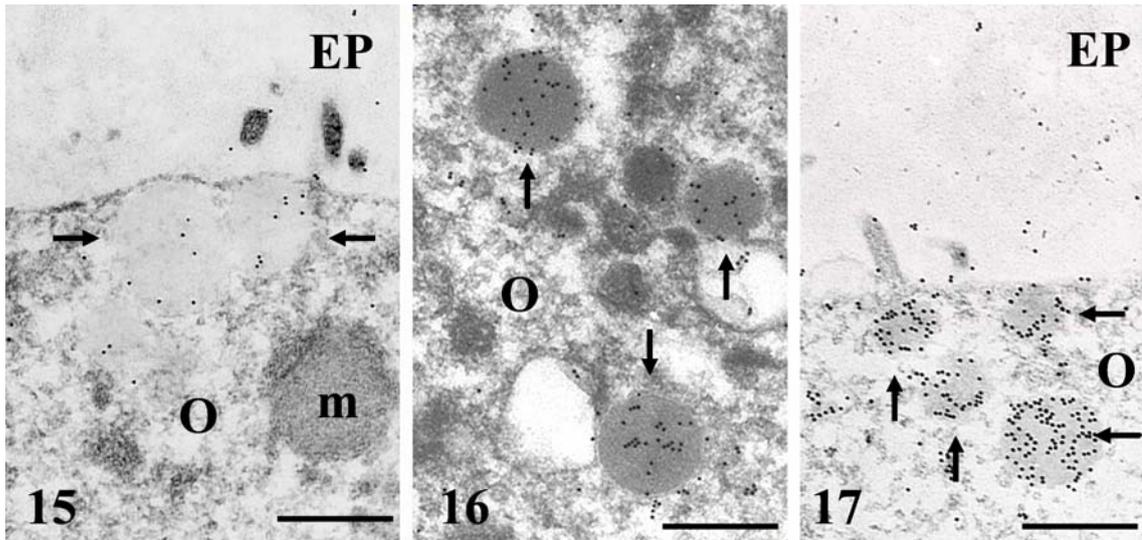


Figura 15. MAA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. Observamos como los GC (flechas) presentan una débil reactividad por esta lectina. Espacio perivitelino: EP; mitocondria: m; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

Figura 16. PHA-E conjugada con HRP. Ovocito en metafase II. Los GC son reactivos a esta lectina (flechas). Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

Figura 17. WGA conjugado con DIG. Ovocito en metafase II. Nótese como los GC muestran una fuerte afinidad por esta lectina. Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

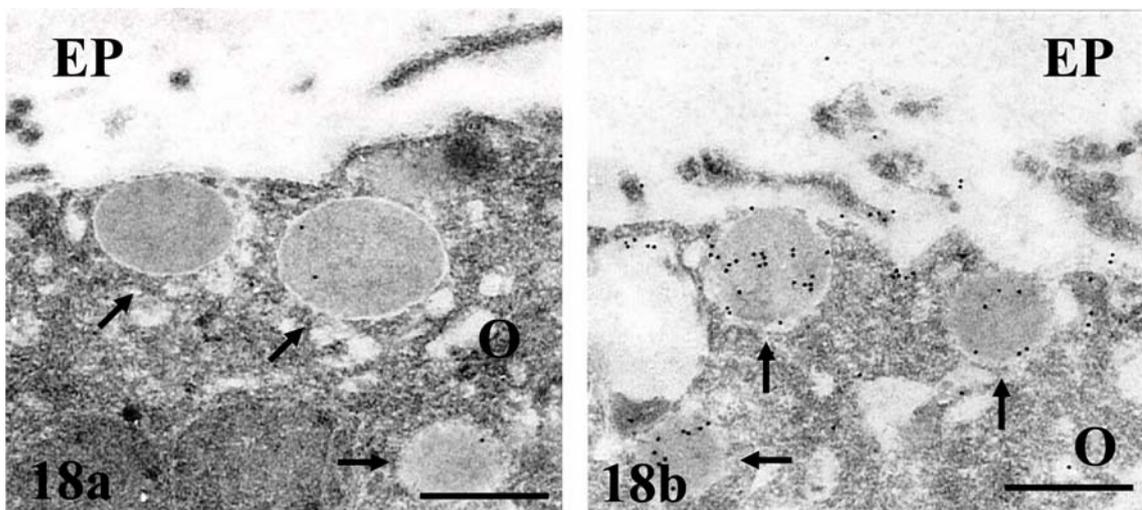


Figura 18. PNA conjugada con DIG. Ovocito en metafase II. (a) No observamos marcaje en los GC con esta lectina (flechas). **(b)** Después del tratamiento con neuraminidasa los GC se vuelven reactivos a esta lectina (flechas). Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O. Barra= 0,5 μ m.

2. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA.

2.1. Inmunocitoquímica de los ovocitos humanos.

Los ovocitos humanos en vesícula germinal (profase I) y metafase II, fueron incluidos en la resina LR-White e incubados con los anticuerpos anti-ZP3 humana, anti-ZP total de cerdo y anti-ZPC de cerdo. Con la utilización de esta resina podemos observar con mejor claridad como el anticuerpo anti-ZP3 humano presenta una mayor densidad de marcaje en la zona interna de la ZP próxima al ovocito (Fig. 19a). Además, los anticuerpos anti-ZP de cerdo y anti-ZPC de cerdo (Fig. 19b,c) muestran una fuerte afinidad por la ZP humana.

En el oolema de los ovocitos en profase I podemos observar un marcaje moderado con los anticuerpos anti-ZP3 humana, anti-ZP de cerdo y anti-ZPC de cerdo (Fig. 20a-c). Sin embargo, en los ovocitos en metafase II no observamos este marcaje. Justamente debajo del oolema observamos como los GC no aparecen marcados demostrando la especificidad de estos anticuerpos por epitopos de la ZP (Fig. 19)

En el ooplasma de los ovocitos en profase I se observa un marcaje específico con estos tres anticuerpos en cuerpos multivesiculares o estructuras con morfología de lisosoma (Fig. 21a-c). En los ovocitos que se encontraban en metafase II no encontramos estas estructuras específicamente marcadas.

El aparato de Golgi en ovocitos en profase I presenta la estructura típica de cisternas apiladas. En los ovocitos que se encontraban en metafase II no encontramos estas organelas. En el ooplasma de ovocitos humanos en profase I podemos observar el aparato de Golgi específicamente marcado con los anticuerpos anti-ZP3 humano, anti-ZP de cerdo y anti-ZPC de cerdo (Fig 22a-c).

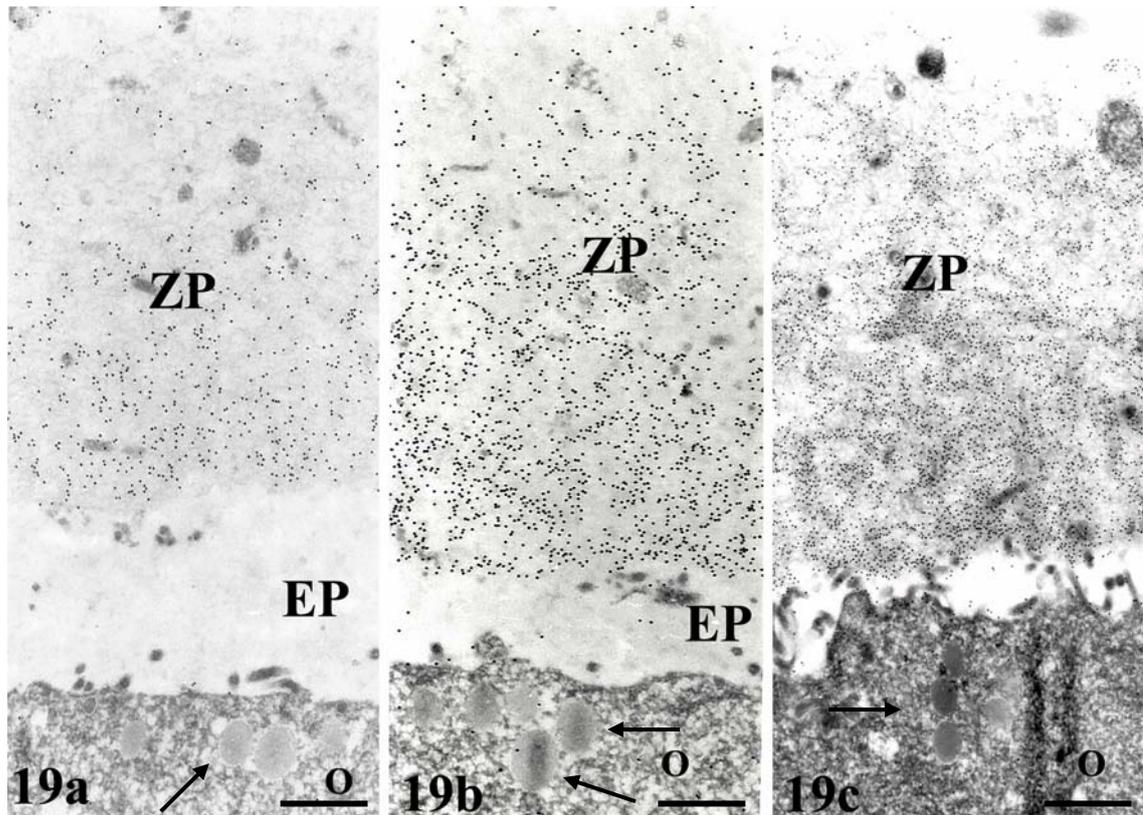


Figura 19. Ovocito en metafase II marcado con anticuerpos contra glicoproteínas de la zona pelúcida. (a) Anti-ZP3 humana. La zona interna de la zona pelúcida presenta mayor densidad de marcaje que la zona externa. **(b)** Anti-ZP de cerdo. La ZP humana aparece específicamente marcada con este anticuerpo. **(c)** Anti-ZPC de cerdo. Observamos como este anticuerpo se une fuertemente a la ZP humana. Nótese como en las tres secciones no se observa marcaje en los GC (flechas) con estos anticuerpos específicos. Espacio perivitelino: EP; Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 1 μ m

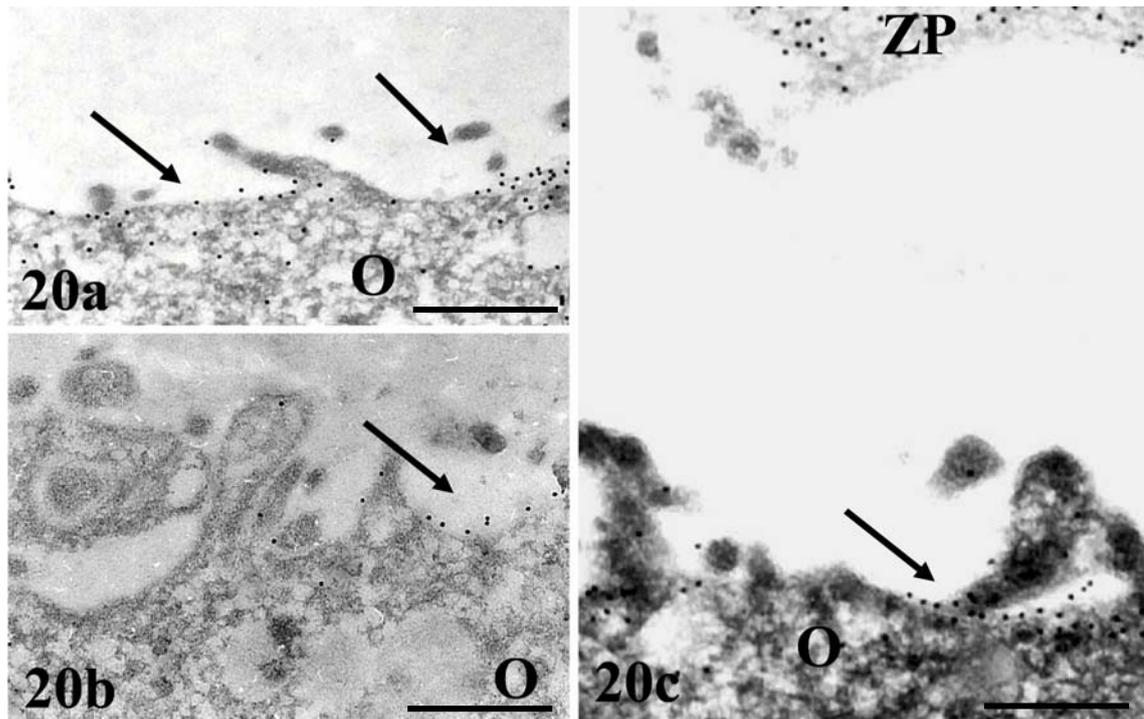


Figura 20. Ovocito en profase I. (a) Anti-ZP de cerdo. Nótese el punteado continuo en el oolema (flechas). Barra= 0.5 μm **(b)** Anti-ZP3 humana. Se observa un moderado marcaje en el oolema (flechas). Barra= 0.5 μm **(c)** Anti-ZPC de cerdo. El oolema (flechas) aparece específicamente marcado con este anticuerpo. Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 0,3 μm .

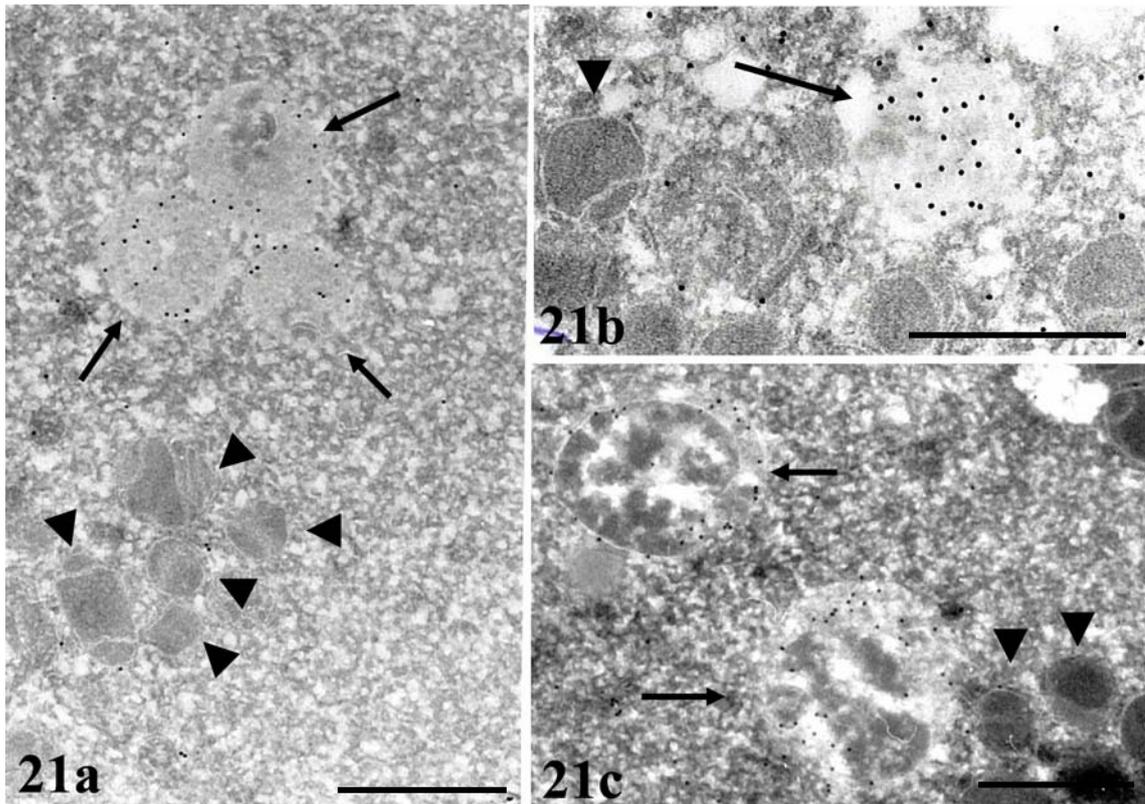


Figura 21. Ovocito en profase I. (a) Anti-ZP3 humano. Nótese como los cuerpos multivesiculares (flechas) aparecen específicamente marcados. **(b)** Anti-ZP de cerdo. Observamos como el cuerpo multivesicular presenta un fuerte marcaje. **(c)** Anti-ZPC de cerdo. Los cuerpos multivesiculares (flechas) presentan un marcaje moderado. Podemos observar como con los tres anticuerpos las mitocondrias (cabeza de flecha) no presentan marcaje debido a la especificidad de estos anticuerpos. Barra= 0,5 μ m.

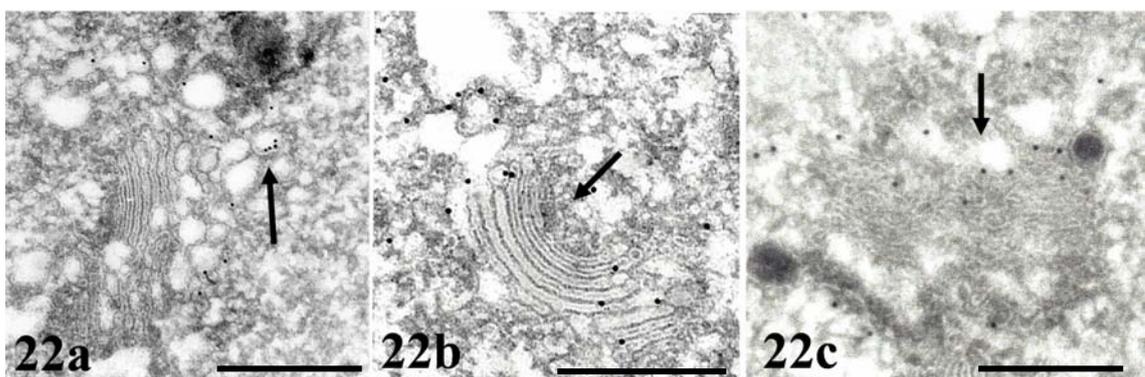


Figura 22. Ovocito en profase I. (a) Anti-ZP3 humana. Observamos marcado específicamente diferentes estructuras vesiculares del aparato de Golgi (flecha). **(b)** Anti-ZP de cerdo. Nótese la estructura típica del aparato de Golgi específicamente marcada. **(c)** Anti-ZPC de cerdo. El aparato de Golgi presenta afinidad por este anticuerpo. Barra= 0,5 μ m.

2.2. Inmunocitoquímica de ovocitos de ratón.

Las secciones ultrafinas de ovarios de ratón fueron marcadas con anticuerpos específicos contra organelas citoplasmáticas como el anticuerpo anti-PDI, que reconoce el retículo endoplasmático y el anticuerpo anti-GM130 que reconoce el aparato de Golgi. El estudio se realizó en folículos unilaminares (n=3), bilaminares (n=7) y multilaminares (n=7). En los folículos unilaminares (Fig. 23a) observamos la presencia de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 23c) con una disposición alargada y formando cisternas apiladas. En esta fase de desarrollo observamos numerosos dictiosomas del aparato de Golgi (Fig. 23b). En los folículos bilaminares se observan unas estructuras circulares abundantes en número distribuidas por todo el ooplasma. Estas estructuras fueron intensamente marcadas con el anticuerpo anti-PDI (Fig. 24). En los folículos multilaminares no se observa la estructura típica de retículo endoplasmático; sin embargo, podemos observar pequeñas vesículas electrodensas distribuidas por todo el ooplasma (Fig. 25), marcadas específicamente con el anticuerpo anti-PDI. En este estadio del desarrollo no observamos los apilamientos de cisternas característicos del aparato de Golgi.

Medimos el diámetro de 10 estructuras circulares de 7 ovocitos diferentes que se encontraban en folículos bilaminares. Estas estructuras presentaron un diámetro medio de $1,5 \mu\text{m} \pm 0,03$.

Medimos el diámetro de 75 vesículas electrodensas de 7 ovocitos diferentes que se encontraban en folículos multilaminares. Estas estructuras presentaron un diámetro medio de $100 \text{ nm} \pm 0,1$.

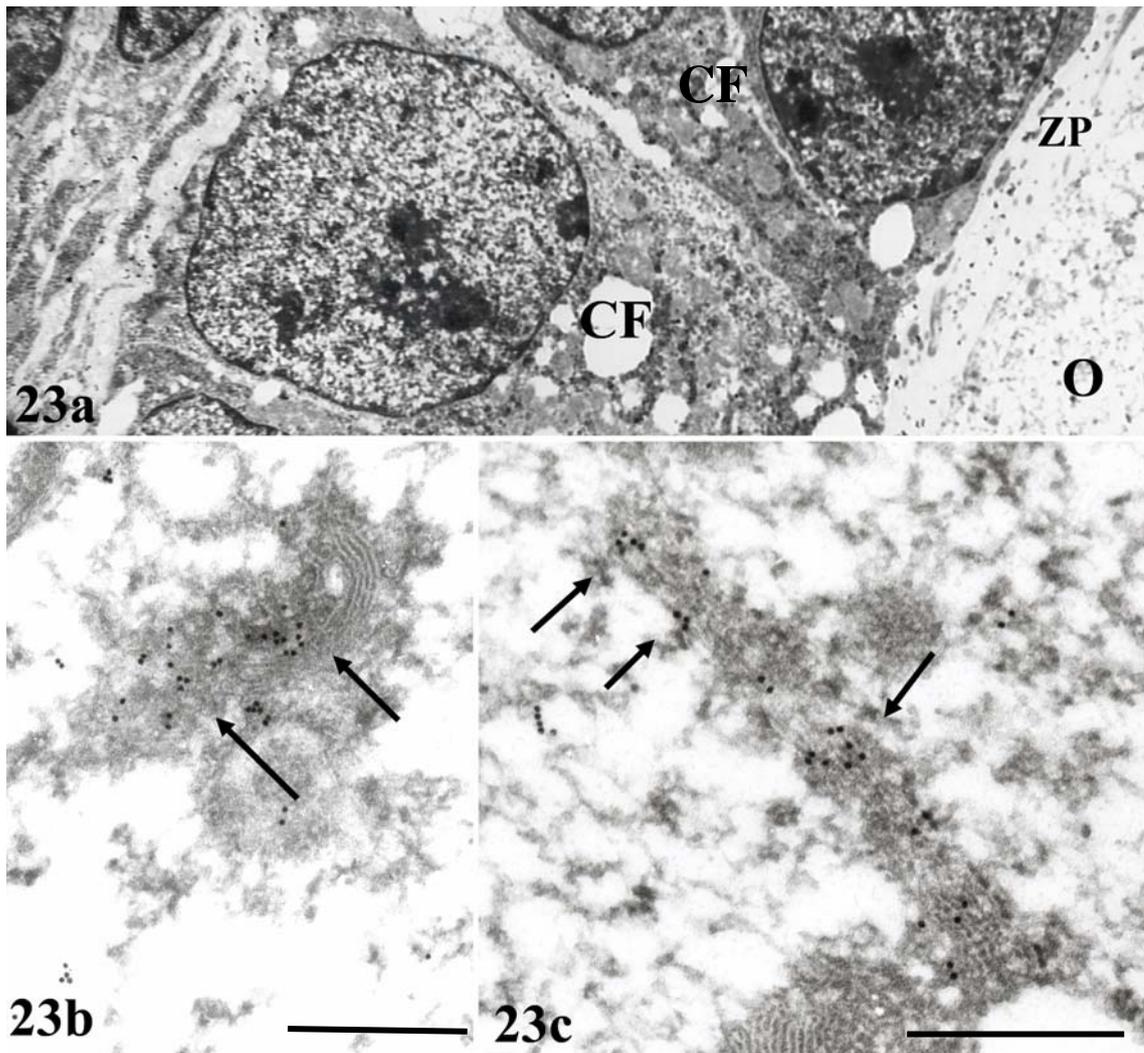


Figura 23. Folículo primario unilaminar. (a) Electromicrografía a pequeño aumento donde se observa una capa de células foliculares que rodean al ovocito y la ZP. (b) Anti-GM130. Observamos la estructura típica del aparato de Golgi (flechas) marcada con el anticuerpo. (c) Anti-PDI. Observamos el retículo endoplasmático rugoso (flechas) formando cisternas alargadas y marcadas específicamente con este anticuerpo. Célula foliculare: CF; Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 0,5 μm .

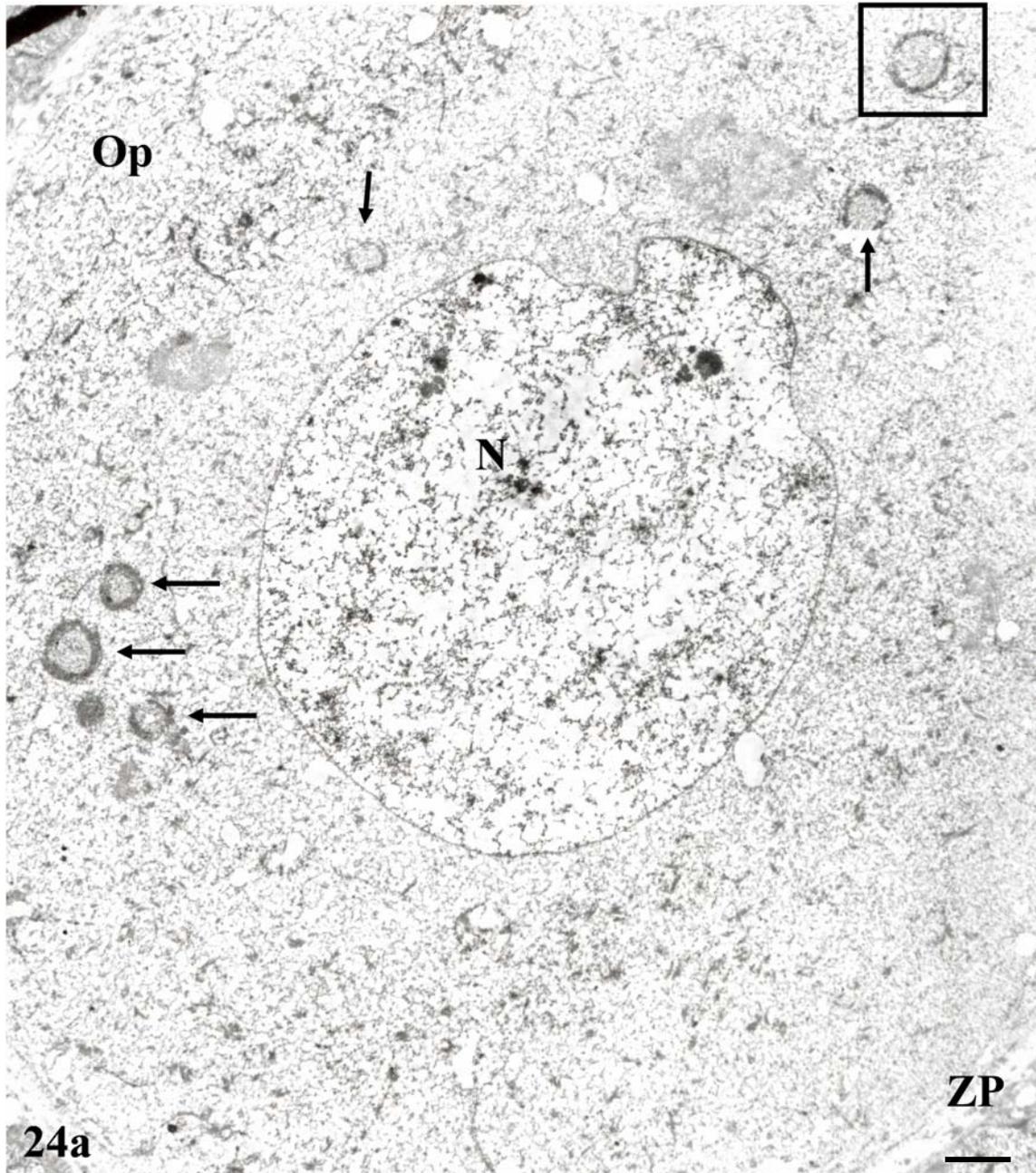


Figura 24a. Folículo primario bilaminar. Anti-PDI. Imagen a pequeño aumento donde podemos observar como en el ooplasma del ovocito encontramos varias estructuras circulares (flechas). **Detalle.** La región encuadrada se observa a mayor aumento en la figura siguiente. Núcleo: N; Ooplasma: Op; Zona pelúcida: ZP. Barra= 2 μ m.

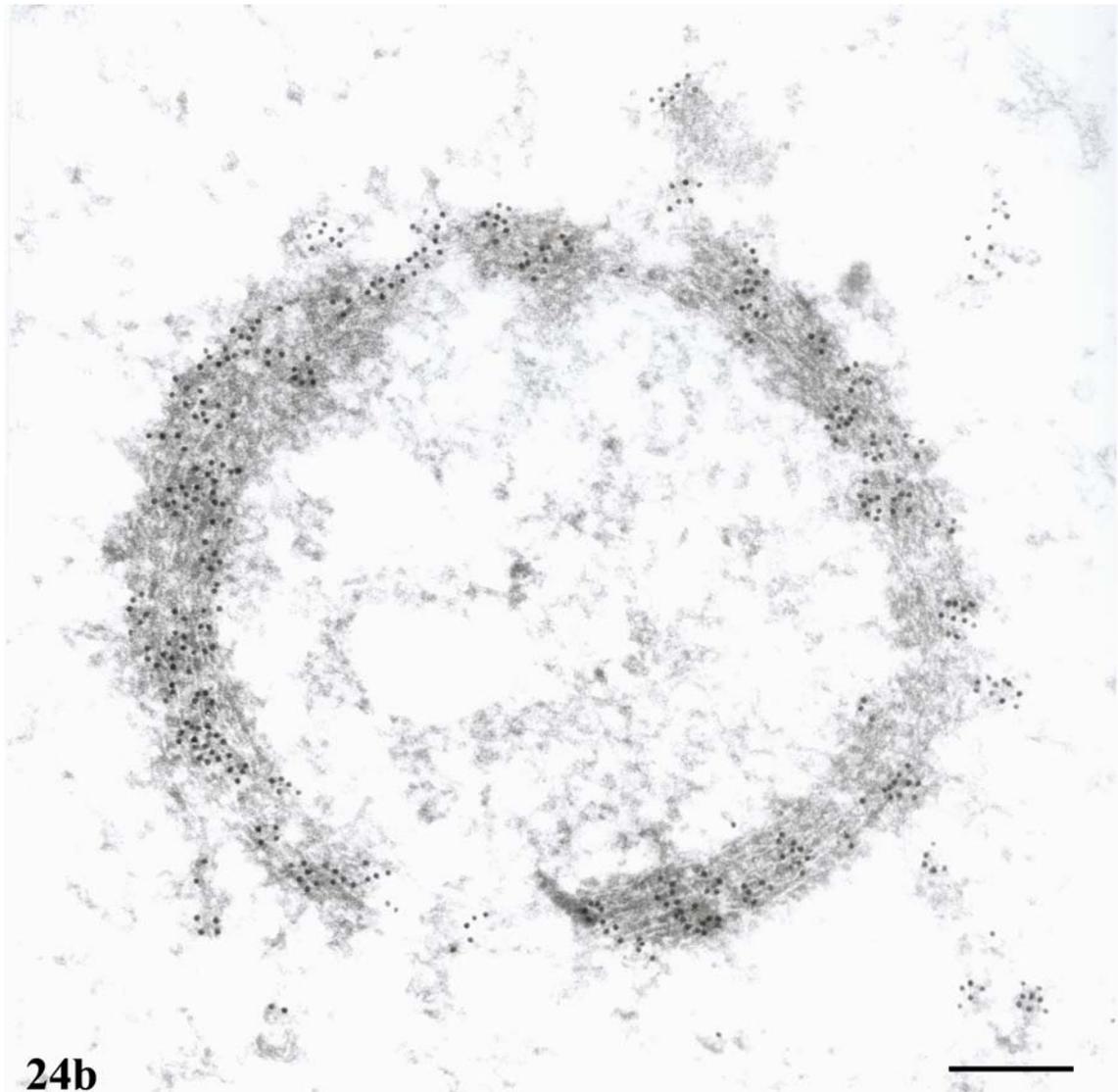


Figura 24b. Folículo primario bilaminar. Anti-PDI. Con mayor detalle observamos como estas estructuras circulares se encuentran específicamente marcadas con el anticuerpo específico para retículo endoplasmático rugoso. Barra= 0,2 μm .

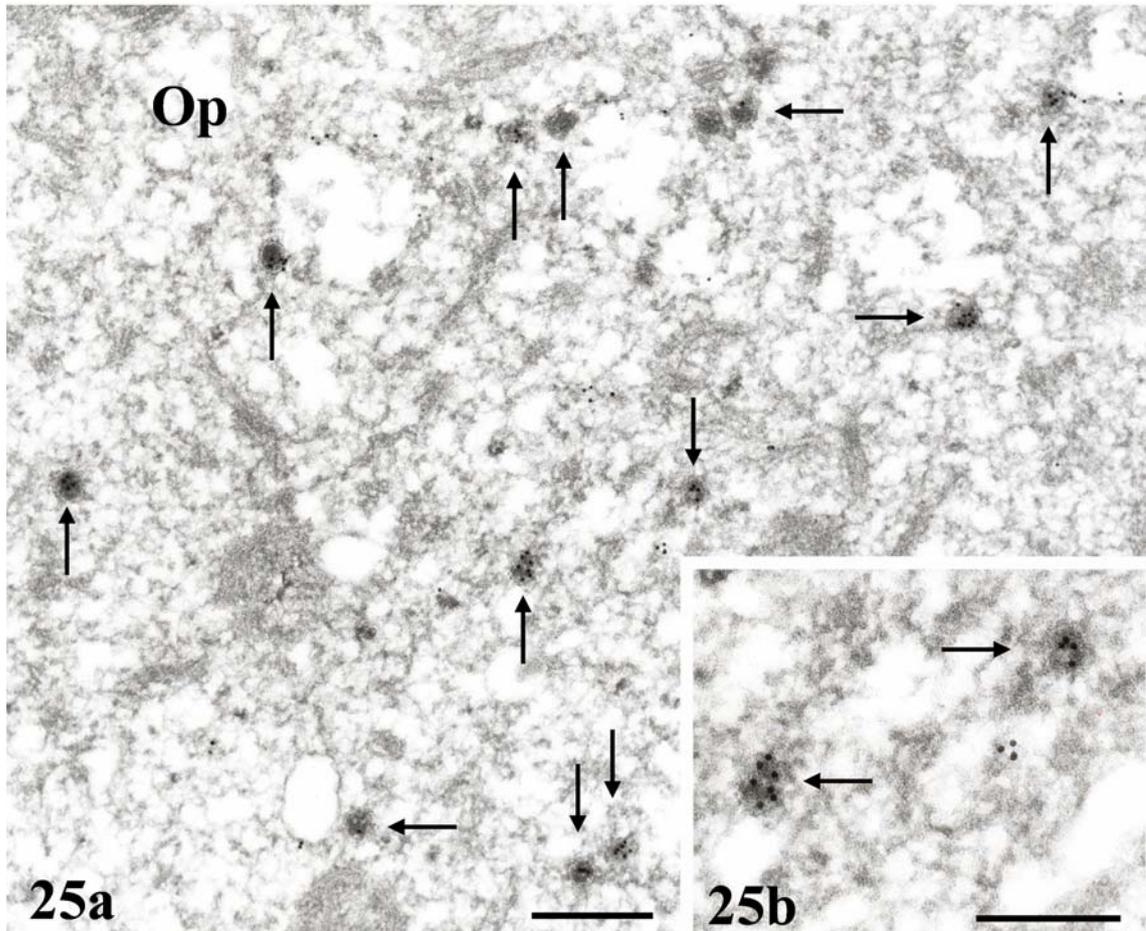


Figura 25. Folículo primario multilaminar. Anti-PDI. (a) En el ooplasma del ovocito podemos observar unas vesículas pequeñas electrodensas (flechas). Barra= 1 μ m. **(b)** A mayor aumento podemos observar como las vesículas aparecen específicamente marcadas con este anticuerpo. Ooplasma: Op. Barra= 0,5 μ m.

3. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICO DE LA ZONA PELÚCIDA DE HÁMSTER.

3.1. Análisis inmunocitoquímico de ovocitos ováricos y ovulados.

La ZP de los ovocitos de los diferentes folículos ováricos de hámster, cerdo, rata y ratón fue específicamente marcada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. A nivel ultraestructural, observamos que el inmunomarcaje fue distribuido por todo el espesor de la ZP de los folículos de ovarios de cerdo (Fig. 28a), rata y ratón (Fig. 28b). Sin embargo, observamos un patrón diferente en la distribución del marcaje obtenido en la ZP de ovarios de hámster. Los folículos ováricos preantrales mostraron un marcaje uniforme por toda la ZP (Fig. 26) mientras que el inmunomarcaje observado en los folículos más grandes (folículos multilaminares y antrales) fue distribuido heterogéneamente (Fig. 27). El marcaje obtenido con el anticuerpo anti-ZP de cerdo en los folículos más desarrollados fue mucho más intenso en la ZP próxima a las células de la granulosa (Fig. 27). Esta región se considera como la región externa de la ZP. La ZP de los diferentes folículos del ovario de hámster teñida con la lectina WGA mostró un marcaje uniforme por todo el espesor.

El patrón heterogéneo observado en los folículos antrales del ovario de hámster también fue observado en los ovocitos ovulados (Fig. 29). Sin embargo, en ovocitos de rata y ratón observamos un marcaje distribuido por todo el espesor de la ZP.

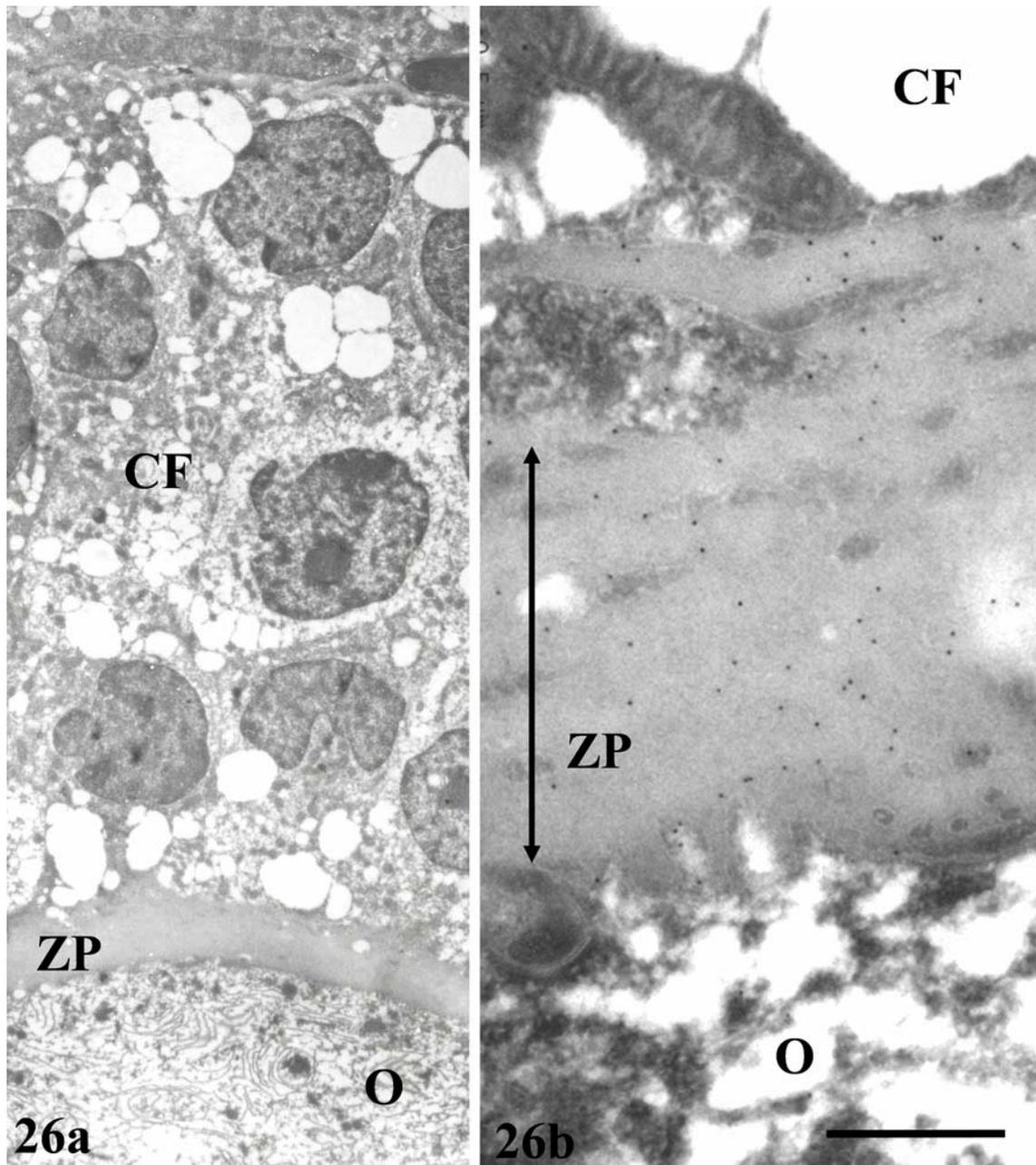


Figura 26. Folículo primario multilaminar de ovario de hámster. Anti-ZP de cerdo. (a) Imagen a menor aumento donde se observan las capas de células foliculares que rodean al ovocito y la ZP. (b) Con mayor detalle vemos que la ZP es marcada en todo su espesor con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Célula folicular: CF; Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 0,5 μm .

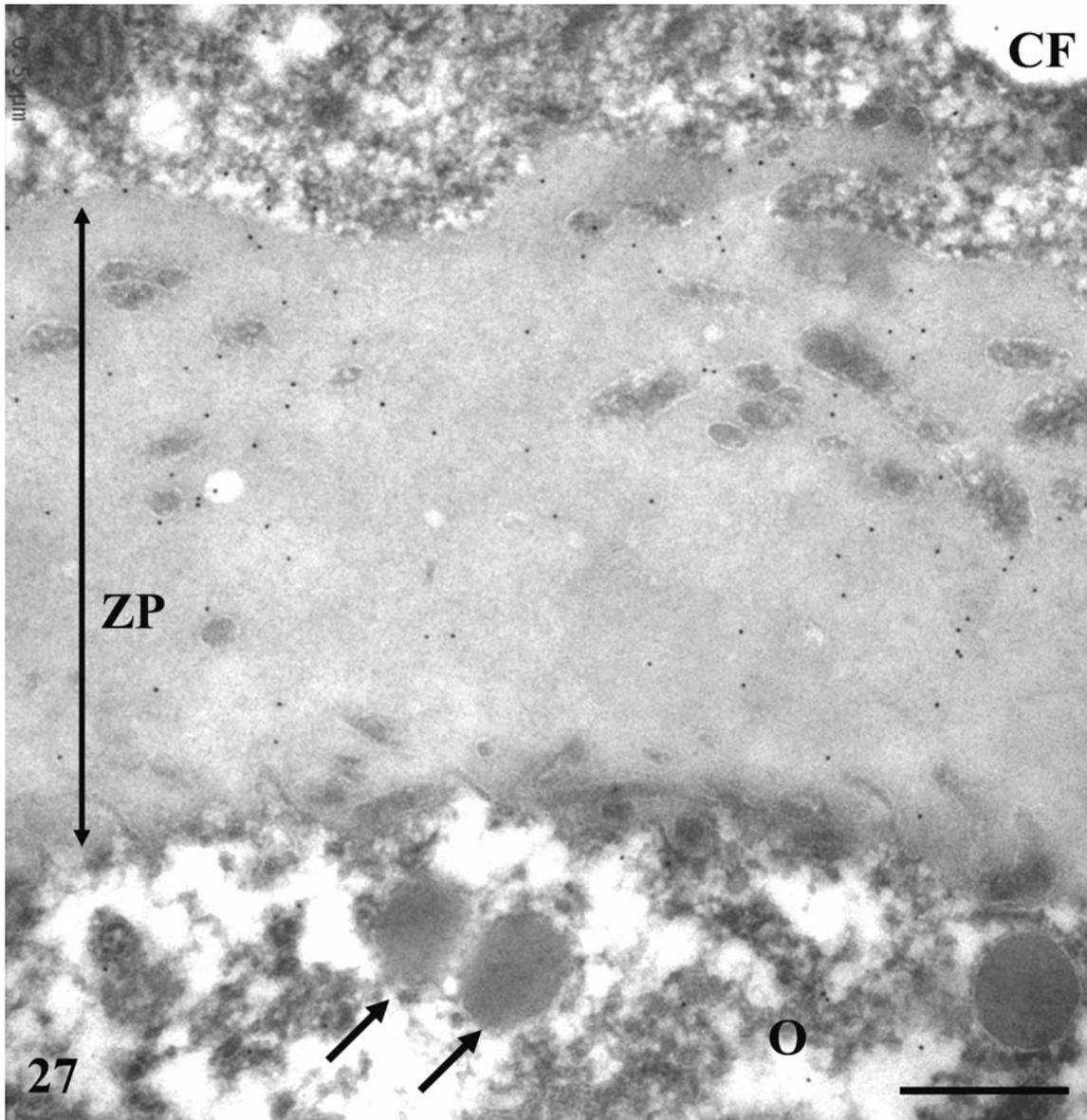


Figura 27. Folículo antral de ovario de hámster. Anti-ZP de cerdo. Observamos una mayor reactividad en la zona externa de la ZP. Nótese la presencia de gránulos corticales (flechas) que no presentan reactividad frente a este anticuerpo. Célula folicular: CF; Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 0,5μm.

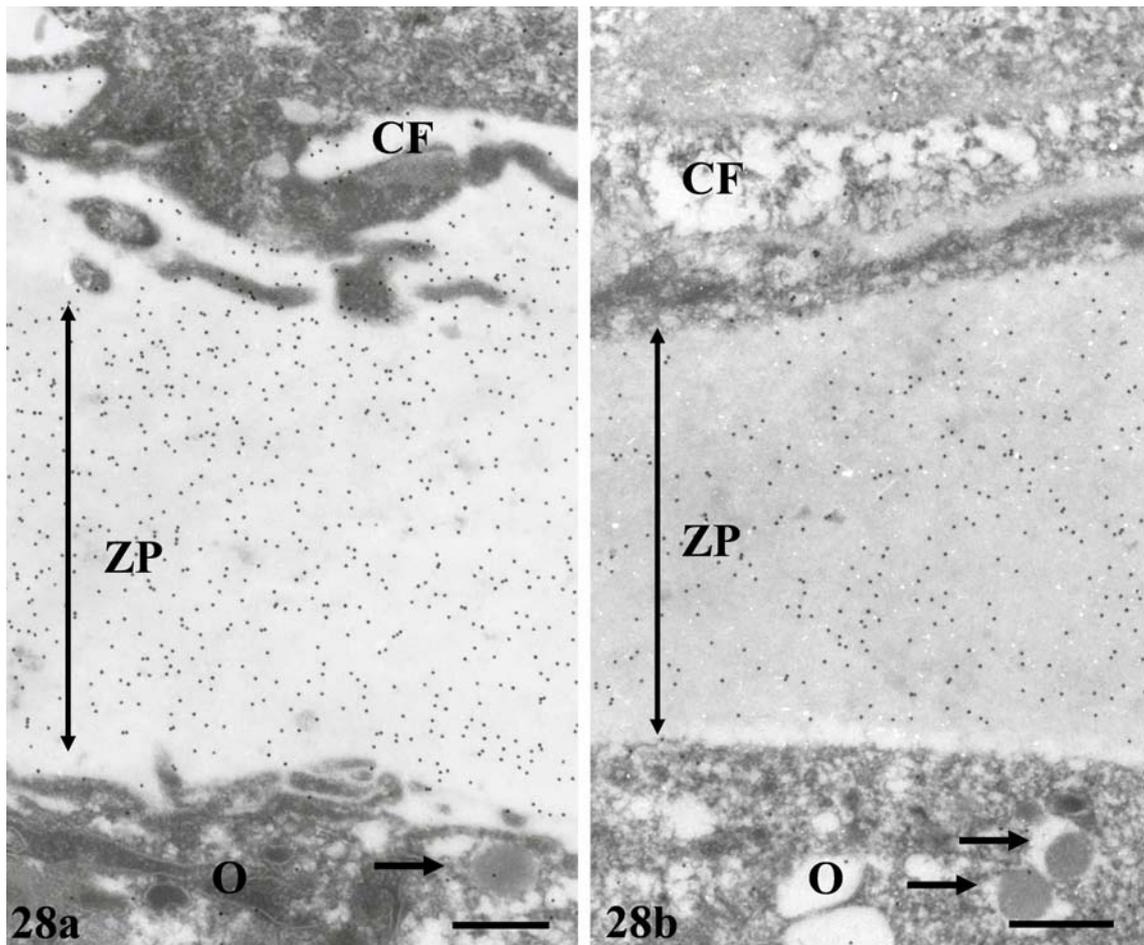


Figura 28. Anti-ZP de cerdo. (a) Folículo antral de ovario de cerdo donde podemos observar reactividad en todo el espesor de la ZP. (b) Folículo antral de ratón que presenta marcaje por toda la ZP. En ambas especies los GC (flechas) no se encuentran marcados con este anticuerpo. Célula folicular: CF; Ovocito: O; Zona pelúcida: ZP. Barra= 0,5 μ m.

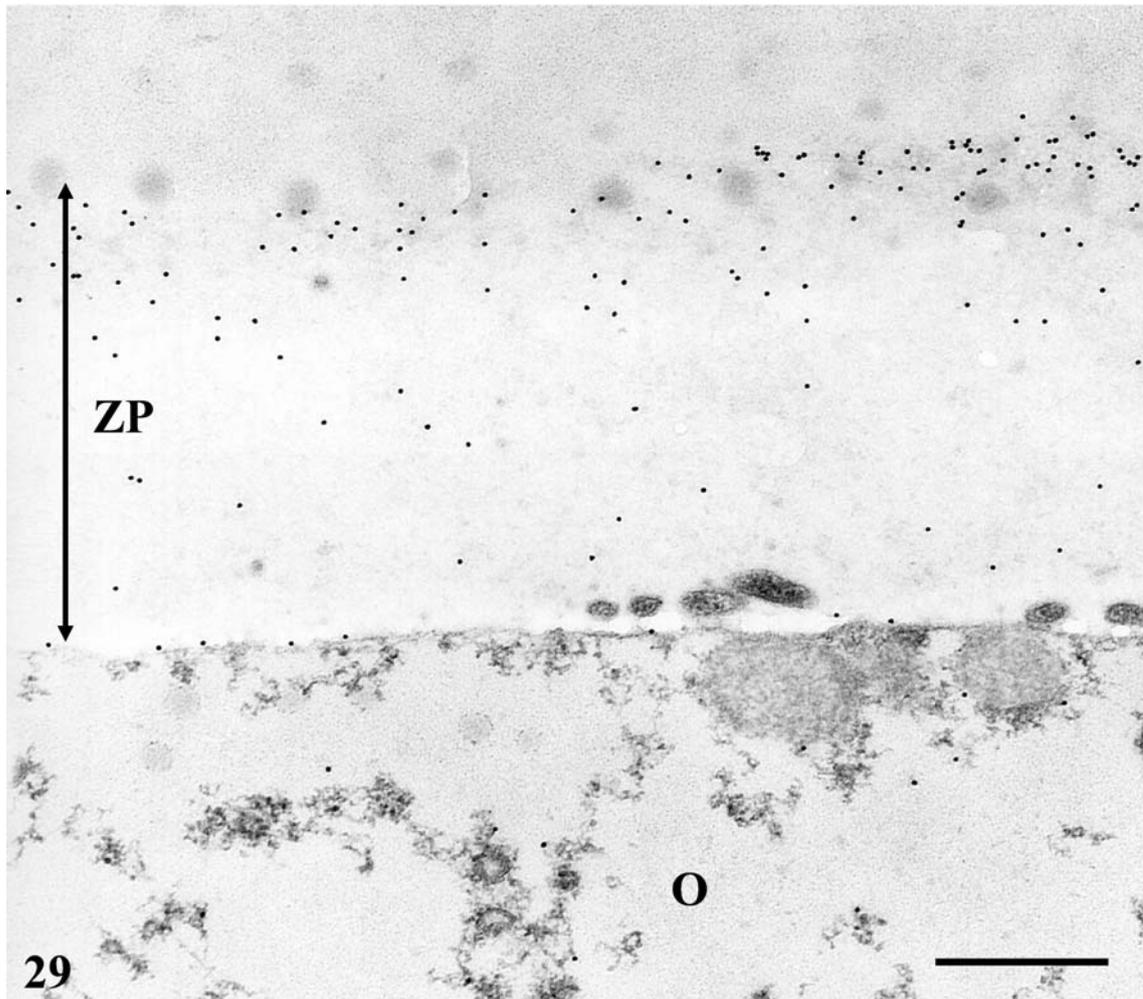


Figura 29. Ovocito ovulado de hámster. Anti-ZP de cerdo. El anticuerpo mostró una fuerte afinidad por la zona externa de la ZP. En la zona interna de la ZP se observó una muy débil reactividad. Ovocito: O; Zona pelúcida; ZP. Barra= 0,5 μ m.

3.2. Análisis cuantitativo.

Realizamos un análisis cuantitativo de la densidad de marcaje obtenida en la ZP de ovocitos ovulados de hámster, rata y ratón y en la ZP de folículos ováricos de cerdo. El inmunomarcaje observado en la zona interna y externa de la ZP de las diferentes especies se muestra en la Tabla II.

De los datos obtenidos observamos que existen diferencias significativas en la densidad de marcaje entre la región interna y externa de la ZP en las diferentes especies. Sin embargo, el análisis cuantitativo demuestra que el inmunomarcaje obtenido en la ZP de rata y ratón fue mayor en la región interna que en la región externa de la ZP. Por el contrario, en la ZP de hámster el inmunomarcaje observado con el anticuerpo anti-ZP de cerdo fue mayor en la región externa que en la región interna de la ZP.

Tabla II. Densidad de marcaje (partículas de oro/ μm^2) en la región interna y externa de la ZP.		
Especies	Zona interna	Zona externa
Hámster	7,68 \pm 0,96	29,3 \pm 0,91 •
Rata	32,67 \pm 1,27	24,49 \pm 1,3 •
Ratón	23,59 \pm 0,72	16,38 \pm 0,76 •
Cerdo	100,96 \pm 2,2	103,09 \pm 2,4

Las intensidades de marcaje vienen expresadas como media \pm error estándar (SE). La ZP fue dividida en dos regiones que fueron llamadas zona interna y zona externa.

• Existen diferencias significativas entre la región interna y externa de la ZP ($P < 0,05$).

En la ZP de cerdo no encontramos diferencias significativas entre la región interna y externa de la ZP ($P < 0,05$).

3.2. Análisis bioquímico de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster.

Obtuvimos una concentración de proteínas de 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la fracción enriquecida de glicoproteínas de la ZP aisladas de ovarios de hámster mediante la solubilización por calor. La muestra fue separada mediante electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Las calles fueron cargadas con 1,8 μg de proteínas. Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron incubadas con la lectina WGA conjugada con HRP pudiendo observar dos bandas: una banda ancha por encima de 90 kDa e inferior de 200 kDa y otra banda de 56 kDa (Fig. 30a). Estas dos bandas

han sido descritas previamente que se corresponden con ZP1 y ZP2, la banda superior y ZP3 la banda de 56 kDa (Moller *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo solamente fue inmunoreactiva la banda inferior de 56 kDa (Fig. 30b).

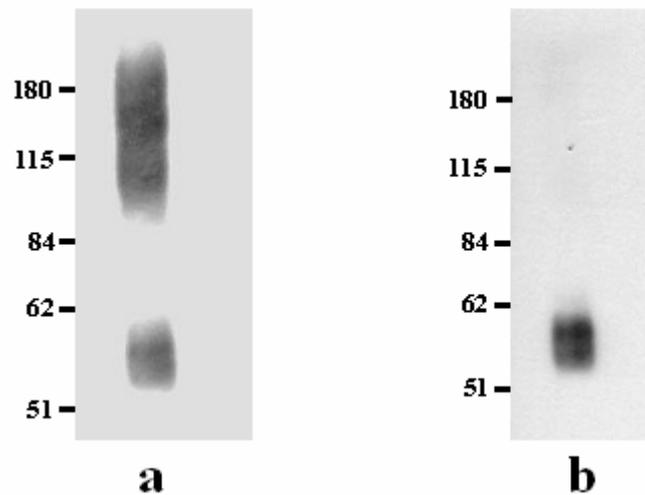


Figura 30. Caracterización mediante electroforesis en condiciones reductoras SDS-PAGE y western-blot de las glicoproteínas de la ZP de hámster (a) WGA-HRP. La lectina mostró afinidad por la banda superior a 90 kDa y la banda de 56 kDa. (b) Anti-ZP de cerdo. El anticuerpo reconoce únicamente la banda de 56 kDa.

Para investigar la especificidad de unión del anticuerpo anti-ZP de cerdo a la banda inferior de 56 kDa de hámster realizamos el mismo análisis con las glicoproteínas de la ZP purificada de ovarios de ratón. El análisis mediante western-blot muestra que ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón fueron específicamente reconocidas por el anticuerpo anti-ZP de cerdo (Fig. 31a). Obtuvimos el mismo resultado con la lectina WGA (Fig. 31b). Confirmamos que las tres bandas, ZP1, ZP2 y ZP3 detectadas por el anticuerpo anti-ZP de cerdo y la lectina WGA se corresponderían con las glicoproteínas de la ZP de ratón mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra las tres glicoproteínas de la ZP de ratón (Fig 31c,d).

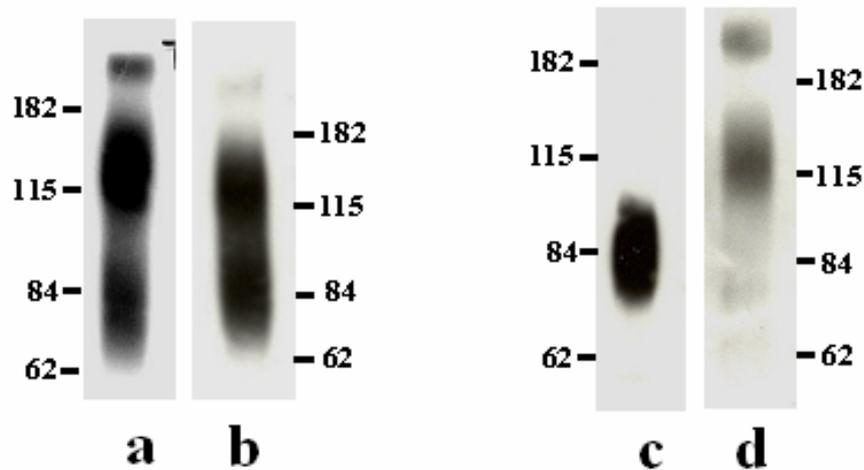


Figura 31. Las glicoproteínas de la ZP de ratón fueron caracterizadas mediante electroforesis no reductora SDS-PAGE y western-blot. **(a)** Anti-ZP de cerdo. El anticuerpo reconoce específicamente tres bandas que pertenecen a ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón. **(b)** WGA-HRP. La lectina fue reactiva a ZP1, ZP2 y ZP3. **(c)** Anti-ZP3 de ratón. La ZP3 de ratón de 84 kDa fue caracterizada mediante su anticuerpo específico. **(d)** Anti-ZP2 y anti-ZP1 de ratón. Las glicoproteínas ZP1 y ZP2 fueron caracterizadas mediante los anticuerpos monoclonales. El anticuerpo anti-ZP1 reconoce la banda de 200 kDa y el anticuerpo anti-ZP2 reconoce la banda de 120 kDa.

Las dos bandas de glicoproteínas que aparecen en el blot de la ZP total de hámster fueron purificadas mediante electroelución. El resultado de la electroelución fue ensayado en un gel reductor e identificado mediante la incubación de la membrana con la lectina WGA-HRP pudiendo observar dos fracciones, una con la banda de 56 kDa (Fig. 32, calle 2) y la otra con la banda superior de 90 kDa (Fig. 32, calle 3).

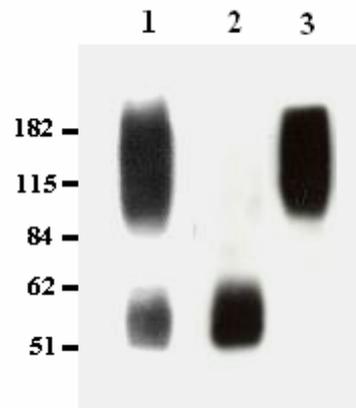


Figura 32. Purificación de las glicoproteínas de la ZP de hámster mediante electroelución y caracterización mediante western-blot con la lectina WGA-HRP. Calle 1: Fracción total de las glicoproteínas de la ZP de hámster. Calle 2: Fracción de la banda de 56 kDa. Calle 3: Fracción de la banda superior de 90 kDa. Podemos observar como las dos fracciones han sido correctamente separadas.

3.4. Inmunoprecipitación de la ZP de hámster con el anticuerpo anti-ZP de cerdo.

La inmunoprecipitación de la ZP total de hámster usando el anticuerpo anti-ZP de cerdo muestra la presencia de la banda de 56 kDa en el precipitado (Fig. 33a, calle 1) demostrando que esta glicoproteína es la que contiene los epitopos que reconoce el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Las membranas fueron incubadas usando la lectina WGA pudiendo observar que solamente la ZP3 fue inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo mientras que la banda más ancha, superior a 90 kDa e inferior a 200 kDa que contiene ZP1 y ZP2 fue detectada en el sobrenadante (Fig. 33a, calle 2) demostrando que la banda de 56 kDa no fue encontrada en la fracción del sobrenadante.

La inmunoprecipitación de la ZP total de hámster realizada con la lectina WGA conjugada con agarosa mostró la presencia de las distintas bandas de la ZP en el precipitado (Fig. 33b, calle 1) mientras que en el sobrenadante no fueron detectadas las glicoproteínas de la ZP de hámster (Fig. 33b, calle 2).

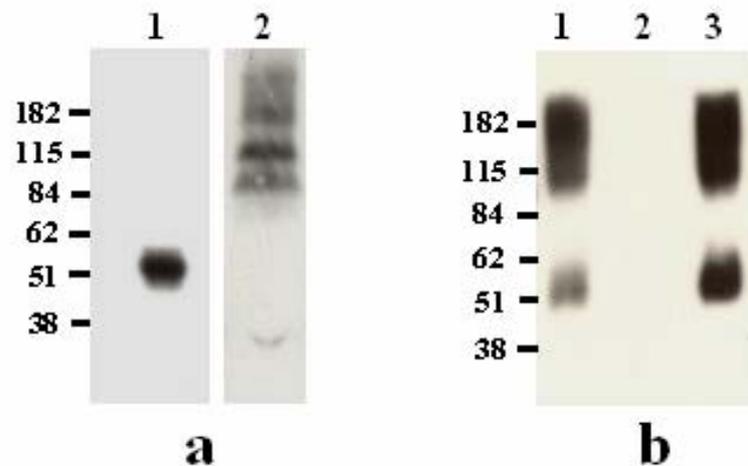


Figura 33. Inmunoprecipitación de la ZP de hámster. (a) Inmunoprecipitación con anti-ZP de cerdo. Calle 1; precipitado. Calle 2; sobrenadante. El blot revelado con WGA-HRP muestra claramente como la ZP3 de hámster fue totalmente inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo y en el sobrenadante se encontraría la fracción de ZP1 y ZP2. **(b)** Inmunoprecipitación con la lectina WGA. Calle 1; precipitado. Calle 2; sobrenadante. Calle 3; ZP total de hámster. El blot revelado con WGA-HRP muestra como la ZP total de hámster fue totalmente inmunoprecipitada con la lectina.

3.5. Caracterización de las glicoproteínas de la ZP de hámster mediante deglicosilación enzimática.

Las glicoproteínas de la ZP de hámster fueron tratadas con la enzima N-glicosidasa F para eliminar específicamente las cadenas oligosacáridicas del tipo N-unidas. Una vez digerida, se analizaron mediante electroforesis y western-blot. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo (Fig. 34a) y pudimos observar la presencia de cuatro proteínas con pesos moleculares de 67 kDa, 58 kDa, 48 kDa y 38 kDa aproximadamente (Fig. 34a, calle 2). Sin embargo, en el correspondiente control, que fue incubado sin la enzima, sólo se detectó la presencia de la banda de 56 kDa (Fig. 34a, calle 1). El procedimiento de deglicosilación también fue aplicado a la banda aislada de 56 kDa (Fig. 34b). Este tratamiento enzimático demostró la presencia de dos bandas de peso molecular fue de 48 y 38 kDa respectivamente (Fig. 34b, calle 2). Estas dos bandas fueron idénticas a las dos bandas de inferior tamaño que aparecieron al deglicosilar la ZP total de hámster.

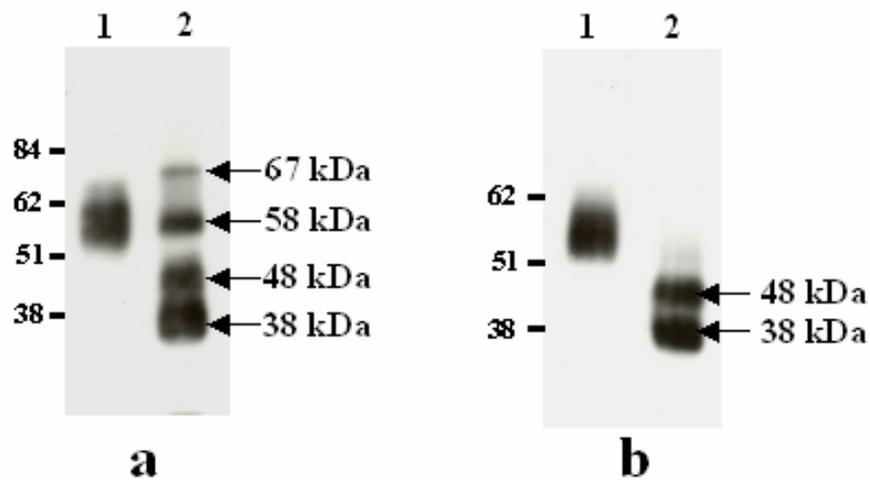


Figura 34. Digestión con la enzima N-glicosidasa F de las glicoproteínas de la ZP de hámster. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-ZP de cerdo **(a)** Tratamiento enzimático de la ZP total de hámster. Calle 1: ZP total de hámster incubado sin la presencia de la enzima. Calle 2: ZP total digerida con la enzima. Nótese como cuatro bandas (flechas) en el blot se vuelven reactivas al anticuerpo anti-ZP de cerdo cuando las glicoproteínas son deglicosiladas por la enzima. **(b)** Tratamiento enzimático de la banda de 56 kDa. Calle 1: Fracción de 56 kDa incubada sin la enzima. Calle 2: Fracción de 56 kDa digerida con la enzima. Se puede observar la presencia de dos bandas (flechas) deglicosiladas.

3.6. Análisis por espectrometría de masas (MS) de la banda de 56 kDa de la ZP de hámster.

La banda de 56 kDa aislada a partir del gel fue analizada mediante espectrometría de masas en tandem, empleando ionización por electrospray (ESI-MS-MS). El análisis de los picos obtenidos a 650 y 713 m/z (Fig. 35) permitió identificar la secuencia de ambos. El pico a 713 m/z corresponde a los aminoácidos 285-297 (VTPANQTPDELNK) (Fig. 35a) y el pico a 650 m/z corresponde a los aminoácidos 334-344 (YQAHGVSQWPT) (Fig. 35b). Estos dos péptidos se encuentran en la secuencia descrita para la ZP3 de hámster como podemos ver en la figura 36.

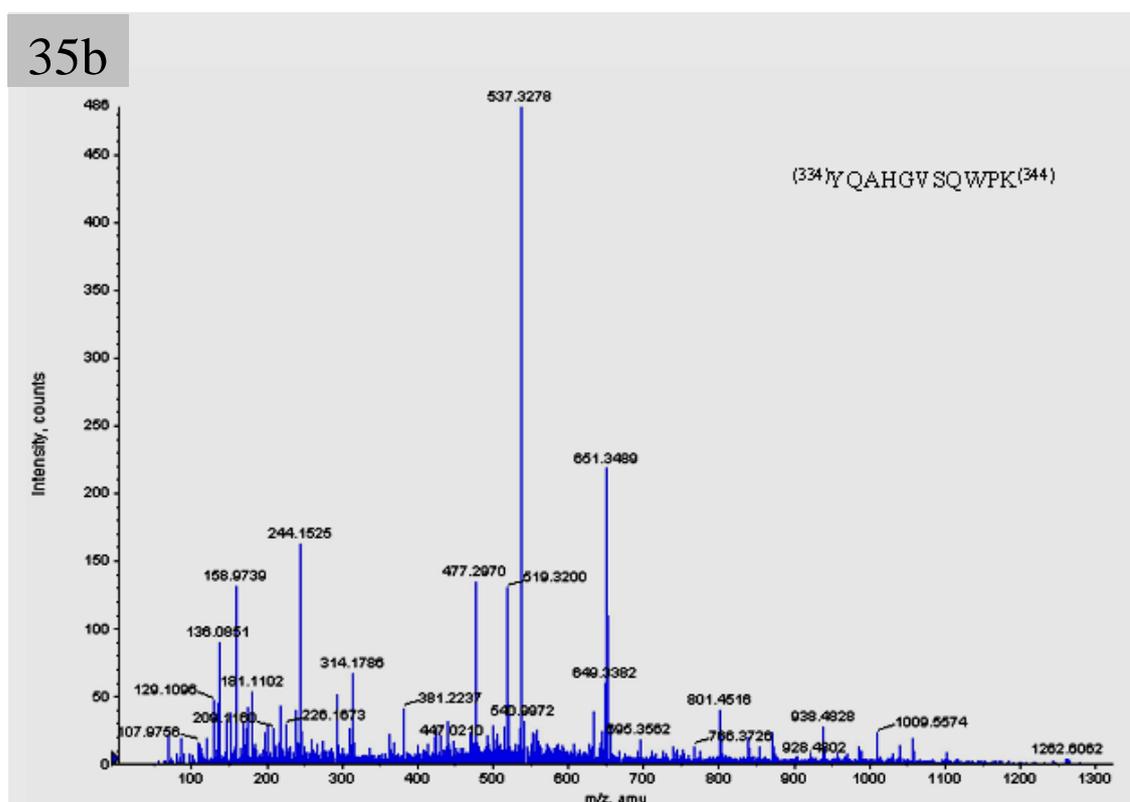
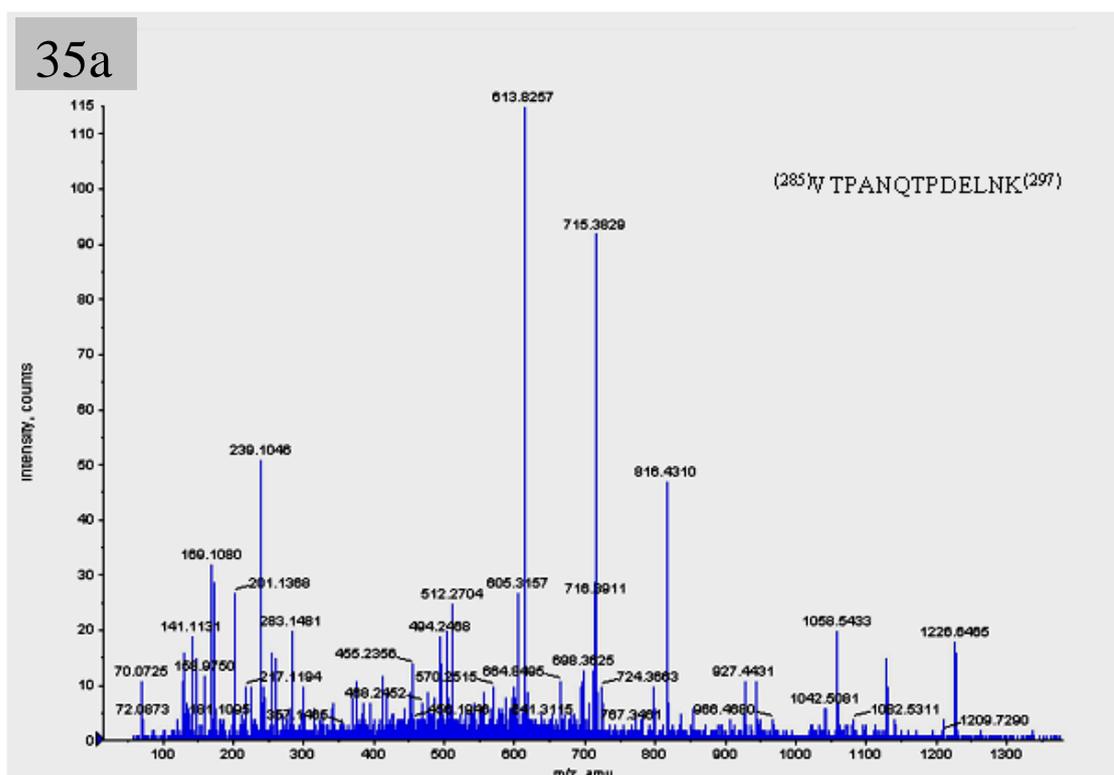


Figura 35. Análisis mediante MS/MS de la fracción de 56 kDa. (a) El pico a m/z 713 corresponde a los aminoácidos 285-297 (VTPANQTPDELNK) de la ZP3 de hámster. **(b)** El pico a m/z 650 corresponde a los aminoácidos 334-344 (YQAHGV SQWPK) de la ZP3 de hámster.

```
1  MGLSYQLLLCLLLCGGAKQCCSQPLWLLPGGTPTPGKLTSSVEVECLEAELVVTVSRDLF
61  GTGKLIQPEDLTLGSENCRPLVSVATDVVRFKAQLHECSNRVQVTEDALVYSTVLLHQPR
121 PVPGLSILRTNRADVPIECRYPRQGNVSSHAIRPTWVPFSTTVSSEEKLVFSLRLMEENW
181 NTEKLSPTSHLGEVAYLQAEVQTGSHLPLLLFVDRCVATPSPDQTASPYHVIVDFHGCLV
241 DGLSEFSAFQVPRPRPETLQFTVDVFHFANSSRNTIYITCHLKVTPANQTPDELNKACS
301 FNRSSKSWSPVEGDAEVCGCCSSGDCGSSSRSRYQAHGVSQWPKSASRRRRHRDEADVT
361 VGPLIFLGKASDQAVEGWASSAQTSLALGLGLAAVAFLLAAIIVLGVTRSCHTPSHVSL
421 SQ
```

Figura 36. Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína ZP3 de hámster (P23491) deducida a partir de cDNA. La zona subrayada y de color rojo se corresponde con los dos mediante MS/MS. péptidos obtenidos del análisis de la fracción de 56 kDa.

4. ANÁLISIS DE ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTES HUMANAS EXPRESADAS EN CÉLULAS CHO.

A partir de tres líneas de células CHO, dos de ellas transfectadas y otra línea parental control, obtuvimos tres muestras. 1) Una muestra que contenía ZP3 recombinante secretada por las células CHO que habían sido transfectadas con el plásmido ZP3 humano. En esta muestra obtuvimos una concentración de proteínas de 80 $\mu\text{g/ml}$ 2) Otra muestra con ZP2 recombinante secretada por las células CHO transfectadas con el plásmido de ZP2 humano. Obtuvimos una concentración de proteínas de 60 $\mu\text{g/ml}$ 3) Una tercera muestra con el sobrenadante de células CHO parentales sin transfectar. Obtuvimos una concentración de proteínas de 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

4.1. Caracterización mediante western-blot de la ZP2 y ZP3 recombinantes humanas.

La ZP2 y ZP3 recombinantes humanas expresadas en células CHO fueron caracterizadas mediante técnicas de western-blot incubando las membranas con diferentes anticuerpos que reconocen específicamente estas glicoproteínas.

4.1.1. Caracterización de ZP3 recombinante humana.

La muestra que contenía ZP3 recombinante humana fue analizada mediante electroforesis reductora, transferida a membranas de PVDF y estas incubadas con los anticuerpos anti-ZPC de mono y el anticuerpo anti-ZP de cerdo (Fig 37). El anticuerpo anti-ZPC de mono reconoce específicamente una banda de 60 kDa en la muestra recogida del sobrenadante de células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humano (Fig. 37a, calle 1). Sin embargo, no observamos reactividad en el sobrenadante recogido de células CHO sin transfectar que hemos usado como control (Fig. 37a, calle 2).

El anticuerpo anti-ZP de cerdo presenta afinidad por la banda de 60 kDa en el sobrenadante de células transfectadas (Fig. 37b, calle 2). Observamos que este anticuerpo presenta el mismo patrón de afinidad por la ZP humana solubilizada obteniendo una banda a 60 kDa específicamente marcada (Fig. 37b, calle 1). Es importante destacar el hecho de que el anticuerpo anti-ZP de cerdo presenta mayor afinidad por la banda de 60 kDa. Esta banda fue detectada por el anticuerpo con una cantidad mínima de 2,5 ZPs humanas y a un tiempo de exposición de revelado fotográfico óptimo (Fig. 37b, calle 1), mientras que para que se produzca la detección de la banda de 110 kDa es necesario aumentar la cantidad de ZPs humanas o aumentar el tiempo de exposición en la visualización de las bandas (Fig. 38b, calle 1).

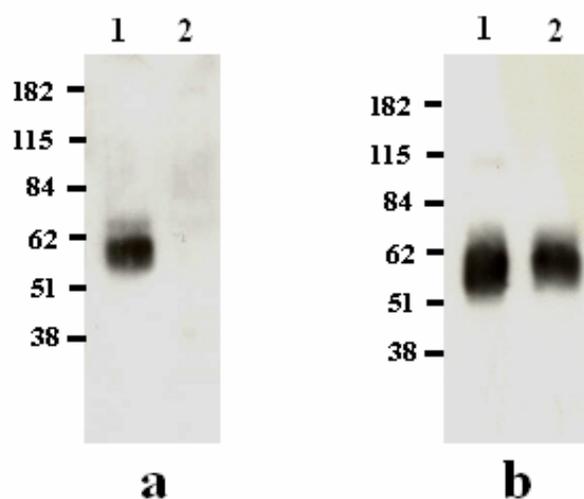


Figura 37. Caracterización mediante SDS-PAGE y western-blot de ZP3 recombinante humana. (a) Anti-ZPC de mono. Calle 1: Fracción recogida de células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humano. Calle 2: Sobrenadante recogido de células CHO sin transfectar. Se observa como el anticuerpo reconoce específicamente una banda de aproximadamente 60 kDa que no aparece en las células CHO sintransfectar. **(b)** Anti-ZP de cerdo. Calle 1: 2,5 ZPs humanas solubilizadas por calor. Calle 2: fracción recogida de células CHO transfectadas con ZP3 humana. El anticuerpo anti-ZP de cerdo reconoce específicamente la banda de 60 kDa en la ZP humana y el medio recogido de células CHO transfectadas.

4.1.2. Caracterización de ZP2 recombinante humana.

La fracción recogida del sobrenadante de células cultivadas que habían sido transfectadas con el plásmido ZP2 humano fue analizado mediante electroforesis reductora, transferido a membranas de PVDF e incubadas con los anticuerpos anti-ZP2 humana y anti-ZP de cerdo (Fig. 38). El anticuerpo anti-ZP2 humana reconoce específicamente dos bandas cuyos pesos moleculares aproximados son de 110 kDa la superior y 90 kDa la inferior (Fig. 38a, calle 1). El anticuerpo no reconoció ninguna proteína en el sobrenadante de las células CHO cultivadas que no habían sido transfectadas (Fig. 38a, calle 2).

El anticuerpo anti-ZP de cerdo presenta afinidad por dos bandas de peso molecular aproximado 110 kDa y 90 kDa en la fracción de células transfectadas (Fig. 38b, calle 2). Podemos observar como este anticuerpo presenta afinidad por una banda de peso aproximado de 110 kDa en la ZP humana solubilizada por calor (Fig. 38b, calle 1).

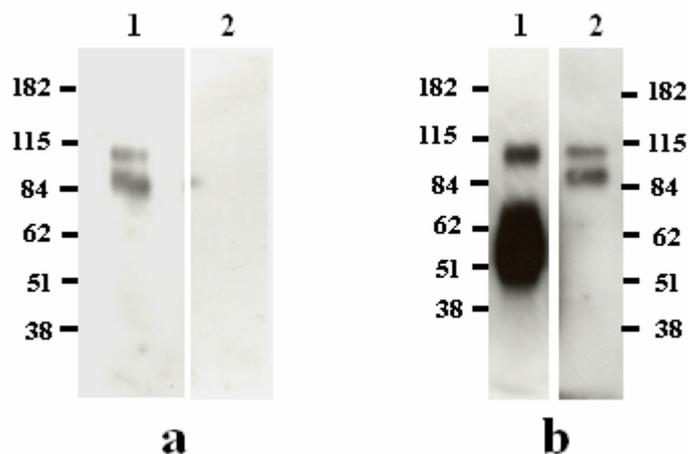


Figura 38. Caracterización mediante SDS-PAGE y western-blot de ZP2 recombinante humana. (a) Anti-ZP2 humana. Calle 1: Sobrenadante recogido de las células CHO transfectadas con ZP2 humana. Calle 2: Sobrenadante recogido de células CHO cultivadas sin transfectar. El anticuerpo se une específicamente a dos bandas cuyo peso molecular aproximado es de 110 kDa y 90 kDa, sin embargo no encontramos reactividad en el sobrenadante recogido de las células sin transfectar. **(b)** Anti-ZP de cerdo. Calle 1: 5 ZPs humanas. Calle 2: Fracción que contenía ZP2 recombinante. El anticuerpo reconoce específicamente una banda superior de aproximadamente 110 kDa y la banda de 60 kDa ensanchada o sobrepuesta en la ZP humana, mientras que en la fracción recogida de células transfectadas, observamos dos bandas de 110 kDa y 90 kDa aproximadamente.

4.2. Estudio de la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos por las glicoproteínas ZP2 y ZP3 recombinantes humanas.

La actividad biológica de la ZP3 recombinante humana entendida como la potencialidad de esta molécula para inducir la reacción acrosómica, fue ensayada junto con la ZP2 recombinante y el sobrenadante obtenido de las células CHO cultivadas sin transfectar.

Los resultados de los ensayos de inducción de la reacción acrosómica pueden observarse en la Tabla III y figura 39. En este análisis podemos observar como la ZP3 recombinante humana expresada en células CHO ensayada a una dilución (1:100) junto con el ionóforo de calcio (control II) tienen la capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. La media obtenida, del ensayo con siete pacientes, del porcentaje de espermatozoides reaccionados debido a la incubación con ZP3 recombinante durante 1 hora fue de 72,6 %. En este análisis podemos observar como la ZP2 recombinante humana, ensayada a una dilución (1:10), tiene unos valores de inducción de reacción acrosómica similares a los de la reacción espontánea (control I). Y con el sobrenadante de las células CHO sin transfectar (control III), ensayada a una dilución (1:10), obtuvimos valores similares que con ZP2 recombinante y la inducción espontánea.

Tabla III. Proporción de espermatozoides reaccionados.

	Control I	Ionóforo	ZP3 recombinante	ZP2 recombinante	Sobrenadante células CHO sin transfectar
%	19,4 ± 1,4 ^a	81,4 ± 3,0 ^b	72,6 ± 2,6 ^b	20,5 ± 0,6 ^a	23,5 ± 1,1 ^a

La proporción de espermatozoides reaccionados viene expresada como media ± error estándar.

La proporción de espermatozoides reaccionados se evaluó siguiendo los patrones de fluorescencia obtenidos de los diferentes ensayos.

a. No existen diferencias significativas entre control I, ZP2 recombinante y el sobrenadante de las células CHO sin transfectar ($P < 0,001$).

b. No existen diferencias significativas entre el ionóforo y ZP3 recombinante. Existen diferencias significativas con el resto de las combinaciones ($P < 0,001$).

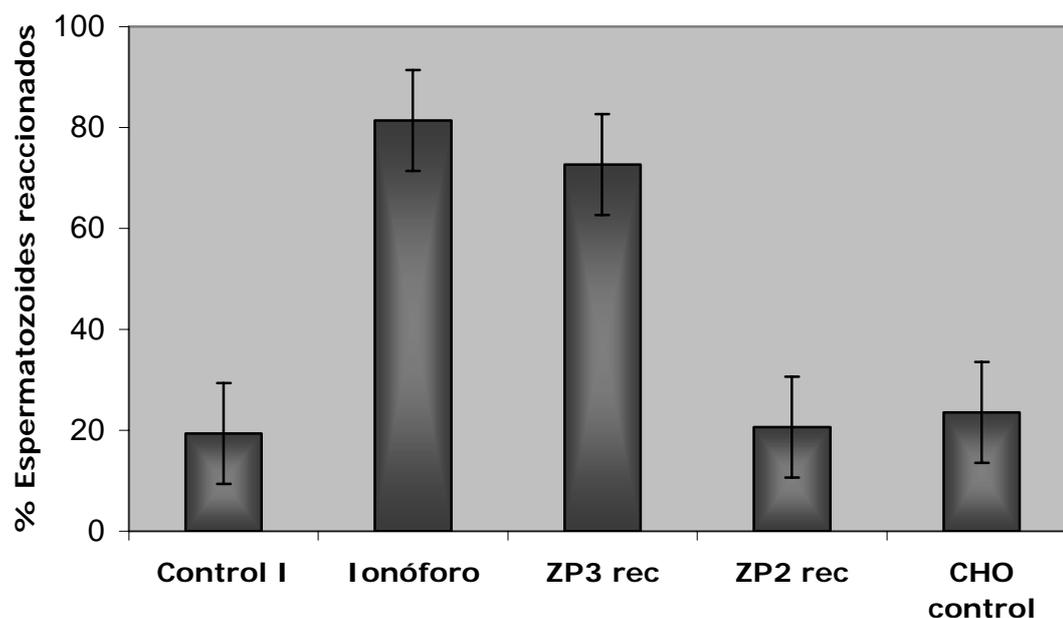


Figura 39. Proporción de espermatozoides reaccionados en el ensayo de la actividad de ZP3 recombinante. Control I: Proporción de espermatozoides reaccionados espontáneamente. Control II: Espermatozoides reaccionados con el ionóforo de calcio. ZP3 rec: Espermatozoides reaccionados con ZP3 recombinante en una dilución (1:100). ZP2 rec: Espermatozoides reaccionados con ZP2 recombinante a una dilución (1:10). Control III: proporción de espermatozoides reaccionados con el medio recogido de células CHO sin transfectar.

4.3. Estudio de la ZP3 recombinante digerida con N-glicosidasa F.

La ZP3 recombinante humana fue digerida con la enzima N-glicosidasa F para eliminar las cadenas glicosídicas N-unidas.

4.3.1. Caracterización mediante western-blot de la digestión de ZP3 recombinante con N-glicosidasa F.

Una vez realizado el tratamiento de la digestión de la ZP3 recombinante con la enzima, ésta fue analizada mediante electroforesis reductora, transferida a membranas de PVDF e incubada con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. El blot muestra como la glicoproteína pasa de un peso molecular de aproximadamente 60 kDa cuando la glicoproteína no está tratada a un peso molecular de 38 kDa aproximadamente, cuando la glicoproteína fue digerida con la enzima (Fig. 40, calle 2). Sin embargo, la

ZP3 recombinante incubada en las mismas condiciones pero sin la enzima no presentó cambio en su movilidad electroforética (Fig. 40, calle 3).

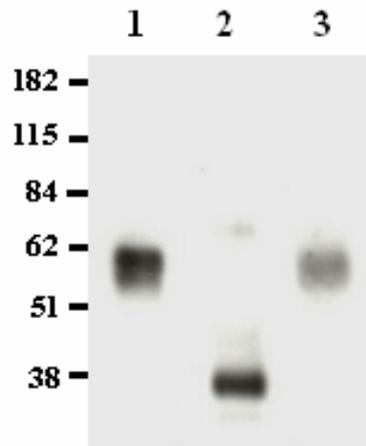


Figura 40. Caracterización mediante western-blot de ZP3 recombinante digerida con N-glicosidasa F. Calle 1: ZP3 recombinante sin tratar. Calle 2: ZP3 recombinante incubada con la enzima N-glicosidasa F. Calle 3; ZP3 recombinante humana incubada mediante el mismo tratamiento que la glicoproteína digerida pero sin la enzima. El blot fue incubado con el anticuerpo anti-ZP de cerdo. Se observa un descenso del peso molecular de la glicoproteína ZP3.

4.3.2. Inducción de la reacción acrosómica por la ZP3 recombinante digerida con la enzima N-glicosidasa F.

Los resultados de los ensayos de inducción de la reacción acrosómica por la ZP3 recombinante sin las cadenas N-glicosídicas quedan detallados en la Tabla IV y en la figura 41. En este análisis podemos observar como la ZP3 recombinante humana digerida con la enzima N-glicosidasa F junto con la ZP3 recombinante que ha sufrido el mismo tratamiento pero sin la enzima y el ionóforo de calcio tienen la capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. La media obtenida, del ensayo con cinco pacientes, del porcentaje de espermatozoides reaccionados debido a la incubación con ZP3 recombinante sin cadenas N-unidas durante 1 hora fue de 71,6 %. En este análisis podemos observar como la enzima N-glicosidasa F hervida tiene unos valores de inducción de reacción acrosómica similares a los de la reacción espontánea (control I).

Tabla IV. Proporción de espermatozoides reaccionados.

	Control I	Ionóforo	ZP3 rec digerida	ZP3 rec control	Enzima hervida
%	18,7 ± 0,5 ^b	78,2 ± 3,9 ^a	71,6 ± 3,4 ^a	70,4 ± 3,3 ^a	19,9 ± 0,6 ^b

Las proporción de espermatozoides reaccionados vienen expresadas como media ± error estándar (SE).

La proporción de espermatozoides reaccionados se evaluó siguiendo los patrones de fluorescencia obtenidos de los diferentes ensayos.

a. No existen diferencias significativas entre el ionóforo, la ZP3 recombinante digerida con la enzima y la ZP3 recombinante control. Existen diferencias significativas con el resto de las combinaciones ($P < 0,001$).

b. No existen diferencias significativas entre control I y la enzima hervida ($P < 0,001$).

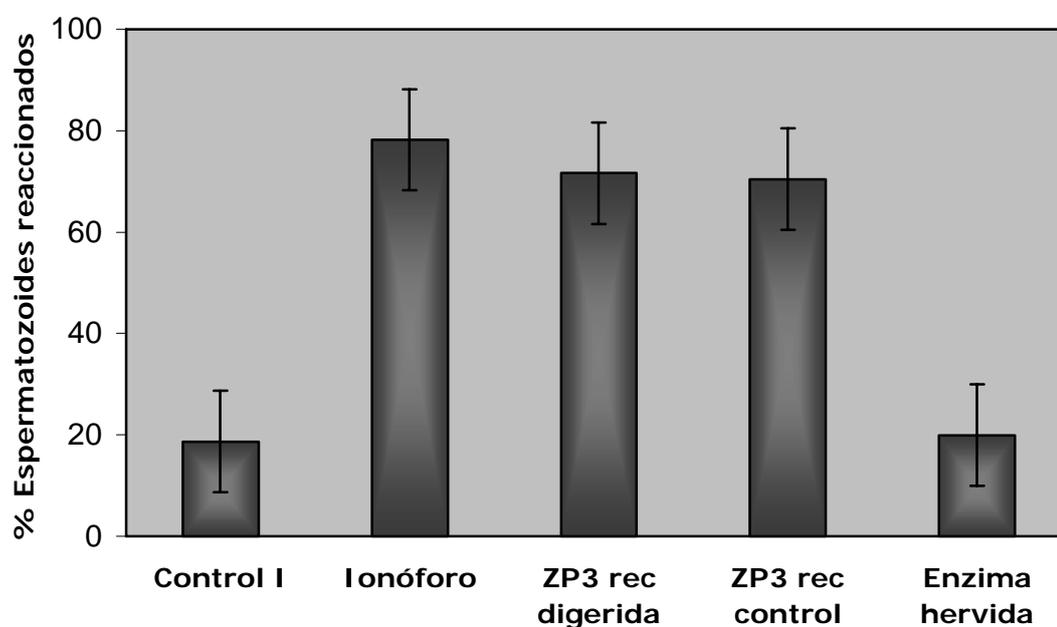
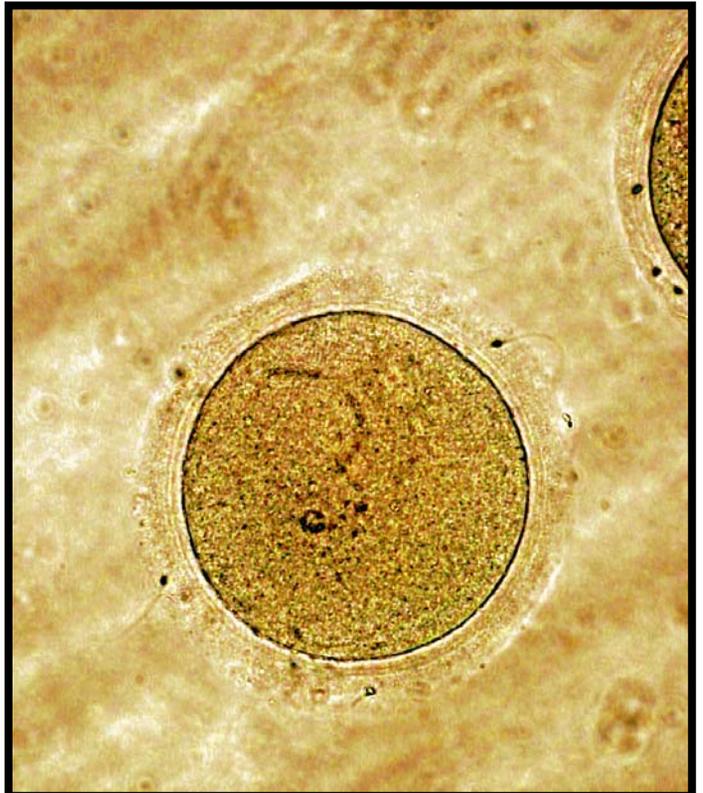


Figura 41. Proporción de espermatozoides reaccionados en el ensayo de la actividad de la ZP3 recombinante sin las cadenas oligosacáridicas N-unidas. Control I: Proporción de espermatozoides reaccionados espontáneamente. Control II: Espermatozoides reaccionados con el ionóforo de calcio. ZP3 rec digerida: Espermatozoides reaccionados con ZP3 recombinante digerida con la enzima N-glicosidasa F. ZP3 rec control: Espermatozoides reaccionados con ZP3 recombinante tratada igual que la anterior pero sin la enzima. Control III: proporción de espermatozoides reaccionados con la enzima N-glicosidasa F hervida.

VII. DISCUSIÓN



1. ANÁLISIS CITOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CARBOHIDRATOS PRESENTES EN LA ZONA PELÚCIDA Y GRÁNULOS CORTICALES DE LOS OVOCITOS HUMANOS.

Gracias a la aportación de importantes laboratorios, se ha comprobado, que ratones transgénicos que expresan ZP3 y ZP2 humana junto con sus análogos murínicos pueden unir espermatozoides de ratón pero no espermatozoides humanos (Rankin *et al.*, 1998, 2003). Esto sugiere que la interacción que se produce entre el ovocito y el espermatozoide de ratón es dependiente de la composición de carbohidratos de las glicoproteínas de la ZP. Estos resultados, también sugieren, que el espermatozoide humano se une específicamente a la secuencia de carbohidratos expresada en la ZP humana nativa, cuya maquinaria de glicosilación es diferente a otra especie y por lo tanto no se une a la secuencia expresada en las glicoproteínas de la ZP de ratón. Debido a la importante contribución que presentan los carbohidratos en la interacción ovocito-espermatozoide, es necesaria una descripción detallada de la composición de los carbohidratos de la ZP humana.

Las propiedades de la ZP son modificadas por la liberación de los gránulos corticales después de la activación del ovocito debido a la fecundación (Sun, 2003). En este estudio, hemos investigado los ovocitos que se encuentran en metafase II con un alto contenido de gránulos corticales en la región del cortex del ovocito para asegurarnos que no se haya producido la liberación de estos. Sin embargo, ovocitos que se encontraban en el estadio de vesícula germinal fueron incluidos en este estudio para comparar los patrones de unión a las diferentes lectinas y anticuerpos con los ovocitos en metafase II. No observamos diferencias cualitativas entre los dos grupos de ovocitos. De todas formas, un estudio cuantitativo detallado incluyendo estos ovocitos y otros, tales como, metafase I y ovocitos metafase II madurados *in vitro* sería necesario investigar para dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la maduración de la ZP descrito anteriormente (Oehninger *et al.*, 1991).

1.1. Composición de los carbohidratos presentes en la zona pelúcida de ovocitos humanos.

1.1.1. Residuos de Ácido siálico.

Clark y colaboradores fueron los primeros en sugerir la posibilidad de que la unión entre el espermatozoide humano y la ZP podría estar mediada por selectinas (Patankar *et al.*, 1993). En este estudio, hemos confirmado que algunos de los glicanos terminales presentes en la ZP son estructuras del tipo sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x, coincidiendo con algunos resultados previos (Lucas *et al.*, 1994). La observación de que la digestión con la enzima neuraminidasa lleva a la pérdida de estas secuencias coincide con la exposición de los sitios de unión a los anticuerpos anti-Lewis^a y Lewis^x. Estos anticuerpos nos proporcionan una evidencia complementaria de la expresión de sialil-Lewis^{a/x}. La unión de la lectina *Maackia amurensis* (MAA) a la ZP de ovocitos humanos indica que la secuencia terminal Neu5Ac α 2-3Gal β 1,4GlcNAc se encuentra presente en la ZP.

Otras secuencias que presentan ácido siálico fueron detectadas usando la combinación de las lectinas PNA, SBA y SNA con el tratamiento con neuraminidasa. Así, el antígeno T sialilado (Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) y la secuencia terminal Neu5Ac-GalNAc fueron detectados por la unión de la lectina PNA y SBA después de la digestión de la ZP con neuraminidasa. Además, el hecho de que no observemos unión con la lectina SNA, específica para la secuencia Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc, sugiere la presencia del enlace α 2,3 entre el ácido siálico y el penúltimo carbohidrato de los antígenos T. Algunas de las lectinas usadas en este estudio también se unen a residuos de ácido 5-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), sin embargo, se ha observado que este residuo se encuentra abundantemente en la ZP de ratones (Easton *et al.*, 2000) pero no es un constituyente normal de las glicoproteínas de la especie humana debido a la inactivación genética de la enzima requerida para su síntesis (Irie *et al.*, 1998).

1.1.2. Residuos de Fucosa.

Se ha sugerido que los residuos de fucosa podrían estar involucrados en la interacción del ovocito y el espermatozoide en diferentes especies, desde los invertebrados hasta los humanos (Ahuja, 1982; Tesarik *et al.*, 1993b; Miranda *et al.*, 1997). Un estudio reciente sugiere que los epitopos de Fucosa contenidos en la secuencia de las estructuras tipo Lewis podrían estar involucrados en la interacción entre gametos en humanos debido a la capacidad del espermatozoide humano a unirse al ovocito del molusco bivalvo *Unio elongatulus* (Focarelli *et al.*, 2003).

En este estudio empleamos tres lectinas diferentes (AAA, LTA y UEA-I) y diferentes anticuerpos monoclonales que detectan oligosacáridos que contienen el residuo fucosa. Observamos un marcaje específico con la lectina AAA. Esta lectina reacciona con los N-glicanos que contienen fucosa unida por enlace α 1,6 a residuos de GlcNAc próxima al sitio de unión a asparagina (Yamashita *et al.*, 1985; Osawa y Tsuji, 1987). Esta clase de oligosacárido tipo N-unido fue identificado previamente en las glicoproteínas de la ZP de ratón y de cerdo (Easton *et al.*, 2000; Nakano y Yonezawa, 2001). El hecho de que la reactividad a la lectina LTA y al anticuerpo anti-Lewis^x fue observada solamente después del tratamiento con la enzima neuraminidasa sugiere que esta lectina podría reconocer la fucosa asociada con el antígeno Lewis^x. La alta afinidad observada por la lectina LTA a los oligosacáridos que contienen el determinante Lewis^x fue demostrado anteriormente (Pereira y Kabat, 1974; Yan *et al.*, 1997). Como hemos descrito anteriormente, otros residuos fucosa presentes en el contexto del antígeno sialil-Lewis también han sido detectados.

1.1.3. Residuos de N-acetilgalactosamina.

Estudios recientes sugieren que en la membrana del espermatozoide tanto en rata como en humano, se encuentra presente una proteína que une residuos de Gal (Goluboff *et al.*, 1995; Rivkin *et al.*, 2000). Recientemente fue detectada la lectina tipo-C en el espermatozoide de rata

y mostró que tenía mayor afinidad por los glicanos cuya secuencia terminaba con GalNAc unida por enlace β que por la Gal unida por enlace β (Rivkin *et al.*, 2000).

En este estudio hemos utilizado cinco lectinas con diferente afinidad por los residuos GalNAc unida por enlace α y β . Solamente las lectinas AIA (jacalina) y MPA mostraron afinidad por la ZP humana. No observamos marcaje con las otras lectinas empleadas confirmando estudios previos (Bar-Shira Maymon *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 1994; Talevi *et al.*, 1997). AIA es una lectina específica para el antígeno Tn (GalNAc α -Ser), demostrando la presencia de este carbohidrato en la ZP humana. Además, la unión a la lectina MPA, también es consistente con la expresión del antígeno Tn y también se sabe que MPA reacciona fuertemente con el antígeno T (Gal β 1,3GalNAc) (Goldstein y Poretz, 1986; Wu y Sugii, 1991). Sin embargo, el hecho de que no observemos unión con la lectina PNA a la ZP humana nativa indica que la ZP humana no contiene el disacárido Gal β 1,3GalNAc. En este estudio, hemos obtenido la misma reactividad en ovocitos en VG y ovocitos que fallaron la fecundación en metafase II. Este resultado está en desacuerdo con estudios previos (Talevi *et al.*, 1997). Este autor observaba que la lectina MPA reacciona solamente con la ZP de ovocitos que habían fallado la fecundación. La razón de esta discrepancia puede ser debida a la utilización de la lectina obtenida de diferentes fuentes o a la metodología empleada (microscopia electrónica frente a microscopia de luz).

En este estudio demostramos la diferente expresión de residuos de GalNAc en ZP humana comparada con otras especies de mamíferos. Así, oligosacáridos que terminan con residuos de GalNAc en el contexto del antígeno secundario (NeuAc α 2,3[GalNAc β 1,4]Gal) expresado en la ZP de ratón e implicado en la unión secundaria y/o penetración del espermatozoide en esta especie (Cahová y Dráber, 1992; Avilés *et al.*, 1999; Easton *et al.*, 2000) no han sido observados en la ZP humana. Sin embargo, hemos detectado la presencia del antígeno Tn en la ZP humana que no ha sido descrito en otras especies. Este carbohidrato no se

encuentra normalmente en tejidos humanos excepto en embriones tempranos de humanos (Springer, 1984). El antígeno Tn es un antígeno pancarcinoma expresado en algunas células tumorales (Springer, 1984; Kim y Gum, 1996). Ha sido generalmente aceptado que la expresión elevada del antígeno Tn está relacionado con el incremento de adhesión celular, invasión y metástasis de células cancerosas (Cao *et al.*, 1995). El papel jugado por este carbohidrato de la ZP durante la fecundación en la especie humana todavía debe ser clarificado.

1.1.4. Residuos Manosa.

Diferentes estudios han propuesto a los residuos manosa como moléculas clave en la interacción entre ovocito y espermatozoide en humanos (Mori *et al.*, 1989; Tulsiani *et al.*, 1990; Tesarik *et al.*, 1991; Benoff *et al.*, 1993a-c; Miranda *et al.*, 1997; Maegawa *et al.*, 2002). Estudios previos sugieren la presencia de glicanos que contienen manosa, en diferentes especies incluyendo en humanos, usando la lectina Con A (Bar-Shira Maymon *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 1994; Talevi *et al.*, 1997). La lectina GNA es mucho más específica para detectar oligosacáridos N-unidos del tipo rico en manosa que la lectina Con A (Shibuya *et al.*, 1988). La lectina Con A se une tanto a oligosacáridos N-unidos tipo rico manosa como a los del tipo complejo biantenarios (Brewer y Bhattachryya, 1986, 1988; Bhattachryya *et al.*, 1987). Estudios basados en el uso de métodos bioquímicos y biofísicos sugieren que N-glicanos del tipo rico manosa se expresan en la ZP de ratón y rata (Easton *et al.*, 2000; Tulsiani, 2000); sin embargo, esto no ha podido ser demostrado con técnicas citoquímicas usando la lectina GNA (Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997a).

En este estudio hemos obtenido marcaje con la lectina Con A pero no con la GNA. Debido a lo desarrollado anteriormente esto puede ser debido a la existencia de modificaciones (sulfatación o fosforilación) en los N-glicanos tipo rico manosa o a la ausencia de este tipo de glicano en la ZP humana. Mediante estudios bioquímicos en humanos se ha visto que tanto la glicoproteína ZP2 como la ZP3 son insensibles a la enzima endoglicosidasa

H indicando la baja presencia o ausencia de N-glicanos tipo rico manosa (Bauskin *et al.*, 1999). Se desconoce la presencia o no de estos oligosacáridos en la ZP1 y ZPB de la especie humana.

1.1.5. Residuos de Galactosa.

Los residuos galactosa (Gal) terminales han sido implicados en la interacción ovocito-espermatozoide en diferentes especies (Benoff, 1997; Tulsiani, 1997; Shalgi y Raz, 1997). En este estudio no hemos observado marcaje con la lectina BSAI-B₄ ni con el anticuerpo policlonal anti- α -Gal indicando que la secuencia Gal α 1-3Gal no se expresa en ovocitos humanos. La unión de los espermatozoides humanos a la ZP es inhibida *in vitro* con la presencia de altas concentraciones de Gal o con RCA-I, lectina que reacciona normalmente con residuos de Gal terminal unidos por enlace β 1,4 a GlcNAc (Mori *et al.*, 1989; Miranda *et al.*, 1997). La ZP de ovocitos humanos reacciona muy bien con la lectina RCA-I consistente con la expresión de residuos de Gal terminal β unidos. La ZP humana también se une a la DSA, una lectina que puede unirse a las cadenas de polilactosamina (Cummings y Kornfeld, 1984) o a secuencias Gal β 1,4GlcNAc terminal unida por enlace β 1,6 al core de residuos de manosa de los N-glicanos tipo complejo (Yamashita *et al.*, 1987). Esta reactividad con DSA, la retención de la unión a la lectina WGA después del tratamiento con neuraminidasa, y la susceptibilidad a la interacción con el espermatozoide después de la digestión con endo- β galactosidasa (Ozgun *et al.*, 1998), indica que la secuencia de polilactosamina se encuentra en la ZP humana.

La fuerte unión que presenta la lectina PHA-E es consistente con la expresión de N-glicanos del tipo complejo biantenarios y triantenarios. Se ha sugerido que el residuo que reconoce la lectina PHA-E podría estar involucrado en la protección del ovocito humano de la respuesta inmune mediada por células natural killer en el tracto genital femenino (Patankar *et al.*, 1997). La unión a la lectina PHA-L sugiere que la terminación de los N-glicanos tipo complejo sería la secuencia Gal β 1,4GlcNAc unida por enlace

β 1,6 al core de manosa en la ZP humana. Este resultado es también consistente con la expresión del sitio de unión de la DSA, que se puede presentar en la misma secuencia.

1.1.6. Residuos de N-acetilglucosamina.

Estudios previos usando la lectina WGA, residuos de GlcNAc y la digestión con β -hexosaminidasa sugieren que GlcNAc terminal unida por enlace β es requerida para la interacción del ovocito con el espermatozoide en ensayos de hemizona (Mori *et al.*, 1989; Miranda *et al.*, 1997, 2000). En este estudio, hemos demostrado la presencia de residuos GlcNAc en el contexto de la secuencia de polilactosamina en la ZP humana por el resultado obtenido con la lectina WGA después del tratamiento con neuraminidasa (Gallagher *et al.*, 1985). Hemos utilizado otras lectinas específicas para esta secuencia, como la STA, pero no hemos obtenido marcaje. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que esta lectina reacciona con la ZP de vaca, de rata y de ratón. De este modo, sugerimos que el residuo GlcNAc es común en los carbohidratos de la ZP de diferentes especies, sin embargo, están presentes en un específico y determinado contexto como se demuestra por la diferente unión observada con diferentes lectinas específicas para este carbohidrato.

1.2. Heterogeneidad de la zona pelúcida humana.

Un estudio previo indica la diferencia sustancial en la unión del espermatozoide a la zona interna y externa de la ZP humana (Burkman *et al.*, 1988). Los estudios citoquímicos ultraestructurales realizados sugieren una distribución heterogénea de los carbohidratos en la ZP humana tal y como se ha descrito para el ratón y la rata (Avilés *et al.*, 1996, 2000b). Los análisis cuantitativos indican que algunas secuencias de carbohidratos como sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x se encuentran principalmente localizados en la región externa de la ZP. El marcaje observado con el anticuerpo anti-ZP3 humana y con las lectinas WGA y AAA indican que estos componentes se encuentran localizados principalmente en la región interna de la ZP.

Estudios previos de microscopía de barrido demuestran que la región más compacta de la ZP es la que se encuentra próxima al ovocito en ovocitos de mamíferos. Por otro lado, la región más porosa de la ZP es la que se encuentra en contacto con las células foliculares en diferentes especies (Phillips y Shalgi, 1980a,b; Familiari *et al.*, 1992).

La distribución heterogénea de los carbohidratos observada en este estudio no se debe a las diferentes características estructurales de la región interna y externa de la ZP humana. La distribución de la ZP3 humana (hipotético receptor del espermatozoide) fue mayor en la región interna de la ZP comparada con la región externa de la ZP que es más porosa. Consideramos que esta diferente distribución en las glicoproteínas de la ZP humana ocurre probablemente durante la síntesis de la ZP como ha sido previamente descrito en la ZP de ratón y rata (Avilés *et al.*, 2000a,b). Sin embargo, no podemos descartar la hipótesis de que diferentes estructuras supramoleculares en la ZP podrían estar presentes en la zona interna y externa, produciendo alguna clase de problemas estéricos que afecten la accesibilidad de las lectinas o los anticuerpos. Una conformación supramolecular especial de la ZP ha sido recientemente propuesta como responsable de la interacción del espermatozoide con la ZP de ratón (Rankin *et al.*, 2003).

La diferente composición por todo el espesor de la ZP podría también estar relacionado con la penetración del espermatozoide a través de la ZP, como ha sido descrito anteriormente (Cahová y Dráber, 1992; Avilés *et al.*, 1999).

Los estudios de microscopía de barrido han proporcionado información sobre la estructura de la región interna y externa de la ZP. Sin embargo, en nuestro estudio citoquímico ultraestructural y usando el anticuerpo anti-ZP3 humano sugerimos que la región porosa de la ZP constituiría el 25% de la región externa de la ZP humana, mientras que la región compacta constituiría el 75% del espesor de la ZP humana. Esta hipótesis está basada en la accesibilidad del anticuerpo anti-ZP3 al espesor

total de la ZP en las secciones ultrafinas. El origen de la diferente organización estructural de la ZP, es decir, región compacta frente a región porosa, debe ser todavía resuelto.

1.3. Composición de los gránulos corticales de ovocitos humanos.

Los gránulos corticales (GC) son unas vesículas secretoras especializadas localizadas justo debajo de la membrana plasmática del ovocito que están involucrados en el bloqueo de la poliespermia. Sin embargo, el papel concreto que juegan estas estructuras no ha sido todavía resuelto debido a la escasez de datos de la composición de los GC y sus efectos sobre la ZP (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Yanagimachi, 1994; Gross *et al.*, 2000; Hoodbhoy *et al.*, 2000; Sun, 2003).

En la década de los 60, se realizaron los primeros estudios sobre la composición de los GC, en donde ya se establecía con ayuda del microscopio óptico su naturaleza glicoproteica en ovocitos de hámster, mono y hombre (Yanagimachi y Chan, 1961). En la década de los 70, con el uso del microscopio electrónico y la histoquímica (Kang, 1974; Selman y Anderson, 1975) se dio confirmación a lo descubierto anteriormente. Actualmente, con el uso de la histoquímica de lectinas, se ha logrado con mayor precisión la identificación del contenido de los GC (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Algunas evidencias sugieren que las lectinas WGA y LCA reconocen específicamente el contenido de los gránulos corticales en los ovocitos humanos mediante microscopía de fluorescencia (Talevi *et al.*, 1997; Ghetler *et al.*, 1998; Sengoku *et al.*, 1999). En este estudio, hemos demostrado la presencia de los siguientes carbohidratos mediante citología de lectinas unidas a partículas de oro coloidal: GlcNAc (WGA), Fuc (AAA), Gal β 1,4GlcNAc (DSA), GalNAc (MPA y AIA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc (MAA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc (tratamiento con neuraminidasa seguido de la interacción con la lectina PNA) y N-glicanos tipo complejo con cadenas biantenarias y/o triantenarias (PHA-E). En este estudio confirmamos la composición glicoproteica de los GC de ovocitos humanos pero además observamos diferente composición con los

GC de otras especies. La lectina RCA-I presenta afinidad por los GC de los ovocitos de hámster, rata y ratón (Kan *et al.*, 1990; Roux *et al.*, 1991; Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997) sin embargo, en humano, no observamos afinidad con esta lectina. En rata y ratón se ha puesto de manifiesto la presencia del azúcar GalNAc mediante la afinidad a los GC de las lectinas DBA y SBA (Avilés *et al.*, 1997) mientras que en humano ponemos de manifiesto la presencia de este azúcar en el contexto del antígeno Tn con las lectinas AIA y MPA pero no obtenemos marcaje con las anteriores lectinas. Hemos observado la presencia del azúcar fucosa mediante la afinidad de la lectina AAA como ocurre en los GC de ovocitos de ratón, rata y hámster (Kan *et al.*, 1990; Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997). En cerdo, se ha detectado la presencia del disacárido Gal β 1,3GalNAc (antígeno T) con la lectina PNA (Yoshida *et al.*, 1993), en humano, hemos observado la afinidad por esta lectina una vez que eliminamos el ácido siálico demostrando la presencia del trisacárido Nue5Ac-Gal β 1,3GalNAc. La lectina MAA presenta afinidad por los GC de ovocitos humanos a diferencia de los de rata que no presentaron afinidad por esta lectina (Avilés *et al.*, 1994, 1996). Sin embargo, algunas lectinas, como DSA y WGA, han sido detectadas en hámster rata y ratón (Kan *et al.*, 1990; Roux *et al.*, 1993; Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997).

También hemos detectado que lectinas que se unen específicamente a la ZP humana no tienen afinidad por los GC confirmando que la composición de la ZP no coincide exactamente con la composición de los GC. Consideramos que las similitudes en la composición de carbohidratos entre la ZP y los GC no se debe a la exocitosis total o parcial del contenido de los gránulos. Esto se debe a que los ovocitos analizados en este estudio mostraban un elevado número de GC en el citoplasma de los ovocitos eludiendo la posibilidad de que se hubiese producido la reacción cortical durante el periodo de cultivo de los ovocitos. Debe realizarse un análisis cuantitativo de la modificación en la composición de los carbohidratos de la ZP usando ovocitos fecundados que no se desarrollaron o ovocitos activados *in vitro* mediante ionóforo de calcio para determinar el efecto de los gránulos corticales en la composición de los carbohidratos de la ZP.

La intensidad que mostraron las lectinas en la unión al contenido de los GC no fue uniforme. Algunos GC no presentaron reactividad. Esto sugiere que en los ovocitos humanos existen poblaciones diferentes de GC como ha sido reflejado con anterioridad usando microscopía electrónica convencional (Nicosia *et al.*, 1977) y citoquímica de lectinas a nivel ultraestructural en otras especies (Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997a). Recientemente, gracias al uso de técnicas de microscopía confocal se ha observado en ratón que existen dos tipos de GC con una diferente distribución en el ooplasma. Estos tipos de GC ha sido caracterizados debido a su diferente afinidad por la lectina *Lens culinaris* (LCA) y el anticuerpo ABL2 (Liu *et al.*, 2003). Se ha sugerido que las diferentes características de los GC podrían estar relacionadas con los diferentes grados de maduración del ovocito (Guraya, 1985; Liu *et al.*, 2003). El significado funcional de la existencia de una población heterogénea de GC debe ser todavía resuelto.

2. ESTUDIO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA.

La formación de la matriz extracelular, ZP, de los ovocitos, es crítica para la fecundación y el desarrollo de los embriones en crecimiento. Las glicoproteínas de la ZP poseen una estructura similar incluyendo un dominio ZP, un sitio de corte consenso con furina y un dominio transmembrana. Ha sido aceptado que la escisión de las glicoproteínas para su liberación hacia la matriz, se realiza en un sitio próximo al dominio transmembrana y que es un paso esencial para la secreción e interacción de estas glicoproteínas para formar la ZP (Dean *et al.*, 2002; Kiefer y Saling, 2002; Qi *et al.*, 2002). Sin embargo, diferentes aspectos de este proceso tales como el tipo de enzima involucrado en el corte y su localización celular no han sido despejados. También, son muy escasos los datos que se tienen sobre la ruta de síntesis de las glicoproteínas de la ZP.

2.1. Síntesis de las glicoproteínas de la ZP humana.

Hace unos años se pensaba que el corte de la proteína para la liberación de las glicoproteínas a la matriz de ZP en ovocitos humanos se realizaba en un dominio bastante conservado reconocido por furina que cortaría esta secuencia y liberaría la glicoproteína a nivel de la membrana plasmática del ovocito (Kiefer y Saling, 2002). Sin embargo, otros estudios en ratón, han revelado que el corte se produce en un sitio alternativo próximo a este sitio conservado y que la enzima furina no es necesaria para la incorporación de las glicoproteínas a la ZP (Zhao *et al.*, 2002, 2003). También, se sugirió que el procesamiento de las glicoproteínas podría tener lugar en vesículas secretoras (Qi *et al.*, 2002). En nuestro estudio hemos demostrado con la utilización de anticuerpos contra glicoproteínas de la ZP humana y la ZP de cerdo que reconocen epitopos presentes en la ZP humana, que las glicoproteínas de la ZP se encuentran a nivel de la membrana plasmática del ovocito sugiriendo que el procesamiento de estas glicoproteínas se produciría a nivel del oolema. Este marcaje específico ha sido detectado en el oolema de ovocitos en profase I. Sin embargo en ovocitos humanos que se encontraban en metafase II no detectamos marcaje. Esto nos sugiere que la incorporación de las glicoproteínas de la ZP de ovocitos humanos se produce principalmente cuando el ovocito se encuentra en profase I, en plena maduración del ovocito, mientras que ovocitos que se encuentran en metafase II y ya han sido ovulados no sintetizan glicoproteínas de la ZP. En ratón, la ZP se sintetiza cuando se inicia la foliculogénesis en los folículos primordiales hasta el momento de la ovulación (Wassarman, 1988), semejante a lo que podría ocurrir en humano.

Son muy escasos los datos que se tienen sobre la ruta de síntesis que siguen las glicoproteínas de la ZP humana. Ni siquiera en ratón, se ha podido determinar el proceso que siguen estas glicoproteínas para ser sintetizadas. En nuestro estudio hemos observado como estas glicoproteínas se encuentran presentes en las cisternas del aparato de Golgi en ovocitos humanos en profase I. No hemos detectado la presencia de

estas organelas en ovocitos en metafase II como ha sido descrito anteriormente (Dvorak *et al.*, 1990).

En el ooplasma de los ovocitos en profase I detectamos cuerpos multivesiculares y estructuras con morfología de lisosomas marcados específicamente con los anticuerpos anti-ZP. En ovocitos en metafase II no detectamos estas estructuras marcadas. Esto nos sugiere que las glicoproteínas de la ZP son endocitadas o degradadas por el ovocito cuando se encuentra en profase I. Es importante destacar que los ovocitos bajo estudio, que se encontraban en metafase II, permanecieron en un medio de maduración para ovocitos durante 48-72 horas, tiempo en el que el contenido lisosomal pudo ser degradado y por eso no detectamos marcaje. Aún así, la explicación de este fenómeno puede ser debido a varias causas; una posible autofagia de las glicoproteínas sintetizadas debido a un exceso de síntesis que llevaría al recambio intracelular en el citoplasma de la célula, una posible endocitosis de las glicoproteínas secretadas debido también a un exceso de moléculas secretadas o por la presencia de enzimas proteolíticas en folículo que digieran las glicoproteínas de la matriz extracelular y el ovocito las recupere mediante endocitosis. La ovulación es un proceso muy complejo en el que los mecanismos moleculares que lo controlan no son muy conocidos. Estudios histológicos han mostrado que en respuesta a la hormona leutinizante (LH) se produce la degradación de tejido y la remodelación de matriz extracelular en los folículos preovulatorios. Esto llevaría a la rotura del folículo y la liberación del ovocito maduro (Espey y Lipner, 1994). Estas modificaciones implican la inducción y activación de proteasas que digieran la matriz (Espey y Lipner, 1994). Se ha demostrado que las células de la granulosa que se encuentran en los folículos ováricos sintetizan dos proteasas ADAMTS-1 y catepsina-L que estarían implicadas en los procesos de degradación y modificación del tejido ovárico (Robker *et al.*, 2000). ADAMTS-1 pertenece a la familia de las enzimas metaloproteasas y media aspectos de la degradación celular y disolución del muro folicular. Catepsina-L se conoce comúnmente como una proteasa lisosomal pero también es secretada por las células (Ishidoh y Kominami, 1998). Estas dos proteasas que son secretadas en los folículos

ováricos podrían degradar de forma indiscriminada la ZP que rodea al ovocito y éste tener la capacidad de recuperar este material degradado y mediante una vía lisosomal reciclar las glicoproteínas. En este trabajo describimos por primera vez una posible ruta de degradación de las glicoproteínas que forman la ZP. Estudios sobre la capacidad del ovocito a incorporar el material extracelular deben realizarse para despejar la función de estas estructuras que contienen las glicoproteínas de la ZP.

2.2. Síntesis de las glicoproteínas de la ZP de ratón.

Estudios recientes sobre la síntesis y procesamiento de las glicoproteínas de la ZP de ratón mediante la monitorización de la ZP3 anclada a una proteína fluorescente han detectado unas estructuras inusualmente grandes marcadas específicamente (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Estos estudios sugieren que estas estructuras nacerían del compartimento post-Golgi como vesículas secretoras (Qi *et al.*, 2002). En este estudio hemos analizado con detalle los ovocitos de folículos ováricos de ratón de 18 días en diferentes estadios de desarrollo utilizando un anticuerpo específico contra una proteína perteneciente al retículo endoplasmático rugoso (Ferrari y Söling, 1999) y otro anticuerpo que marca específicamente las región cis del aparato de Golgi (Martínez-Alonso *et al.*, 2005). Hemos podido observar que en folículos bilaminares encontramos numerosas estructuras circulares marcadas con el anticuerpo que reconoce el retículo endoplasmático. Estas estructuras no aparecen marcadas con el anticuerpo que reconoce el aparato de Golgi. Mediante el estudio ultraestructural que realizamos en este trabajo, observamos como las estructuras, en las que se encontraba anclada la glicoproteína ZP3 de ratón y presentaban un tamaño inusualmente grande (0,5-3,0 μm) (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003) en realidad es retículo endoplasmático rugoso que aparece en forma circular y con un diámetro de $1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Estudios realizados en rata mediante técnicas de microscopía electrónica determinaron que formaciones concéntricas en el ooplasma de los ovocitos pertenecían a retículo endoplasmático rugoso (Kang, 1974). Estudios anteriores detectaron importantes cambios en la organización de las

organelas durante las primeras fases de desarrollo probablemente debido a un aumento en el tráfico de glicoproteínas en el oolema del ovocito (Wassarman y Josefowicz, 1978). No se ha podido describir, hasta el momento, como se produce el tráfico de las glicoproteínas en el ooplasma del ovocito de ratón. Solamente se han descrito unos agregados vesiculares que aparecen en ovocitos de folículos primarios y presentan marcaje con lectinas con un patrón idéntico al que muestra el aparato de Golgi y la ZP de estos ovocitos, pudiendo sugerir que estas estructuras estarían involucradas en el tráfico de las glicoproteínas de la ZP en el ovocito (Avilés *et al.*, 1999,2000). En ratón, se ha sugerido, que la máxima expresión de las glicoproteínas que forman la ZP se produce en ovocitos de 50-60 μm de diámetro que se encuentran en folículos primarios (Epifano *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos nos sugieren que el ovocito que se encuentra en folículos primarios bilaminares "soporta" un importante tráfico de proteínas, como las glicoproteínas que forman la ZP, y esto, repercute en un elevado número de organelas implicadas en la síntesis de proteínas como es el retículo endoplasmático. La organización del retículo endoplasmático en forma circular puede favorecer el funcionamiento correcto de esta organela sometida a un importante tráfico de proteínas.

La síntesis de las glicoproteínas de la ZP comienza en el ovocito que forma parte de los folículos primarios (Wassarman, 1988; Totzauer *et al.*, 1998; Sinowatz, 2001a). En este estadio, el ovocito se encuentra detenido en profase I de la primera división meiótica y se denomina vesícula germinal (VG). Justo antes de la ovulación se reinicia la meiosis para detenerse en la metafase II hasta ser fecundado. La maduración del ovocito es un proceso complejo que involucra la reanudación de la meiosis a partir del estado de profase I detenido produciendo la desorganización del núcleo y los cambios citoplasmáticos necesarios para preparar al ovocito para la fecundación y desarrollo del embrión temprano (Eppig *et al.*, 1993). El periodo de crecimiento del folículo ovárico y del ovocito se caracterizan por ser una fase de síntesis proteica intensiva y de almacenamiento de macromoléculas (Miyano, 2003). El aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso juegan un papel central en el tráfico intracelular

(Rothman, 1994). Estudios recientes realizados en ovocitos de ratón detenidos en VG, aparecen pequeños grupos de cisternas apiladas o "mini-Golgi" funcionalmente activos principalmente localizados por todo el citoplasma del ovocito (Moreno *et al.*, 2002). Nosotros hemos observado la presencia de estructuras formando Golgi repartidos por todo el citoplasma en los folículos primarios unilaminares pero no hemos observado esta organela en los ovocitos de folículos multilaminares.

La reorganización de las organelas es uno de los temas más importantes a debatir durante la división celular. Durante la mitosis las células deben garantizar que las dos células hijas contengan cantidades similares de las organelas membranosas para su viabilidad (Warren y Wickner, 1996). Para este proceso existen varias teorías. Algunos autores opinan que tanto el retículo endoplasmático como el aparato de Golgi se fragmentan y los fragmentos vesiculares se diseminaban homogéneamente por todo el citoplasma antes de la citoquinesis, permitiendo que cada célula hija tuviese la mitad del material disponible en células somáticas (Warren y Wickner, 1996). Otros autores han sugerido que en el caso del aparato de Golgi, el reparto de los fragmentos pueda ser un proceso más específico que aleatorio (Shima *et al.*, 1997). Y por último, otros autores sugieren que el aparato de Golgi interacciona con el retículo endoplasmático en el comienzo de la mitosis para volver a formarse a partir del retículo endoplasmático en la telofase (Roth, 1999; Nelson, 2000). La fragmentación del aparato de Golgi también tiene lugar durante la meiosis (Weakley, 1966; Colman *et al.*, 1985). La secreción de proteínas es inhibida durante la mitosis de células somáticas (Featherstone *et al.*, 1985) y la secreción de proteínas también se bloquea durante la maduración de los ovocitos en *Xenopus* (Colman *et al.*, 1985). La presencia de pequeñas cisternas formando el aparato de Golgi en los folículos primarios unilaminares y bilaminare y la ausencia de estas estructuras en folículos multilaminares, que hemos observado en los ovarios de ratón, puede ser debido a una paulatina desorganización de estas estructuras durante la maduración del ovocito. Durante la maduración *in vitro* de ovocitos de ratón se observó que las estructuras que forman el aparato de Golgi se fragmentan durante la disolución de la membrana

nuclear de los ovocitos en VG y estos fragmentos se dispersan por todo el citoplasma del ovocito en metafase II (Moreno *et al.*, 2002).

En ovocitos que se encontraban en folículos multilaminares no detectamos las estructuras circulares que forman el retículo endoplasmático. Sin embargo, detectamos, con el anticuerpo que reconoce la proteína del retículo endoplasmático, la presencia de pequeñas vesículas electrodensas marcadas específicamente con un diámetro de $100 \text{ nm} \pm 0,01$.

Se ha observado en todas las especies estudiadas que la fecundación estimula un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Stricker, 1999). El incremento de Ca^{2+} es responsable de la estimulación de la exocitosis de los gránulos corticales y de la reanudación del ciclo celular (Swann y Ozil, 1994; Runft *et al.*, 2002). El tránsito de Ca^{2+} está estimulado por el incremento en la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) (Ciapa *et al.*, 1994) que moviliza el Ca^{2+} por la activación de los receptores de InsP_3 en el retículo endoplasmático (Berridge *et al.*, 2000). Así, el retículo endoplasmático sirve como un reservorio de Ca^{2+} que se usa para la generación del tránsito de Ca^{2+} necesario para conducir el ciclo celular de las células germinales. En ovocitos maduros, el retículo endoplasmático está sometido a cambios en su organización estructural asociados con la habilidad del ovocito a ser fecundado con éxito (Stricker *et al.*, 1998; Kline, 2000; Terasaki *et al.*, 2001). Los cambios observados en la reorganización del retículo endoplasmático de ovocitos maduros en metafase II consiste en la formación de grupos de RE distribuidos en el córtex del ovocito y su formación está relacionada con la capacidad del ovocito maduro a generar transitos de Ca^{2+} en respuesta a la interacción con el espermatozoide (Kline, 2000). En especies donde se producen múltiples transitos de Ca^{2+} , como en mamíferos, no se ha observado fragmentación del RE a diferencia de las especies que solo muestran un simple tránsito como *Xenopus* (Striker, 1999; Kline, 2000). En estudios recientes, utilizando técnicas de fluorescencia, han observado que en ovocitos que se encuentra en M II el RE forma racimos de 1-2 μm de

diámetro. Estos racimos desaparecen cuando el segundo cuerpo polar es liberado (FitzHarris *et al.*, 2003). En nuestro estudio hemos observado mediante microscopía electrónica como las estructuras circularizadas, presentes en folículos bilaminares desaparecen en folículos multilaminares. Sugerimos que el ovocito, una vez que tiene completas sus necesidades proteicas para enfrentarse a la fecundación, reorganiza el RE para servir como reservorio de Ca^{2+} y regular los diferentes tránsitos de Ca^{2+} que ocurren durante la fecundación. Este cambio en la organización pasaría de unas cisternas apiladas bien estructuradas en los folículos unilaminares y bilaminares a estructuras o vesículas membranosas repartidos por el cortex del ovocito cerca de la membrana. Un estudio más detallado de la composición de estas vesículas y de su caracterización y distribución debe realizarse para determinar con exactitud el papel que desempeñan.

3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZP DE HÁMSTER.

3.1. Organización estructural de la zona pelúcida de hámster.

Ha sido descrito anteriormente que el espermatozoide de hámster se une principalmente a la región externa de la ZP que corresponde con la región porosa que se encuentra en contacto con la células del cúmulo (Phillips y Shalgi, 1980a; Ahuja y Bolwell, 1983). Propiedades similares han sido descritas en otras especies como la humana y porcina (Burkman *et al.*, 1988; Fazeli *et al.*, 1997). Debido a que los carbohidratos han sido implicados directamente en los procesos de unión al espermatozoide se sugiere que probablemente en la estructura de la ZP haya una diferente composición de glicoproteínas en la región interna y la región externa que sea responsable de este proceso. Se ha observado que en diferentes especies existe una composición diferente de carbohidratos en el espesor de la ZP (Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997, 1999, 2000b). La composición y distribución de los carbohidratos de la ZP de hámster han sido descritos con anterioridad usando citoquímica de lectinas (Roux *et al.*, 1991; El-Mestrah y Kan, 2001). En ese estudio, se demostró que la mayoría de los

carbohidratos se encuentran distribuidos homogéneamente o localizados principalmente en la región interna de la ZP. No fue descrita la presencia de ningún residuo azucarídico con mayor abundancia o exclusivamente localizado en la región externa de la ZP. En este estudio hemos demostrado que un epitopo presente en la ZP de cerdo y que se encuentra también en la ZP de rata, ratón y hámster, se encuentra principalmente distribuido en la región externa de la ZP de hámster.

Los análisis citoquímicos realizados de la distribución de los epitopos que reconoce el anticuerpo durante la foliculogénesis, demuestran que estos epitopos fueron expresados en las primeras etapas del desarrollo folicular, sin embargo, conforme el ovocito se desarrolla deja de expresar la ZP con los epitopos que reconoce el anticuerpo para expresar otra conformación que no reconoce el anticuerpo puesto que el marcaje obtenido en los folículos antrales se restringe a la zona externa. Este análisis citoquímico podría ser interpretado por la expresión selectiva de los epitopos reconocidos por el anticuerpo contra ZP de cerdo durante los estadios tempranos de la foliculogénesis. Purificamos las glicoproteínas de la ZP de hámster para poder identificar que glicoproteínas que contenían este epitopo y observamos que únicamente una banda de aproximadamente 56 kDa fue marcada con este anticuerpo. Esta banda corresponde con la ZP3 de hámster como ha sido descrito anteriormente (Moller *et al.*, 1990; Kinloch *et al.*, 1990). Mediante el análisis citoquímico demostramos que el anticuerpo es localizado principalmente en la región externa de la ZP por lo que podríamos esperar la presencia de dos subclases de ZP3, una conteniendo los epitopos que reconoce el anticuerpo y otra subclase sin los epitopos. Realizamos la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ZP de cerdo y el análisis mostró que toda la ZP3 de hámster se encontró localizada en el precipitado y no detectamos ZP3 de hámster en el sobrenadante. Este resultado demuestra la diferente estructura de la ZP a lo largo de su espesor puesto que mediante microscopía electrónica observamos el marcaje del anticuerpo casi exclusivamente en la parte externa de la ZP y como hemos podido observar mediante western-blot y la inmunoprecipitación total de la banda de 56 kDa que contiene ZP3, el

anticuerpo reconoce esta glicoproteína que se encuentra distribuida por todo el espesor de la ZP por lo que la diferente estructura de la ZP de hámster hace que el anticuerpo no pueda reconocer la ZP3 que se encuentra en la parte interna.

Durante el desarrollo de los ovocitos de *Discoglossus pictus* se observó, también, una diferente afinidad por las lectinas cuando se comparaban los análisis citoquímicos y bioquímicos (Caputo *et al.*, 2001). Así, en nuestro estudio y como describen Caputo y sus colaboradores (2001) sugerimos que esta diferencia podría ser debida a una organización molecular específica que proporcionara accesibilidad a los epitopos de la región externa y enmascarase los epitopos de la región interna bajo las condiciones en las que se realiza el análisis de microscopía electrónica. Sin embargo, una vez que la ZP es disuelta por el tratamiento de la electroforesis SDS-PAGE los epitopos se vuelven accesibles. Cuando realizamos la deglicosilación de la ZP total de hámster mediante la enzima N-glicosidasa F observamos que el anticuerpo anti-ZP de cerdo detecta cuatro bandas. Esto nos sugiere que el anticuerpo reconoce la parte proteica de todas las glicoproteínas pero estas se encuentran inaccesibles debido a la presencia de oligosacáridos distribuidos heterogéneamente o una estructura supramolecular (Dean, 2004) formada entre la glicoproteínas glicosiladas.

Se observa de forma más clara la diferente distribución de los epitopos entre la región externa y la región interna en los ovocitos ovulados que en los ovocitos ováricos. Esta diferencia podría ser debida a la adición de algunas proteínas con origen en el oviducto que podrían unirse a la ZP como ha sido descrito anteriormente con las oviductinas (St-Jacques *et al.*, 1992; El-Mestrah y Kan, 2001; Buhi, 2002; O'Day-Bowman *et al.*, 2002). Ha sido descrito anteriormente un cambio en el patrón de unión a lectinas después de la ovulación en la ZP de hámster (Yanagimachi, 1994; Avilés *et al.*, 2000; El-Mestrah y Kan, 2001), por lo que se produce un cambio en la estructura de la ZP durante la maduración del ovocito.

Con todos estos datos podríamos sugerir que la ZP estaría organizada mediante estructuras supramoleculares específicas y diferentemente estructuradas a lo largo de la ZP de forma que en la zona externa, donde se produce la primera interacción con los espermatozoides, hubiese una conformación concreta y en la región interna esta estructura supramolecular fuese diferente. Estudios recientes usando ensayos moleculares reflejan la importancia de la estructura de la ZP. Así, ha sido descrito que una estructura molecular específica en la ZP de ratón sería la responsable de la interacción del espermatozoide con la ZP del ovocito (Dean, 2004).

3.2. Estudio de la composición de las glicoproteínas de la zona pelúcida de hámster.

Estudios bioquímicos mediante la utilización de electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras demostraron que la ZP de hámster muestra la presencia de dos bandas, una banda bastante grande de 92 kDa a 208 kDa y otra banda de 56 kDa, por lo tanto, estas glicoproteínas se encuentran altamente glicosiladas y presentan una gran heterogeneidad en su glicosilación. En la banda superior se consideró que están comprendidas las glicoproteínas ZP1 y ZP2 y en la banda inferior con un peso molecular de 56 kDa, correspondería a la ZP3 de hámster (Moller *et al.*, 1990). Para la ZP de ratón se realizó una clasificación de forma similar, atendiendo al peso molecular y designando las glicoproteínas de mayor a menor ZP1, ZP2 y ZP3. Un análisis mediante electroforesis bidimensional de la ZP de hámster mostró la presencia de tres bandas (Moller *et al.*, 1990). Bajo condiciones reductoras, la ZP1 de hámster con un peso molecular aparente de 200 kDa migraría a un peso de 103 kDa sugiriendo que la ZP1 de hámster está compuesta por dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro (Moller *et al.*, 1990).

La identificación de las diferentes glicoproteínas contenidas en la ZP de hámster fue realizada mediante la identificación de sus propiedades de movilidad en un gel de electroforesis. Solamente la ZP3 de hámster ha sido

identificada mediante un análisis en western-blot con un anticuerpo específico desarrollado contra la ZP3 de hámster (Kinloch *et al.*, 1990). En nuestro estudio hemos demostrado mediante espectrometría de masas la presencia de la ZP3 de hámster en la fracción recogida del gel que mostraba un peso molecular de 56 kDa sin descartar la presencia de otras glicoproteínas de la ZP de hámster.

La deglicosilación de la ZP total de hámster mostró la presencia de cuatro bandas. Debido a la ausencia de datos de la ZP1 y ZP2 de hámster en los bancos de datos comparamos los pesos moleculares obtenidos con los pesos moleculares de la ZP1 y ZP2 de ratón. El peso moléculas de la ZP1 extracelular deglicosilada es de 58,32 kDa y el de ZP2 es de 67,83 kDa (pesos moleculares obtenidos del programa bioinformático Expasy que se encuentra disponible en la red con la dirección <http://us.expasy.org/sprot/>) que corresponderían al peso molecular obtenido en las dos bandas superiores de la ZP total de hámster tratada con N-glicosidasa F.

Mediante la deglicosilación de la banda de 56 kDa observamos la presencia de dos glicoproteínas. Estas dos bandas se observan solamente después de la digestión con N-glicosidasa F, tanto en la digestión de la ZP total como en la digestión de la fracción de 56 kDa. Estas dos bandas mostraron un peso molecular aproximado de 48 y 38 kDa. El peso molecular estimado de la ZP3 de hámster extracelular y además sin las glicosilaciones es de 36,02 kDa (Expasy Page). Teniendo la certeza de la presencia de ZP3 de hámster en esta fracción sugerimos que la banda de 38 kDa correspondería a la ZP3 de hámster.

Estudios previos han demostrado que diferentes proteínas que muestran un número diferente de aminoácidos tienen la misma movilidad en geles de electroforesis y se hacen indistinguibles. Esto también se observa en las glicoproteínas de la ZP de diferentes especies puesto que se encuentran altamente glicosiladas. Así, la ZP1 y ZP3 humanas se muestran superpuestas en geles de electroforesis (Gupta *et al.*, 1998; Bauskin *et al.*, 1999). Un resultado similar se observa en la ZP de rata (Araki *et al.*, 1992).

Las diferentes glicoproteínas de la ZP de bovino migran en una banda ancha y solamente pueden ser aisladas mediante el tratamiento con endo-beta-galactosidasa (Noguchi *et al.*, 1994). Nosotros sugerimos que en la banda de 56 kDa de la ZP de hámster se encuentran presentes dos glicoproteínas que pueden ser detectadas después del tratamiento con N-glicosidasa F. La banda superior de 48 kDa podría corresponder a una nueva glicoproteína que no había sido descrita hasta ahora. Recientemente, se ha descrito una nueva glicoproteína, ZP4 (ZPB), en la ZP humana (Lefievre *et al.*, 2004), y en la ZP de rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005). El peso molecular de esta proteína extracelular sin las cadenas de azúcares es de 48 kDa. Este peso molecular corresponde al peso aproximado de la banda superior detectada después de la deglicosilación de la banda de 56 kDa. De este modo, sugerimos que la ZP de hámster estaría compuesta por cuatro glicoproteínas y la banda detectada a 48 kDa podría corresponder a la ZP4 de hámster.

El hecho de que la ZP3 sin las glicosilaciones muestre un peso molecular aproximado de 38 kDa demuestra la eliminación de la mayoría de los azúcares presentes en la glicoproteína. Estudios anteriores confirman el bajo contenido de O-glicanos en la ZP3 de ratón (Boja *et al.*, 2003) en concordancia con los datos obtenidos en la ZP3 de hámster al retirar los N-glicanos. Comparando las secuencias de aminoácidos de la ZP3 de hámster y de ratón podemos observar que de los cinco sitios descritos en la ZP3 de ratón que se encuentran N-glicosilados solamente uno de ellos (N146) aparece conservado en la ZP3 de hámster y de las dos regiones descritas en ZP3 de ratón a ser potencialmente O-glicosiladas, en hámster, encontramos que solamente la región formada por los aminoácidos T155 y T162 se encuentra totalmente conservada. Esta diferencia puede determinar el distinto peso molecular que muestra la ZP3 de ratón con 83 kDa y la ZP de hámster con 56 kDa.

En este estudio mostramos la evidencia de la presencia de cuatro glicoproteínas en la ZP de hámster. Esto sugiere que la estructura y probablemente la fisiología de la ZP de hámster es muy similar a la ZP humana. Estos resultados hacen que el hámster sea un modelo animal más

apropiado para investigar la interacción entre gametos y relacionarlo con la especie humana que el modelo de ratón que esta formado por tres glicoproteínas. La rata podría servir también como modelo sin embargo, existen grandes problemas en este animal para realizar fecundación *in vitro*. Estudios posteriores son necesarios para clonar los genes de la ZP en el hámster.

4. ESTUDIO DE ZP2 Y ZP3 RECOMBINANTE HUMANA.

La interacción entre gametos de mamíferos es un proceso altamente especializado en el cual las secuencias de carbohidratos de las moléculas que intervienen juegan un papel muy importante en los eventos de reconocimiento asociados con la fecundación (Yanagimachi, 1994; Benoff, 1997, Shalgi, 1997, Easton *et al.*, 2000). En principio, esta especificidad, asociada a los carbohidratos, podría limitar la posibilidad de la expresión de proteínas recombinantes biológicamente activas involucradas en el reconocimiento ovocito-espermatozoide, debido a que este reconocimiento requiere un mecanismo específico de glicosilación similar al presente en el desarrollo de las células espermáticas y el ovocito. Sin embargo, los datos que presentamos en la presente tesis doctoral y los recogidos de estudios anteriores, nos demuestran que, para la biosíntesis de ZP3 recombinante humana biológicamente activa, la secuencia de aminoácidos de la proteína, que determina la conformación y las modificaciones postraduccionales, es decisiva y sistemas de expresión diferentes al natural son capaces de sintetizar las secuencias oligosacáridicas necesarias para el reconocimiento entre gametos. Similares resultados también se obtuvieron con la expresión de ZP3 recombinante de ratón, la expresión de este gen en al menos cuatro líneas celulares diferentes de mamíferos produjo, en todos los casos, una proteína recombinante que podía inducir la reacción acrosómica en ratones (Kinloch *et al.*, 1991; Beebe *et al.*, 1992).

4.1. Caracterización bioquímica de la ZP2 y ZP3 recombinante humana.

Recogimos el sobrenadante de células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humana y detectamos la presencia de ZP3 recombinante humana en este medio. Podemos concluir que la expresión de ZP3 en células CHO permite la producción y secreción de esta proteína, obteniendo suficiente cantidad para poder caracterizarla bioquímica y fisiológicamente, como ha sido descrito anteriormente (van Duin *et al.*, 1994). La ZP3 recombinante que expresamos en células CHO presentó un peso molecular de aproximadamente 60 kDa sugiriendo que la proteína había sido altamente glicosilada puesto que el peso molecular de la proteína ZP3 humana secretada sin glicosilar es de 36,39 kDa (Expasy Page). La ZP3 recombinante expresada en células CHO por otros grupos tiene un peso molecular de 55-60 kDa (van Duin *et al.*, 1994; Brewis *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1999). La ZP3 expresada en células de teratocarcinoma ovárico humano tiene un peso molecular de 65 kDa aproximadamente (Dong *et al.*, 2001) y la expresada en células de riñón embrionario tiene un peso molecular de 55 kDa. La ZP3 humana nativa tiene un peso molecular de 55-60 kDa (Gupta *et al.*, 1998; Bauskin *et al.*, 1999). Con estos datos podemos concluir que la ZP3 recombinante bajo estudio tiene un peso molecular semejante a la ZP3 nativa y a la expresada por otros grupos.

Probablemente la ligera diferencia que presentan la ZP3 recombinante y la ZP3 nativa se debe al mecanismo de glicosilación que hay en las diferentes especies y grupos celulares. En la ZP3 recombinante de ratón se obtuvieron datos semejantes puesto que la glicoproteína recombinante fue ligeramente más pequeña que la glicoproteína nativa (Beebe *et al.*, 1992), sugiriendo que el procesamiento de estas proteínas durante la síntesis difiere, aunque sea ligeramente, en los diferentes sistemas de expresión.

El nivel de glicosilación al que se somete la glicoproteína depende de la conformación y de la presencia o ausencia de motivos específicos de glicosilación (Hubbard *et al.*, 1988). De manera que el patrón de glicosilación que presenta el péptido de ZP3 humano es el que determina el nivel de glicosilación de la glicoproteína. Un ejemplo claro es la expresión de

ZP3 humana en ratones transgénicos; el peso molecular de esta glicoproteína fue de 60 kDa y no de 83 kDa que es el peso molecular de la ZP3 de ratón (Rankin *et al.*, 1998). Nuestra glicoproteína tiene un nivel de glicosilación semejante a la nativa por lo que el grado de glicosilación producido por las células CHO es semejante al que se produce en el sistema nativo. Recientemente ha sido analizado mediante espectrometría de masas la secuencia del péptido de ZP3 recombinante humana expresadas en células CHO-Lec3.2.8.1, una línea celular deficiente en la glicosilación tipo O y N (Stanley, 1989). En este estudio demuestran que la ZP3 humana tiene 3 sitios de N-glicosilación y dos regiones O-glicosiladas (Zhao *et al.*, 2004) y todos ellos se encuentra glicosiladas demostrando que la maquinaria de glicosilación de las células CHO es capaz de reconocer los sitios de glicosilación en la proteína ZP3 humana. El gen ZP3 de diferentes mamíferos como, ratón, hámster, humano y mono tienen todos una proteína homóloga de 422-424 aminoácidos pero el procesamiento postraduccional de estas proteínas lleva en el caso del ratón a una glicoproteína de \pm 83 kDa mientras que en las otras especies la ZP3 tiene una peso aproximado de 55 kDa. Esto se debe a la diferente glicosilación que presentan estas glicoproteínas.

Para determinar la aportación en el nivel de glicosilación de las cadenas N-oligosacáridicas realizamos la digestión de la cadenas N-unidas de la ZP3 recombinante mediante la enzima N-glicosidasa F. La caracterización bioquímica que realizamos con el anticuerpo anti-ZP de cerdo demuestra que después del tratamiento con la enzima, la proteína sufre un importante descenso en su peso molecular. La proteína recombinante pasa de un peso molecular aproximado de 60 kDa a un peso aproximado de 38 kDa. Con este resultado podemos concluir que con la liberación de las cadenas N-unidas se produce la eliminación de la mayoría de los carbohidratos que componen la molécula, puesto que el peso molecular estimado de la proteína secretada sin los azúcares es de 36 kDa. Este resultado coincide con el descrito por el grupo del Dr. Dean donde realizan el mismo tratamiento en la ZP3 recombinante expresada en células CHO deficientes en la glicosilación pasando de un peso molecular de

42 kDa a un peso después del tratamiento de 38 kDa (Zhao *et al.*, 2004). El estudio mediante espectrometría de masas de la glicoptoeína recombinante indica la presencia de tres sitios de N-glicosilación en la molécula (Zhao *et al.*, 2004) y como se observó en la ZP3 de ratón (Nagdas *et al.*, 1994; Boja *et al.*, 2003) la ZP3 humana se encuentra más fuertemente N-glicosilada que O-glicosilada.

De las células CHO transfectadas con el plásmido de ZP2 humana recogimos el sobrenadante y detectamos la presencia de dos bandas con el anticuerpo específico anti-ZP2 humana. El peso molecular de la ZP2 nativa es de 105-110 kDa (Gupta *et al.*, 1998; Bauskin *et al.*, 1999). En el sobrenadante de las células transfectadas observamos una banda superior de 110 kDa y otra banda de aproximadamente 90 kDa. Mediante la interacción específica de estas bandas con el anticuerpo anti-ZP2 humana podemos concluir que las células CHO sintetizan y secretan al medio la glicoproteína transfectada, sin embargo, estas células son capaces de sintetizar dos poblaciones de ZP2 recombinante. Se ha descrito que diferentes parámetros que pueden intervenir en el cultivo de células CHO como el suero, las proteínas que contienen el medio, los niveles de glucosa, el pH del cultivo o la forma de crecimiento de las células, influyen significativamente en los patrones de glicosilación de las proteínas recombinantes (Andersen y Goochee, 1994; Hokke *et al.*, 1995; Forno *et al.*, 2004). La expresión de la glicoproteína glicodelina A en células de riñón presenta dos poblaciones cuyo nivel de expresión depende de la concentración de glucosa y la aportación de glucosamina al medio (Nieuwenhof *et al.*, 2000). La expresión de ZP2 humana en células de riñón embrionario (293T) también detectan la presencia de dos bandas de 110 kDa y 90 kDa en el medio recogido de la células transfectadas (Martic *et al.*, 2004). ZP2 recombinante expresada en células CHO, descrita anteriormente, tiene un peso molecular de 100-110 kDa (Harris *et al.*, 1999). Sugerimos que las células CHO han expresado la ZP2 recombinante humana con dos niveles de glicosilación, una menos glicosilada de 90 kDa y otra de 110 kDa más parecida a la ZP2 nativa. Las dos clases de ZP2 expresadas se hayan glicosiladas puesto que el peso molecular de la

proteína excretada sin las glicosilaciones es de 67,44 kDa (Expasy Page). Estudios anteriores, que expresan ZP2 humana en células CHO indican que ZP2 recombinante expresada presenta una población heterogénea de glicoproteínas en cuanto a su peso molecular y al comparar la expresión de ZP1, ZP2 y ZP3 en células CHO, ZP2 presenta mayor variación en los niveles de glicosilación que las otras dos proteínas recombinantes (Harris *et al.*, 1999). Hasta el momento no se conoce la razón de esta variabilidad en la glicosilación de ZP2 recombinante y si tiene algún significado biológico.

4.2. Análisis de la actividad biológica de ZP3 recombinante.

En este trabajo hemos demostrado como ZP3 recombinante expresada en células CHO tiene actividad biológica puesto que es capaz de inducir la reacción acrosómica en un 72,2% de espermatozoides humanos incubados 1 hora. La capacidad de inducción de la glicoproteína recombinante es ligeramente menor que la capacidad de inducción que presenta el ionóforo de calcio A23187. Diferentes estudios han usado ZP humana nativa para ensayar su actividad biológica y han observado que los niveles de reacción acrosómica inducida con las glicoproteínas de la ZP nativa son menores que los niveles de inducción con el ionóforo de calcio (Lee *et al.*, 1992; Hoshi *et al.*, 1993; Tesarik *et al.*, 1993a). Se ha descrito en estudios anteriores que con cuatro ZP/ μ l solubilizadas se induce la reacción acrosómica en más del 45% de los espermatozoides humanos (Liu y Braker, 1996) y la cantidad de ZP3 en la ZP humana se ha estimado entre 1 y 5 ng (van Duin *et al.*, 1994). La diferencia en la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo y la ZP humana suele ser de dos o tres unidades de proporción (Liu y Braker, 1996). El hecho que los niveles de inducción de la reacción acrosómica con la proteína recombinante sean menores puede ser debido a dos hechos; primero a la diferente glicosilación que presenta esta glicoproteína con respecto a la nativa y segundo que la ZP3 recombinante por si solo es un desencadenante incompleto de la reacción acrosómica. Estudios anteriores han observado que el momento idóneo de la realización de la reacción acrosómica, está asegurado por la acción de inductores fisiológicos presentes en la ZP (Cross *et al.*, 1990), en las células

del cúmulo (Tesarik, 1985, 1988; Siiteri *et al.*, 1988; Murase y Roldan, 1996) y en el líquido folicular (Tesarik, 1985; Thomas y Meizel, 1986). Por otro lado, en otras especies, como el cerdo, se ha determinado que la actividad de unión al espermatozoide la proporcionan dos glicoproteínas de la ZP, ZPC/ZPB (Yonezawa *et al.*, 1997; Yurewicz *et al.*, 1998), en humano cabría la posibilidad de que la presencia de otra glicoproteína de la ZP, junto con la ZP3, produjese un aumento en la capacidad de inducir la reacción acrosómica. Recientemente se ha descrito como la incubación de ZPC recombinante humana expresada en baculovirus junto con ZPB recombinante tienen la capacidad de incrementar significativamente la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos (Chakravarty *et al.*, 2005)

La ZP3 recombinante expresada por el grupo del Dr. van Dean en células CHO, ha sido criticada porque obtuvo espermatozoides reaccionados (\approx 40%) cuando incubó la ZP3 con los espermatozoides durante 24 horas (van Duin *et al.*, 1994). Posteriormente, el grupo del Dr. Brewis, produjo una ZP3 recombinante expresada en células CHO con mayores índices de inducción de la reacción acrosómica (59 %) incubando los espermatozoides con la glicoproteína durante 3 horas (Brewis *et al.*, 1996). En este trabajo hemos expresado ZP3 recombinante con alta capacidad de inducir reacción acrosómica en espermatozoides humanos incubando las muestras durante 1 hora. El aumento de la capacidad de inducción por ZP3 recombinante con respecto a estudios anteriores puede ser debido a la mejora en las técnicas de transfección o a una diferente metodología. Así, sugerimos, que la expresión de ZP3 recombinante humana, biológicamente activa, en células CHO, es un sistema muy eficiente pudiendo obtener una glicoproteína recombinante con niveles de actividad semejantes a la nativa.

Se ha descrito recientemente que ZPB y ZPC recombinantes de cerdo expresadas en células SF9 tienen capacidad de unirse al espermatozoide bovino pero no al espermatozoide porcino. Sugieren que esto es debido a que la maquinaria de glicosilación de estas células sintetiza alta cantidad de cadenas tipo rico manosa produciendo una glicosilación en ZPB

recombinante de cerdo similar a la secuencia de azúcares presente en la ZPB bovina y diferente a la secuencia presente en la ZPB porcina (Yonezawa *et al.*, 2005). Estos experimentos demuestran como la secuencias de azúcares de la glicoproteína son decisivos en la interacción entre gametos. Las células CHO expresan los tres tipos de glicosilación de las cadenas N-unidas; rico manosa, híbrido y complejo pero suele ser mayor la proporción de tipo complejo. Es importante destacar que estas células no presentan actividad $\alpha(1,3)$ fucosiltransferasa (Campbell y Stanley, 1983) por lo que no puede añadir fucosa a la secuencia N-acetilactosamina para formar las estructuras Lewis. En el estudio citoquímico de la ZP humana pudimos observar como estos epitopos se encontraban en la región externa de la ZP donde se produce la primer contacto con el espermatozoide. Con estos datos sugerimos que estas secuencias de azúcares no están involucradas en la primera interacción del ovocito e inducción de la reacción acrosómica puesto que la proteína ZP3 recombinante con actividad biológica no presenta estos azúcares aunque no descartamos que pueda tener un papel en etapas posteriores.

Aunque la maquinaria de glicosilación de las células CHO sea diferente al sistema humano, sugerimos que las células CHO tienen la capacidad de sintetizar la glicoproteína ZP3 recombinante humana con las secuencias de azúcares necesarias para producir una glicoproteína capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos.

De las diferentes glicoproteínas presentes en la ZP, solamente se ha demostrado la capacidad de inducir la reacción acrosómica en la ZP3. La ZP2 tendría un papel de segundo receptor una vez que se ha producido la interacción primaria con la ZP3. ZP2 recombinante humana expresada en *E. Coli* tiene la capacidad de unirse a los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica (Tsubamoto *et al.*, 1999). Los datos aportados en este trabajo demuestran que ZP2 recombinante expresada en células CHO concentrada 10 veces más que la ZP3 recombinante no tiene la capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. El uso de esta proteína recombinante secretada por la células CHO también nos sirve

como control la posible capacidad de inducir la reacción acrosómica por algún componente secretado por las células CHO. Solamente obtuvimos inducción de la reacción acrosómica con la fracción que contenía ZP3 recombinante. Deben realizarse estudios de unión de ZP2 recombinante al espermatozoide humano una vez reaccionado para determinar si la expresión de esta proteína en células CHO puede compararse con la actividad de la ZP2 nativa y con ello determinar con exactitud el papel jugado por esta glicoproteína en la especie humana. Estudios posteriores son necesarios para conocer las propiedades biológicas de esta ZP2 recombinante y averiguar las diferencias entre las dos bandas de 110 y 90 kDa.

4.3. Actividad biológica de la ZP3 recombinante sin las cadenas N-oligosacarídicas.

La implicación de las cadenas oligosacarídicas en la interacción entre gametos ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo no se ha podido llegar a una conclusión general de qué tipo de azúcar sería el encargado de esta interacción. Existen resultados contradictorios y en cada especie se atribuye esta actividad a estructuras oligosacarídicas diferentes. En ratón, Florman y Wassarman en 1985 atribuyeron a las cadenas O-oligosacarídicas el determinante para inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón (Florman y Wassarman. 1985). Sin embargo, otros laboratorios implican a una estructura supramolecular formada por las diferentes glicoproteínas de la ZP como responsables de la interacción con el espermatozoide (Dean, 2004). Tanto en la especie porcina como en la especie bovina se ha atribuido principalmente a las cadenas oligosacarídicas del tipo N-unidas la responsabilidad de la interacción primaria con el espermatozoide (Amari *et al.*, 2001; Yonezawa *et al.*, 2001).

Con la glicoproteína recombinante digerida con la enzima N-glicosidasa F realizamos los ensayos de la inducción acrosómica. Con este experimento observamos que la proporción de espermatozoides reaccionados con la glicoproteína tratada y con la glicoproteína control sin

tratar fueron los mismos. Estos datos sugieren, que las cadenas N-oligosacáridicas de la glicoproteína recombinante ZP3 no están involucradas en la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos, la ZP3 recombinante sin las cadenas N-unidas sigue siendo capaz de inducir la reacción acrosómica. Estos datos indicarían que en la especie humana, ZP3 y probablemente los azúcares O-unidos estarían involucrados en la inducción de la reacción acrosómica como ha sido descrito en el ratón (Florman y Wassarman, 1985).

La expresión en *E. Coli* nos permite estudiar la contribución de la proteína frente a los carbohidratos. La expresión de ZP3 humana en bacterias hace que esta proteína no esté glicosilada y es incapaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Barratt y Hornby, 1995). Posteriormente, el laboratorio del Dr. Barratt produjo una ZP3 recombinante expresada en *E. coli* con capacidad de inducir reacción acrosómica en espermatozoides humanos habiendo sido incubados 18 horas con la glicoproteína (Chapman *et al.*, 1998). En estos experimento obtuvieron una proporción baja de espermatozoides reaccionados pero suficiente como para sugerir que el péptido por si solo es capaz de interaccionar con el espermatozoide humano aunque para obtener la actividad óptima necesite la secuencia específica de glicosilación. En concordancia con esta teoría son los datos aportados recientemente en los que una secuencia consenso formada por 12 aminoácidos de la ZP3 y sin glicosilar tiene la capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides en baja proporción. Estos autores sugieren que la conformación terciaria de este péptido sería el responsable de la actividad y otros epitopos glicosilados podrían ser necesarios para una óptima actividad (Hinsch *et al.*, 2005). Otros estudios revelan que las proteínas recombinantes de la zona pelúcida de primates expresadas en *E. Coli* (r-bmZP) tienen la capacidad de unirse a la cabeza de los espermatozoides capacitados y producen la inducción de la reacción acrosómica tras 18 horas de incubación del espermatozoide con r-bmZPC (ZP3) (Gahlay *et al.*, 2002). Por otro lado la ZP3 recombinante humana expresada en células 293T no tiene capacidad de inducir reacción acrosómica en espermatozoides

humanos (Martic *et al.*, 2004) y ZP recombinante de cerdo expresada en células SF9 no se une al espermatozoide porcino pero si al bovino (Yonezawa *et al.*, 2005). Con los datos obtenidos y los proporcionados por diferentes grupos, sugerimos que la secuencia de azúcares de la ZP3 es clave para proporcionar la especie-especificidad de la interacción en las diferentes especies en niveles óptimos y en humano las cadenas O-oligosacáridicas serían las responsables de esta especificidad.

En este trabajo no hemos evaluado la implicación de las cadenas O-unidas en la inducción de la reacción acrosómica puesto que no hemos encontrado un método "fiable" como el tratamiento de la enzima N-glicosidasa F para eliminar las cadenas O-oligosacáridicas. Para eliminar los O-oligosacáridos se han desarrollado métodos químicos como la β -eliminación donde se produce la liberación de estas cadenas mediante la hidrólisis alcalina en la interacción del azúcar GalNAc con la serina o tronina (Sharon, 1975). Sin embargo este tipo de experimento produce proteólisis en la cadena peptídica (Florman y Wassarman, 1985) impidiendo la valoración correcta de la implicación de los azúcares en los ensayos de reacción acrosómica.

Para determinar la implicación de los azúcares en la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos se pueden desarrollar otro tipo de experimentos. Una de las ventajas de la utilización de las células CHO como sistema de expresión es que hoy en día existe una gran variedad de mutantes de estas células con diferentes niveles de glicosilación. La expresión de ZP3 recombinante en células CHO con mutaciones concretas y el ensayo de la actividad de esta glicoproteínas comparada con la ZP3 recombinante de células CHO parentales podría determinar el tipo de azúcar involucrado en esta actividad. Otra posibilidad, que propicia el sistema de expresión en células CHO, es la mutación dirigida de los aminoácidos en los que se produce la O-glicosilación de la ZP3 recombinante, produciendo una glicoproteína recombinante sin cadenas O-unidas. El ensayo de la actividad biológica de esta glicoproteína comparada

con la recombinante de las células parentales nos informaría de la implicación de las cadenas O-glicosiladas.

La obtención de una glicoproteína recombinante humana con actividad biológica en un sistema de expresión muy conocido como es el de las células CHO abre las puertas a multitud de experimentos que serían imposibles de realizar con el material nativo de ZP humana debido a la dificultad de obtención de este material. Una detallada caracterización bioquímica y fisiológica de la ZP3 recombinante expresada en células CHO parentales es la base para posteriores experimentos que puedan aclarar cual es la molécula o estructura que determina la capacidad de esta proteína a interaccionar con el espermatozoide humano e inducir la reacción acrosómica. Por otro lado, también se ha estudiado la posibilidad de utilizar esta molécula, biológicamente activa con la posibilidad de obtener altas concentraciones, para ensayos de viabilidad de espermatozoides humanos. Determinar cuales son los problemas de fertilidad que presentan una importante proporción de la población es uno de los retos más importantes de este siglo, la utilización de este tipo de material biológicamente activo ayudaría a diseñar diferentes pruebas que determinen fallos en la calidad espermática.

VIII. CONCLUSIONES



1. La zona pelúcida de ovocitos humanos en profase I y metafase II presentan residuos glucídicos con secuencias terminales muy similares.

1.1. La utilización de técnicas citoquímicas de lectinas en conjunción con la enzima neuraminidasa pone de manifiesto la existencia de los siguientes disacáridos terminales en la zona pelúcida de ovocitos humanos Neu5Ac α 2-3Gal β 1,4GlcNAc (MAA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc (PNA) y Neu5Ac-GalNAc (SBA) y los tetrasacáridos terminales sialil-lewis^a y sialil-lewis^x detectados con anticuerpos específicos. A diferencia de otras especies detectamos el antígeno Tn (GalNAc α -Ser) con las lectinas AIA y MPA.

1.2. Los datos obtenidos también nos demuestran la presencia de la secuencia polilactosamina (DSA), GlcNAc en el contexto de la secuencia polilactosamina (neuraminidasa-WGA), fucosa unida α 1,6 a la GlcNAc que interacciona con el aminoácido Asn (AAA), la expresión de N-glicanos tipo complejo con cadenas biantenarias y/o triantenarias que contienen GlcNAc unida por enlace β 1,4 a manosa (PHA-E), N-glicanos tipo complejo que contienen lactosamina unida por enlace β 1,6 a manosa (PHA-L) y el residuo terminal Gal unido por enlace β a GlcNAc (RCA-I).

2. La zona pelúcida humana posee una composición glucídica distinta a la observada en otras especies descritas hasta la fecha. Este hecho podría estar relacionado con el reconocimiento especie-específico.

3. La distribución de los diferentes residuos glucídicos en el espesor de la zona pelúcida de ovocitos humanos muestra un patrón heterogéneo que puede estar involucrado en la diferente capacidad de unión a los espermatozoides observada entre la región externa e interna de la zona pelúcida.

3.1. Los residuos sialil-lewis^a y sialil-lewis^x son más abundantes en la región externa que en la región interna de la zona pelúcida humana.

3.2. Los residuos que reconocen las lectinas AAA y WGA son más abundantes en la región interna que en la región externa de la zona pelúcida.

4. El análisis cuantitativo de la distribución del anticuerpo anti-ZP3 humano en el espesor de la zona pelúcida nos indica que la región porosa de la zona pelúcida constituye aproximadamente el 25% de la región externa de la zona pelúcida humana, mientras que la región compacta constituiría el 75% del espesor de la zona pelúcida humana.

5. Los gránulos corticales de ovocitos humanos presentan un alto contenido en carbohidratos siendo su composición similar pero no idéntica a la zona pelúcida humana.

5.1. Los siguientes residuos glucídicos han sido identificados: GlcNAc (WGA), fucosa (AAA), Gal β 1,4GlcNAc (DSA), antígeno Tn (GalNAc) (MPA y AIA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc (MAA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc (Neuraminidasa-PNA) y N-glicanos tipo complejo con cadenas biantenarias y/o triantenarias que contienen GlcNAc unida por enlace β 1,4 a manosa (PHA-E).

5.2. En ovocitos humanos existen distintas poblaciones de gránulos corticales que muestran diferente patrón de afinidad por las lectinas y anticuerpos utilizados en este estudio.

6. Respecto al mecanismo de biosíntesis y secreción de las glicoproteínas de la zona pelúcida:

6.1. La detección de las glicoproteínas de la zona pelúcida a nivel del oolema mediante el estudio inmunocitoquímico en ovocitos humanos nos indica que la proteólisis de las glicoproteínas necesaria para su secreción ocurre fundamentalmente a este nivel y no en el aparato de Golgi.

6.2. En el ooplasma de los ovocitos humanos en profase I detectamos la presencia de glicoproteínas de la zona pelúcida en organelas implicadas en la vía endocítica demostrando la existencia de una vía de degradación de estas glicoproteínas.

6.3. Nuestro estudio inmunocitoquímico ultraestructural indica que las megavesículas o estructuras tipo "donuts" previamente descritas como vesículas responsables del transporte de las glicoproteínas de la zona pelúcida en ovocito de ratón se corresponden con retículo endoplasmático rugoso con una morfología especial. Esta atípica morfología es característica

de los folículos ováricos bilaminares. El retículo endoplasmático rugoso sufre un cambio morfológico drástico transformándose en vesículas de unos 100 nanómetros distribuidas por todo el ooplasma a partir de los folículos ováricos primarios multilaminares.

7. La zona pelúcida de ovocitos de hámster:

7.1. Está constituida por cuatro glicoproteínas como indican nuestros resultados mediante western blot en combinación con la deglicosilación enzimática. Esta nueva glicoproteína se encuentra formando parte de la banda con un peso molecular medio de 56 kDa y por su movilidad electroforética tras deglicosilación podría deberse a la glicoproteína ZP4 (ZPB).

7.2. El análisis de la banda de 56 kDa de la zona pelúcida de hámster mediante espectrometría de masas nos demuestra la existencia de la glicoproteína ZP3.

7.3. Presenta una composición heterogénea así el epitopo/epitopos reconocido/s por un anticuerpo específico anti-zona pelúcida se encuentra localizado principalmente en la región externa de la zona pelúcida. Esta distribución heterogénea en el espesor de la zona pelúcida es probablemente producida por la existencia de una estructura supramolecular de la zona pelúcida producida durante la foliculogénesis.

8. Las células CHO transfectadas expresan una proteína recombinante ZP3 humana semejante en peso molecular a la ZP3 nativa.

8.1. La ZP3 recombinante humana expresada en células CHO es biológicamente activa obteniéndose unos índices de reacción acrosómica en espermatozoide humano superiores al 70%.

8.2. Los oligosacáridos N-unidos presentes en la glicoproteína ZP3 recombinante no participan en la actividad biológica de esta glicoproteína. Probablemente los oligosacáridos O-unidos sean fundamentales para este proceso.

8.3. Mediante la deglicosilación enzimática de la ZP3 recombinante demostramos que los oligosacáridos N-unidos forman más del 30% del peso molecular de la glicoproteína frente a la escasa presencia de oligosacáridos O-unidos.

IX. SUMMARY



1. INTRODUCTION.

During fertilisation, sperm initially bind to the oocyte, undergo the acrosome reaction, penetrate the zona pellucida (ZP), and fuse with the egg to form a zygote. The entry of a single sperm into the egg initiates a cascade of reactions known as oocyte activation. During this process, cortical granules lying just beneath the oolema of the egg fuse with the plasma membrane and undergo exocytosis. Factors released from the granules induce specific biochemical changes in the ZP, leading in part, to the block to polyspermy (Hoodbhoy and Talbot, 1994; Yanagimachi, 1994; Green, 1997; Wassarman *et al.*, 2001; Sun, 2003).

It is generally accepted that the specific interaction between the sperm and the ZP is a carbohydrate mediated event in different species including the human (Chapman and Barratt, 1996; Ozgur *et al.* 1998; Benoff, 1997; Dell *et al.*, 1999; Primakoff and Myles, 2002; Talbot *et al.*, 2003). This binding is probably mediated by egg binding proteins located in the head region of capacitated sperm that bind to specific oligosaccharides expressed on outer surface of the ZP (Nixon *et al.*, 2001). The molecular characterisation of the components involved in mammalian and specially in human gamete binding remains unresolved and is the subject of considerable controversy (Dean, 2004). The determination of the precise composition of the carbohydrate sequences contained in the human ZP glycoproteins could provide valuable insight into the identity of the specific egg binding protein(s) expressed in the sperm plasma membrane. However, these studies are severely limited in the human due to the difficulties in both the availability and manipulation of human oocytes.

The zona pellucida (ZP) is a relatively thick extracellular coat that surrounds mammalian oocytes. The ZP contains sperm receptors that mediate sperm-egg interaction as a prelude to fertilization; it also induces acrosome reaction and participates in the block to polyspermy following fertilization of eggs (Yanagimachi, 1994; Wassarman, 2003). Genetic models, mainly using the mouse model, have showed that the mouse ZP is

formed by only three glycoproteins called ZP1, ZP2 and ZP3. The current model suggests that the ZP is formed by filaments composed by dimers of the ZP2 and ZP3 and these filaments are linked by dimers of ZP1 glycoprotein (Green, 1997; Wassarman *et al.*, 2001a). However, molecular technology has produced modified genetic mice that provide new information about the ZP and make to reconsider some aspects of the model previously described (Dean, 2004). Thus, the development of null mice without ZP2, ZP3 or ZP1 suggests that the ZP3 is necessary for the formation of the ZP matrix and that one of both ZP2 or ZP1 is sufficient to form the extracellular matrix (Dean, 2004). Moreover, it was described that most of the mammalian ZP is formed by only three different glycoproteins. However, recently it has been described that in some species like human and rat, this extracellular coat is formed by four different proteins (Lefievre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005). Another studies by Dr. Dean's lab showed that mice oocyte with humanized ZP including human ZP2 or both ZP2 and ZP3 are fertilized in vitro by the mouse sperm but not by human sperm. These oocytes showed an effective block to polyspermy; however, the ZP of fertilized oocytes still bound free swimming sperm (Rankin *et al.*, 2003; Dean, 2004). The authors suggest a new model for the early fertilization process in mouse that could be probably due to a special supramolecular structure of the ZP where ZP2 will play an important role in the sperm-ZP binding. These studies suggest that the glycosylation events that modify the ZP protein is more important than the source of protein backbone (mice versus human). This study also suggests that the glycosylation produced in the human ZP3 expressed by the mouse oocyte is mostly identical to the native mouse ZP3. This hypothesis was recently demonstrated by Dell's lab analyzing the O-linked oligosaccharide from human ZP3 expressed in the transgenic mice using MALDI-TOF technology (Dell *et al.*, 2003).

Previous morphological studies have demonstrated that the ZP is a complex structure. Thus, scanning electron microscopy studies have showed the different structure of the ZP in the region facing the oocyte and the region facing the cumulus cells. These regions were called inner and outer

region of the ZP, respectively (Familiari *et al.*, 1992). Other studies combining the transmission electron microscopy with cytochemical techniques showed evidence of a heterogeneous carbohydrate composition of both regions of the ZP in different species (Avilés *et al.*, 1996, 1997, 1999, 2000a,b). The use of the pol-scope microscopy showed that the ZP of hamster and human oocytes is organized in three different layers; however, its significance is not yet solved (Keefe *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 2004). This complexity could be the origin of an unclarified results showing a substantial difference in the binding of sperm to the inner and outer regions of the ZP of different species like hamster (Phillips and Shalgi, 1980a; Ahuja and Bolwell, 1983), human (Burkman *et al.*, 1988) and pig (Fazeli *et al.*, 1997).

The information on the human fertilization and, specially, the molecular mechanisms responsible of the sperm-ZP interaction are restricted compared with the mouse model. This is true for different reasons. First, the amount of human ZP is very limited compared with other species. Second, genetically modification are fortunately not allowed and the design of experiments using human sample are very controlled due to bioethical reason. Therefore, biophysical analysis as described in the mouse ZP are mostly impossible to perform using isolated human ZP.

These results make necessary the development of new models to dilucidate the molecules involved in the human sperm-ZP interaction. The expression of recombinant ZP glycoproteins in mammalian cells is a good approach since a large amount of ZP glycoproteins can be obtained. It has been previously reported the successful expression of ZP glycoproteins from human and other species (Kinloch *et al.*, 1991; Beebe *et al.*, 1992; van Duin *et al.*, 1994). The human ZP recombinant proteins showed a biological activity determined by the induction of the acrosome reaction. However, a different activity between the different recombinant ZP was also observed.

In the present thesis, several aspects of the carbohydrate content, structure, formation and origin of the ZP, with special attention to the

human ZP, have been analyzed. Therefore, the methods and techniques used in the present thesis included, the ultrastructural study of human ZP, cortical granules and biosynthetic pathway of the human and mouse ZP, biochemical and cytochemical characterization of the hamster zona pellucida and characterization of recombinant human ZP2 y ZP3 expressed in CHO cells. The methodology and main results obtained in the present study have been divided into four sections and described below.

2. METHODS, RESULTS AND CONCLUSIONS

2.1. CARBOHYDRATE ANALYSIS OF THE ZONA PELLUCIDA AND CORTICAL GRANULES OF HUMAN OOCYTES BY MEANS OF ULTRASTRUCTURAL CYTOCHEMISTRY

In this study, the carbohydrate composition of the ZP and cortical granules from human oocytes were analysed by employing lectin- and immunocytochemistry at the ultrastructural level in combination with enzymatic treatment and quantitative analysis. The precise identification of the carbohydrate distribution in these compartments should provide new information about the roles played by these glycans during both sperm binding interactions and the cortical reaction. This information could also be useful for future studies related to idiopathic human infertility in IVF programmes.

2.1.1. Methods.

Human metaphase II (MII) oocytes that failed to be fertilised by IVF technique and germinal vesicle (GV) oocytes used in this study were donated by patients from the IVF program of the Reproduction Unit of the Hospital La Fe (Valencia, Spain). GV oocytes were included in this study to discard a possible modification of the carbohydrate composition of the ZP due to the effect produced by the sperm during the FIV process. Informed consent was obtained from all subjects participating in the study as

approved by the Ethics committee at the Hospital La Fe in Valencia. These oocytes represent material that is normally discarded.

In most cases, MII oocytes were fixed 48-72 h after oocyte retrieval; however, in the case of GV oocyte, samples were fixed 2 h after oocyte retrieval. GV (9 oocytes from 5 patients) and M II (28 oocytes from 16 patients) human oocytes were fixed and processed for embedding in Lowicryl medium as previously described (Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997).

Colloidal gold particles were employed as marker for cytochemistry at ultrastructural level. For DIG- and HRP-labeled lectins a three step-method was used (Avilés *et al.*, 1996; 1997; 2000). For immunocytochemistry, a three step method was used for the mouse anti-human ZP3 monoclonal antibody. For the mouse monoclonal antibodies against Lewis and sialyl-Lewis antigens a two step method was used. Finally, the ultrathin sections were observed in a Phillips Tecnai 12 electron microscope.

Neuraminidase treatment was employed to remove terminal sialic acid residues thus exposing potential ligands for lectins or antibodies masked by these acidic sugars. This treatment was used with some lectins (DBA, HPA, LFA, LTA, PNA, SBA and UEA I) and antibodies (Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, sialyl-Lewis^a, sialyl-Lewis^x). Grids carrying the sections were treated with neuraminidase type V from *Clostridium perfringens*.

For the quantitative analysis the ZP was divided into two zones of approximately equal thickness: inner and outer zones. The inner and outer zone were subdivided in two regions that we call inner 1, inner 2, outer 1 and outer 2 according to the proximity to the egg cell. Density of labelling was performed with a computer-assisted image analyser model Q500MC from Leica. The density of labelling was determined by automatic counting of the gold particles enclosed in manually delineated areas. A statistical comparison was performed for lectin and antibody labelling in the four regions of the ZP previously described. Labelling densities were compared

using ANOVA and T3 Dunnet and Games-Howell test with $p < 0.05$ performed with a SPSS v10.

2.1.2. Results and conclusions.

The human ZP was intensely labelled with LTA, PNA and SBA lectins, but only after the removal of terminal sialic acid by neuraminidase treatment. This treatment also exposed binding sites for the anti-Lewis^a and anti-Lewis^x antibodies. However, WGA binding was reduced but not eliminated by digestion with this glycosidase. LFA-, MAA-, anti-sialyl-Lewis^a and anti-sialyl-Lewis^x antibodies labelling was completely abolished after neuraminidase digestion. In this study, we confirm that some of the human ZP glycans contain terminal sialyl-Lewis^a and sialyl-Lewis^x residues as previously described (Lucas *et al.*, 1994). Therefore known selectin ligands are expressed on the human ZP. The binding of the lectin (MAA) indicates that terminal Neu5Ac α 2-3Gal β 1,4GlcNAc sequences are also expressed on the human ZP. Sialylated T-antigen (Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) and the terminal sequence Neu5Ac-GalNAc were detected by demonstrating PNA and SBA binding following neuraminidase digestion. Moreover, the lack of binding observed with the SNA lectin, specific for Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc, strongly suggests the presence of α 2,3 linkage between the sialic acid and the penultimate carbohydrate of the T and Tn antigens. We have obtained affinity with LFA lectin that bind to N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) but this carbohydrate residue is not a normal constituent of human glycoproteins due to the genetic inactivation of the enzyme required for its synthesis (Irie *et al.*, 1998).

Specific labelling was observed with the AAA lectin. This lectin reacts with N-glycans expressing fucose linked α 1,6 to GlcNAc residues proximal to the Asn linkage site (Osawa and Tsuji, 1987; Yamashita *et al.*, 1985). This type of N-linked oligosaccharides was previously identified in the mouse and pig ZP glycoproteins (Nakano and Yonezawa, 2001; Easton *et al.*, 2000). The fact that LTA reactivity and anti-Lewis^x antibody binding is observed

only after neuraminidase treatment suggests that this lectin could be recognising the α 1,3 linked fucose associated with the Lewis^x antigen.

In this study, we have used five different lectins with different affinity for α - and β -linked GalNAc residues. Only AIA (jacalin) and MPA lectins display affinity for the human ZP. AIA is specific for the Tn antigen (GalNAc α -Ser) demonstrating the presence of this carbohydrate in the human ZP. Furthermore, MPA lectin binding is also consistent with the expression of the Tn antigen. It is known that MPA also reacts strongly with the T antigen (Gal β 1,3GalNAc) (Goldstein and Poretz, 1986; Wu and Sugii, 1991). However, the lack of PNA binding to native human ZP indicates that this matrix does not express the Gal β 1,3GalNAc disaccharide.

Human eggs react very well with RCA-I showed Gal residues. Human ZP also binds DSA, a lectin that can bind to polylactosamine chain extensions (Cummings and Kornfeld, 1984) or terminal Gal β 1,4GlcNAc sequences β 1,6 linked to the core mannose residue of complex type N-glycans (Yamashita *et al.*, 1987) This reactivity with DSA, the retention of WGA binding after neuraminidase treatment, and the sensitivity to endo- β -galactosidase digestion reported in an earlier study (Ozgun *et al.*, 1998), indicate that polylactosamine sequences are expressed on the human ZP.

The strong binding of E-PHA is consistent with the expression of biantennary and triantennary bisecting type N-glycans and the binding of L-PHA strongly suggests that complex type N-glycans terminated with Gal β 1,4GlcNAc sequences β 1,6 linked to a core mannose residue are also expressed on the human ZP.

In this study, we demonstrate the presence of the GlcNAc residues in the context of the polylactosamine sequence in the human ZP by the sequence neuraminidase-WGA.

No labeling was detected in the human ZP with BSA-I-B₄, DBA, HPA, GNA, SNA, STA or UEA I lectins.

We observed colloidal gold particles indicating AAA and WGA lectin binding primarily in the inner region of the ZP. A similar colloidal gold distribution was observed with anti-ZP3 antibody. However, immunolabeling with anti-sialyl-Lewis^a and anti-sialyl-Lewis^x antibodies was higher in the outer region of the ZP. The differences observed between the different regions of the human ZP were statistically significant. Our quantitative analyses indicate that some carbohydrate sequences like sialyl-Lewis^a and Lewis^x are mainly located in the outer region of the ZP. This heterogeneous distribution of the carbohydrate sequences is not due to the different structural characteristics of the inner and outer region of the human ZP previously reported in a scanning electron microscopy study (Familiari *et al.*, 1992). Our ultrastructural cytochemical findings using anti-human ZP3 antibodies suggest that the porous region of the ZP is limited to the 25% of the external region of the human ZP, whereas the compacted region constitutes approximately 75% of the total ZP. This hypothesis is consistent with the accessibility of the anti-ZP3 antibody to the entire thickness of the ZP in an ultrathin section. The origin of this different structural organisation in the compact versus porous zones of the human ZP remains unresolved.

In this study, we demonstrate the presence of the following carbohydrate residues in human cortical granules by means of lectin-gold cytochemistry GlcNAc (WGA), Fuc (AAA), Gal β 1,4GlcNAc (DSA), GalNAc (MPA and AIA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc (MAA), Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc (neuraminidase treatment followed by PNA binding) and biantennary and/or triantennary bisecting type N-glycans (E-PHA). However, no labelling was observed with the BSAI-B₄, ConA, DBA, GNA, HPA, LTA, L-PHA, RCA I, SBA, SNA, STA, UEA I or the other antibodies employed in this study. The intensity of lectin binding to the cortical granules was not uniform, however. Some cortical granules are completely unreactive. This result suggests that a different population of cortical granules exists in the human oocyte, an observation previously reported using conventional electron microscopy (Nicosia *et al.*, 1977) and lectin cytochemistry at ultrastructural level in other species (Avilés *et al.*, 1994; 1996; 1997).

In summary, this study reveals variable glycosylation of the human ZP throughout its thickness, with pronounced differences between the most external and internal regions of this matrix. This result was not due to a differential protein concentration in the porous structure, based on the binding of anti-ZP3 antibodies. The binding studies also indicate that human ZP glycoproteins express some carbohydrate sequences not previously detected in other species. Finally, cytochemical analysis of human cortical granules suggests similarities in glycosylation to human ZP glycoproteins but not to cortical granules from other mammalian species.

2.2. BIOSYNTHETIC PATHWAY OF ZONA PELLUCIDA: AN ULTRASTRUCTURAL STUDY.

Formation of the egg's extracellular matrix, ZP, is critical for fertilization and development of growing embryos (Dean, 2004). The different ZP glycoproteins possess a similar structure including a ZP domain, a consensus furin cleavage site and a transmembrane domain. It is generally accepted that the excision of the ZP glycoprotein by a specific convertase enzyme such as furin is an essential step for the secretion and assembly of the ZP (Kiefer and Saling 2002; Wassarman *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2002). However, different aspects of this process such as the type of convertase enzyme involved and the cellular localization remain an open question. Furthermore, the information available about the secretory pathway of the ZP is scarce specially in the human being. In this study, the secretory pathway of the ZP glycoproteins in human and mouse oocytes were investigated using ultrastructural cytochemistry.

2.2.1. Synthesis of human ZP.

2.2.1.1. Methods.

Human oocytes at Prophase I and Metaphase II were obtained from patients undergoing *In Vitro Fertilization Program* in La Fe Hospital. After hormonal stimulation of the ovaries with FSH and hCG, oocyte retrieval by

ultrasound transvaginal follicular aspiration was performed. Oocytes were fixed by immersion in glutaraldehyde and embedded in LR white according to routine procedures.

Polyclonal antibodies against heat solubilized pig ovarian ZP (kindly provided by Dr. Fayrer-Hosken) and pig ZPC (kindly provided by Dr. Hedrick) were applied. A monoclonal antibody against human ZP3 peptide representing the residues 335-350 located upstream the consensus furin cleavage site (kindly provided by Dr. Dean) was also applied. Ultrathin sections were incubated with the different antibodies at the appropriate dilution for 1 h. The specific interaction between the antibody and the antigen was visualized by means of the protein A-gold complex. Finally, the ultrathin sections were observed in a Phillips Tecnai 12 transmission electron microscope.

2.2.1.2. Results and conclusions.

Intense immunolabeling was observed in the ZP of both prophase I and metaphase II human oocytes using the anti human ZP3 antibody and with the two different anti-pig ZP glycoproteins. These results demonstrate that the epitopes recognized by the anti-pig ZP antibodies are shared by the human and the pig ZP. A moderate immunolabeling was detected in the oolema of the prophase I oocyte. However, the reactivity at the oolema of metaphase II oocyte was almost absent. A typical Golgi apparatus constituted by stacked cisterna was only observed in the prophase I oocyte. This Golgi apparatus was specifically labelled with the different anti-ZP antibodies. We suggest that the synthesis of human ZP glycoproteins occurs in the early stage of oogenesis, before ovulation. In mature oocyte, the zona matrix is fully formed and appears to be quite stable. In mouse, the glycoprotein have a dramatic increase during the early stage of oogenesis and then a decline as the oocyte matures (Epifano *et al.*, 1995). The immunolabelling associated with the oolema in prophase I oocytes suggests that the human ZP glycoproteins are cleaved at the oocyte plasma membrane. In mouse, the immunolocalization of individual and epitope-

tagged zona proteins at the periphery of growing oocytes in the absence of a zona pellucida suggests that this cleavage occurs at the surface of the plasma membrane (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002). We have not found evidences in favour of the hypothesis of cleavage of human glycoproteins at the Golgi apparatus level.

Multivesicular bodies and lysosome-like bodies of prophase I oocyte were also specifically immunolabeled with the different anti-ZP antibodies. No reactivity was detected in these organelles at the metaphase II oocyte. The reactivity detected in the multivesicular bodies and lysosome-like bodies suggests that the ZP is endocytosed by the oocyte. We suggest that the oocyte could need endocytose the glycoproteins for two reasons. The ZP glycoproteins are bad folded or different metalloproteinases act at follicular level and cut the ZP glycoproteins and the oocyte could recycle this material. Histological studies have shown that tissue degradation and extracellular matrix remodelling occurs in preovulatory follicle, ultimately leading to follicular rupture on the outer edge of the ovary and release of the mature oocyte (Espey and Lipner, 1994). These remodelling events implicate precisely controlled induction and activation of matrix-digesting proteases (Espey and Lipner, 1994). The matrix metalloproteinases have received considerable attention as candidate proteases controlling ovulation (Richards *et al.*, 1998). However, endocytic pathway in human oocytes remains to be clarified.

2.2.2. Synthesis of mouse ZP.

2.2.2.1. Methods.

Ovaries from 18 days mouse were kindly provided Dr. Dean from Laboratory of Cellular and Developmental Biology, NIDDK, National Institutes of Health, (Bethesda, Maryland). Ovaries were fixed by immersion in glutaraldehyde and embedded in LR white according to routine procedures.

Antibodies against PDI (protein disulfuro isomerase), protein present in the rough endoplasmatic reticulum and antibody anti-GM130 protein present in the Golgi complex (Ferrari y Söling, 1999; Martínez-Alonso *et al.*, 2005) were applied. Ultrathin sections were incubated with the different antibodies at the appropriate dilution for 1 h. The specific interaction between the antibody and the antigen was visualized by means of the protein A-gold complex. Finally, the ultrathin sections were observed in a Phillips Tecnai 12 transmission electron microscope. For morphometric analysis a total of 10 circular structures from 6 oocytes of 3 different animals and 75 vesicles from 6 oocytes of 3 different animals were photographed and analyzed using an image analyser with the MIP4.5 software.

2.2.2.2. Results and conclusions.

Oocyte from different maturation stage of the ovarian follicles were analyzed. In this study, unilaminar (n=3), bilaminar (n=7) and multilaminar (n=7) primary ovarian follicles were used. In the oocyte of unilaminar follicle, we observed specifically labelled endoplasmatic reticulum with the anti-PDI and the reticulum showed straights stacks. The endoplasmic reticulum showed a circular structure in bilaminar ovarian follicles and we obtained that this structures presented a mean diameter of $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$. The circular structures no were labelled with anti-GM130 antibody to confirm that these circular structures are rough endoplasmic reticulum

To study the intracellular trafficking of ZP glycoproteins, different labs have monitored the expression of ZP3 and ZP2 with fluorescent fusion protein. They observed specifically labelled large circular structures (Donuts-like or megavesicles) and suggested that the intracellular ZP2 and ZP3 were localized to membrane-bound secretory vesicles (Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). In this study, we show that the large vesicles are circular endoplasmatic reticulum presents in bilaminar follicles. A similar structure of the endoplasmic reticulum was previously described in the rat (kang, 1974). We suggest that the reticulum adopt this structure for the

important traffic protein in this point of the growing oocyte. The glycoprotein of the ZP show a increase during early stages of oogenesis when the oocyte present a 50-60 μm of diameter, in primary oocytes, and decline as the oocyte matures (Epifano *et al.*, 1995). The circular reticulum in primary bilaminar follicles suggest that these oocytes become engaged in trafficking of various glycoproteins, including those of the ZP.

When study the multilaminar follicles and we not observed circular endoplasmic reticulum. However, small dark vesicles were specifically labelled with the anti-PDI antibody and were distributed throughout the cytoplasm. The vesicles showed a mean diameter of 100 ± 1.0 nm. The change in reticulum organization in hamster, mouse and *Xenopus* consist with the ability of the maturing oocyte to generate Ca^{2+} transients in response to sperm (Kline, 2000). We suggest that the reticulum acquire tubular shape in multilaminar follicles to store de Ca^{2+} necessary to fecundation and we can observe in ultrathin sections small vesicles throughout cytoplasm. More precise analysis will be necessary to confirm this proposed significance.

2.3. BIOCHEMICAL, BIOPHYSICAL AND CYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE HAMSTER ZONA PELLUCIDA.

In the present study, the structure and composition of the hamster ZP was investigated by means of biochemical, biophysical and ultrastructural cytochemistry approaches. A specific polyclonal antibody developed against isolated ZP from porcine ovaries was used.

2.3.1. Methods.

2.3.1.1. Cytochemistry analysis

Adult female CD1 mice (n=3), wistar rats (n=3) and hamsters (*Mesocricetus auratus*) (n=3) were stimulated to superovulate by an intraperitoneal injection of PMSG followed 48 hours later by an i.p. injection

hCG. Females were killed by CO₂ inhalation 17 hours after injection with hCG and ovaries and oviducts were removed. To collect postovulatory oocytes-cumulus complexes, the ampullary region of the oviduct was identified and turned open with fine steel tweezers under a dissecting microscope. Ovaries from prepubertal gilts were transported to the laboratory. For ultrastructural study, the ovaries and oocytes were fixed with glutaraldehyde and processed for embedding in Lowicryl medium as previously described (Avilés *et al.*, 1994, 1996, 1997) and LR White resin according to routine procedures (Newman, 1989).

Grids were incubated with the lectin WGA-HRP as previously described. For immunocytochemistry, grids were incubated with a drop of polyclonal anti-pig ZP antibody. The specific interaction between the antibody and the antigen was visualized by means of the protein A-gold complex. Finally, the ultrathin sections were observed in a Phillips Tecnai 12 transmission electron microscope.

In the present study, the ZP was divided into two zones of approximately equal thickness: inner and outer zones. The inner zone is normally located close to the egg cell itself while the outer zone faces the cumulus cells and mediates sperm binding. Density of labelling was performed with a computer-assisted image analyser model Q500MC from Leica. The density of labelling was determined by automatic counting of the gold particles enclosed in manually delineated areas. A statistical comparison was performed for lectin and antibody labelling in the four regions of the ZP previously described. Labelling densities were compared using analysis of variance and T student test with $p < 0.05$ performed with a SPSS v10.

2.3.1.2. Biochemical and biophysical analysis

Zona pellucida glycoproteins were obtained from hamster (n = 14-20) and mouse (n = 20-25) ovaries. Ovaries were trimmed using small

scissors under a dissecting microscope to remove fat and connective tissue. The ovaries were homogenized and centrifuged. The pellet was washed and heat solubilized at 65°C for 45 min. Finally, the supernatant was recovered and the heat solubilized ZP was stored at –80°C. For purification the upper and 56 kDa bands of hamster ZP was carried out by electroelution from SDS/PAGE gels.

Hamster ZP glycoproteins were immunoprecipitated with the presence of anti-pig ZP antibody and with WGA-agarose. The digestion of the electroeluted 56 kDa band and the heat solubilized hamster were carried out in the presence of N-glycosidase F. Different ZP samples obtained as protocols described were dissolved in sample buffer in reducing and non-reducing conditions. The samples were separated by SDS/PAGE and the proteins were electrotransferred to PVDF membrane. The membrane was incubated with anti mouse ZP1, ZP2 and ZP3 monoclonal antibodies and anti pig ZP policlonal antibody. For lectin-blot, the membranes were incubated with WGA conjugated with HRP. After washing, visualization was accomplished using the ECL method following the manufacturer instructions.

Direct MS/MS analysis was used to analyse the 56 kDa band. The fractions were analysed by ES (Electro spray) mass spectrometry (MS) and tandem MS/MS analysis. MS analysis showed the presence of a number of doubly charged species which were subsequently MS/MS.

2.3.2. Results and conclusions.

The immunolabeling observed with the anti-pig ZP was specifically localized in the zona pellucida of the different follicles from rat, mice, pig and hamster ovary. At ultrastructural level it was observed that the immunolabelling was distributed over the entire thickness of the ZP of the different follicles in the rat, mouse and pig ovary. However, a different immunolabelling pattern was observed in the hamster ovary. Small ovarian follicles showed a uniform labelling over the entire width of the zona

pellucida; however, the immunolabelling observed in the large ovarian follicle was heterogeneously distributed. This immunolabeling is much higher in the region of the zona pellucida in contact with the granulosa cells, the outer region of the ZP. The heterogeneous pattern observed in the antral ovarian follicles in the hamster was also observed in the tubal oocytes. However, in the mouse and rat tubal oocytes the labelling was detected over the entire thickness of the ZP. A quantitative analysis was performed in the tubal oocytes of the three rodent species and pig ovarian. In summary, it was observed that there is statistically significant difference in the labelling density between the inner and the outer region of the ZP in the three different species. However, this quantitative analysis demonstrate that the immunolabeling was higher in the inner region of the ZP than the outer in the mouse and rat specie. On the contrary, in the hamster ZP the immunolabeling observed with the anti-pig ZP was higher in the outer region of the ZP than the inner region of the ZP.

In a further set of experiments that try to identify the glycoproteins that contained this epitope in the hamster ovarian ZP, we have purified the hamster ZP and observed that only a broad band of approximately 56 kda was specifically labelled by this antibody. This band corresponds to the hamster ZP3 as previously described (Moller *et al.*, 1990). As the cytochemical analyses demonstrated that the antibody is located mainly in the outer region of the ZP we would expect at least two different subclasses of the ZP3. One containing the epitopes recognized by the specific antibody against the pig ZP and another subclass without this epitope. The immunoprecipitation analyses showed that all the hamster ZP3 is contained in the pellet and no hamster ZP3 is detected in the supernatant. To investigate if the specific binding of the anti-pig ZP to the hamster ZP3 is also observed in the mouse ZP glycoproteins a similar western blot analysis was carried out using heat solubilized ZP glycoproteins from mouse ovarian homogenate. The western blot analysis showed that ZP1, ZP2 and ZP3 mouse glycoproteins were specifically stained by this antibody. The same result was obtained using the WGA lectin. The fact that the three bands detected using the anti-pig ZP antibody and WGA lectin are ZP1, ZP2 and

ZP3 mouse glycoproteins was confirmed by using specific rat monoclonal antibodies against the three different mouse ZP glycoproteins.

In summary, this study showed that the pig ZP shared epitopes with other rodent species like hamster, rat, mice and pig. In the hamster, these epitopes were located mainly in the outer region of the ZP of preovulatory and ovulated oocytes. However, the distribution is throughout the ZP in more immature oocytes.

To confirm the hamster ZP3 glycoprotein is included in 56 kDa band the hamster ZP glycoproteins were isolated from heat solubilized hamster ZP by electroelution from SDS/PAGE gels. ZP3 glycoprotein isolated was identified by mass spectrometry. This glycoprotein, implicated in hamster sperm receptor (Moller *et al.*, 1990), was identified by CID spectra of two peptides ⁽²⁸⁵⁾VTPANQTPDELNK⁽²⁹⁷⁾ and ⁽³³⁴⁾YQAHGVSQWPT⁽³⁴⁴⁾.

The isolated total hamster ZP glycoproteins were treated with the *N*-glycosidase F enzyme which specifically removed all type of N-linked oligosaccharides. Four different bands with an estimated molecular weight of 67 kDa, 58 kDa, 48.5 kDa and 36 kDa was observed using the anti-pig ZP antibody. This deglycosylation procedure was also applied to the broad band of 56 kDa previously identified as hamster ZP3. This enzymatic treatment produced the appearance of two different bands with a molecular weight of approximately 48 and 38 kDa. These two bands are identical to the lower molecular weight bands previously described using the total hamster ZP. In this study, we clearly showed that the broad 56 kDa band of the hamster ZP glycoproteins is constituted by two different glycoproteins. These two bands were only observed after N-linked deglycosylation. We suggest that the 38 kDa band is ZP3 without N-linked because the expected molecular weight without sugar is the 36 kDa. The upper band with the 48 kDa correspond with the hamster ZP4 and we suggest that because the molecular weight of this band is similar to the expected molecular weight of the mature form and deglycosylated form of the ZP4 from human and rat. compared with the expected molecular weight

expected for the human (Lefievre *et al.*, 2004) and rat ZP4 (Hodbhoy *et al.*, 2005). This data strongly suggest the existence of four different ZP glycoproteins in the hamster ZP. This new band has an apparent mobility of 56 kDa and co-migrate with the hamster ZP3.

2.4. RECOMBINANT ZP2 AND ZP3 EXPRESSED IN CHO CELLS.

The knowledge of human fertilization and specially the molecular mechanisms responsible of the sperm-ZP interaction are restricted compared with the mouse model. This is true for different reasons. First, the amount of human ZP is very limited compared with other species. Second, genetically modification are fortunately not allowed and the design of experiments using human sample are very controlled due to bioethical reason. For this reason it necessary the development of new models to dilucidate the molecules involved in the human sperm-ZP interaction. The expression of recombinant ZP glycoproteins in mammals cells is a good approach because a large amount of the ZP glycoproteins can be obtained. It was previously reported the successful expression of ZP glycoproteins from human and other species. The human ZP recombinant proteins produced showed a biological activity determined by the induction of the acrosome reaction.

2.4.1. Methods.

ZP2 and ZP3 plasmid constructs kindly provided by Dr. Jurrien Dean was introduced in CHO cells. After cell culture in the appropriate condition, the supernatant were collected. We used the supernatant of CHO cell parental as a control. The proteins secreted were separated using a SDS-PAGE gel electrophoresis. ZP glycoproteins were identified using western-blot analysis with a specific antibody against human ZP2 protein backbone kindly provided by Dr. Jurrien Dean, anti-ZPC monkey kindly provided by Dr. Gupta and the anti pig ZP antibody.

The sample with recombinant ZP3 was digested with N-glycosidase F to remove N-linked. The glycoprotein without N-linked oligosaccharides was identified using western-blot analysis with the anti pig ZP antibody.

The acrosoma reaction was assessed by use of fluorescein-conjugated PSA lectin in conjunction with an assessment of viability using the hypoosmotic swelling test. Cell that were viable and exhibited dispersal of the label from the acrosomal region of the cell were classified as acrosoma-reacted. The experiment were done with the supernatant contained ZP3 and ZP2 recombinant, the sample digested with N-glycosidase F and with supernatant control. From positive control calcium ionophore A23187 was used and for the assay of ZP3 recombinant without N-linked, boiled enzyme N-glycosidase F was used.

2.4.2. Results and conclusions.

We obtained affinity for 60 kDa band with the anti-ZPC and anti pig ZP antibodies in the supernatant of transfected cells with ZP3 plasmid. The control supernatant didn't show reactivity for this antibody. With this results we can concluded that the CHO cell were able to express ZP3 recombinant similarly to the native human ZP3. The recombinant protein were highly glycosilated when digested the glycoprotein with N-glycosidase F we obtained affinity for the 38 kDa band with the anti pig ZP antibody. Thus, the N-linked represented the most sugar present in the recombinant ZP3 suggesting a small contribution of O-linked glycosylation to the processing of human ZP3

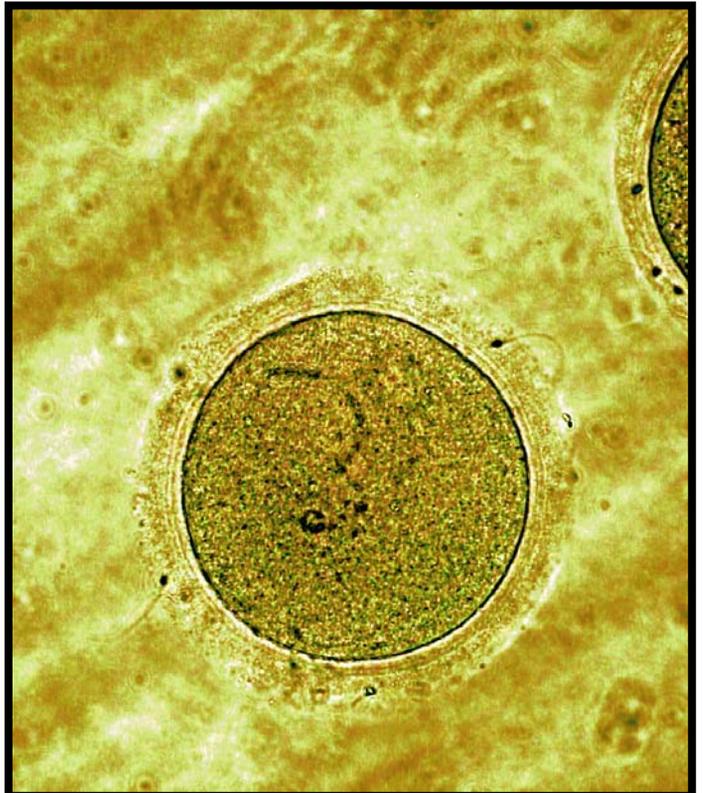
The supernatant contained recombinant ZP2 showed reactivity for two bands with the anti-human ZP2 backbone and anti-pig ZP antibodies. The bans were 90 and 110 kDa. Human ZP2 have a molecular weigh of 110 kDa (Gupta *et al.*, 1998; Baauskin *et al.*, 1999). The control supernatant no showed affinity for this antibody. We suggest that CHO cells were able to express two populations of ZP2 differently glycosilated.

The analysis of the acrosoma reaction rates observed in response to recombinant ZP3 and A23187 revealed that both of these reagents were capable of inducing significant increase in acrosoma reaction rates compared with the control incubations. Thus, recombinant ZP3 induced a significant increase in acrosoma reaction rates after 1 hour to mean value of 72%. In this assay we have demonstrated that human recombinant ZP3 produced in CHO cells is biologically active, as evidence by its capacity to induce the acrosoma reaction. We obtained best rates compared with other groups (van Duin *et al.*, 1994; Brewis *et al.*, 1996). The human recombinant ZP2 no was capable to induce acrosoma reaction should be secondary receptor function.

The recombinant ZP3 without N-linked glycans was able to induced the acrosome reaction and showed the same rates that recombinant ZP3 control. The boiled enzyme no showed activity. These results strongly suggest that N-linked oligosaccharides are not involved in the receptor activity of human ZP3.

The expression and characterization of human ZP2 and ZP3 represents an important intermediate step in generating the tools that are necessary to further the investigation of human reproduction.

X. ANEXOS



Anexo I. Listado de lectinas I.

Nombre taxonómico	Abreviatura	Especificidad de unión	Referencias
<u>Bandeiraea simplicifolia I-B₄</u>	BSA-I-B ₄	α -Gal terminal	Hayes y Goldstein, 1974
<u>Ricinus communis</u>	RCA-I	Gal β 1,4GlcNAc terminal	Baezinger y Fiete, 1979; Green et al., 1987
<u>Datura stramonium</u>	DSA	Cadenas bi-, tri- and tetraantenarias en las cuales al menos un residuo N-acetyltosamine está presente	Yamashita et al., 1987
<u>Arachis hypogaea</u>	PNA	Gal β 1,3GalNAc terminal	Lotan et al., 1975
<u>Galanthus nivalis</u>	GNA	Man α 1,3 terminal en N-oligosacáridos de tipo rico en manosa	Shibuya et al., 1988
<u>Canavalia ensiformis</u>	Con A	Core trimanosil de N-oligosacáridos de tipo rico en manosa o complejos biantenarios	Bhattacharyya et al., 1987; Brewer y Bhattacharyya, 1986; 1988
<u>Artocarpus integrifolia(jacalin)</u>	AIA	GalNAc (Tn antígeno)	Wu et al., 2003
<u>Helix pomatia</u>	HPA	α - y β - GalNAc terminal	Piller et al., 1990; Wu y Sugii, 1991
<u>Dolichos biflorus</u>	DBA	β GalNAc terminal	Piller et al., 1990; Wu y Sugii, 1991
<u>Glycine max</u>	SBA	GalNAc terminal	Piller et al., 1990; Wu y Sugii, 1991
<u>Maclura pomifera</u>	MPA	Gal β 1,3GalNAc, GalNAc (Tn antígeno)	Goldstein y Poretz, 1986
<u>Maackia amurensis</u>	MAA	Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,4 GlcNAc, NeuGc α 2,3	Wang y Cummings, 1988; Knibbs et al., 1991; Brinkman -Van der linden et al., 2002
<u>Sambucus nigra</u>	SNA	Neu5Ac α 2,6 Gal/GalNAc, NeuGc α 2,6	Shibuya et al., 1987; Mandal y Mandal, 1990; Brinkman -Van der linden et al., 2002
<u>Limax flavus</u>	LFA	NeuGC, Neu5Ac	Knibbs et al., 1993
<u>Triticum vulgare</u>	WGA	Glicanos con grupos de ac. siálico y secuencias de polilactosamine	Bhavanandan et al, 1977; Debray et al., 1981; Gallagher et al., 1985
<u>Solanum tuberosus</u>	STA	β -GlcNAc	Allen y Neuberger, 1978; Debray et al., 1981
<u>Tetragonolobus purpureas</u>	LTA	Cadenas tipo 2 que contengan residuos Fuc en el C-2 de Gal en la estructura Gal β 1,4GlcNAc, con o sin Fuc en la GlcNAc	Pereira and Kabat, 1974; Sugii and Kabat, 1982
<u>Ulex europaeus</u>	UEA-I	H type 2 antigen and lewis ^y	Sugii y Kabat, 1982; Baldus et al., 1996
<u>Aleuria aurantia</u>	AAA	N-oligosacáridos de tipo complejo con a α 1,6 Fuc unida al residuo GlcNAc más interno. α 1,2-Fuc terminal.	Osawa y Tsuji, 1987; Yamashita et al., 1985
<u>Phaseolus vulgaris</u>	PHA-E	N-oligosacáridos de tipo complejo que llevan el biséctido GlcNAc unido por enlace β 1-4 a la β -mannose.	Cummings y Kornfeld, 1982; Yamashita et al., 1983; Green y Baezinger, 1987
<u>Phaseolus vulgaris</u>	PHA-L	N-oligosacáridos de tipo complejo que contienen lactosamina unida por enlace β 1,6 a la β -mannose	Cummings y Kornfeld, 1982; Green y Baezinger, 1987

Anexo II. Listado de lectinas II.

Abreviatura	Marcador	Concentración	Fuente
BSA-I-B ₄	DIG	10µg/ml	Sigma
AAA	DIG	5µg/ml	Roche
LTA	DIG	(1:10)	Sigma
UEA-I	HRP	5µg/ml	Sigma
WGA	DIG	5µg/ml	Roche
WGA	HRP	10µg/ml	Sigma
STA	HRP	100µg/ml	Sigma
AIA	HRP	5µg/ml	Sigma
MPA	DIG	(1:5)	Sigma
SNA	DIG	5µg/ml	Roche
DBA	DIG	(1:10)	Sigma
SBA	DIG	(1:40)	Sigma
HPA	HRP	50µg/ml	Sigma
RCA-I	HRP	20µg/ml	Sigma
DSA	DIG	20µg/ml	Roche
PNA	DIG	10µg/ml	Roche
ConA	HRP	10µg/ml	Sigma
GNA	DIG	100µg/ml	Sigma
MAA	DIG	40µg/ml	Roche
LFA	HRP	1µg/ml	Calbiochem
PHA-L	DIG	20µg/ml	Roche
PHA-E	HRP	2.5µg/ml	Sigma

Anexo III. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpos	Especificidad	Fuente
Anti- α -Gal	α -Gal	Dr. Galili
Anti-TEC-02	GalNAc β 1,4Gal β 1,4	Dr. Dráver
Anti-lewis ^a	Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc	Calbiochem
Anti-sialil-lewis ^a	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc	Calbiochem
Anti-lewis ^b	Fuc α 1,2Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc	Gamma Biologicals, Inc.
Anti-lewis ^x	Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc	Dako
Anti-sialil-lewis ^x	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc	Kamiya Company
Anti-ZP3 humana	Péptido de ZP3 humana que comprende los residuos 335-350	Dr. Dean (Rankin et al., 1998)
Anti-ZP2 humana	Peptido de ZP2 humana	Dr. Dean
Anti-ZPC de mono	Péptido de ZPC recombinante de mono que comprende los residuos 324-347	Dr. Gupta
Anti-ZP de cerdo	ZP total de cerdo purificada por solubilización por calor a partir de ovarios de cerdo	Dr. Fayrer-Hosken
Anti-ZPC de cerdo	α ZPC de cerdo	Dr. Hedrick (Berger et al., 1989)
Anti-PDI	Proteína disulfuro isomerasa	Stressgen
Anti-GM130	GM130	BD Biosciences
Anti-ZP1 de ratón	ZP1 de ratón	Dr. Dean (Rankin et al., 1998)
Anti-ZP2 de ratón	ZP2 de ratón	Dr. Dean (East y Dean, 1984)
Anti-ZP3 de ratón	ZP3 de ratón	Dr. Dean (East et al., 1985)

Anexo IV. Anticuerpos secundarios y otros reactivos.

Listado de anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Fuente
Anti-DIG	Monoclonal	2 µg/ml	Roche
Anti-ratón-Oro (15 nm)	Policlonal	(1:20)	Biocell
Anti-HRP	Policlonal	(1:400)	Sigma
Anti-ratón	Policlonal	(1:400)	Dako
Anti-conejo-HRP	Policlonal	(1:20000)	Santa Cruz
Anti-rata-HRP	Policlonal	(1:500)	Sigma
Anti-ratón-HRP	Policlonal	(1:5000)	Chemicon

Otros reactivos.

Reactivo	Dilución	Fuente
Proteína A-Oro (15 nm)	(1:70)	Departamento de Biología Celular, Universidad de Utrecht, Holanda
WGA-HRP (Blot)	50 µg/µl	Sigma
PSA-FICT	50 µg/µl	Sigma

Anexo V. Preparación de geles para electroforesis.

Gel separador	Gel al 10% para 10ml	Gel a 12% para 10ml
Agua destilada	4 ml	3,34 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10% (p/v)	100 μ l	100 μ l
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	3,3 ml	3,96 ml
Persulfato amónico 10%	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Gel concentrador	Gel al 4% para 5ml
Agua destilada	3,05 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10% (p/v)	50 μ l
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	0,65 ml
Persulfato amónico 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

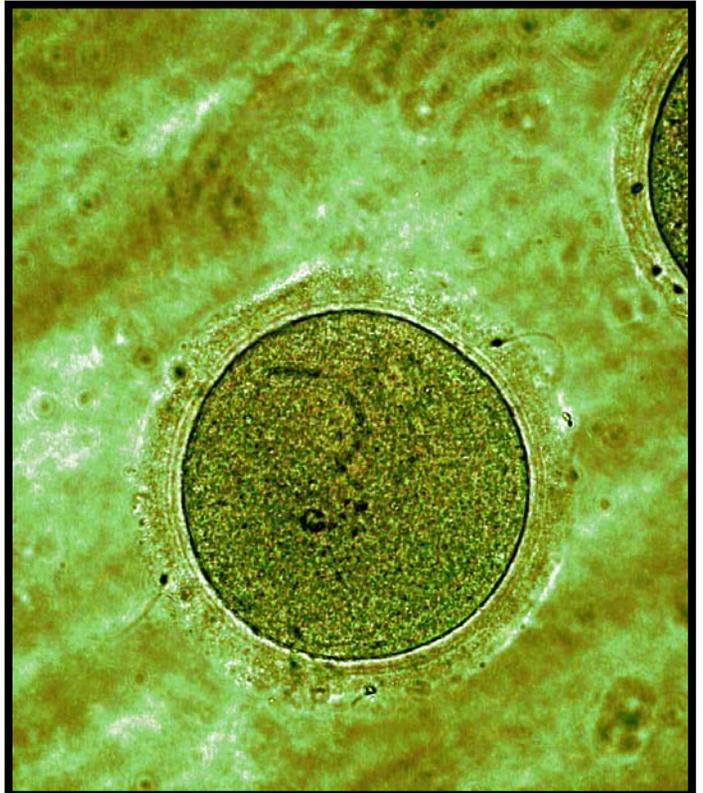
Anexo VI. Composición de los medios utilizados.

Medio de cultivo de células I		
Componentes	Concentración	Fuente
Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM		Gibco
Suero fetal bovino	10%	Gibco
L-glutamina	100 µg/ml	
Penicilina	100 UI/ml	Gibco
Estreptomicina	100 UI/ml	Gibco

Medio de cultivo de células II		
Componentes	Concentración	Fuente
Medio específico de células CHO, CHO PF-AF Attachment Médium		Sigma
L-glutamina	100 µg/ml	
Penicilina	100 UI/ml	Gibco
Estreptomicina	100 UI/ml	Gibco

Medio para la capacitación de espermatozoide humanos	
Componentes	Fuente
Medio de cultivo definido, HAM-F10	Biochrom

XI. BIBLIOGRAFÍA



- Aeed, P.A., D.M. Guido, W.R. Mathews, A.P. Elhammer (1992).** Characterization of the oligosaccharide structures on recombinant human prorenin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem.* 31: 6951-6961.
- Ahuja, K.K. (1982).** Fertilization studies in the hamster. The role of cell-surface carbohydrates. *Exp. Cell. Res.* 140: 353-62.
- Ahuja, K.K., G.P. Bolwell (1983).** Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 69: 49-55.
- Aitken R.J. (1989).** Evaluation of human sperm function. En de Krester D y Burger H (eds.). *The testes 2^a ed.* Raven Press, New York. 441-474.
- Aitken R.J. (1990)** Evaluation of the human sperm function. In: Edwards RG (ed.) *Assisted human conception.* *Brit. Med. Bull.* 46: 654-674.
- Aitken, R.J., D.W. Buckingham, D. Harkiss, M. Paterson, H. Fisher, D.S. Irvine (1996).** The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol. Cell Endocrinol.* 117: 83-93.
- Aitken, R.J. (1997).** Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 169-73.
- Aktas, H., M.L. Leibfried-Rutledge, N. First (2003).** Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 336-343.
- Allen, A.K., A. Neuberger (1978)** Potato lectin. *Methods. Enzymol.* 50: 340-5.
- Amari, S., N. Yonezawa, S. Mitsui, T. Katsumata, S. Hamano, M. Kuwayama, Y. Hashimoto, A. Suzuki, Y. Takeda, M. Nakano (2001).** Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 221-226.
- Andersen, D.C., C.F. Goochee (1994).** The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 546-549.
- Anderson, E., D.F. Albertini (1976).** Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.* 71: 680-686.
- Araki, Y., M.C. Orgebin-Crist, D.R. Tulsiani (1992).** Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol. Reprod.* 46: 912-919.
- Arnoult, C., R.A. Cardullo, J. R. Lemos, H.M. Florman (1996).** Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13004-13009.
- Arnoult, C., I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, H.M. Florman (1999).** Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6757-6762.
- Asch, R., C. Simerly, T. Ord, V.A. Ord, G. Schatten (1995).** The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum. Reprod.* 10: 1897-1906.
- Austin, C.R. (1951).** Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. *Nature.* 168: 558-559.

- Avilés, M., J.A. Martínez-Menárguez, M.T. Castells, J.F. Madrid, J. Ballesta (1994)** Cytochemical characterization of oligosaccharide side chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study. *Anat. Rec.* 239: 137-49.
- Avilés, M., L. Jaber, M.T. Castells, F.K. Kan, J. Ballesta (1996)** Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 370-81.
- Avilés, M., L. Jaber, M.T. Castells, J. Ballesta, F.W. Kan (1997a)**. Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol. Reprod.* 57: 1155-1163.
- Avilés, M., M.T. Castells, J.A. Martínez-Menárguez, I. Abascal, J. Ballesta (1997b)** Localization of penultimate carbohydrate residues in zona pellucida and acrosomes by means of lectin cytochemistry and enzymatic treatments. *Histochem. J.* 29: 583-592.
- Avilés, M., M.T. Castells, I. Abascal, J.A. Martínez-Menárguez, P. Draber, F.W. Kan, J. Ballesta (1999)**. Cytochemical localization of GalNAc and GalNAc β 1,4Gal β 1,4 disaccharide in mouse zona pellucida. *Cell Tissue Res.* 295: 269-277.
- Avilés, M., M. El-Mestrah, L. Jaber, M.T. Castells, J. Ballesta, F.W. Kan (2000a)** Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. *Histochem. Cell. Biol.* 113: 207-19.
- Avilés, M., T. Okinaga, B.D. Shur, J. Ballesta (2000b)**. Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 296-308.
- Baenziger, J.U., Fiete, D. (1979)** Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254: 9795-9.
- Baldus, S.E., J. Thiele, Y.O. Park, F.G. Hanisch, J. Bara, R. Fischer (1996)** Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I). *Glycoconj. J.* 13: 585-90.
- Barnes, F.L., M.A. Sirard (2000)**. Oocyte maturation. *Reprod. Med.* 18: 123-1321.
- Barratt, C.L.R., D.P. Hornby (1995)**. Induction of the acrosome reaction by rhuZP3. In Fe' nichel, P. and Parinaud, J. (eds), *Human Sperm Acrosome Reaction*. Colloque INSERM, no. 236. John Libbey Eurotext, Paris. 105-122.
- Barros, C., R. Yanagimachi (1971)**. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature.* 233: 268-269.
- Bar-Shira Maymon, B., R. Maymon, I. Ben-Nun, Y. Ghetler, R. Shalgi, E. Skutelsky (1994)** Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 102: 81-86.
- Bauskin, A.R., D.R. Franken, U. Eberspaecher, P. Donner (1999)**. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 534-540.
- Beebe, S.J., L. Leyton, D. Burks, M. Ishikawa, T. Fuerst, J. Dean, P. Saling (1992)**. Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 151: 48-54.
- Benoff, S., G.W. Cooper, I. Hurley, B. Napolitano, D.L. Rosenfeld, G.M. Scholl, A. Hershlag (1993a)**. Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil. Steril.* 59: 854-862.
- Benoff, S., I. Hurley, G.W. Cooper, F.S. Mandel, D.L. Rosenfeld, A. Hershlag (1993b)**. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum. Reprod.* 8: 2141-2154.

- Benoff, S., I. Hurley, G.W. Cooper, F.S. Mandel, A. Hershlag, G.M. Scholl, D.L. Rosenfeld. (1993c).** Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum. Reprod.* 8: 2155-2166.
- Benoff, S. (1997a).** Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 599-637.
- Benoff, S., I.R. Hurley, F.S. Mandel, G.W. Cooper, A. Hershlag (1997b).** Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 827-837.
- Benoff, S (1998).** Investigations into the molecular basis of human sperm-egg interactions: what's next? *Mol. Hum. Reprod.* 4: 925-928.
- Bercegeay, S., M. Jean, H. Lucas, P. Barriere (1995).** Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 355-359.
- Berger E.G., Roth J. (1997).** The Golgi apparatus. En Berger EG y Roth J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza.
- Berger, T., A. Davis, N.J. Wardrip, J. L. Hedrick (1989).** Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 86: 559-565.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 11-21.
- Bhattacharyya, L., M. Haraldsson, C.F. Brewer (1987)** Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides. Bivalency of bisected complex type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 262: 1294-1299.
- Bhavanandan, V.P., J. Umemoto, J.R. Banks, E.A. Davidson (1977)** Isolation and partial characterization of sialoglycopeptides produced by a murine melanoma. *Biochem.* 16: 4426-4437.
- Blackmore, P.F., J. Neulen, F. Lattanzio, S.J. Beebe (1991).** Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266: 18655-18659.
- Bleil, J.D., P.M. Wassarman (1980a).** Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell.* 20: 873-882.
- Bleil, J.D., P.M. Wassarman (1980b).** Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76: 185-202.
- Bleil, J.D., C.F. Beall, P.M. Wassarman (1981).** Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP-2. *Dev. Biol.* 86: 189-197.
- Bleil, J.D., J.M. Greve, P.M. Wassarman (1988).** Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128: 376-385.
- Bleil, J.D., P.M. Wassarman (1988).** Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6778-6782.
- Bleil, J.D., P.M. Wassarman (1990).** Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5563-5567.

- Bockbinder, L.H., A. Cheng, J.D. Bleil (1995).** Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science*. 269: 86-89.
- Bogner, K., K.D. Hinsch, P. Nayudu, L. Konrad, C. Cassara, E. Hinsch (2004).** Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 481-488.
- Boja, E. S., T. Hoodbhoy, H.M. Fales, J. Dean (2003).** Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 278: 34189-34202.
- Bork, P.C, Sander (1992).** A large domain common to sperm receptors (ZP2 and ZP3) and TGF- β type III receptor. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 300: 237-240.
- Boué F., J. Blais, R. Sullivan (1996).** Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54: 1009-1017.
- Bousquet, D., M.C. Leveille, K.D. Roberts, A. Chapdelaine, G. Bleau (1981).** The cellular origin of the zona pellucida antigen in the human and hamster. *J. Exp. Zool.* 215: 215-218.
- Braden, A.W.H., C.R. Austin, H.A. David (1954).** The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *J. Exp. Zool.* 180: 251-266.
- Brandelli, A., P.V. Miranda, J.G. Tezon (1994).** Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1220: 299-304.
- Brandelli, A. (1997).** Modulation of sperm acrosomal exocytosis by guanyl nucleotides and G-protein-modifier agents. *Biochem. Mol. Biol.* 41: 1217-1225.
- Brannian, J.D., K.A. Hansen (2002).** Leptin and ovarian folliculogenesis: Implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin. Reprod. Med.* 20: 103-112.
- Breitbart, H., B. Spungin (1997).** The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 195-202.
- Breitbart, H. (2002).** Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187: 139-144.
- Breitbart, H. (2003).** Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell. Mol. Biol.* 49: 321-327.
- Brewer, C.F., L. Bhattacharyya (1986)** Specificity of Concanavalin A binding to asparagine-linked glycopeptides. A nuclear magnetic relaxation dispersion study. *J. Biol. Chem.* 261: 7306-7310.
- Brewer, C.F., L. Bhattacharyya (1988)** Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides. The mechanisms of binding of oligomannose, bisected hybrid and complex type carbohydrates. *Glycoconjugate J.* 5: 159-173.
- Brewis, I.A., R. Clayton, C.I.R. Barratt (1996).** Characterisation of the calcium influx and the acrosome reaction in human spermatozoa in response to recombinant ZP3. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 583-589.
- Brewis, I.A., R. Clayton, C.E. Browes, M. Martin, C.L. Barratt, D.P. Hornby, H.D. Moore (1998).** Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 1136-1144.

- Brewis, I.A., C.H. Wong (1999).** Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev. Reprod.* 4: 135-142.
- Brinkman-Van der Linden, E.C., J.L. Sonnenburg, A. Varki (2002)** Effects of sialic acid substitutions on recognition by *Sambucus nigra* agglutinin and *Maackia amurensis* hemagglutinin. *Anal. Biochem.* 303 :98-104.
- Buhi. W.C. (2002)** Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reprod.* 123: 355-362.
- Burkman, L.J., C.C. Coddington, D.R. Franken, T.F. Kruger, Z. Rosenwaks, G.D. Hodgen (1988).** The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 49: 688-697.
- Burks, D.J., R. Carballada, H.D.M. Moore, P.M. Saling (1995).** Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science.* 269: 83-86.
- Byers, A.P., M.A. Baraone, A.M. Donoghue, D.E. Wildt (1992).** Mature domestic cat oocyte does not express a cortical granule-free domain. *Biol. Reprod.* 47: 709-715.
- Chen, C., A.H. Sathananthan. (1986)** Early penetration of human sperm through the vestments of human eggs in vitro. *Arch. Androl.* 16: 183-197.
- Cahova, M., P. Draber (1992).** Inhibition of fertilization by a monoclonal antibody recognizing the oligosaccharide sequence GalNAc beta 1----4Gal beta 1----4 on the mouse zona pellucida. *J. Reprod. Immunol.* 21: 241-256.
- Calogero, A.E., N. Burrello, E. Ferrara, J. Hall, S. Fishel, R. D'Agata (1999).** Gamma-aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil. Steril.* 71: 930-936.
- Campbell, C., P. Stanley (1983).** Regulatory mutations in CHO cells induce expression of the mouse embryonic antigen SSEA-1. *Cell.* 35: 303-309.
- Canipari, R. (1994).** Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote.* 2: 343-345.
- Cao, Y., U.R. Karsten, W. Liebrich, W. Haensch, G.F. Springer, P.M. Schlag (1995).** Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation. *Cancer.* 15: 1700-8.
- Caputo, M., V. Infante, R. Talevi, M.C. Vaccaro, R. Carotenuto, C. Campanella (2001).** Following passage through the oviduct, the coelomic envelope of *Discoglossus pictus* (amphibia) acquires fertilizability upon reorganization, conversion of gp 42 to gp 40, extensive glycosylation, and formation of a specific layer. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 318-329.
- Carabatsos, M.J., J. Elvin, M.M. Matzuk, D.F. Albertini (1998).** Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor 9 deficient mice. *Dev. Biol.* 204: 373-384.
- Carlemalm E., M. Garavito, W. Villiger (1982).** Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Microsc.* 126: 123-143.
- Carrell, D.T., R.G. Middleton, C.M. Peterson, K.P. Jones, R.L. Urry (1993).** Role of the cumulus in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. *Arch. Androl.* 31: 133-137.
- Castells, M.T., J. Ballesta, J.F. Madrid, J.A. Martinez-Menarguez, M. Aviles (1992).** Ultrastructural localization of glycoconjugates in human bronchial glands: the subcellular organization of N- and O-linked oligosaccharide chains. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 265-274.

- Chakravarty, S., K. Suraj, S.K. Gupta (2005).** Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C.
- Chamberlin, M.E., J. Dean (1990).** Human homolog of the mouse sperm receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6014-6018.
- Chapman, N.R., C.L.R. Barratt (1996).** The role of carbohydrates in spermatozoa-zona pellucida adhesion. Mol. Hum. Reprod. 2: 767-774.
- Chapman, N.R., C.L. Barratt (1997).** Sperm-zona interaction and recombinant DNA technology. Mol. Hum. Reprod. 3: 646-650.
- Chapman, N.R., E. Kessopoulo, P.D. Andrews, D.P. Hornby, C.L.R. Barratt (1998).** The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa *in vitro*. Biochem. J. 330: 839-845.
- Chen, C., A.H. Sathananthan (1986).** Early penetration of human sperm through the vestments of human eggs *in vitro*. Arch. Androl 16: 183-197.
- Chen, J., E.S. Litscher, P.M. Wassarman (1998).** Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6193-6197.
- Cherr, G. N., E.Z. Drobnis, D.F. Katz (1988).** Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. J. Exp. Zool. 246: 81-93.
- Chou, D.K., F.B. Jungalwala (2001).** Regulation of sulfoglucuronyl glycolipid synthesis in the developing rat sciatic nerve. Neurochem. Res. 26: 1231-1235.
- Ciapa, B., D. Pesando, M. Wilding, M. Whitaker (1994).** Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels. Nature. 368: 875-878.
- Colman, A., E.A. Jones, J. Heasman (1985).** Meiotic maturation in *Xenopus* oocytes: a link between the cessation of protein secretion and the polarized disappearance of Golgi apparatus. J. Cell. Biol. 101: 313-318.
- Conner, S.J. L. Lefievre, D.C. Hughes, C.L. Barratt (2005).** Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. Hum.Reprod. 20: 1148-1152.
- Conradt, H.S., H. Egge, J. Peter-Katalinic, W. Reiser, T. Siklos, K. Schaper (1987).** Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line J. Biol. Chem. 262: 14600-14605.
- Cornwall, G.A., D.R. Tulsiani, M.C. Orgebin-Crist (1991).** Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding *in vitro*. Biol. Reprod. 44: 913-921.
- Cran, D.G. (1989).** Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. J. Reprod. Fert. Suppl. 38: 49-62.
- Cran, D.G., C. R. Esper (1990).** Cortical granules and the cortical reaction in mammals. J. Reprod. Fert.. Suppl. 42: 177-188.
- Cregg, J.M., T.S. Vedvick, W.C. Raschke (1993).** Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology. 11: 905-910.
- Cross, N.L., P. Morales, J.W. Overstreet, F.W. Hanson (1988).** Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. Biol.Reprod. 38: 235-244, 1988.
- Cross, N.L., S. Meizel (1989).** Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod. 41: 635-641.

- Cross, N.L. S. Moore (1990).** Regional binding of human anti-sperm antibodies assessed by indirect immunofluorescence. *Hum.Reprod.* 5: 47-51.
- Cross, N. L. (1998).** Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7-11.
- Cummings, R.D., S. Kornfeld (1982)** Characterisation of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilised *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* 257: 11230-11234.
- Cummings, R.D., S. Kornfeld (1984)** The distribution of repeating Gal β 1-4GlcNAc β 1,3 sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. *J. Biol. Chem.* 259: 6253-60.
- Cummins, J.M., S.M. Pember, A.M. Jequier, J.L. Yovich, P.E. Hartmann (1991).** A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J. Androl.* 12: 98-103.
- Darszon, A., P. Labarca, T. Nishigaki, F. Espinosa (1999).** Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev.* 79: 481-510.
- Datti, A., J.W. Dennis (1993).** Regulation of UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GalNAc-R beta 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase (GlcNAc to GalNAc) in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268: 5409-5416.
- De Jonge, C. (1996).** The cAMP-dependent kinase pathway and human sperm acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.* 1: d234-d240.
- De los Reyes M., C. Barros (2000).** Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Ani. Reprod. Sci.* 58: 215-228.
- Dean, J. (2002).** Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J. Reprod. Immunol.* 53: 171-180.
- Dean, J. (2004).** Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays.* 26: 29-38.
- Debray, H., D. Decout, G. Strecker, G. Spik, J. Montreuil (1981)** Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 1117: 41-55.
- Dell, A., H.R. Morris, R.L. Easton, M. Patankar, G.F. Clark (1999).** The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1473: 196-205.
- Dell, A., S. Chalabi, R.L. Easton, S.M. Haslam, M. Sutton-Smith, M.S. Patankar, F. Lattanzio, M. Panico, H.R. Morris, G.F. Clark (2003).** Murine and human zona pellucida 3 derived from mouse eggs express identical O-glycans. *PNAS. Dev. Biol.* 100: 15631-15636.
- Denker, H.W. (2000).** Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells. Tiss. Org.* 166: 180-207.
- Dennis, J.W., M. Granovsky, C.E. Warren (1999).** Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays.* 21: 412-421.
- Donaldson, J.G., J. Lippincott-Schwartz (2000).** Sorting and signaling at the Golgi complex. *Cell.* 101: 693-696.
- Dong, K.W., T.F. Chi, Y.W. Juan, C.W. Chen, Z. Lin, X.Q. Xiang, M. Mahony, W.E. Gibbons, S. Oehninger (2001).** Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184: 835-843.

- Drenckhahn, D., R. Dermietzel (1988).** Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J. Cell Biol.* 107: 1037-1048.
- Ducibella, T., E. Anderson, D.F. Albertini, J. Aalberg, S. Rangarajan (1988).** Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 130: 184-197.
- Ducibella, T., S. Kurasawa, Srangarajan, G.S. Kopf, R.M. Schultz (1990).** Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg induced modification of the zona pellucida. *Dev. Biol.* 137: 46-55.
- Dunbar, B.S., D.J. Wolgemuth (1984).** Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. En *Modern Cell Biology, Volumen 3.* B.H. Satir (ed.) New York: Alan R. Liss, Inc. 77-111.
- Dunbar, B.S., G.A. Maresh, K. Washenik (1989).** Ovarian development and formation of the mammalian zona pellucida. En *The mammalian egg coat: Structure and Function.* J.J. Dietl (ed). Berlin, Spinger, pp 38-48.
- Dunbar, B. S., S.V. Prasad, T.M. Timmons (1991).** Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. En *A comparative overview of mammalian fertilization.* Bonnie S. Dunbar and Michael G. O'Rand (eds.). Plenum Press, New York.
- Dunbar, B. S., S. Avery, V. Lee, S. Prasad, D. Schwahn, E. Schwoebel, S. Skinner, B. Wilkins (1994).** The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod. Fert. Dev.* 6: 331-347.
- Dvorak, M. (1989).** Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 296: 273-280.
- Dvorak, M., K. Gregorcikova, M. Sedlackova (1990).** The occurrence of the Golgi apparatus in mouse oocytes. Demonstration of thiamine pyrophosphatase activity. *Z.Mikrosk. Anat. Forsch.* 104: 975-981.
- East, I.J., J. Dean (1984).** Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. *J. Cell Biol.* 98: 795-800.
- Easton, R.L., M.S. Patankar, F.A. Lattanzia, T.H. Leaven, H.R. Morris, G.F. Clark, A. Dell (2000).** Structural analysis of murine zona pellucida glycans. Evidence for the expression of core 2-type *O*-glycans and the Sd^a antigen. *J. Biol. Chem.* 275: 7731-7742.
- Eberspaecher, U., A. Becker, P. Bringmann, Merwe L. van der, P. Donner (2001).** Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res.* 303: 277-287.
- El Mestrah, M., F.W. Kan (2001).** Distribution of lectin-binding glycosidic residues in the hamster follicular oocytes and their modifications in the zona pellucida after ovulation. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 517-534.
- El Mestrah, M., P.E. Castle, G. Borossa, F.W. Kan (2002).** Subcellular distribution of ZP1, ZP2, and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol. Reprod.* 66: 866-876.
- Ensslin, M., T. Vogel, J.J. Calvete, H.H. Thole, J. Schmidtke, T. Matsuda, E. Topfer-Petersen (1998).** Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol.Reprod.* 58: 1057-1064.
- Ensslin, M.A., B.D. Shur (2003).** Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell.* 114: 405-417.

- Epifano, O., J. Dean (1994).** Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 319-330.
- Epifano, O., L.F. Liang, M. Familiari, M.C Moos Jr, J. Dean (1995).** Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development.* 121: 1947-1956.
- Eppig, J.J. (1977).** Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev. Biol.* 60: 371-388.
- Eppig J.J. (1993).** Regulation of mammalian oocyte maturation. En: Adashi EY, Leung PCK (eds.). *The Ovary.* New York. Raven Press. 185-208.
- Eppig, J.J., K. Wigglesworth, F. Chesnel (1993)** Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis. *Dev. Biol.* 158: 400-409.
- Eppig, J.J. (2001).** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122: 829-838.
- Erickson, G.F., S. Shimasaki (2000).** The role of oocyte in folliculogenesis. *Endocrinol. Met.* 11: 193-198.
- Espey, L.L., H. Lipner (1994).** En *The physiology of Reproduction.* Knobil, E. y Neill, K.D. (eds.). Raven, New York. 725-780.
- Evans, J.P., H.M. Florman (2002).** The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat. Cell Biol.* 4: 57-63.
- Familiari, G., S.A. Nottola, G. Macchiarelli, G. Micara, C. Aragona, P.M. Motta (1992).** Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 51-61.
- Fanchin, R. (2002).** Revisiting the role of LH in follicular development. *Gynecol. Obstet. Fert.* 30: 753-764.
- Fazeli, A., W.J. Hage, F.P. Cheng, W.F. Voorhout, A. Marks, M.M. Bevers (1997).** Colenbrander B. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.* 56: 430-8.
- Featherstone, C., G. Griffiths, G. Warren (1985).** Newly synthesized G protein of vesicular stomatitis virus is not transported to the Golgi complex in mitotic cells. *J. Cell Biol.* 101: 2036-2046.
- Ferrari, D.M., H.D. Söling (1999).** The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339: 1-10.
- Filicori, M. (1999).** The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fert. Steril.* 71: 405-414.
- Fissore, R.A., C.L. He, G.F. Vande Woude (1996).** Potential role of mitogen activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 55: 1261-1270.
- FitzHarris, G., P. Marangos, J. Carroll (2003).** Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in mouse oocytes and embryos. *Mol. Biol. Cell* 14: 288-301.
- Florman, H.M., B.T. Storey (1982).** Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.* 91: 121-130.
- Florman, H.M., P.M. Wassarman (1985).** O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell.* 41: 313-324.

- Florman, H.M. (1994).** Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 165: 152-164.
- Florman, H.M., C. Arnoult, I.G. Kazam, C. Li, C.M. O'Toole (1998).** A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59: 12-16.
- Focarelli, R., A. Capone, L. Ermini, F. Del buono, G.B. La Sala, M. Balasini, F. Rosati (2003).** Immunoglobulins against gp273, the ligand for sperm-egg interaction in the mollusc bivalve *Unio elongatulus*, are directed against charged O-linked oligosaccharide chains bearing a Lewis-like structure and interact with epitopes of the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 226-234.
- Foresta, C., M. Rossato, F. Di Virgilio (1993).** Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem. J.* 294: 279-283.
- Forno, G., Fogolin M. Bollati, M. Oggero, R. Kratje, M. Etcheverrigaray, H.S. Conratt, M. Nimtz (2004).** N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *Eur. J. Biochem.* 271: 907-919.
- Franken, D.R., T.F. Kruger, R. Menkveld, S. Oehninger, C.C. Coddington, G.D. Hodgen (1990).** Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. *Fertil. Steril.* 54: 497-503.
- Franken, D.R., P.J. Morales, U.F. Habenicht (1996).** Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. *Fertil. Steril.* 66: 1009-1011.
- Fraser, L.R. (1998).** Sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 13: 9-12.
- Gahlay G.K., N. Srivastava, C.K. Govind, S.K. Gupta (2002).** Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 53: 67-77.
- Galili, U., K. Swanson (1991).** Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7401-7404.
- Gallagher, J.T., A. Morris, T.M. Dexter (1985)** Identification of two binding sites for *wheat-germ* agglutinin on poly-lactosamine-type oligosaccharides. *Biochem. J.* 231: 115-122.
- Ghetler, Y., T. Raz, I. Ben Nun, R. Shalgi (1998).** Cortical granules reaction after intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 289-294.
- Goluboff, E.T., J.R. Mertz, L.L. Tres A.L. Kierszenbaum (1995)** Galactosyl receptor in human testis and sperm is antigenically related to the minor C-type (Ca²⁺)-dependent lectin variant of human and rat liver. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 460-6.
- Gougeon, A. (1981).** Frequent occurrence of multiovular follicles and multinuclear oocytes in the adult human ovary. *Fertil. Steril.* 35: 417-422.
- Govind, C.K., S.K. Gupta (2000).** Failure of female baboons (*Papio anubis*) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zona pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine.* 18: 2970-2978.
- Green, D.P.L. (1997)** Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev. Reprod.* 2: 147-156.
- Green, E.D., J.U. Baenziger (1987)** Oligosaccharide specificities of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins. Interactions with N-glycanase-released oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 262: 12018-29.

- Gross, V.S., G. Wessel, H.M. Florman, T. Ducibella (2000).** A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32 Kilodalton protein in mouse eggs. *Biol. Reprod.* 63: 575-581.
- Gulyas, B.J. (1979).** Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.* 63: 357-398.
- Gulyas, B.J., E.D. Schmell (1980).** Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. I. Electron micorscopic localization. *Gamete Res.* 3: 267-278.
- Gupta SK, K. Chadha, J.D. Harris, E.C. Yurewicz, A.G. Sacco, S.K. Kolluri, A. Afzalpurka (1996).** Mapping of epitopes on porcine zona pellucida-3 alpha by monoclonal antibodies inhibiting oocyte-sperm interaction. *Biol. Reprod.* Aug. 55: 410-5.
- Gupta, S.K., E.C. Yurewicz, A.G. Sacco, R. Kaul, P. Jethanandani, C.K. Govind (1998).** Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 1058-1064.
- Guraya, S.S. (1962).** Histochemistry of the so-called 'Golgi complex' in the mammalian spermatid. *Experientia.* 18: 167-168.
- Guraya, S.S. (1982).** Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *Int. Rev. Cytol.* 78: 257-360.
- Guraya, S.S. (1985).** *Biology of ovarian follicles in mammals.* Springer Verlag, Berlin, Alemania. 27-34.
- Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams, J.F. Hartmann, M. Kniazuk (1973).** The zona reaction of hamster and mouse eggs: production *in vitro* by a trypsin-like protease from cortical granules. *J. Reprod. Fert.* 32: 259-265.
- Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams (1974).** Heat sensitivity of the cortical granule protease from hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 39: 153-155.
- Thole, H.H., J. Schmidtke, T. Matsuda, E. Töpfer-Petersen (1998).** Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol. Reprod.* 58: 1057-1064.
- Hafez, E.S., L. Goff, B. Hafez (2004).** Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. *Arch. Androl* 50: 69-88.
- Hafez, E.S.E., B. Hafez (2002).** Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En Hafez E.S.E., B. Hafez (eds.). *Reproducción e inseminación artificial en animales.* 7ª ed. México: Interamericana-Mc Graw-Hill. 70-83.
- Hardy, D.M., D.L. Garbers (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: 26025-26028.
- Harris, R.J., M.W. Spellman (1993).** O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology.* 3: 219-224.
- Harris, J.D., D.W. Hibler, G.K. Fontenot, K.T. Hsu, E.C. Yurewicz, A.G. Sacco AG (1994).** Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA. Seq.* 4: 361-93.
- Harris, J.D., C.A. Seid, A.S. Fontenot, H.F. Liu (1999).** Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expression and Purification.* 16: 298-307.
- Hart, G.W. (1997).** Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 315-335.

- Haslam, S.M., H.R. Morris, A. Dell (2001).** Mass spectrometric strategies: providing structural clues for helminth glycoproteins. *Trends Parasitol.* 17: 231-235.
- Hayes, C.E., I.J. Goldstein (1974)** An α -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.* 249: 1904-1914
- Hedrick, J.L., N.J. Wardrip (1986).** Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal. Biochem.* 157: 63-70.
- Hedrick, J.L., N.J. Wardrip (1987).** On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev. Biol.* 121: 478-488.
- Henkel, R., D.R. Franken, U.F. Habenicht (1998).** Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrologia.* 30: 275-280.
- Herrler, A., H.M. Beier (2000).** Early embryonic coats: Morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs.* 166: 233-246.
- Hess, R.A., L. Chen., W.J. Larsen (1999).** Inter- α -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 62: 436-443.
- Hinduja, I.N., A. Kumar, T.C. A. Kumar (1990).** Ultrastructure of the cortex in the human egg. *Hum. Reprod.* 5: 66-70.
- Hinsch, K.D., E. Hinsch, B. Meinecke, E. Topfer-Petersen, S. Pfisterer, W.B. Schill (1994).** Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. *Biol. Reprod.* 51: 193-204.
- Hinsch, E., V.A. Aires, F. Hedrich, S. Oehninger, K.D. Hinsch (2005).** A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 63: 1683-1694.
- Hirshfield A.N. (1994)** Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol. Reprod.* 50: 421-8.
- Hokke, C.H., A.A. Bergwerff, G.W. Van Dedem, J.P. Kamerling, J.F. Vliegenthart (1995).** Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetyllactosamine units. *Eur. J. Biochem.* 228: 981-1008.
- Hoodbhoy, T., P. Talbot (1994).** Mammalian cortical granules: contents, fate and function. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 439-448.
- Hoodbhoy, T., E.J.Jr. Carroll, P. Talbot (2000).** Relationship between p62 and p56, two proteins of the mammalian cortical granule envelope, and hyalin, the major component of the echinoderm hyaline layer, in hamsters. *Biol. Reprod.* 62: 979-87.
- Hoodbhoy, T., P Dandekar, P Calarco, P Talbot. (2001).** p62/p56 are cortical granule proteins that contribute to formation of the cortical granule envelope and play a role in mammalian preimplantation development. *Mol. Reprod. and Dev.* 59: 78-89.
- Hoodbhoy, T., P. Talbot (2001).** Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 223-135.
- Hoodbhoy, T., J Dean (2004).** Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reprod. Fert.* 127: 417-422.
- Hoodbhoy, T., S. Joshi, E.S. Boja, S.A. Williams, P. Stanley, J. Dean (2005).** Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 280: 12721-12731.

- Hooper, N.M., E.H. Karran, A.J. Turner (1997).** Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321: 265-279.
- Hoshi, K., T. Sugano, C. Endo, N. Yoshimatsu, K. Yanagida, A. Sato (1993).** Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 60: 149-153.
- Hounsell, E.F., M.J. Davies, D.V. Renouf (1996).** O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.* 13: 19-26.
- Hubbard S.C. (1988).** Regulation of glycosylation. The influence of protein structure on N-linked oligosaccharide processing. *J. Biol. Chem.* 263: 19303-19317.
- Hughes, D.C., C.L. Barratt (1999).** Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim. Biophys. Acta.* 1447: 303-306.
- Hunnicuttt, G.R., P. Primakoff, D.G. Myles (1996).** Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol. Reprod.* 55: 80-86.
- Inoue, N., M. Takeuchi, K. Asano, R. Shimizu, S. Takasaki, A. Kobata (1993).** Structures of mucin-type sugar chains on human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 375-378.
- Irie, A., S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, A. Suzuki (1998)** The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J. Biol. Chem.* 273: 15866-71.
- Ishidoh, K., E. Kominami. (1998).** Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. *Biol. Chem.* 379: 131-135.
- Jansen, S., M. Quigley, W. Reik, R. Jones (1995).** Analysis of polysulfate binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 501-510.
- Jansen, S., M. Ekhlesi-Hundrieser, E. Topfer-Petersen (2001).** Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs.* 168: 82-92.
- Jewgenow, K., J. Fickel (1999).** Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol. Reprod.* 60: 522-526.
- Jeyendran, R.S., H.H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B.G. Crabo, L.J. Zaneveld (1984).** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.
- Johnston, D.S., W.W. Wright, J.H. Shaper, C.H. Hokke, D.H. Van den Eijnden, D.H. Joziase (1998).** Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. *J. Biol. Chem.* 273: 1888-1895.
- Jovine, L., H. Qi, Z. Williams, E. Litscher, P.M. Wassarman (2002).** The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol.* 4: 457-461.
- Kan, F.W. (1990).** High-resolution localization of hyaluronic acid in the golden hamster oocyte-cumulus complex by use of a hyaluronidase-gold complex. *Anat. Rec.* 228: 370-382.
- Kang, Y.H. (1974).** Development of the zona pellucida in the rat oocyte. *Am. J. Anat.* 139: 535-565.
- Kang, Y.H., W.A. Anderson (1975).** Ultrastructure of the oocytes of the Egyptian sping

mouse (*Acomys cahirinus*). *Anat. Rec.* 182: 175-200.

Katsumata, T., S. Noguchi, N. Yonezawa, M. Tanokura, M. Nakano (1996). Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Eur. J. Biochem.* 240: 448-53.

Kaul, R., A. Afzalpurkar, S.K. Gupta (1997). Expression of bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida-3 (ZP3) in a prokaryotic system and its immunogenicity. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 140-147.

Keefe, R.G., D.A. Ferrick, J.L. Scott (1997). Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59: 271-283.

Kerr, C.L., W.F. Hanna, J.H. Shaper, W.W. Wright (2004). Lewis X-contain in Glycans are specific and potent competitive inhibitors of the binding of ZP3 to complementary sites on capacitated, acrosome-intact mouse sperm. *Biol. Reprod.* 1: 770-777.

Kiefer, S.M., P. Saling (2002) Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol. Reprod.* 66: 407-14.

Kim, Y.S., J.R. Gum (1996) Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate.* 13: 693-707.

Kimura, J., K. Sato, M. Okano, A. Tsukise (1994). Localization of ZP3 mRNA in mouse ovary by non-radioactive in situ hybridization with digoxigenin-labelled cDNA. *Cell. Mol. Biol.* 40: 1097-1101.

Kingsley, D. M., K. F. Kozarsky, R. D. Sege, M. Segal, M. Krieger (1986). Three types of LDL receptor-deficient mutant have pleiotropic defects in the synthesis of N-linked, O-linked and lipid-linked carbohydrate chains. *J. Cell Biol.* 102: 1576-1585.

Kinloch, R.A., B. Ruiz-Seiler, P.M. Wassarman (1990). Genomic organization and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor. *Dev. Biol.* 142: 414-421.

Kinloch, R.A., S.A. Mortillo, C.L. Stewart, et al. (1991). Embryonal carcinoma cells transfected with ZP3 genes differentially glycosylate similar polypeptides and secrete active mouse sperm receptor. *J. Cell. Biol.* 115: 655-664.

Kinloch, R.A., Y. Sakai, P.M. Wassarman, (1995). Mapping the mouse ZP3 combining sites for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 263-267.

Kirkman-Brown, J.C., C. Bray, P.M. Stewart, C.L. Barratt, S.J. Publicover (2000). Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev. Biol.* 222: 326-335.

Kirkman-Brown, J.C., L. Lefievre, C. Bray, P.M. Stewart, C.L. Barratt, S.J. Publicover (2002). Inhibitors of receptor tyrosine kinases do not suppress progesterone-induced $[Ca^{2+}]_i$ signalling in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 326-332.

Kline, D. (2000). Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr. Top. Dev. Biol.* 50: 125-154.

Knibbs, R.N., I.J. Goldstein, R.M. Ratcliffe, N. Shibuya (1991) Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J. Biol. Chem.* 266: 83-8.

Knibbs, R.N., Osborne, S.E., Glick, G.D. and Goldstein, I.J. (1993) Binding determinants of the sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J. Biol. Chem.* 268: 18524-31.

- Knight, P.G., C. Glister (2003).** Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reprod. Sci.* 78: 165-183.
- Kobata, A. (1992).** Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* 209: 483-501.
- Kohn, F.M., S.R. Mack, W.B. Schill, L.J. Zaneveld (1997).** Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum. Reprod.* 12: 714-721.
- Kolle, S., F. Sinowatz, G. Boie, I. Totzauer, W. Amselgruber, J. Plendl (1996).** Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem. J.* 28: 441-447.
- Kölle, S., F. Sinowatz, G. Boie, G. Palma (1998).** Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 435-443.
- Kopf, G.S. (1990).** Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 42: 33-49.
- Kornfeld, R., S. Kornfeld (1985).** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-664.
- Krausz, C., G. Gervasi, G. Forti, E. Baldi (1994).** Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 9: 471-476.
- Kudo, K., N. Yonezawa, T. Katsumata, H. Aoki, M. Nakano (1998).** Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 252: 492-499.
- Kukowska-Latallo, J.F., R.D. Larsen, R.P. Nair, J.B. Lowe (1990).** A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Genes Dev.* 4: 1288-1303.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lax, Y., S. Rubinstein, H. Breitbart (1994).** Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett.* 339: 234-238.
- Lazzari, G., C. Galli, R.M. Moor (1994).** Functional-changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 35: 119-130.
- Lee, M.A., G.S. Trucco, K.B. Bechtol, N. Wummer, G.S. Kopf, L. Blasco, B.T. Storey (1987).** Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 48: 649-658.
- Lee, M.A., J.H. Check, G.S. Kopf (1992).** A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 78-86.
- Lee, T.C., M.L. Wei, W.J. Chang, I.C. Ho, J.F. Lo, K.Y. Jan, H. Huang (1989).** Elevation of glutathione levels and glutathione S-transferase activity in arsenic-resistant Chinese hamster ovary cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25: 442-448.
- Lee, V H., B.S. Dunbar (1993).** Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev. Biol.* 155: 371-382.
- Lee, S.H., K.K. Ahuja, D.J. Gilbert, D.G. Wittingham (1988).** The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. *Development.* 102: 595-604.

- Lefièvre, L., C.L.R. Barratt, C.V. Harper, S.J. Conner, F.M. Flesch, E. Deeks, F.L.C Moseley, K.L. Pixton, I.A. Brewis, S.J. Publicover (2003). Physiological and proteomic approaches to studying prefertilization events in the human. *Reprod. Biomed.* 7: 12-20.
- Lefièvre, L., S.J. Conner, A. Salpekar, O. Olufowobi, P. Ashton, B. Pavlovic, W. Lenton, M. Afnan, I.A. Brewis, M.Monk, D.C. Hughes, C.L.R. Barratt (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 19: 1580-1586.
- Lemp, D., A. Haselbeck, F. Klebl (1990). Molecular cloning and heterologous expression of N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* 265: 15606-15610.
- Leyton, L., P.M. Saling (1989a). 95kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell.* 57:1123-1130.
- Leyton, L., P.M. Saling (1989b). Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 108: 2163-2168.
- Li, E., S. Kornfeld (1979). Structural studies of the major high mannose oligosaccharide units from Chinese hamster ovary cell glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 254: 1600-1605.
- Li, E., R. Gibson, S. Kornfeld (1980). Structure of an unusual complex-type oligosaccharide isolated from Chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 393-399.
- Liang, L.F., S.M. Chamow, J. Dean (1990). Oocyte-specific expression of mouse Zp-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol. Cell Biol.* 10: 1507-1515.
- Liang, L.F., J. Dean (1993). Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 156: 399-408.
- Liang, L., S.M. Soyal, J. Dean (1997). FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development.* 124: 4939-4947.
- Lin R.C., R.H. Scheller (2000). Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 19-49.
- Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, R. Peach (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity.* 1: 793-801.
- Litscher, E.S., P.M. Wassarman (1996). Characterization of a mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity *in vitro*. *Biochem.*, 35: 3980-3985.
- Litscher, E.S., H. Qi, P.M. Wassarman (1999). Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochem.* 38: 12280-12287.
- Liu, C., E.S. Litscher, P.M. Wassarman (1997). Zona pellucida glycoprotein mZP3 bioactivity is not dependent on the extent of glycosylation of its polypeptide or on sulfation and sialylation of its oligosaccharides. *J. Cell Sci.* 110: 745-752.
- Liu, D.Y., H.W. Baker (1996). Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil. Steril.* 66: 312-315.
- Liu, D.Y., H.W. Baker, M.J. Pearse, A.J. d`Apice (1997) Normal sperm zona pellucida interaction and fertilization *in vitro* in alpha-1,3-galactosyltransferase gene knockout mice. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 1015-1016.

- Liu, M., D. Sims, P. Calarco, P. Talbot (2003)**. Biochemical heterogeneity, migration, and pre-fertilization release of mouse oocyte cortical granules. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 77-85.
- Llanos, M.N., A.M. Ronco, M.C. Aguirre, S. Meizel (2001)**. Hamster sperm glycine receptor: evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 205-215.
- Longo, F.J. (1991)**. Morphogenesis of the mammalian egg cortex. En a comparative overview of mammalian fertilization. B. S. Dunbar and M. O´Rand (eds.). Plenum Press, New York.
- Lotan, R., E. Skutelsky, D. Danon, N. Sharon (1975)** The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.* 250: 8518-8523.
- Lu, Q., B.D. Shur (1997)**. Sperm from β 1,4-galactosyltransferase null mice are refractory to ZP3- induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Develop.* 124: 4121-4131.
- Lucas, H., S. Bercegeay, J. Le Pendu, M. Jean, S. Mirallie, P. Barriere (1994)**. A fucose-containing epitope potentially involved in gamete interaction on the human zona pellucida. *Hum. Reprod.* 9: 1532-1538.
- Maegawa, M., M. Kamda, S. Yamamoto, S. Yamano, M. Irahara, H. Kido, T. Aono (2002)**. Involvement of carbohydrate molecules on zona pellucida in human fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 53: 79-89.
- Magerkurth, C., E. Topfer-Petersen, P. Schwartz, H.W. Michelmann (1999)**. Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. *Hum. Reprod.* 14: 1057-1066.
- Mandal, C., C. Mandal (1990)** Sialic acid binding lectins. *Experientia.* 46 :433-41.
- Marsh B.J., K.E. Howell (2002)**. The mammalian Golgi-complex debates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 789-795.
- Martic, M., E.K. Moses, T.E. Adams, Y. Liu, D.A. Gook, C. Garrett, M.E. Dunlop, G.H. Baker (2004)**. Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J. Androl.* 1: 3-13.
- Martinez, M.L., G.K. Fontenot, J.D. Harris (1996)**. The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 50: 35-41.
- Martínez-Alonso. E., G. Egea, J. Ballesta, J.A. Martínez-Menárguez (2005)**. Structure and dynamics of the Golgi complex at 15 degrees C: low temperature induces the formation of Golgi-derived tubules. *Traffic.* 6: 32-44.
- Mate, K.E., I. Giles, J.C. Rodger (1992)**. Evidence that cortical granule formation is a periovulatory event in marsupials. *J. Reprod. Fertil.* 95: 719-728.
- Mattioli, M., P. Lucidi., B. Barboni (1994)**. Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote.* 2: 347-349.
- Maymon, B.B, R. Maymon, I. Ben-Nun, Y. Ghetler, R. Shalgi, E. Skutelsky (1994)**. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J. Reprod. Fert.* 102: 81-86.
- McEvoy, TG., G.D. Coull, P.J. Broadbent, J.S.M. Hutchinson, B.K. Speake (2000)**. Fatty acid composition of lipids in mature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 118: 163-170.

- McGee, E.A., A.J. Hsueh (2000).** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21: 200-214.
- McLeskey, S.B., C. Dowds, R. Carballada, R. White, P.M. Saling (1998).** Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int. Rev. Cytol.* 177: 57-113.
- Meizel, S. (1985).** Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174: 285-302.
- Meizel, S., K.O. Turner (1991).** Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell Endocrinol.* 77: R1-R5.
- Meizel, S., K.O. Turner, R. Nuccitelli (1997).** Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 182: 67-75.
- Melendrez, C.S., S. Meizel (1995).** Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 53: 676-683.
- Miller, D.J., M.B. Macek, B.D. Shur (1992).** Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357: 589-593.
- Miller, D.J., X. Gong, G. Decker, B.D. Shur (1993).** Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.* 123: 1431-1440.
- Miller, D.J., X. Shi, H. Burkon (2002).** Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 37-73.
- Minch, S.L., P.T. Kallio, J. E. Bailey (1995).** Tissue plasminogen activator coexpressed in Chinese hamster ovary cells with α (2,6)-sialyltransferase contains NeuAc α (2,6)Gal β (1,4)Glc-N-AcR linkages. *Biotechnol. Prog.* 11: 348-351.
- Miranda, P.V., F. Gonzalez-Echeverría, C.I. Marín-Briggiler, A. Brandelli, J.A. Blaquier, J.G. Tezón (1997).** Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 399-404.
- Miranda, P.V., F. González-Echeverría, J.A. Blaquier, D.J. Mahuran, J.G. Tezón (2000).** Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 699-706.
- Miyano, T. (2003).** Bringing up small oocytes to eggs in pig and cows. *Theriogenology.* 59: 61-72.
- Mizuochi, T., M.W. Spellman, M. Larkin, J. Solomon, L.J. Basa, T. Feizi (1988).** Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells *Biochem. J.* 254: 599-603.
- Moller, C.C., P.M. Wassarman (1989).** Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* 132: 103-112.
- Moller, C.C., J.D. Bleil, R.A. Kinloch, P.M. Wassarman (1990).** Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev. Biol.* 137: 276-286.
- Moloney, D.J., A.I. Lin, R.S. Haltiwanger (1997).** The O-linked fucose glycosylation pathway. Evidence for protein-specific elongation of O-linked fucose in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272: 19046-19050.
- Moloney, D.J., R. S. Haltiwanger (1999).** The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose-

beta1,3-glucosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 9: 679-687.

Moor, R.M., G.M. Warnes (1979). Regulation of meiosis in mammalian oocytes. *Brist. Med. Bull.* 35: 99-103.

Moore, H.D., T.D. Hartman, A.P. Bye, P. Lutjen, M. De Witt, A.O. Trounson (1987). Monoclonal antibody against a sperm antigen Mr 95,000 inhibits attachment of human spermatozoa to the zona pellucida. *J. Reprod. Immunol.* 11: 157-166.

Morales, P., P. Vigil, D.R. Franken, K. Kaskar, K. Coetzee, T.F. Kruger (1994). Sperm-oocyte interaction: studies on the kinetics of zona pellucida binding and acrosome reaction of human spermatozoa. *Andrologia.* 26: 131-137.

Moreno, R.D., G. Schatten, J. Ramalho-Santos (2002). Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol. Reprod.* 66: 1259-1266.

Mori, K., T. Daitoh, M. Irahara, M. Kamada, T. Aono (1989). Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 207-211.

Mori, E., S. Takasaki, J.L. Hedrick, N.J. Wardrip, T. Mori, A. Kobata (1991). Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins. *Biochem.* 30: 2078-2087.

Mori, K., T. Daitoh, M. Kamada, N. Maeda, M. Maegawa, K. Hirano, M. Irahara, T. Aono (1993). Blocking of human fertilization by carbohydrates. *Hum. Reprod.* 8: 1729-1732.

Mori, E., N. Yoshitani, T. Mori, S. Takasaki (2000). Calcium ion-independent recognition of sialyl and nonsialyl N-acetyllactosamine and Le^x structures by boar sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 374: 86-92.

Muñoz-Gotera, R.J., E.O. Hernández-Gonzalez, G. Mendoza- Hernández, R., G. Contreras, A. Mujica (2001). Exocytosis of a 60 Kda protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 405-413.

Murase, T., E.R. Roldan (1996). Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem. J.* 320: 1017-1023.

Murdoch, W.J., A.C. McDonnell (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reprod.* 123: 743-50.

Mutsaers, J.H.G.M., J.P. Kamerling, R. Devos, Y. Guisez, W. Fiers, J.F.G. Vliegthart (1986). Structural studies of the carbohydrate chains of human gamma-interferon. *Eur. J. Biochem.* 156,651-654

Nagdas, S.D., Y. Araki, C.A. Chayko, M.C. Orgebin-Crist, D.R.P. Tulsiani (1994). O-linked trisaccharide and N-linked poly-N-acetyllactosaminyl glycans are present on mouse ZP2 and ZP3. *Biol. Reprod.* 51: 262-272.

Nakano, M., N. Yonezawa, Y. Hatanaka, S. Noguchi (1996). Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil.* 30: 25-34.

Nakano, M., N. Yonezawa (2001). Localization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Org.* 168 :65-75.

Nelson W.J. (2000). W(h)ither the Golgi during mitosis?. *J. Cell Biol.* 149: 243-348.

- Newman, G.R. (1999).** LR White embedding for immunoelectron microscopy. *Histochem. J.* 31: 79.
- Nicosia, S.V., D.P. Wolf, M. Inoue (1977).** Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse ova. *Dev. Biol.* 57: 56-74.
- Nikas, G., T. Paraschos, A. Psychoyos, A.H. Handyside (1994).** The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum. Reprod.* 9: 2135-2138.
- Nixon, B., Q. Lu, M.J. Wassler, C.I. Foote, M.A. Ensslin, B.D. Shur (2001).** Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cell. Tissues. Org.* 168: 46-57.
- Noguchi, S., Y. Hatanaka, T. Tobita, M. Nakano (1992).** Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 204: 1089-1100.
- Noguchi, S., M. Nakano (1993).** Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3. *Biochem. Biophys. Acta.* 1158: 217-226.
- Noguchi, S., N. Yonezawa, T. Katsumata, K. Hashimuze, M. Kuwayama, S. Hamano, S. Watanabe, M. Nakano (1994).** Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1201: 7-14.
- O'Day-Bowman, M.B., P.A. Mavrogianis, R.D. Minshall, H.G. Verhage (2002).** In vivo versus in vitro oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 248-256.
- Oehninger, S., A. Acosta, G.D. Hodgen (1990).** Antagonistic and agonistic properties of saccharide moieties in the hemizona assay. *Fertil. Steril.* 53: 143-149.
- Oehninger, S., G.F. Clark, A.A. Acosta, G.D. Hodgen (1991).** Nature of the inhibitory effect of complex saccharide moieties on the tight binding of human spermatozoa to the human zona pellucida. *Fertil. Steril.* 55: 165-169.
- Oehninger, S., C. Sueldo, S. Lanzendorf, M. Mahony, L. J. Burkman, N. J. Alexander, G.D. Hodgen (1994).** A sequential analysis of the effect of progesterone on specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum. Reprod.* 9: 1322-1327.
- Oehninger, S. (2000).** Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. *J. Androl.* 21: 814-821.
- Oehninger, S (2001).** Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction. *Cells Tissues Org.* 168: 58-64.
- Okitsu, O., S. Yamano, T. Aono (2001).** Activation of bovine matured *in vitro* by injection of bovine and human spermatozoa or their cytosolic fractions. *Zygote.* 9: 89-95.
- Osawa, T., T. Tsuji (1987)** Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins. *Annu. Rev. Biochem.* 5: 621-42.
- Osman, R.A., M.L. Andria, A.D. Jones, S. Meizel (1989).** Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 :828-833.
- O'Toole, C.M., C. Arnoult, A. Darszon, R.A. Steinhardt, H.M. Florman (2000).** Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* 11: 1571-1584.
- Otsuka, F., Z. Yao, T. Lee, S. Yamamoto, G.F. Erickson, S. Shimasaki (2000).** Bone morphogenetic protein-15 identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* 275: 39523-39528.

- Otvos, L., G.R. Krivulka, L. Urge, G.I. Szendrei, L. Nagy, Z.Q. Xiang, H.C. Ertl (1995).** Comparison of the effects of amino acid substitutions and beta-N- vs. alpha-O-glycosylation on the T-cell stimulatory activity and conformation of an epitope on the rabies virus glycoprotein. *Biochim.Biophys.Acta* 1267: 55-64.
- Ozgun, K., M.S. Patankar, S. Oehninger, G.F. Clark (1998).** Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 318-324.
- Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer, N.L. First (1988).** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
- Patankar, M.S., S. Oehninger, T. Barnett, R.L. Williams, G.F. Clark (1993)** A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* 268: 21770-21776.
- Patankar, M.S., K. Ozgun, S. Oehninger, A. Dell, H. Morris, M. Seppala, G.F. Clark (1997)** Expression of glycans linked to natural killer cell inhibition on the human zona pellucida. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 501-5.
- Patrat, C., C. Serres, P. Jouannet (2000)** The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell.* 92: 255-266.
- Pelletier, C., D.L. Keefe, J.R. Trimarchi, (2004).** Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fert. Steril.* 81: 850.
- Pereira, M.E., E.A. Kabat (1974)** Specificity of purified hemagglutinin (lectin) from *Lotus tetragonolobus*. *Biochem.* 13: 3184-3192.
- Perez-Vilar, J., J. Hidalgo, A. Velasco (1991).** Presence of terminal N-acetylgalactosamine residues in subregions of the endoplasmic reticulum is influenced by cell differentiation in culture. *J. Biol. Chem.* 266: 23967-23976.
- Phillips, D.M., R.M. Shalgi (1980a).** Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 72: 1-12.
- Phillips, D.M., R.M. Shalgi (1980b).** Surface properties of the zona pellucida. *J. Exp. Zool.* 213: 1-8.
- Philpott, C.C., M.J. Ringuette, J. Dean (1987).** Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 121: 568-575.
- Pickering, S.J., M.H. Johnson, P.R. Braude, E. Houlston (1988).** Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum. Reprod.* 3: 978-989.
- Picton, H.M., R.G. Gosden (1999).** Oogenesis in mammals. *Encyclopedia of Reproduction.* 3: 488-496.
- Picton, H.M. (2001).** Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology.* 56: 1193-1210.
- Picton, H.M., M.A. Danfour, S.E. Harris, E.L. Chambers, J. Huntriss (2003).** Growth and maturation of oocytes *in vitro*. *Reproduction Supplement.* 61: 445-462.
- Pierce, K.E., M.C. Siebert, G.S. Kopf, R.M. Schultz, P.G. Calarco (1990).** Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Dev. Biol.* 141: 381-392.

- Pilka, L., P. Travník, M. Dvorák, J. Tesářík, P. Ventruba, K. Krejčí, J. Soska (1985).** [Delivery after intrauterine embryo transfer obtained by fertilization and oocyte culture in vitro]. *Cesk. Gynekol.* 50: 452-459.
- Piller, V., F. Piller, J.P. Cartron (1990)** Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. *Eur. J. Biochem.* 191: 461-6.
- Plant, A., E. A. McLaughlin, W.C. Ford (1995).** Intracellular calcium measurements in individual human sperm demonstrate that the majority can respond to progesterone. *Fertil. Steril.* 64: 1213-1215.
- Prasad, S.V., B. Wilkins, S.M. Skinner, B.S. Dunbar (1996).** Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 519-529.
- Prasad, S.V., S.M. Skinner, C. Carino, N. Wang, J. Cartwright, B.S. Dunbar (2000).** Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Org.* 166: 148-164.
- Primakoff, P., D.G. Myles (2002).** Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science.* 296: 2183-2185.
- Qi, H., Z. Williams, P.M. Wassarman (2002).** Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol. Biol. Cell.* 13: 530-41.
- Rankin, T.L., Z.B. Tong, P.E. Castle, E. Lee, R. Gore-Langton, L.M. Nelson, J. Dean (1998).** Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development.* 125: 2415-2424.
- Rankin, T., P. Talbot, E. Lee, J. Dean (1999).** Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development.* 126: 3847-3855.
- Rankin, T.L., M. O'Brien, E. Lee, K. Wigglesworth, J. Eppig, J. Dean (2001).** Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development.* 128: 1119-1126.
- Rankin, T., J.S. Coleman, O. Epifano, T. Hoodbhoy, S.G. Turner, P.E. Castle, E. Lee, R. Gore-Langton, J. Dean (2003).** Fertility and taxon specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev. Cell.* 5: 33-43.
- Rekkas, C.A., U. Bessenfelder, V. Havlicek, E. Vainas, G. Brem (2002).** Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology.* 57: 1897-1905.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A.C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, D.E. Clapham (2001).** A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413: 603-609.
- Richards, J.S., D.L. Russell, R.L. Robker, M. Dajee, T.N. Alliston (1998).** Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol. Cell Endocrinol.* 145: 47-54.
- Ringuette, M.J., M.E. Chamberlin, A.W. Baur, D.A. Sobieski, J. Dean (1988).** Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 127: 287-295.
- Rivkin, E., L.L. Tres, R. Kaplan-Kraicer, R. Shalgi, A.L. Kierszenbaum (2000)** Molecular cloning of rat sperm galactosyl receptor, a C-type lectin with in vitro egg binding activity. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 401-11.

- Robker, R.L., D.L. Russell, L.L. Espey, J.P. Lydon, B.W. O'Malley, J.S. Richards (2000).** Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 4689-4694.
- Roldan, E.R., T. Murase, Q.X. Shi (1994).** Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science.* 266: 1578-1581.
- Roller, R.J., R.A. Kinloch, B.Y. Hiraoka, S.S. Li, P.M. Wassarman (1989).** Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Develop.* 106: 251-261.
- Rotem, R., N. Zamir, N. Keynan, D. Barkan, H. Breitbart, Z. Naor (1998).** Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis of human spermatozoa. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism.* 37: 218-223.
- Roth, J., D.J. Taatjes, J. Weinstein, J.C. Paulson, P. Greenwell, W.M. Watkins (1986).** Differential subcompartmentation of terminal glycosylation in the Golgi apparatus of intestinal absorptive and goblet cells. *J. Biol. Chem.* 261: 14307-14312.
- Roth, J. (1996).** Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and cell type-specificity of cell surface glycoconjugate expression: analysis by the protein A-gold and lectin-gold techniques. *Histochem. Cell Biol.* 106: 79-92.
- Roth, M.G. (1999).** Inheriting the Golgi. *Cell.* 99: 559-562.
- Rothman, J.E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 372: 55-63.
- Roux, E., F.W.K. Kan (1991).** Changes of glycoconjugate contents of the zona pellucida during oocyte growth and development in the golden hamster: a quantitative cytochemical study. *Anat. Rec.* 230: 347-360.
- Runft, L.L., L.A. Jaffe, L.M. Mehlmann (2002).** Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev. Biol.* 245: 237-254.
- Sabeur, K., G.N. Cherr, A.I. Yudin, J.W. Overstreet (1998).** Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote.* 6: 103-111.
- Sasaki, H., B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda (1987).** Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* 262: 12059-12076.
- Sathananthan, A.H., S.C. Ng, C.M. Chia, H.Y. Law, W.R. Edirisinghe, S.S. Ratnam (1985).** The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 442: 251-264.
- Sathananthan, A.H., S.C. Ng, A. Trounson, A. Bongso, A. Laws-King, S.S. Ratnam (1989).** Human micro-insemination by injection of single or multiple sperm: ultrastructure. *Hum. Reprod.* 4: 574-583.
- Sathananthan, A.H., I. Kola, J. Osborne, A. Trounson, S.C. Ng, A. Bongso, S.S. Ratnam (1991).** Centrioles in the beginning of human development. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 88: 4806-4810.
- Sathananthan A.H. (1994).** Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. *Microsc. Res. Tech.* 27: 145-164.
- Schmell, E.D., B.J. Gulyas (1980a).** Mammalian sperm-egg recognition and binding in vitro. I. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous inseminations of hamster, mouse, and guinea pig oocytes. *Biol. Reprod.* 23: 1075-1085.

- Schmell, E.D., B.J. Gulyas (1980b)**. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzyme's role in hardening of the zona pellucida. *Gamete Res.* 3: 279-290.
- Schmell, E.D., B.J. Gulyas., J.L. Hedrick (1983)**. Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. En: Hartmann, J.F. (ed.). *Mechanism and control of animal fertilization*. New York: Academic Press. 365-413.
- Schmut, O. J. Horwath-Winter, A. Zenker, G. Trummer (2002)**. The effect of sample treatment on separation profiles of tear fluid proteins: qualitative and semi-quantitative protein determination by an automated analysis system. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 240: 900-905.
- Schroeder, A.C., R.M. Schultz, G.S. Kopf, F.R. Talor, R.B. Becker, J.J. Eppig (1990)**. Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro* in the absence of serum. *Biol. Reprod.* 43: 891-897.
- Schulte, B.A., S.S. Spicer (1983)**. Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactosamine residues in rodent complex carbohydrates using a galactose oxidase--Schiff sequence and peanut lectin--horseradish peroxidase conjugate. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 19-24.
- Sebon, S., Y. Hirao, T. Miyano (2003)**. Interactions between the oocyte and somatic cells in follicular development: Lesson from *In Vitro* Culture. *J. Reprod. Dev.* 49: 259-269.
- Selman, K., E. Anderson (1975)**. The formation and cytochemical characterization of cortical granules in ovarian oocytes of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Morph.* 147: 251-274.
- Sengoku, K., K. Tamate, Y. Takaoka, M. Horikawa, K. Goishi, R. Okada, K. Tsuchiya, M. Ishikawa (1999)**. Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 5: 183-188.
- Shabanowitz, R.B., M.G. O'Rand (1988)**. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J. Reprod. Fertil.* 82: 151-161.
- Shabanowitz, R.B. (1990)**. Mouse antibodies to human zona pellucida: evidence that human ZP3 is strongly immunogenic and contains two distinct isomer chains. *Biol. Reprod.* 43: 260-270.
- Shalgi, R., T. Raz (1997)**. The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histol. Histopathol.* 12: 813-822.
- Sharon N. (1975)**. *Complex carbohydrates. Their chemistry. Biosynthesis and functions* (Reading Massachusetts: Addison-Wesley).
- Shi, Q.X., E.R. Roldan (1995)**. Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 52: 373-381.
- Shi, Q.X., Y.Y. Yuan, E.R.S. Roldan (1997)**. Gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 677-683.
- Shibuya, N., I.J. Goldstein, W.F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, W.J. Peumans (1987)** The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* 262: 1596-601.
- Shibuya, N., I.J. Goldstein, E.J. Van Damme, W.J. Peumans (1988)** Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J. Biol. Chem.* 263: 728-34.

- Shima, D.T., K. Haldar, R. Pepperkok, R. Watson, G. Warren (1997).** Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J. Cell Biol.* 137: 1211-1228.
- Shimizu, S., M. Tsuji, J. Dean (1983).** *In vitro* biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J. Biol. Chem.* 258: 5858-5863.
- Shinozawa, S., Y. Gomita, Y. Araki (1992).** [Effects of anthracycline drugs (aclerubicin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin) on mouse acute toxicity and rat liver microsomal lipid peroxidation]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 19: 805-809.
- Shivers, C.A., B.S. Dunbar (1977).** Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women. *Science.* 197: 1082-1084.
- Shur, B.D., N.G. Hall (1982).** A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* 95: 567-573.
- Shur, B.D. (1998).** Is sperm galactosyltransferase a signaling subunit of a multimeric gamete receptor?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250: 537-543.
- Shur, B.D., M.A. Ensslin, C. Rodeheffer (2004).** SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. *Curr. Opin. Cell.* 16: 477-485.
- Siiteri, J.E., W. Gottlieb, S. Meizel (1988).** Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction *in vitro*. *Gamete Res.* 20: 25-42.
- Sinosich, M.J., S.E. Anzendorf, H.G. Hodgen (1990a).** Immunocytochemical studies of hamster oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 331-336.
- Sinosich, M.J., S.E. Lanzebdorf, D.M. Saunders (1990b).** A protein marker of hamster oocyte fertilization. *Hum. Reprod.* 5: 729-736.
- Sinowatz, F., W. Amselgruber, E. Töpfer-Petersen, I Totzauer, J.J.Calvete, J Plendl (1995).** Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat. Embryol.* 191: 41-46.
- Sinowatz, F., S. Kollé, E. Topfer-Petersen (2001a).** Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Org.* 168: 24-35.
- Sinowatz, F., E. Topfer-Petersen, S. Koller, G. Palma (2001b).** Functional morphology of the zona pellucida. *Anat. Histol. Embryol.* 5: 257-263.
- Skinner, S.M., B.S. Dunbar (1992).** Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1031-1036.
- Smith, D.F., R.D. Larsen, S. Mattox, J.B. Lowe, R.D. Cummings (1990).** Transfer and expression of a murine UDP-Gal:beta-D-Gal-alpha 1,3-galactosyltransferase gene in transfected Chinese hamster ovary cells. Competition reactions between the alpha 1,3-galactosyltransferase and the endogenous alpha 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 265: 6225-6234.
- Soyal, S.M., A. Amleh, J. Dean (2000).** FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development.* 127: 4645-4654.
- Spargo, S.C., R.M. Hope (2003).** Evolution and nomenclature of zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.* 68: 358-362.

- Spellman, M.W., L.J. Basa, C.K. Leonard, J.A. Chakel, J.V. O'Connor, S. Wilson, H. van Halbeek (1989).** Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264: 14100-14111.
- Springer, G.F. (1984)** T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science.* 224: 1198-206.
- St Jacques, S., B. Malette, S. Chevalier, K.D. Roberts, G. Bleau (1992).** The zona pellucida binds the mature form of an oviductal glycoprotein (oviductin). *J. Exp. Zool.* 262: 97-104.
- Staneloni, R.J., L.F. Leloir (1982).** The biosynthetic pathway of the asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 289-326.
- Stanley P. (1989).** Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol. Cell Biol.* 9: 377-383.
- Stricker, S.A., R. Silva, T. Smythe (1998).** Calcium and endoplasmic reticulum dynamics during oocyte maturation and fertilization in the marine worm *Cerebratulus lacteus*. *Dev. Biol.* 203: 305-322.
- Stricker. S.A. (1999).** Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211: 157-176.
- Sueldo, C.E., S. Oehninger, E. Subias, M. Mahony, N.J. Alexander, L.J. Burkman, A.A. Acosta (1993).** Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertil. Steril.* 60: 137-140.
- Sugii, S., E.A. Kabat (1982)** Further immunochemical studies on the combining sites of *Lotus tetragonolobus* and *Ulex europaeus* I and II lectins. *Carbohydr. Res.* 99: 99-101.
- Sun, Q.Y., L. Lai, K.W. Park, B. Kühholzer, R.S. Prather, H. Schatten (2001a).** Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* 64: 871-889.
- Sun, Q.Y., L. Lai, A. BonK, R.S. Prather, H. Schatten (2001b).** Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size and protein synthesis inhibition. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 131-137.
- Sun, Q.Y. (2003).** Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermia block in mammalian eggs. *Micr. Res. Tech.* 61: 342-348.
- Swann, K., J. P. Ozil (1994).** Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.* 152: 183-222.
- Szollosi, D. (1967).** Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.* 159: 431-446.
- Szollosi, D., M. S. Szollosi, R. Czolowska, A. K. Tarkowski. (1990)** Sperm penetration into immature mouse oocytes and nuclear changes during maturation: an EM study. *Biol. Cell.* 69: 53-64.
- Takasaki, S., E. Mori, T. Mori (1999).** Structures of sugar chains included in mammalian zona pellucida glycoproteins and their potential roles in sperm-egg interaction. *Biochem. Biophys. Acta.* 1473: 206-215.
- Takeuchi, M., S. Takasaki, H. Miyazaki, T. Kato, S. Hoshi, N. Kochibe, A. Kobata (1988).** Comparative study of the Asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium. *J. Biol. Chem.* 263: 365-3663.

- Takeuchi, Y., K. Nishimura, N. Aoki, T. Adachi, C. Sato, K. Kitajima, T. Matsuda (1999).** A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. *Eur. J. Biochem.* 260: 736-742.
- Talbot, P (1985).** Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am. J. Anat.* 174: 331-346.
- Talbot, P., BD. Shur, GD Myles (2003).** Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 68: 1-9.
- Talbot, P., P. Dandekar (2003).** Perivitelline space: Does it play a role in blocking polyspermy in mammals. *Micr. Res. Tech.* 61: 349-357.
- Talevi, R., R. Gualtieri, G. Tartaglione, A. Fortunato (1997)** Heterogeneity of the zona pellucida carbohydrate distribution in human oocytes failing to fertilize in vitro. *Hum. Reprod.* 12: 2773-2780.
- Tesarik, J. (1985).** Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74: 383-388.
- Tesarik, J. (1988).** Developmental control of human preimplantation embryos: a comparative approach. *J. In Vitro Fert. Embryo. Transf.* 5: 347-362.
- Tesarik, J., C. Mendoza, A. Carreras (1991).** Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 56: 113-118.
- Tesarik, J., A. Carreras, C. Mendonza (1993a).** Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reaction to pertussis toxin. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 183-9.
- Tesarik, J., C. Mendoza, J.P. Ramirez, J. Moos (1993b).** Solubilized human zona pellucida competes with a fucosylated neoglycoprotein for binding sites on the human sperm surface. *Fertil. Steril.* 60: 344-350.
- Tesarik, J., C. Mendoza (1995).** Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk. *Fert. Steril.* 63: 153-7.
- Terasaki, M., L.L. Runft, A.R. Hand (2001).** Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol. Biol. Cell.* 12: 1103-1116.
- Thall, A.D., P. Maly, J.B. Lowe (1995).** Oocyte gal α 1,3gal epitope implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J. Biol. Chem.* 270: 21437-21440.
- Thibault, C., D. Szöllosi, M. Gerard (1987).** Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 856-896.
- Thomas, P., S. Meizel (1988).** An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res.* 20: 397-411.
- Thomas, P., S. Meizel (1989).** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca²⁺ influx. *Biochem. J.* 264: 539-546.
- Tisdall, D.J., K. Watanabe, N.L. Hudson, P. Smith, K.P. McNatty (1995).** FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 273-281.

- Toma, V., C. Zuber, H.C. Winter, I.J. Goldstein, J. Roth (2001).** Application of a lectin from the mushroom *Polysporus squamosus* for the histochemical detection of the NeuAcalpha2,6Galbeta1,4Glc/GlcNAc sequence of N-linked oligosaccharides: a comparison with the *Sambucus nigra* lectin. *Histochem. Cell Biol.* 116: 183-193.
- Tomiyama, T., K. Ohashi, T. Tsutsui, F. Saji, O. Tanizawa (1995).** Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca^{++} dependent) and ATP (Ca^{++} independent). *Hum. Reprod.* 10: 2052-2055.
- Töpfer-Petersen, E., J. Calvete (1995).** Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *Int. J. Androl.* 2: 20-26.
- Töpfer-Petersen, E., A. Romero, P.F. Varela, M. Ekhiasi-Hundrieser, Z. Dostalova, L. Sanz, J.J. Calvete (1998).** Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30: 217-224.
- Topper, E.K., L. Kruijt, J. Calvete, K. Mann, E. Topfer-Petersen, H. Woelders (1997).** Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 344-350.
- Totzauer, I., S. Kolle, F. Sinowatz, J. Plendl, W. Amselgruber, E. Töpfer-Petersen (1998).** Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. *Anat. Anz.* 180: 37-43.
- Tsubamoto, H., W.A. Hasegawa, M. Inoue, N. Yamasaki, K. Koyama (1996).** Binding of recombinant pig zona pellucida protein 1 (ZP1) to acrosome-reacted spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 50: 63-67.
- Tsubamoto H., A. Hasegawa, Y. Nakata, S. Naito, N. Yamasaki, K. Koyama (1999).** Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol. Reprod.* 61: 1649-54.
- Tsuda, E., M. Goto, A. Murakami, K. Akai, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, R. Sasaki, H. Chiba, H. Ishihara (1988).** Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochem.* 27: 5646-5654.
- Tulsiani, D.R., M.D. Skudlarek, M.C. Orgebin-Crist (1990).** Human sperm plasma membranes possess α -D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol. Reprod.* 42: 843-858.
- Tulsiani, D.R., H. Yoshida-Komiya, Y. Araki (1997).** Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediate event. *Biol. Reprod.* 57: 487-494.
- Tulsiani, D.R. (2000).** Structural analysis of the asparagine-linked glycan units of the ZP2 and ZP3 glycoproteins from mouse zona pellucida. *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 275-83.
- Turner, K.O., M. Syvanen, S. Meizel (1997).** The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by cyclodiene insecticides. *J. Androl.* 18: 571-575.
- Van den Nieuwenhof, I., H. Koistinen, R.L. Easton, R. Koistinen, M. Kamarainen, H.R. Morris, I. Van Die, M. Seppala, A. Dell, D.H. Van den Eijnden (2000).** Recombinant glycodefin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodefin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.* 267: 4753-4762.
- van Duin M, J.E. Polman, I.T. De Breet, K. van Ginneken, H. Bunschoten, A. Grootenhuis, J. Brindle, R.J. Aitken (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: 607-17.
- Vanroose, G., H. Nauwynck, A. Van Soom, M.T. Ysebaert, G. Charlier, P. Van Oostveldt, A. de Kruif (2000).** Structural aspects of the zona pellucida of *in vitro*

produced bovine embryos: A scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol. Reprod.* 62: 463-469.

Waclawek, M., R. Foisner, J. Nimpf, W.J. Schneider (1998). The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol. Reprod.* 59: 1230-1239.

Wakayama, T., A. Ogura, J. Suto, Y. Matsubara, M. Kurohmaru, Y. Hayashi, R. Yanagimachi (1996). Penetration by field vole spermatozoa of mouse and hamster zonae pellucidae without acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 107: 97-102.

Wang, W.C., R.D. Cummings (1988) The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J. Biol. Chem.* 263: 4576-85.

Ward, C.R., B.T. Storey, G.S. Kopf (1992). Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 267: 14061-14067.

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

Warren, G., W. Wickner (1996). Organelle inheritance. *Cell.* 84: 395-400.

Wassarman, P.M., W.J. Josefowicz (1978). Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of Growth and Meiotic competence. *J. Morphol.* 156: 209-236.

Wassarman, P.M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 415-442.

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

Wassarman, P.M., S. Mortillo (1991). Structure of the mouse extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 130: 85-110.

Wassarman, P.M. (1992). Mouse gamete adhesion molecules. *Biol. Reprod.* 46: 186-191.

Wassarman, P.M., E.S. Litscher (1995). Sperm--egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 1-19.

Wassarman, P.M., C. Liu, E.S. Litscher (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell Sci.* 109: 2001-2004.

Wassarman, P.M., C. Liu, J. Chen, H. Qi, E.S. Litscher (1998). Ovarian development in mice bearing homozygous or heterozygous null mutations in zona pellucida glycoprotein gene mZP3. *Histol. Histopathol.* 13: 293-300.

Wassarman, P.M., C. Liu, E.S. Litscher (2001a). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell. Sci.* 109: 2001-2004.

Wassarman, P.M., L. Jovine, E.S. Litscher (2001b). A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3: 59-64.

Wassarman, P.M., E.S. Litscher (2001). Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Org.* 168: 36-45.

Wassarman, P.M. (2002). Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt. Sinai J. Med.* 69: 148-55.

Weakley. B.S. (1966). Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Anat.* 100: 503-534.

- Williams, G.L., M. Amstalden, M.R Garcia, R.L. Satanko, S.E. Nizielski, C.D. Morrison, D.H. Keisler (2002).** Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23:339-349.
- Williams, Z., P.M. Wassarman (2001).** Secretion of mouse ZP3, the sperm receptor, requires cleavage of its polypeptide at a consensus furin cleavage-site. *Biochem.* 40: 929-937.
- Wistrom, C.A., S. Meizel (1993).** Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev. Biol.* 159: 679-690.
- Wolf, D.E., M. Hamada (1977).** Induction of zonal and oolemmal blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate. *Biol. Reprod.* 17: 350-354.
- Wu, A.M., S. Sugii (1991)** Coding and classification of D-galactose, N-Acetyl-D-galactosamine, and -D-Galp-[1-3(4)]-β-D-GlcpNAC, specificities of applied lectins. *Carbohydr. Research.*
- Wu, A.M., J.H. Wu, L.H. Lin, S.H. Lin, J.H. Liu (2003)** Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life. Sci.* 72: 2285-302.
- Yamashita, K., A. Hitoi, A. Kobata (1983)** Structural determinants of *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 258:14753-5.
- Yamashita, K., N. Kochibe, T. Ohkura, I. Ueda, A. Kobata (1985)** Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J. Biol. Chem.* 260: 4688-93.
- Yamashita, K., K. Totani, T. Ohkura, S. Takasaki, I.J. Goldstein, A. Kobata (1987)** Carbohydrate binding properties of complex-type oligosaccharides on immobilized *Datura stramonium* lectin. *J. Biol. Chem.* 262: 1602-7.
- Yamashita, Y., Y.S. Chung, R. Horie, R. Kannagi, M. Sowa (1995).** Alterations in gastric mucin with malignant transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 441-446.
- Yamasaki, N., H. Tsubamoto, A. Hasegawa, M. Inoue, K. Koyama (1996).** Genomic organization of the gene for pig zona pellucida glycoprotein ZP1 and its expression in mammalian cells. *J. Reprod. Fertil.* 50: 19-23.
- Yan, L., P.P. Wilkins, G. Alvarez-Manilla, S.I. Do, D.F. Smith, R.D. Cummings (1997)** Immobilized *Lotus tetragonolobus* agglutinin binds oligosaccharides containing the Le(x) determinant. *Glycoconj. J.* 14: 45-55.
- Yanagimachi, R., M.C. Chang (1961).** Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J. Exp. Zool.* 148: 185-204.
- Yanagimachi, R. (1994)** Mammalian fertilization. En Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York. 189-317.
- Yanagishita, M., V.C. Hascall (1979).** Biosynthesis of proteoglycans by rat granulosa cells cultured *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 252: 12355-12364.
- Yonezawa, N., S. Mitsui, K. Kudo, M. Nakano (1997).** Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *Eur. J. Biochem.* 248: 86-92.
- Yonezawa, N., N. Fukui, K. Kudo, M. Nakano (1999).** Localization of neutral N-linked carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoprotein ZPC. *Eur. J. Biochem.* 260: 57-63.

- Yonezawa, N., N. Fukui, M. Kuno, M. Shinoda, S. Goko, S. Mitsui, M. Nakano (2001).** Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur. J. Biochem.* 268: 3587-94.
- Yonezawa, N., M. Nakano (2003).** Identification of the carboxyl termini of porcine zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 877-882.
- Yonezawa, N., K. Kudo, H. Terauchi, S. Kanai, N. Yoda, M. Tanokura, K. Ito, K. I. Miura, T. Katsumata, M. Nakano (2005).** Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J. Biol. Chem.* 23: en prensa.
- Yoshida, M., D.G. Cran, V.G. Pursel (1993).** Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 462-468.
- Yousefi, S., E. Higgins, Z. Daoling, A. Pollex-Kruger, O. Hindsgaul, J.W. Dennis (1991).** Increased UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of polylectosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* 266: 1772-1782.
- Yurewicz, E.C., A.G. Sacco, M.G. Subramanian (1987).** Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *J. Biol. Chem.* 262: 564-571.
- Yurewicz, E.C., B.A. Pack, A.G. Sacco (1991).** Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* 30: 126-134.
- Yurewicz, E.C., S. Zhang, A.G. Sacco (1993).** Generation and characterization of site-directed antisera against an amino-terminal segment of a 55 kDa sperm adhesive glycoprotein from zona pellucida of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 98: 147-152.
- Yurewicz, E.C., A.G. Sacco, S.K. Gupta, N. Xu, D.A. Gage (1998).** Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 273: 7488-7494.
- Zhao, M., L. Gold, A.M. Ginsberg, L.F. Liang, J. Dean (2002).** Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 22: 3111-3120.
- Zhao, M., L. Gold, H. Dorward, L.F. Liang, T. Hoodbhoy, E. Boja, H.M. Fales, J. Dean (2003).** Mutation of a conserved hydrophobic patch prevents incorporation of ZP3 into the zona pellucida surrounding mouse eggs. *Mol. Cell Biol.* 23: 8982-8991.
- Zhao, M., E.S. Boja, T. Hoodbhoy, J. Nawrocki, J. B. Kaufman, N. Kresge, R. Ghirlando, J. Shiloach, L. Pannell, R. L. Levine, H.M. Fales, J. Dean (2004).** Mass spectrometry analysis of recombinant human ZP3 expressed in glycosylation-deficient CHO cells. *Biochem.* 43: 12090-12104.
- Zini, A., E. De Iamirande, C. Gagnon (1995).** Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. *J. Androl.* 16: 424-431.