

INMUNOLocalIZACIÓN DE LA ESPERMADHESINA PSP-I/PSP-II SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO

Immunolocalization of PSP-I/PSP-II spermadhesin on boar spermatozoa

Ignacio Caballero^{1*}, Juan María Vázquez¹, Inmaculada Parrilla^{1,2}

¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España. ²Inst for Animal Breeding, Mariensee (FAL), Germany.

* Autor para correspondencia: Ignacio Caballero, Teléfono: +34-968-364812. Fax: +34-968-367069. E-mail: nachof@um.es

RESUMEN

El heterodímero PSP-I/PSP-II es el mayor componente proteico del plasma seminal del verraco. En este trabajo se investigó el patrón de unión del heterodímero PSP-I/PSP-II sobre los espermatozoides de verraco desde su almacenamiento en el epidídimo hasta el lugar de la fecundación. Para ello se recogieron espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo, del eyaculado de verracos maduros sexualmente y del oviducto de cerdas multíparas las cuales habían sido cubiertas por un verraco y sacrificadas aproximadamente 6-8 horas tras la ovulación. La inmunolocalización se realizó con anticuerpos policlonales monoespecífico anti-PSP-II obtenidos mediante inmunización de conejas por inyecciones subcutáneas. Se usó como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con partículas de oro de 10 nm. Tras la incubación con el anticuerpo secundario las muestras fueron sometidas a amplificación con plata. Para el examen de la distribución del heterodímero PSP-I/PSP-II se usó tanto microscopía óptica como microscopía electrónica de transmisión. Los espermatozoides procedentes del epidídimo fueron inmunonegativos de manera constante. En cambio, cuando se examinaron los espermatozoides procedentes del eyaculado, estos mostraron grandes agregados de plata recubriendo la región acrosomal del espermatozoide. Cuando los espermatozoides provenían del oviducto nos encontramos dos subpoblaciones espermáticas, con o sin el heterodímero PSP-I/PSP-II sobre la región acrosomal, haciéndonos pensar que la capacitación espermática podría estar relacionada con la eliminación del heterodímero PSP-I/PSP-II de la superficie del espermatozoide. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el heterodímero PSP-I/PSP-II se une al espermatozoide y su liberación podría estar relacionada con cambios en la membrana plasmática del espermatozoide previos a la fecundación.

Palabras clave: espermadhesina, plasma seminal, PSP-I/PSP-II, verraco.

ABSTRACT

The heterodimeric PSP-I/PSP-II spermadhesin represents the major protein of boar seminal plasma. We investigated the pattern of binding of PSP-I/PSP-II on boar spermatozoa, from the epididymis to the site of fertilization. Spermatozoa were collected from the cauda epididymis, from ejaculates of mature boars, and from the oviduct of sows mated with a fertile boar and slaughtered 6-8 h after spontaneous ovulation. Immunolocalization of the PSP-I/PSP-II spermadhesin on spermatozoa was studied using a monospecific polyclonal antibody raised against the PSP-II subunit in rabbits. A 10-nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG was used as the secondary antibody and the samples subjected to silver enhancement. Light and scanning electron microscopy were used to examine the distribution of PSP-I/II on spermatozoa. Epididymal spermatozoa were consistently immunonegative. In contrast, ejaculated spermatozoa exhibited large aggregates of silver coating the acrosomal cap. When spermatozoa were collected from the oviduct, two sperm populations, either with or without PSP-I/II on the acrosomal cap, were found tempting to considered capacitation as involved in the release/removal of PSP-I/II from the sperm surface. The results suggest PSP-I/PSP-II binds to the sperm surface at ejaculation, and that its release might be related to pre-fertilization changes of the sperm membrane.

Key words: spermadhesina, plasma seminal, PSP-I/PSP-II, verraco.

INTRODUCCIÓN

A pesar del creciente interés que presenta la preselección del sexo mediante separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo, esta biotecnología continua sin poder ser usada de manera rutinaria debido a su baja eficiencia y a que conlleva alteraciones en la viabilidad, integridad de membrana, estado acrosomal y patrones de motilidad de los espermatozoides, además de la aparición de una subpoblación espermática en un estado de precapacitación que culminará con una exocitosis prematura del contenido acrosomal (Maxwell y cols., 1997; Maxwell y Johnson, 1997; Maxwell y Johnson, 1999, Parrilla y cols., 2004). Entre los factores responsables de esta situación se ha incluido la pérdida de sustancias protectoras del PS que cubren la cabeza de los espermatozoides debida a la alta dilución a la que son sometidos durante el proceso de separación espermática (Maxwell y Johnson, 1999).

Con el fin de disminuir los efectos de la alta dilución se incluyeron en los medios de recogida una cierta proporción (entre un 1 y un 10%) de PS completo (Maxwell y cols., 1997) o determinados componentes de bajo peso molecular del PS (Ashworth y cols., 1994). Sin embargo, la adición de PS a los medios de recogida de es-

permatozoides ha dado lugar a la obtención de resultados contradictorios, observándose tanto efectos positivos como negativos (Caballero y cols., 2004a). Esta variabilidad podría estar relacionada con los diferentes perfiles de proteínas del PS hallados entre machos de diferente fertilidad (Fournier-Delpech y Thibault, 1993; Killian y cols., 1993).

En el verraco, las espermadhesinas son el mayor componente proteico del PS, y se les suponen varias funciones en diferentes etapas del proceso de fertilización, como es la participación en los procesos de capacitación espermática, modulación de la respuesta inmune uterina, formación del reservorio oviductal y reconocimiento entre gametos (Töpfer-Petersen y cols., 1998; Rodríguez-Martínez y cols., 2005).

Centurión y cols. (2003) observaron como una de las proteínas de la familia de las espermadhesinas, el heterodímero PSP-I/PSP-II, presenta un efecto protector sobre los espermatozoides altamente diluidos similar al hallado tras la adición de plasma seminal completo proveniente de machos seleccionados, preservando la integridad de membrana, motilidad y actividad mitocondrial. Este efecto protector del heterodímero PSP-I/PSP-II presenta una clara ventaja sobre el uso del PS y determina que sea claro candidato para su uso como aditivo en los medios de dilución

de los espermatozoides, ya que al usar una proteína aislada evitaríamos la variabilidad inherente hallada en la composición del PS tanto entre machos, entre eyaculados e incluso entre diferentes fracciones de un mismo eyaculado (Killian y cols., 1993; Ashworth y cols., 1994; Zhu y cols., 2000). Estudios anteriores han mostrado como el heterodímetro PSP-I/PSP-II no es capaz de mantener su influencia durante largos periodos de incubación, siendo eliminadas la mayor parte de las espermadhesinas mediante procesos de capacitación *in vitro* (Dostálová y cols., 1994; Caballero y cols., 2004b).

Sin embargo, no se ha estudiado todavía como varía la presencia, ausencia y/o la distribución del heterodímetro PSP-I/PSP-II sobre los espermatozoides durante diferentes etapas del proceso de fertilización. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la posible unión del heterodímetro PSP-I/PSP-II sobre los espermatozoides de verraco y como varía entre diferentes tipos de espermatozoides como serían los procedentes del epidídimo, eyaculados y recogidos del oviducto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida del semen

Se recogieron espermatozoides tanto epididimarios como eyaculados y procedentes del oviducto. Los espermatozoides epididimarios fueron recogidos de la cola del epidídimo mediante raspado y lavado con PBS, los espermatozoides eyaculados se recogieron mediante el método manual.

Los espermatozoides procedentes del oviducto se recogieron tras la inseminación mediante monta natural de 3 cerdas multíparas a las 0 y 12 horas tras la detección del celo. Las cerdas fueron sacrificadas aproximadamente 6-8 horas después de la ovulación, los oviductos fueron lavados con 5 ml de PBS atemperado a 38 °C centrifugándose el medio de recogida a 1200 x g durante 3 minutos para concentrar los

espermatozoides. Todos los machos utilizados fueron verracos selectos que habían producido descendencia anteriormente.

Obtención del plasma seminal y aislamiento del heterodímetro PSP-I/PSP-II

Todos los experimentos fueron realizados con PS procedente de verracos maduros sexualmente de fertilidad comprobada. El PS se obtuvo mediante centrifugación del semen a 3800 x g durante 15 minutos a 20° C en una centrífuga refrigerada (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R; Osterode, Germany). Posteriormente el sobrenadante fue filtrado sucesivamente a través de filtros de nylon de baja adsorción de solutos de 10 y 1'2 µm.

Para la obtención del heterodímetro PSP-I/PSP-II, el PS fue sometido a cromatografía de afinidad en columna de heparina-sepharosa (Calvete y cols., 1995). De esta manera separamos una fracción que no une heparina, correspondiente al heterodímetro PSP-I/PSP-II, de otra que si une heparina.

El heterodímetro PSP-I/PSP-II fue purificado de la fracción que no une heparina mediante cromatografía de filtración en gel en una columna G-50 de Sephadex de 2000 x 5 cm equilibrada en 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA y 0,025% de azida sódica y pH 7'4 (Calvete y cols., 1995). La identidad y pureza de la muestra proteica fue valorada mediante análisis de la secuencia N-terminal (usando un secuenciador automatizado de proteínas Applied Biosystems 492, Langen, Alemania) y espectrometría de masas MALDI-TOF (Applied Biosystems Voyager DE-Pro mass spectrometer, Lancen, Alemania). Una solución saturada de ácido sinapínico en 50% de acetonitrilo y 0'1% de ácido trifluoroacético (v/v) fue usada como matriz. La concentración proteica fue determinada por medio de espectrofotometría usando un coeficiente de absorción molar de 27332 M⁻¹ cm⁻¹ como había sido determinado previamente por Menéndez y cols. (1995) o por análisis de aminoácidos tras hidrólisis de la muestra en 6

M de HCl durante 24 h a 106 °C en ampollas selladas a las cuales se les había creado el vacío (Beckman Gold Amino Acid Analyser, Beckman, Barcelona, España). Las proteínas fueron dializadas contra agua destilada, liofilizadas y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Obtención de anticuerpos Anti-PSP-II

Las subunidades PSP-I y PSP-II se purificaron por cromatografía de alta resolución utilizando una columna (250 x 10 mm) de fase reversa Lichrocart (Merk) de 10 μ m de tamaño de partícula. La columna se eluyó a 3 ml/minuto con una mezcla de 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B), isocráticamente (25% B) durante 5 minutos, seguidos de 25-45% B por 5 minutos, 45-60% B por 15 minutos y 60-70% B por 5 minutos.

Los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-PSP-II fueron obtenidos mediante inmunización de conejas por inyecciones subcutáneas de 0,5 mg del monómero PSP-II en 0,5 ml de PBS emulsificado en 1,5 ml de adyuvante de Freund completo. Los animales fueron inoculados por 2 veces a intervalos de 5 semanas después de la primera inmunización con 0,25 mg del antígeno. 2 semanas después de la última administración, las conejas fueron sangradas a través de la vena auricular. La actividad anti-PSP-II del suero sanguíneo fue testada mediante técnicas de ELISA y Western Blot.

Inmunolocalización del heterodímero PSP-I/PSP-II

La inmunolocalización del heterodímero PSP-I/PSP-II sobre la cabeza del espermatozoide fue estudiada a nivel de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Para ello, se realizó un frotis de la muestra espermática (procedente de espermatozoides epididimales, eyaculados y recogidos del oviducto) sobre portaobjetos (26 x 76 mm) cubiertos por una capa de poli-lisina y secados en aire durante 24

horas. Los frotis fueron fijados en una solución de 1% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos, tras los cuales fueron lavados repetidas veces en PBS e incubados 120 minutos con el anticuerpo anti-PSP-II (1:500 en PBS) a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas en PBS e incubadas con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo marcado con partículas de oro de 10 nm (Auoprobe EM GAR G10, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) durante 100 minutos, tras los cuales fueron sometidos a varios lavados en PBS y agua destilada. Previamente a la evaluación de los espermatozoides mediante microscopía electrónica de barrido fue aplicado un kit comercial de intensificación con plata (RPN 491, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) durante 10 minutos. Finalmente, los frotis fueron lavados en agua destilada y secados en aire.

Para la evaluación a nivel de microscopía óptica, las muestras fueron fotografiadas con un microscopio Nikon Microphot-FXA (Chiba, Japón) a 100 aumentos. Para la evaluación mediante el microscopio electrónico de barrido (6000 aumentos), una porción del portaobjetos conteniendo espermatozoides marcados con el anticuerpo fue recortada y colocadas en monturas de metal, contrastada durante 15-30 segundos con oro paladio y examinada usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6320F (JEOL LTD, Japón) operando a 5 kV. Como control positivo se utilizaron espermatozoides epididimales incubados con el heterodímero PSP-I/PSP-II previo a la incubación con el anticuerpo primario. Los controles negativos se obtuvieron por omisión del anticuerpo primario.

RESULTADOS

La evaluación mediante microscopía óptica de los espermatozoides epididimales reveló como éstos no presentaban el heterodímero PSP-I/PSP-II en su superficie, este hecho fue confirmado mediante microscopía electrónica de transmisión observándose como los esper-

matozoides procedentes del epidídimo fueron inmunonegativos de manera constante (figuras 1A y 1B). Sin embargo, cuando se observaron los espermatozoides eyaculados al microscopio óptico, la mayor parte de ellos presentó agregados de plata sobre la cabeza del espermatozoide (figura 2A). Esta afirmación se confirmó con el microscopio electrónico de transmisión, en el cual se vio como el heterodímetro PSP-I/PSP-II se hallaba situado sobre la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide (figura 2B). Cuando se evaluaron los espermatozoides recogidos del oviducto, se observó al microscopio óptico como aparecían dos subpoblaciones, observan-

Figura 1. **Microscopía óptica (A) y microscopía electrónica de transmisión (B) de espermatozoides epididimales. No se encontró heterodímetro PSP-I/PSP-II sobre la cabeza del espermatozoide.**

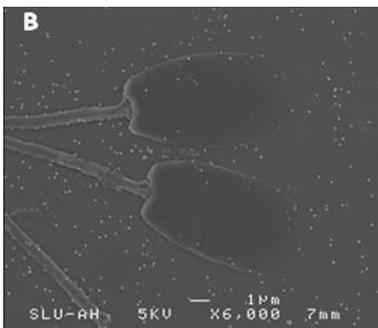
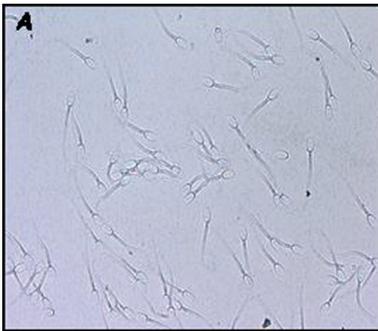
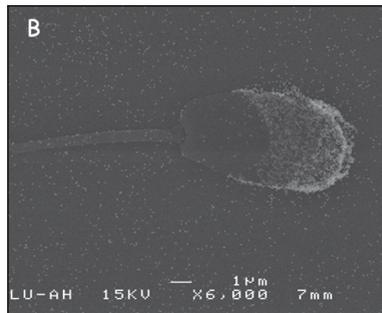
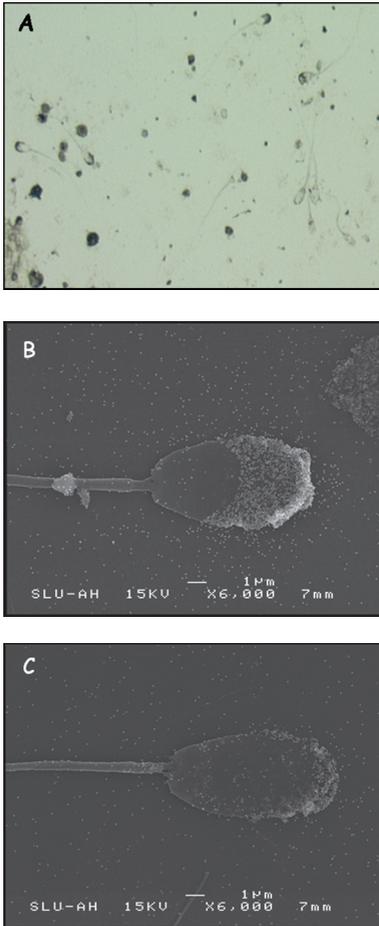


Figura 2. **Microscopía óptica (A) y microscopía electrónica de transmisión (B) de espermatozoides eyaculados. El heterodímetro PSP-I/PSP-II cubre el dominio acrosomal del espermatozoide.**



dose espermatozoides tanto inmunopositivos como inmunonegativos (figura 3A). Cuando los espermatozoides oviductales se evaluaron a nivel del microscopio electrónico de transmisión, también se observaron esas dos subpoblaciones espermáticas. En la primera de ellas aparecía el heterodímetro PSP-I/PSP-II rodeando la región acrosomal del espermatozoide (figura 3B), mientras que en la segunda subpoblación éstos se mostraron inmunonegativos (figura 3C). Como se esperaba, los controles negativos no presentaron agregados en su superficie siendo totalmente inmunonegativos, mientras que los controles positivos estuvieron recubiertos por agregados de plata a lo largo de toda la superficie del espermatozoide.

Figura 3. **Espermatozoides procedentes del oviducto. Microscopía óptica (A) y microscopía electrónica de transmisión mostrando espermatozoides con heterodímero PSP-I/PSP-II sobre el acrosoma (B) o sin heterodímero PSP-I/PSP-II (C).**



DISCUSIÓN

Las espermadhesinas son una familia de glicoproteínas de bajo peso molecular (12-16 kDa) compuestas por entre 109 y 133 aminoácidos y constituidas estructuralmente

por un único dominio CUB que sirve como soporte estructural y al cual se le atribuyen diferentes funciones (Romero y cols., 1997). En el verraco, esta familia está compuesta por 5 miembros: AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I y PSP-II. Bajo condiciones fisiológicas, estas 2 últimas proteínas (PSP-I y PSP-II) forman el heterodímero PSP-I/PSP-II (Calvete y cols., 1995).

La biosíntesis de PSP-I y PSP-II a lo largo de los diferentes tejidos del tracto genital del verraco ha sido estudiada con anterioridad. Ekhlesi-Hundrieser y cols. (2002) demostraron mediante transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) la expresión de ARNm para los monómeros PSP-I y PSP-II en las vesículas seminales, próstata y cola del epidídimo. Sin embargo, la expresión de estas espermadhesinas sobre la superficie del espermatozoide a lo largo de diferentes etapas de su vida (epidídimo, eyaculado y oviducto) no había sido estudiada hasta el momento.

Para evaluar el patrón de unión del heterodímero PSP-I/PSP-II sobre el espermatozoide se produjo un anticuerpo policlonal monoespecífico de conejo contra PSP-II. Estudios realizados con anterioridad (Calvete y cols., 1995) demostraron como la espermadhesina PSP-II se encuentra exclusivamente formando un complejo heterodimérico junto con PSP-I cuando se secreta en el plasma seminal de verraco, mientras que el monómero PSP-I se secreta en mayor cantidad que el PSP-II existiendo de forma libre en el plasma seminal. Por lo tanto, el anticuerpo anti-PSP-II resultaría específico para el heterodímero PSP-I/PSP-II.

El estudio inmunocitoquímico reveló que los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo no presentaban PSP-I/PSP-II adherido en su superficie. Es conocido que el epidídimo es un órgano donde se produce una gran remodelación de la membrana plasmática del espermatozoide tanto en lo que se refiere a proteínas como en lo referente a la

composición lipídica de la misma, alcanzando el espermatozoide la capacidad de fertilizar al ovocito (França y cols., 2005). En la actualidad, se han caracterizado más de 100 proteínas secretadas a lo largo del epidídimo (Syntin y cols., 1996), la mayor parte de esta secreción se produce en la cabeza y cuerpo del epidídimo, secretando la cola del epidídimo solamente un 1% del total de éstas. Algunas de estas proteínas se ha observado como son reabsorbidas o sufren cambios posttranscripcionales poco tiempo después de ser secretadas (Dacheux y cols., 2005). El hecho de que la espermadhesina PSP-I/PSP-II no se localice sobre la cabeza de los espermatozoides recogidos de la cola del epidídimo podría ser debido a una reabsorción de las PSP-I y PSP-II, a que no exista secreción de los monómero PSP-I y PSP-II, o a que ésta sea demasiado baja como para ser detectada (Dacheux y cols., 2005).

En el eyaculado, bajo condiciones fisiológicas, las espermadhesinas se hallan en el plasma seminal en forma de agregados, teniendo estos agregados una capacidad de unión a ligandos diferente a la presentada por las formas monoméricas de las espermadhesinas (Jonáková y cols., 2000). Teniendo en cuenta la biosíntesis y afinidad por los ligandos de las diferentes espermadhesinas, Dostálová y cols. (1995) propusieron un modelo en el cual sugieren que ya en el epidídimo encontraríamos AWN-1 adherido a la membrana plasmática de los espermatozoides. Mientras que tras la eyaculación se unirían moléculas no agregadas de AWN-1 y AQN-3, sobre las cuales se unirían el resto de agregados de espermadhesinas.

Este modelo está en concordancia con los resultados hallados en este trabajo, en el cual no se encontró PSP-I/PSP-II sobre los espermatozoides epididimarios, mientras que al producirse la eyaculación y por lo tanto entrar en contacto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias del verraco, los espermatozoides presentaron sobre su superficie el heterodímetro PSP-I/PSP-II. Cuando se obser-

varon estas muestras al microscopio electrónico de transmisión se vio como el heterodímetro PSP-I/PSP-II se encontraba recubriendo principalmente la superficie acrosomal.

En un trabajo reciente, se ha observado como el heterodímetro PSP-I/PSP-II se encuentra asociado al dominio acrosomal de los espermatozoides altamente diluidos, sufriendo una redistribución a la región postacrosomal para finalmente ser eliminado de la cabeza del espermatozoide tras un largo periodo de incubación (Caballero y cols., 2006). Este patrón de unión del heterodímetro PSP-I/PSP-II sobre la cabeza espermática fue relacionado con su capacidad para mantener la viabilidad, motilidad y actividad mitocondrial de los espermatozoides altamente diluidos (Centurión y cols., 2003; Caballero y cols., 2006). Por lo tanto, una de las funciones del heterodímetro PSP-I/PSP-II podría ser el de formar una cubierta protectora sobre el espermatozoide, la cual los mantendría en un estado de decapitación. Este estado de decapitación se ha visto que es necesario para la formación del reservorio oviductal (Fazeli y cols., 1999).

En los últimos años han aparecido numerosas evidencias que muestran como la unión espermatozoide-oviducto es mediada por carbohidratos (Suarez, 2001). En el porcino parece ser mediada concretamente por residuos de D-manosa (Green y cols., 2001). Aunque en nuestros resultados hemos podido observar la presencia del heterodímetro PSP-I/PSP-II sobre parte de los espermatozoides recogidos del oviducto, este parece no participar de forma importante en la formación del reservorio oviductal, ya que su afinidad tanto por el fluido oviductal como por epitelio oviductal es muy reducida en comparación con el resto de espermadhesinas (especialmente AQN-1) (Ekhlas-Hundrieser y cols., 2005; Liberda y cols., 2006).

El heterodímetro PSP-I/PSP-II parece ser eliminado de la cabeza del espermatozoide cuando estos son sometidos a tratamientos de

capacitación *in vitro*, esta eliminación parece ser anterior a la reacción acrosómica (Caballero y cols., 2004b; Caballero y cols., 2006). Los procesos de capacitación *in vivo* parecen coincidir con la capacidad del espermatozoide de liberarse del reservorio oviductal, lo cual ocurre de manera secuencial (Smith y Yanagimachi, 1991, Yanagimachi, 1994). En trabajos anteriores se ha descrito la presencia de dos subpoblaciones de espermatozoides, tanto capacitados como no capacitados. De igual manera se ha relacionado la integridad de la membrana del espermatozoide con la presencia de éstos en la porción central de la luz del oviducto (los cuales tienen la membrana dañada), o en la profundidad de las criptas, presentando en este caso membranas íntegras (Mburu y cols., 1997; Tienthai y cols., 2004).

Basado en lo anteriormente expuesto, una hipótesis para explicar la presencia en nuestros resultados de las dos subpoblaciones de espermatozoides en el oviducto, con heterodímero PSP-I/PSP-II sobre la cabeza o sin él, sería que en el proceso de lavado se recogieron tanto espermatozoides unidos al epitelio del reservorio oviductal (no capacitados) como aquellos que han sido liberados del reservorio oviductal (capacitados o muertos) y se encuentran bañados en el fluido intraluminal.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el heterodímero PSP-I/PSP-II se une al espermatozoide durante la eyacuación cubriendo su dominio acrosomal, estando su liberación relacionada con cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que se producen previamente a la fecundación y que son necesarios para el reconocimiento espermatozoide-ovocito y la posterior penetración del ovocito por parte del gameto masculino.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por MEC (AGL2001-0471 y BFU 2004-1432) y FORMAS

BIBLIOGRAFÍA

- ASHWORTH P.J.C., HARRISON R.A.P., MILLER N.G., PLUMMER J.M., WATSON P.J. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 173-180.
- CABALLERO I., VÁZQUEZ J.M., CENTURIÓN F., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., PARRILLA I., ROCA J., CUELLO C., MARTÍNEZ E.A. 2004a. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 370-375.
- CABALLERO I., VÁZQUEZ J.M., GIL M.A., CALVETE J.J., ROCA J., SANZ L., PARRILLA I., GARCÍA E.M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., MARTÍNEZ E.A. 2004b. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes *in vitro*? *J. Androl.* 25: 1004-1012.
- CABALLERO I., VÁZQUEZ J.M., GARCÍA E.M., ROCA J., MARTÍNEZ E.A., CALVETE J.J., SANZ L., EKWALL H., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. 2006. Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. *J. Androl.* 27: 766-773.
- CALVETE J.J., MANN K., SCHAFFER W., RAIDA M., SANZ L., TÖPFER-PETERSEN E. 1995. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modification, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett.* 365: 179-182.
- CENTURIÓN F., VÁZQUEZ J.M., CALVETE J.J., ROCA J., SANZ L., PARRILLA I., GARCÍA E.M., MARTÍNEZ E.A. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the

- susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod.* 69: 640-646.
- DACHEUX J.L., CASTELLA S., GATTI J.L., DACHEUX F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63: 319-341.
- DOSTÁLOVÁ Z., CALVETE J.J., SANZ L., TOPFER-PETERSEN E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1200: 48-54.
- DOSTÁLOVÁ Z., CALVETE J.J., TÖPFER-PETERSEN E. 1995. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 376: 237-242.
- EKHLASI-HUNDRIESER M., SINOWATZ F., GREISER DE WILKE I., WABERSKI D., TÖPFER-PETERSEN E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 32-41.
- EKHLASI-HUNDRIESER M., GOHR K., WAGNER A., SOLOVA M., PETRUNKINA A., TÖPFER-PETERSEN E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol. Reprod.* 73: 536-545.
- FAZELI A., DUNCAN A.E., WATSON P.F., HOLT W.V. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.* 60: 879-886.
- FOURNIER-DELPECH S., THIBAUT C. 1993. Acquisition of sperm fertilizing ability. En: *Reproduction in Mammals and Man*, pp. 257-278. Eds. Thibault C., Levasseur M.C., Hunter R.H.F. Ellipses, Paris.
- FRANÇA L.R., AVELAR G.F., Almeida F.F.L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63: 300-318.
- GREEN C.E., BREDL J., HOLT W.V., WILSON P.F., FAZELI A. 2001. Carbohydrate-mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction*. 122: 305-315.
- JONÁKOVÁ V., MANÁSKOVÁ P., KRAUS M., LIBERDA J., TICHÁ M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 275-277.
- KILLIAN G.J., CHAPMAN D.A., ROGOWSKI L.A. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49: 1202-1207.
- LIBERDA J., MANASKOVA P., PRELOVSKA L., TICHÁ M., JONAKOVA V. 2006. Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J. Reprod. Immunol.* 71: 112-125.
- MAXWELL W.M.C., JOHNSON L.A. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 408-418.
- MAXWELL W.M.C., JOHNSON L.A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52: 1353-1362.
- MAXWELL W.M.C., WELCH G.R., JOHNSON L.A. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1165-1178.
- MBURU J.N., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., EINARSSON S. 1997. Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 41: 137-148.
- MENENDEZ M., GASSET M., LAYNEZ J.L., LÓPEZ-ZÚMEL C., USOBIAGA P., TÖPFER-PETERSEN E., CALVETE J.J. 1995. Analysis of the structural organization and

- thermal stability of two spermadhesins. Calorimetric, circular dichroic and Fourier-transform infrared spectroscopic studies. *Eur. J. Biochem.* 234: 887-896.
- PARRILLA I., VAZQUEZ J.M., CUELLO C., GIL M.A., ROCA J., DI BERARDINO D., MARTINEZ E.A. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction.* 128: 615-621.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., SARAVIA F., WALLGREN M., TIENHAI P., JOHANISSON A., VÁZQUEZ J.M., MARTÍNEZ E.A., ROCA J., SANZ L., CALVETE J.J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology.* 63: 514-535.
- ROMERO A., ROMAO M.J., VARELA P.F., KOLLN I., DIAS J.M., CARVALHO A.L., SANZ L., TÖPFER-PETERSEN E., CALVETE J.J. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.* 4: 783-788.
- SMITH T.T., YANAGIMACHI R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 91: 567-573.
- SUÁREZ S.S. 2001. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cell Tissues Organs.* 168: 105-112.
- SYNTIN P., DACHEUX F., DRUART X., GATTI J.L., OKAMURA N., DACHEUX J.L. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol. Reprod.* 55: 956-974.
- TIENHAI P., JOHANISSON A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 131-146.
- TÖPFER-PETERSEN E., ROMERO A., VARELA P.F., EKHLASI-HUNDRIESER M., DOSTÁLOVÁ Z., SANZ L., CALVETE J.J. 1998. Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30: 217-224.
- YANAGIMACHI R.. MAMMALIAN FERTILIZATION. 1994. En: *The Physiology of Reproduction.* 2nd ed, pp. 189 -317. Eds. Knobil E., Neill J.D. New York, Raven Press.
- ZHU J., XU X., COSGROVE J.R., FOXECROFT G.R. 2000. Effects of semen plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. *Theriogenology* 54: 1443-1452.