



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria  
Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina

Estudio de la composición de los gránulos corticales  
y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos  
madurados y fecundados *in vitro*.

María Dolores Saavedra Leos

2009

*Este trabajo experimental ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y el FEDER (AGL2006-03495) y la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (04542/GERM/06).*



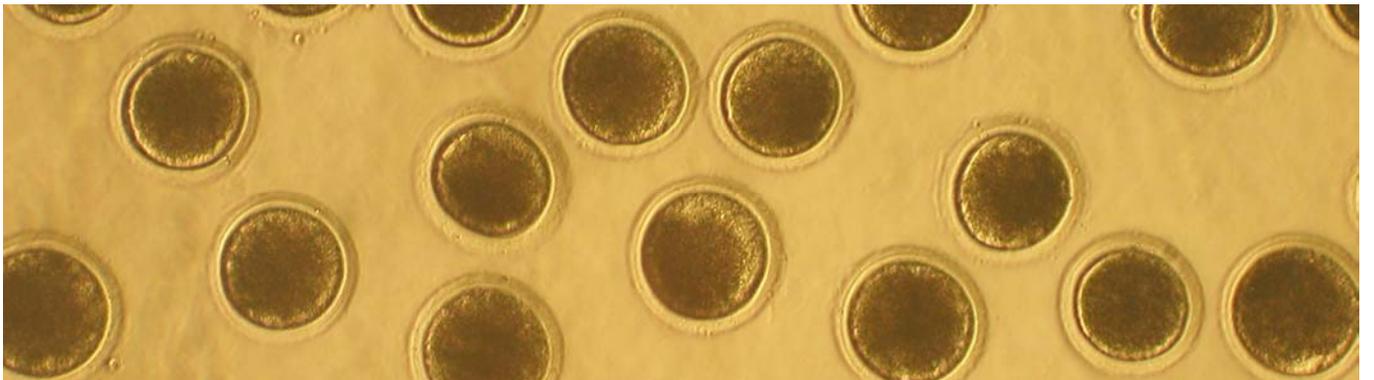
---

<b>5.6. Precipitación del lisado de ovocitos porcinos con las lectinas PNA y WGA .....</b>	<b>73</b>
<b>5.7. Estudio bioquímico de las glicoproteínas con afinidad a las lectinas PNA y WGA precipitadas del lisado obtenido de ovocitos porcinos .....</b>	<b>77</b>
5.7.1. Electroforesis en SDS-PAGE .....	77
5.7.2. Western blot .....	78
5.7.3. Tinción de plata .....	79
5.7.4. Análisis por proteómica de las bandas proteicas de interés ....	80
<b>5.8. Inmunocitoquímica .....</b>	<b>81</b>
5.8.1. Microscopía confocal .....	81
5.8.2. Microscopía electrónica .....	83
<b>5.9. Estudio de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos porcinos y bovinos madurados <i>in vitro</i> .....</b>	<b>85</b>
5.9.1. Síntesis <i>in vitro</i> de ADNc de ovocitos porcinos y bovinos y amplificación mediante PCR de fragmentos correspondientes a ADAM-10 y ADAM-17 .....	85
<b>5.10. Diseño experimental.....</b>	<b>87</b>
5.10.1. Fase experimental 1. Obtención del exudado de GCs porcinos y bovinos mediante interacción de gametos. Efecto del exudado sobre la FIV y la digestión de la ZP porcina .....	87
5.10.2. Fase experimental 2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos .....	88
5.10.2.1. Análisis del contenido del exudado de GCs obtenido mediante la interacción de gametos porcinos mediante proteómica .....	88
5.10.2.2. Análisis del contenido de los GCs de ovocitos porcinos mediante el uso de lectinas PNA y WGA .....	88
5.10.2.3. Análisis de la presencia y localización de las proteínas calreticulina y ER-60 en ovocitos porcinos madurados y fecundados <i>in vitro</i> .....	89
5.10.3. Fase experimental 3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos .....	89
<b>5.11. Análisis estadístico .....</b>	<b>89</b>

---

<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
<b>6.1. Efecto del exudado de los gránulos corticales porcinos y bovinos, obtenido mediante interacción de gametos, sobre la fecundación <i>in vitro</i> y la digestión de la zona pelúcida de ovocitos porcinos .....</b>	<b>94</b>
<b>6.2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos .....</b>	<b>98</b>
<b>6.3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos .....</b>	<b>117</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>7.1. Efecto del exudado de los gránulos corticales porcinos y bovinos, obtenido mediante interacción de gametos, sobre la fecundación <i>in vitro</i> y la digestión de la zona pelúcida de ovocitos porcinos .....</b>	<b>122</b>
<b>7.2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos .....</b>	<b>128</b>
<b>7.3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos .....</b>	<b>140</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>9. ABREVIATURAS .....</b>	<b>145</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>148</b>

# 1. Resumen



## 1. RESUMEN

Desde hace casi 100 años se ha postulado que durante la fecundación en mamíferos se presentan diferentes procesos regulados por una gran variedad de proteínas localizadas tanto en el espermatozoide como en el ovocito. El ovocito, presenta síntesis de proteínas destinadas a estructuras como la zona pelúcida (ZP), el oolema y los gránulos corticales (GCs) y esta síntesis es mayor o menor dependiendo del estadio de maduración ovocitaria. Las proteínas localizadas en el oolema, ZP y GCs regulan procesos claves como el reconocimiento entre gametos, en el que están implicadas glicoproteínas de la ZP y proteínas tipo lectinas del espermatozoide; la fusión de gametos, en la que se presenta la interacción ligando-receptor de proteínas del oolema del ovocito y espermatozoide; y por último el bloqueo de la polispermia, proceso en el que participan proteínas de la ZP, oolema y GCs. Está ampliamente descrito que las moléculas liberadas de los GCs durante la fecundación o activación ovocitaria, mediante estimulación química o eléctrica, producen importantes modificaciones particularmente en la ZP, el espacio perivitelino y, probablemente, el oolema del ovocito. En la actualidad, el conocimiento sobre el contenido de los GCs y las proteínas del oolema, así como su papel durante la fecundación, en la especie porcina es escaso. La mayoría de la información que se tiene en la actualidad se ha obtenido a partir del modelo murino. En la presente Tesis Doctoral investigamos sobre el contenido proteico de los GCs en ovocitos porcinos así como la presencia de metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en el oolema de ovocitos porcinos y bovinos. Para ello, este estudio se dividió en tres apartados:

**I.** Se evaluó el efecto del contenido de los GCs porcinos y bovinos, obtenido mediante interacción de gametos, sobre la fecundación *in vitro* (FIV) y el endurecimiento de la ZP de ovocitos porcinos. Puesto que tras la interacción del espermatozoide con el oolema del ovocito maduro se produce la exocitosis de los GCs (reacción cortical), se realizó una interacción de gametos utilizando ovocitos libres de ZP. Durante la interacción de los gametos se produce la reacción cortical y el contenido de los GCs se libera al medio de cultivo, que es utilizado como fuente de exudado de GCs de la especie porcina y bovina. Este exudado se empleó para analizar su contenido proteico y para incubar ovocitos porcinos observando su efecto sobre la FIV y ZP.

Los resultados obtenidos en este primer apartado indican que el medio de cultivo que contiene el exudado de los GCs de ovocitos porcinos y bovinos disminuye la penetración (%PEN) y el número de espermatozoides unidos a la ZP (%SPZ-ZP), y produce un aumento en la monospermia (%MONO) en ovocitos porcinos durante la FIV comparado con el control. Cabe destacar que los resultados antes mencionados fueron mucho más evidentes cuando los ovocitos porcinos se incubaron con el exudado de los GCs bovinos comparado con el exudado de los GCs de la especie porcina y el grupo control (%PEN: 43´5, 84´0, 98´3 respectivamente), (%SPZ-ZP: 52´5, 66´4, 95´0 respectivamente), (%MONO: 69´9, 12´8, 6´5 respectivamente). Sin embargo, la incubación con el exudado no afectó al tiempo de digestión de la ZP, que fue similar en todos los grupos, en torno a 1 min y medio. Estos resultados sugieren que tanto el contenido de los GCs porcinos como bovinos tiene una función en el bloqueo de la polispermia en la especie porcina y que este efecto no parece deberse a un endurecimiento de la ZP.

**II.** Se realizó un análisis de las posibles moléculas existentes en los GCs de la especie porcina. Para ello, el estudio de los GCs se abordó de distintas maneras. Por un lado, el medio de cultivo obtenido en la primera fase experimental se separó mediante electroforesis de SDS-PAGE y se analizó por proteómica, encontrando que en este medio están presentes proteínas de menos de 40 kDa, entre las que se pudieron identificar las proteasas tripsina-4 y tripsina V-A. Por otro lado, se estudiaron glicoproteínas en los GCs que sean reconocidas por las lectinas PNA y WGA mediante microscopía electrónica de transmisión. A partir del lisado de ovocitos porcinos madurados *in vitro* se realizó un análisis bioquímico mediante Western blot y proteómica de las bandas reactivas a la lectina PNA. Los resultados obtenidos muestran que las lectinas PNA y WGA tienen afinidad por componentes de los GCs y presentan una distribución heterogénea entre GCs. En el lisado de ovocitos porcinos existen glicoproteínas con afinidad a PNA de 120, 100, 80, 65 y 55 kDa aproximadamente; para WGA, glicoproteínas de 180 y 15 kDa aproximadamente, y una banda continua de 85 a 50 kDa aproximadamente. Mediante análisis por proteómica del lisado de ovocitos porcinos precipitado con PNA se identificó la proteína chaperona Hsp-70 (Hsp-70 proteína 1A) y la proteína ER-60, así como glicoproteínas de la ZP (ZP3 y ZP4).

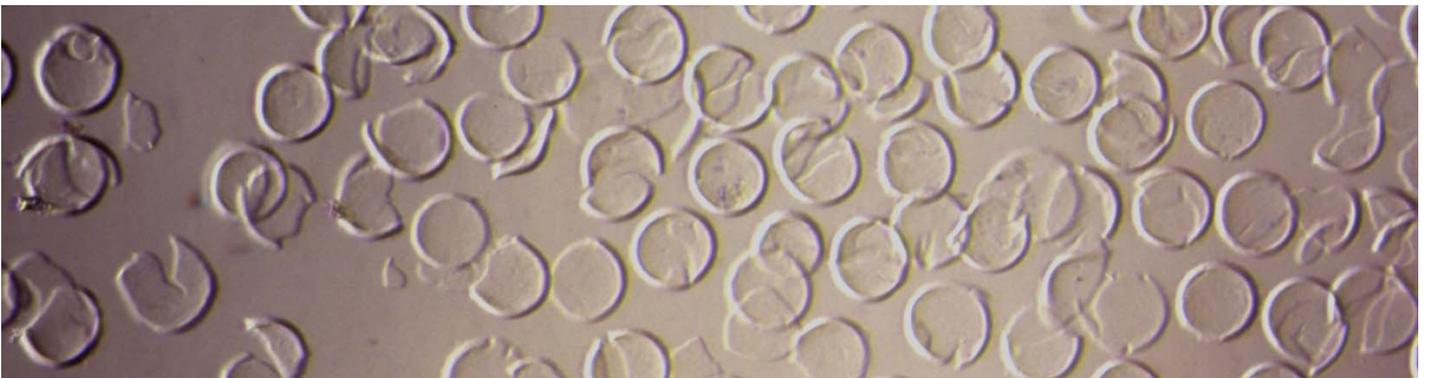
También se analizó mediante microscopía confocal la proteína ER-60 localizándose en la región cortical de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* y permeabilizados. Sin embargo, la proteína ER-60 no se identifica en ovocitos maduros no permeabilizados, indicando así que esta proteína no está localizada en el oolema limitándose su localización a la región cortical del ovocito. Esta inmunorreactividad se mantuvo en ovocitos fecundados permeabilizados y no permeabilizados. Esto indicaría que ER-60 es secretada por los GCs tras la fecundación y continúa presente probablemente debido a su interacción con proteínas del oolema.

Finalmente se estudió la localización de la proteína calreticulina en ovocitos porcinos. En nuestros resultados encontramos que esta proteína se localiza en la región cortical de ovocitos porcinos maduros, al igual que ER-60, pero a diferencia de ésta, la inmunorreactividad para calreticulina desaparece en ovocitos fecundados. Esto indicaría que calreticulina es secretada por los GCs tras la fecundación.

En conjunto, los resultados de este segundo apartado muestran que los GCs de los ovocitos porcinos probablemente contengan proteasas tipo tripsina, así como glicoconjugados afines a la lectinas PNA y WGA. Por otro lado, la presencia de las proteínas ER-60 y calreticulina en la región cortical de los ovocitos porcinos maduros está relacionada con los GCs.

**III.** Por último, se realizó un estudio de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos porcinos y bovinos madurados *in vitro*. Se encontró que los ovocitos de ambas especies expresan el gen que codifica para estas metaloproteasas y mediante inmunofluorescencia se determinó que están localizadas en el oolema de ovocitos porcinos y bovinos.

## 2. Summary



## 2. SUMMARY

For almost 100 years it has been postulated in mammals that fertilization involves many different events regulated by a great variety of proteins located both in the spermatozoon such as in the oocyte. The oocyte displays protein synthesis destined to structures like the zona pelucida (ZP), the oolemma and the cortical granules (GCs) and this synthesis is greater or smaller according to the stage of oocyte maturation. The proteins located in oolemma, ZP and GCs regulate key processes like the recognition between gametes in which glycoproteins of the ZP and lectin-like proteins from the sperm are involved; fusion of gametes, in which it appears the ligand-receptor interaction between proteins of oolemma and spermatozoon; and finally the block to polyspermy, process in which participate proteins of the ZP, oolemma and GCs. It is widely described that the release of molecules contained in the GCs during the fertilization or oocyte activation, by means of chemical or electrical stimulation, produces important modifications particularly in the ZP, the perivitelline space and, probably, oolemma of the oocyte. The knowledge about the content of GCs and the composition of proteins of oolemma as well as their behavior during the fertilization in the pig species is scarce and the majority of the current information about this topic has been obtained from the murine model. In the present Doctoral Thesis we investigated the presence of possible proteins of the GCs in pig oocytes as well as the presence of metalloproteases ADAM-10 and ADAM-17 in oolemma of pig and bovine oocytes. For that, this study was divided into three sections:

**I.** It was evaluated the effect of the content obtained from the GCs, by means of porcine and bovine gametes interaction, on the *in vitro* fertilization (IVF) and ZP hardening of pig oocytes. Since the exocytosis of the GCs takes place after the interaction of the spermatozoon with the oolemma of the mature oocyte, an interaction of gametes was performed by using ZP-free oocytes. During the gametes interaction, the cortical reaction occurs and the content of the CGs is released to the culture medium. So, this exudate was used as a source of pig and bovine CGs-derived proteins. This exudate was also used to analyze its protein content and for incubating pig oocytes studying on one hand the resistance of the ZP to the digestion with protease and, on the other, its effect on the results of porcine IVF.

Results obtained in this first section indicate that the culture medium containing the CGs exudate from pig and bovine oocytes diminishes the penetration rate (%PEN), the mean number of spermatozoa per penetrated oocyte and the mean number of spermatozoa bounded to the ZP (%SPZ-ZP), and it increases the monospermy rate (%MONO) in pig oocytes during the IVF compared to the control group. It is worthwhile to emphasize that the effect on the IVF parameters mentioned above were much more evident when the pig oocytes were incubated with the CGs exudate obtained from bovine oocytes instead of the one obtained from porcine oocytes or the absence of incubation (% PEN: 43.5, 84.0 and 98.3 respectively), (%SPZ-ZP: 52.5, 66.4, 95.0 respectively), (%MONO: 69.9, 12.8, 6.5 respectively). Nevertheless, the incubation with the CGs exudate did not affect the digestion time of the ZP that was similar in all the groups suggesting that the content of the CGs both from pig and bovine oocytes has a function in the block to polyspermy in the pig species and that this effect does not seem to be due to a ZP hardening.

**II.** It was done an analysis of possible existing molecules in the porcine GCs and this study of the CGs was approached in two different ways. On one hand the culture medium obtained in first experiment was separated by means of SDS-PAGE electrophoresis. Bands were cut and analyzed by proteomics finding that there are present proteins with molecular weight smaller than 40 kDa being identified the proteases trypsin-4 and trypsin V-A.

On the other hand studying glycoproteins contained in the GCs that are recognized by PNA and WGA lectins by means of transmission electronic microscopy. We obtained the lysate from in vitro matured pig oocytes and it was studied by biochemical analysis by means of Western-blot and proteomics of the bands reacting against PNA lectin. The obtained results show that PNA and WGA lectins have affinity towards GCs components in pig oocytes. In the lysate from pig oocytes there are glycoproteins with affinity to PNA and with molecular weight of 55, 65, 80, 100 and 120 kDa approximately and, for WGA, glycoproteins of 180 and 15 kDa approximately, and one continuous band from 85 to 50 kDa approximately. By means of proteomics of the lysate from pig

oocytes precipitated with PNA the chaperone protein Hsp-70 (Hsp-70 protein 1A) were identified as well as the ER-60 protein and ZP glycoproteins (ZP3 and ZP4).

ER-60 protein was also studied by means of confocal microscopy being located in the cortical region of permeabilized mature pig oocytes. However, ER-60 protein was not identified in matured oocytes non permeabilized thus indicating that this membrane protein is not located at the oolema but in the cortical region of the oocyte. This immunoreactivity was kept in fertilized oocytes.

Finally the location of the protein calreticulin in pig oocytes was studied. In our results we found that this protein is located in the cortical region of mature pig oocytes, like ER-60, but unlike this one the immunoreactivity for calreticulin disappeared in fertilized oocytes.

These results show that the pig GCs probably contain trypsin-like proteases as well as affine molecules to PNA and WGA lectins. On the other hand the presence of the proteins ER-60 and calreticulin in the cortical region of the mature pig oocytes could be related to the GCs, in particular calreticulin whose immunoreactivity disappears in fertilized oocytes.

**III.** A study of metalloproteases ADAM-10 and ADAM-17 was realized in pig and bovine matured oocytes. It was observed that mature pig and bovine oocytes express the gene that codifies for these metalloproteases and, by means of immunofluorescence, it was determined that they are located in the oolema of oocytes from both species.

### 3. Introducción y Objetivos



### 3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La interacción entre el espermatozoide y el ovocito involucra diferentes procesos que culminan en la fecundación, comenzando por la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP), la inducción de la reacción acrosómica, la penetración de la ZP, la fusión de membranas (espermatozoide-ovocito), la reacción cortical en el ovocito y, finalmente, la activación nuclear que lleva a la formación del cigoto (Yanagimachi, 1994a). La mayoría de estos eventos son mediados por proteínas localizadas tanto en el espermatozoide como en el ovocito cuya expresión puede ser la diferencia entre una exitosa fecundación o un fallo de ésta (Myles *et al.*, 1984; Primakoff *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2000; Evans, 2002). Por esta razón, una de las principales funciones del ovocito es la síntesis y almacenamiento de proteínas para su uso durante la fecundación y embriogénesis temprana. Para esta tarea, el ovocito ha desarrollado diferentes compartimentos en los que almacena proteínas que son destinadas a los gránulos corticales (GCs), el oolema y la zona pelúcida (Alliegro *et al.*, 1992) y que son utilizadas antes, durante y después de la fecundación. Por ejemplo, la ZP es una estructura formada por glicoproteínas que son sintetizadas durante las etapas tempranas del desarrollo ovocitario y tendrán un papel fundamental en el momento de la fecundación y durante las etapas tempranas de desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1994a; Wassarman, 1999). Mientras, las proteínas que son sintetizadas y almacenadas para dar origen a los GCs (Wessel *et al.*, 2001) y al oolema participarán en procesos claves durante la fecundación como el bloqueo de la polispermia y el desarrollo embrionario (Liu *et al.*, 2005).

Las proteínas almacenadas en los GCs y presentes en el oolema tienen un papel fundamental en el bloqueo de la polispermia. *In vivo* el bloqueo de la polispermia en mamíferos es regulado por dos sistemas. Uno es el tracto reproductor de la hembra, que reduce el número de espermatozoides que accederán al ovocito (Hunter 1990, 1991) y permite la incorporación a la ZP de moléculas como la oviductina (Broermann *et al.*, 1989; Coy *et al.*, 2008a). El segundo sistema es la exocitosis de los gránulos corticales, llamada reacción cortical (Abbott y Ducibella. 2001), y que modifica la ZP (reacción de zona). La fecundación *in vivo* en la mayoría de las especies incluyendo la porcina y bovina

no presenta niveles importantes de polispermia. Sin embargo, en los sistemas *in vitro* se observa que el índice de polispermia aumenta y por ejemplo en la especie bovina se acerca al 10% (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki y Nakahara 1990; Kawarsky *et al.*, 1996), mientras que en la especie porcina se puede alcanzar hasta un 65% (Wang *et al.*, 1998c; Coy y Romar 2002). En la especie porcina, la polispermia es un problema común y aún sin resolver en los sistemas de fecundación *in vitro* (Coy y Romar 2002; Hao *et al.*, 2006).

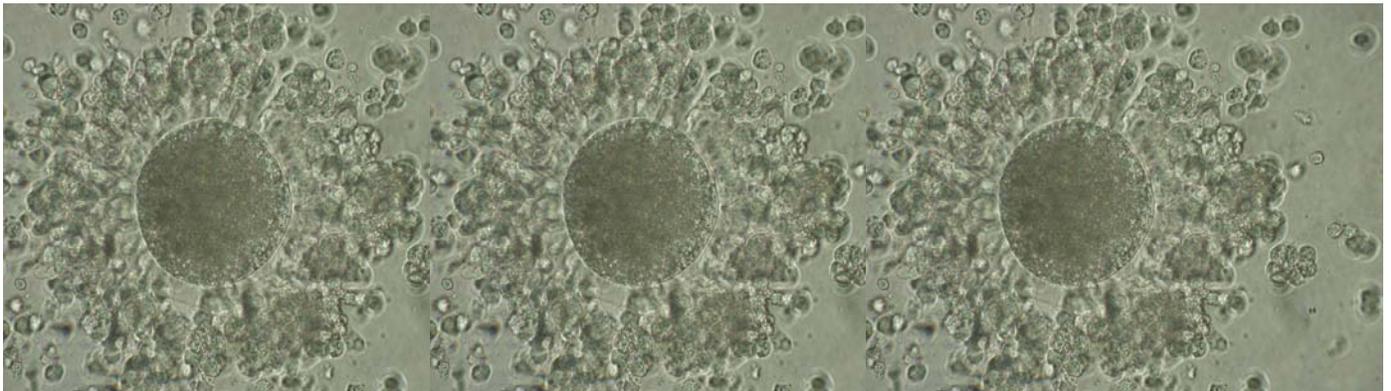
Cran y Cheng (1986) indican que en la especie porcina el número y naturaleza de la exocitosis de los GCs es diferente entre ovocitos fecundados *in vitro* comparados con los *in vivo*, siendo más eficiente en este último caso. Otros autores atribuyen esta diferencia en la exocitosis de los GCs a la presencia de las secreciones oviductales que *in vivo* estarían en contacto con el ovocito (Kim *et al.*, 1996). Lo cierto es que la ausencia o fallo de la reacción cortical *in vitro* deja desprovisto al ovocito de uno de los mecanismos de bloqueo de la polispermia.

Debido a que las técnicas de producción de cerdos clonados y transgénicos requieren ovocitos maduros y cigotos respectivamente, existe un creciente interés en la producción de ovocitos maduros y embriones porcinos a gran escala, mediante técnicas de maduración y fecundación *in vitro*, con el fin de ser empleados en el campo de la investigación básica y biomédica. Por lo tanto, el interés que despierta la tecnología de la reproducción en el área de la medicina, aumenta la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías así como la mejora de las existentes. Para finalmente aumentar, el número de embriones porcinos producidos *in vitro*, primero es necesario resolver o al menos reducir notablemente, el problema de la polispermia en esta especie. El estudio de las proteínas contenidas en los GCs y oolema implicadas en este mecanismo requiere una mayor atención con la finalidad de poder aportar alternativas que den solución al problema de la polispermia en la especie porcina.

Tras lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se ha planteado con el objetivo de estudiar proteínas contenidas en los GCs y oolema de ovocitos porcinos y bovinos.

1. Estudiar el efecto del exudado de los GCs obtenido mediante interacción de gametos de las especies porcina y bovina sobre la FIV y endurecimiento de la ZP de ovocitos porcinos.
2. Estudiar las moléculas liberadas al medio de cultivo tras la interacción de gametos porcinos.
3. Estudiar las glicoproteínas contenidas en los GCs porcinos utilizando las lectinas PNA y WGA.
4. Estudiar las proteínas ER-60 y calreticulina en ovocitos porcinos antes y después de la fecundación.
5. Estudiar la presencia de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en el oolema de ovocitos porcinos y bovinos.

## 4. Revisión Bibliográfica



## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Cada una de las estructuras del **ovocito** y el **espermatozoide** tienen un papel fundamental durante la fecundación y posterior desarrollo embrionario, que involucran procesos celulares en muchos casos exclusivos de los gametos. Las proteínas localizadas en el espermatozoide, zona pelúcida (ZP), oolema y gránulos corticales (GCs) del ovocito participan en procesos de reconocimiento entre gametos, fusión de membranas y bloqueo de la polispermia. Para entender el origen de nuevos organismos y la conservación de las especies es importante el estudio individual de la función de cada uno de los procesos que se presentan en los gametos así como su regulación.

Esta investigación se centra en el estudio del contenido de los GCs, así como en el análisis de metaloproteasas del oolema.

### 4.1. Gametos

Los gametos presentan complejos procesos que los preparan para la fecundación y posterior desarrollo embrionario. Cada uno de estos cambios involucra moléculas (proteínas, enzimas, iones, hormonas, etc) que, de forma sincronizada o individual, tienen un papel fundamental en los mismos. En este apartado describiremos los procesos moleculares que preparan al ovocito y espermatozoide para una futura fecundación.

#### 4.1.1. Ovocito de mamífero

##### 4.1.1.1. Crecimiento del ovocito y del folículo

El ovocito y el folículo sufren un periodo de crecimiento que se caracteriza por una fase de intensa síntesis proteica y almacenamiento de moléculas como agua, iones, carbohidratos y lípidos (Moor *et al.*, 1990). En la especie porcina, al igual que en los primates y los rumiantes, el crecimiento del ovocito se inicia durante el periodo prenatal (Black y Erickson, 1968; Bielanska-Osuchowska, 2006). En esta etapa, las **células primordiales germinales (CPGs)** tienen su origen extragonadal en la pared del saco vitelino a partir de células somáticas

que tienen el potencial de convertirse en células germinales (Kelly, 1977). Antes de que las CPGs migren hacia el borde genital se dividen mediante mitosis, manteniendo esta actividad durante todo el proceso de migración (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998). En la especie porcina, la división mitótica de las CPGs se observa a partir del día 13 de vida embrionaria y continúa hasta el día 7 después del nacimiento (Black y Erickson, 1968). Una vez establecidas las CPGs en el ovario, se diferencian en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas.

Las **ovogonias** situadas en la periferia del ovario son más grandes que las CPGs, presentan un núcleo vesicular central con 1-3 nucleolos reticulados y un citoplasma escaso de aspecto claro y pocas organelas (Adams y Hertiga, 1964; Bielanska-Osuchowska, 2006; Sathananthan *et al.*, 2006). Durante el desarrollo fetal, las ovogonias sufren un proceso de diferenciación y sucesiva división mitótica hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios (Bielanska-Osuchowska, 1974; Bukovsky *et al.*, 2004).

Las ovogonias se diferencian a **ovocitos primarios** mediante la primera división meiótica en la que tiene lugar la reducción del número de cromosomas a estado haploide. Este proceso tiene lugar en el folículo primordial en el que se lleva a cabo el primer paso de la meiosis I que incluye la replicación del ADN y el arresto en el estadio de diploteno de la profase I (estado de dictiatio) en lo que se conoce como primera detención de la meiosis (Adams y Hertiga, 1964; Jamnongjit y Hammes, 2005). La detención meiótica del ovocito primario está regulada por señales inhibitoras. Una de las moléculas intracelulares más importantes, responsables de mantener el arresto meiótico es el AMPcíclico que, dentro del ovocito, parece actuar como un inhibidor de la maduración, aparentemente a través de la activación de las proteínas kinasas (Conti *et al.*, 2002). El ovocito primario se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente e irregular que recibe el nombre de vesícula germinal (VG), así como por la agregación de organelas celulares compuestas predominantemente por mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas y microtúbulos. La meiosis iniciada por el ovocito primario y detenido en la profase I, no se reanuda hasta que el folículo se desarrolle totalmente y se produzca la ovulación durante la pubertad,

por lo que dependiendo de la especie el ovocito puede permanecer en detención meiótica durante semanas o años (Canipari, 1994).

Los ovocitos primarios se encuentran en el interior de los **folículos primordiales en reposo** que no tienen capacidad de crecer, aunque son metabólicamente activos. En la especie porcina, la población de folículos primordiales al nacer es de aproximadamente 500.000 (Black y Erickson, 1968) y disminuye mediante procesos de apoptosis hasta 420.000 en la pubertad (Gosden y Telfer, 1987). Al final, la cerda contará con unos 200.000 folículos primordiales por ovario durante su etapa reproductiva (Moor *et al.*, 1990).

Tras el nacimiento del individuo, los folículos primordiales presentan un crecimiento basal lento con cada ciclo ovárico y una activación progresiva, que se inicia con la proliferación de las células de la granulosa. Cuando el ovocito se ha rodeado completamente por células de la granulosa cúbicas, los folículos primordiales se transforman en **folículos primarios** (Moor *et al.*, 1990). En este momento la expresión de tres genes (Nobox, Sohlh I y Lhx8) específicos de los ovocitos de mamíferos, son esenciales para la transición de folículo primordial a primario (Suzumori *et al.*, 2002; Pangas *et al.*, 2004, 2006), así como diferentes factores secretados por el ovocito y las células foliculares (Picton, 2001; Picton *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). A pesar de que la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona leutinizante (LH) tienen influencia sobre estos factores en las etapas posteriores de la foliculogénesis, la transición de folículo primordial a primario es independiente de estas gonadotropinas (Buccione *et al.*, 1990; Fortune, 2003).

En el folículo primario, entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa adyacentes, se originan espacios en los que se deposita un tipo de material fibrilar que representa el inicio de la formación de la ZP (Tetzlauer *et al.*, 1998; Sinowatz *et al.*, 2001). También ocurre un aumento del tamaño del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al **folículo secundario**. En los folículos secundarios de las especies porcina, bovina, humana y murina se han identificado factores responsables del desarrollo folicular y ovocitario como el GDF9 (factor de crecimiento y diferenciación 9) específico del ovocito, y el factor BMP15 (proteína morfogénica ósea 15), ambos están asociados con la proliferación de células de la

granulosa (Dong *et al.*, 1996; Dube *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito que la expresión de GDF9 y BMP15 en ovocitos porcinos varía dependiendo del estadio de maduración (Li *et al.*, 2008).

La continua proliferación de las células de la granulosa, regulada en gran medida por los factores GDF9 y BMP15, lleva a la producción y acumulación intrafolicular de fluido y en respuesta a la FSH se forma la cavidad antral repleta de fluido folicular. Este fluido, mayoritariamente exudado del plasma, contiene moléculas secretadas por el ovocito y las células foliculares como glucosaminoglicanos y hormonas fijadoras de esteroides producidas por las células de la granulosa (Canipari, 1994; Kezele *et al.*, 2002). Cuando en el folículo secundario se ha formado la cavidad antral se denomina **folículo terciario**, antral o de Graaf, y alcanza un diámetro aproximadamente de 2´2mm en la especie porcina (Motlik *et al.*, 1984).

En el folículo terciario, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten el folículo formando un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; por otra, las células del *cumulus oophorus* que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994; Kezele *et al.*, 2002). Las células del cúmulus desarrollan procesos citoplasmáticos atravesando la zona pelúcida y forman zonas de contacto con la membrana plasmática del ovocito mediante uniones tipo gap (Eppig y O'Brien, 1996; Tanghe *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 2002). Estas uniones facilitan el abastecimiento de nutrientes y el aporte de pequeñas moléculas reguladoras para el ovocito procedentes de las células de la granulosa en un proceso de cooperación metabólica (Canipari, 1994). El crecimiento del ovocito va unido a un aumento en el número de orgánulos citoplasmáticos como las mitocondrias y el aparato de Golgi (Sathananthan *et al.*, 2006). Toda esta maquinaria celular indica una elevada actividad metabólica permitiendo la síntesis y almacenamiento de proteínas, enzimas y, durante la última etapa de crecimiento ovocitario, el desarrollo de redes de microtúbulos y filamentos.

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa de desarrollo experimentan atresia mientras otros siguen desarrollándose para convertirse en

folículos maduros, también llamados folículos dominantes, que serán seleccionados para continuar su crecimiento. La selección de los folículos que producirán ovocitos maduros listos para ovular está determinada por los receptores de LH y FSH localizados en las células de la granulosa. Justo después del pico preovulatorio de LH, los folículos seleccionados comienzan un rápido crecimiento como resultado de la acumulación de fluido folicular en el antro. Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular modifican el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y de la teca, y preparan al ovocito para la maduración nuclear y citoplasmática (McGee y Hsueh, 2000).

#### **4.1.1.2. Maduración del ovocito**

El proceso de maduración ovocitaria comprende la maduración nuclear y citoplasmática durante las que se presentan cambios cuyo fin es preparar al ovocito para la fecundación y posterior desarrollo embrionario.

La maduración del ovocito es activada por el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de la LH. El pico de LH promueve una serie de acontecimientos de diferenciación que incluyen alteraciones específicas de la esteroidogénesis folicular, cambios en el complejo cúmulus-ovocito, eliminación de una o más sustancias inhibitorias de la maduración, así como la activación de ciclinas, fosfatasa y kinasas que son requeridas para la maduración nuclear y por tanto para la reanudación de la meiosis (Motlik *et al.*, 1986; Moor *et al.*, 1990; Hunter, 2000; Moor y Dai, 2001).

La reanudación de la meiosis es precedida por un aumento en los niveles de AMPc (Gilula *et al.*, 1978), lo que parece estar en contradicción con su actuación en el manteniendo del bloqueo meiótico en el ovocito. Esto se explica por el doble papel que desempeña el AMPc durante la regulación de la meiosis. Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, para mantenerlo en arresto meiótico puesto que el ovocito no es capaz de producir AMPc a los niveles necesarios. Sin embargo, a partir de la adquisición de receptores para la LH en las células del cúmulus y la granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio

de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc. Estas elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes regulan la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo gap ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/defosforilación se producen cambios en la conformación de la conexina 43 que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células (Gilula *et al.*, 1978). Este fenómeno, conocido como expansión o mucificación del cúmulus (Eppig, 1979), se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas. Bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cúmulus hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración (MPF), permitiendo de esta forma que se active el MPF y continúe la reanudación de la meiosis, así como un importante incremento en la actividad kinasa en el citosol del ovocito.

El MPF, también conocido como p34cdc2, es una de las moléculas con principal actividad kinasa en el citosol del ovocito. El MPF es una serina-treonina proteín kinasa sintetizado durante la fase de crecimiento del ovocito y está involucrado en la regulación del ciclo celular. La activación del MPF desencadena una serie de reacciones que llevan a la disolución de la membrana nuclear, en un proceso conocido como "ruptura de la vesícula germinal", así como a la formación del huso mitótico y condensación de la cromatina, alcanzándose así el estadio nuclear de metafase I (MI) (Masui y Markert, 1971; Dekel, 1996; Hunter, 2000). En el ovocito en MI la membrana nuclear ha desaparecido y los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso mitótico.

Durante la progresión meiótica tienen lugar la anafase I, caracterizada por la migración de los cromosomas hacia el huso; la telofase I, en la que los cromosomas alcanzan las regiones polares y se forma el primer corpúsculo polar (que continúa pegado al huso); la profase II, que es una etapa de corta duración difícilmente evidente y, finalmente, la metafase II (MII) en la que los cromosomas se sitúan en el ecuador del huso. Los ovocitos en MII presentan elevados niveles de MPF y MAP kinasas (proteín kinasa activadas por mitógenos) que mantienen los ovocitos detenidos en MII en lo que se conoce como segunda detención meiótica. En ovocitos porcinos, después de la fecundación o activación

partenogénica, la actividad de MPF y MAP kinasas disminuye y se completa la meiosis II (Kikuchi *et al.*, 1995).

En el ovocito, de forma paralela a la maduración nuclear, también acontece la maduración citoplasmática que implica una redistribución de organelas como las mitocondrias que migran para situarse en una posición perinuclear. Las mitocondrias tienen una morfología característica en los ovocitos siendo esféricas u ovaladas y con un estroma muy denso (Thibault *et al.*, 1987). Mientras, los gránulos corticales también migran pero en este caso hacia la periferia del ovocito situándose por debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Cran, 1985). Esta situación de proximidad al oolema les permitirá liberar su contenido al espacio perivitelino tras la reacción cortical. En el apartado 4.1.2 estudiaremos más en profundidad estas organelas.

La maduración citoplasmática también implica una reprogramación de la síntesis de proteínas, por lo que parte del ARN mensajero almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide. Entre estas proteínas se encuentra el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, que será esencial para la formación de este pronúcleo tras la penetración del espermatozoide (Moor *et al.*, 1990).

#### **4.1.1.3. Ovulación**

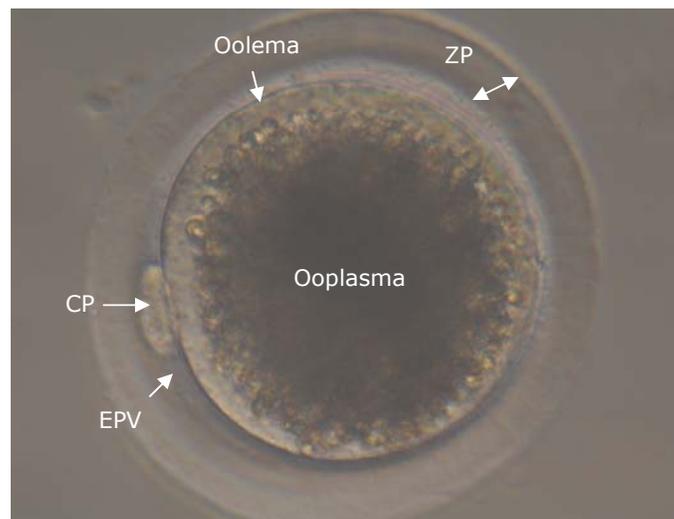
La ovulación en mamíferos es desencadenada por el pico preovulatorio de LH que está regulado por niveles adecuados de estradiol producidos por los folículos preovulatorios (Stroband *et al.*, 1986). En la especie porcina, la ovulación tiene lugar 36-40h después del inicio del estro, tomando el pico preovulatorio de LH como día cero del ciclo estral, y dura de 1 a 3h (Geisert, 1999). Los folículos preovulatorios en la especie porcina tienen un tamaño de 7 a 11mm de diámetro y, momentos antes de la ovulación, sus tensas paredes se vuelven flácidas como consecuencia de una disminución de la presión intrafolicular y los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) se desligan de la pared folicular (Hunter, 1967; Bolamba y Sirard, 2000). Los ovocitos se liberan del

folículo preovulatorio como **ovocitos secundarios**, en estadio de metafase II, con el primer corpúsculo polar extruído en el espacio perivitelino y rodeados por las células del cúmulus y líquido folicular viscoso. El número de ovocitos liberados durante la ovulación en la especie porcina es variable y oscila entre 10 y 24 (Geisert, 1999).

#### 4.1.1.4. Características morfológicas del ovocito maduro

El ovocito maduro de hembras de mamífero es una de las células más grandes del organismo (100-120 $\mu\text{m}$  de diámetro) y en la cerda en particular tiene un diámetro de 120 $\mu\text{m}$  (Morbeck *et al.*, 1992). Está rodeado por una capa extracelular transparente compuesta por una matriz de glicoproteínas denominada zona pelúcida (ZP), que rodea el ooplasma del ovocito que cuenta con su propia membrana celular (oolema). Entre el oolema y la ZP existe un espacio virtual denominado espacio perivitelino (EPV) en el que se localiza el primer corpúsculo polar (CP) del ovocito en MII. Cada una de estas estructuras del ovocito tienen un papel fundamental durante la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Figura 1).

**Figura 1.** Descripción esquemática de la morfología del ovocito maduro. Ovocito porcino madurado *in vitro* (Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia). CP: corpúsculo polar; EPV: espacio perivitelino; ZP: zona pelúcida.



La **zona pelúcida** (ZP) de los ovocitos de mamíferos tiene un grosor de 1 a 25µm y un contenido de 1-33ng de glicoproteínas dependiendo de la especie (Wassarman, 1988). Por ejemplo, la ZP porcina tiene un grosor de 16µm y un contenido de 30 a 33ng de glicoproteínas (Nakano y Yonezawa, 2001). En general, la ZP presenta una estructura amorfa, elástica, permeable a anticuerpos, enzimas y pequeños virus y con un aspecto de entramado fibrilar. Estas fibras o filamentos están formados por distintas glicoproteínas (Wassarman y Mortillo, 1991). Inicialmente, las distintas glicoproteínas de la ZP de mamíferos se clasificaron como ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassarman, 1980a). Sin embargo, en especies como la porcina (Hedrick y Wardrip, 1986) o la bovina (Noguchi *et al.*, 1994) no está presente la ZP1 aunque en ambas especies también se ha descrito la presencia de tres glicoproteínas nombradas como ZP2, ZP3 y ZP4. Recientemente en la ZP de ovocitos humanos, de rata, de macaco coronado y de hámster se han caracterizado 4 glicoproteínas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Lefievre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009).

Las glicoproteínas que componen la ZP están glicosiladas de forma heterogénea con oligosacáridos tipo asparragina (N-unidos) y serina-treonina (O-unidos). Los polipéptidos que conforman las glicoproteínas de la ZP tienen un péptido señal N-terminal, un dominio ZP, un péptido carboxi terminal con un sitio de corte furina y un dominio transmembranal (Jovine *et al.*, 2002). Estas glicoproteínas que forman la ZP de mamíferos son sintetizadas y secretadas continuamente durante el desarrollo del ovocito. De esta forma, la ZP incrementa su grosor a medida que incrementa el diámetro de los ovocitos (Wassarman, 1988). Dependiendo de la especie, la síntesis de las glicoproteínas está asociada con el citoplasma del ovocito y/o las células foliculares (Sinowitz *et al.*, 2001). Así pues, en la especie porcina la ZP4 se expresa tanto en el ovocito como en las células de la granulosa, al igual que ocurre con la ZP3 bovina (Kolle *et al.*, 1998). Sin embargo, en el ratón la síntesis de las glicoproteínas de la ZP se origina exclusivamente a partir del citoplasma del ovocito (Epifano *et al.*, 1995; El-Mestrah *et al.*, 2002).

La organización de las glicoproteínas en la ZP de ratón está ampliamente estudiada y se sabe que forman filamentos compuestos por dímeros de las

glicoproteínas ZP2:ZP3 que a su vez están unidos entre sí por dímeros de las glicoproteínas ZP1:ZP1 (Wassarman y Mortillo, 1991; Wassarman *et al.*, 1996). Otros estudios realizados utilizando ratones con diferentes modificaciones genéticas en las glicoproteínas de la ZP indican que los filamentos que la constituyen están formados por dímeros ZP1:ZP3 y ZP2:ZP3 (Rankin *et al.*, 1999; Dean, 2004). Sin embargo, la reciente descripción de una cuarta glicoproteína en la ZP de ovocitos de rata, mujer, macaca coronada y hámster podrían replantear la información que se tiene respecto a la organización de las glicoproteínas, proponiéndose una distribución y organización especie-específica (Lefievre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009).

La ZP tiene importantes funciones en el ovocito durante la ovogénesis, fecundación y preimplantación (Yanagimachi, 1994a). Durante la fecundación, la ZP regula la unión del espermatozoide al ovocito promoviendo la reacción acrosómica (Wassarman, 1999). Inmediatamente después de la fecundación, la ZP es modificada por el contenido de los GCs liberado durante la activación del ovocito. Así pues, la ZP presenta cambios tras la fecundación en las glicoproteínas que la forman (Bleil *et al.*, 1981) y por ejemplo, en ovocitos porcinos la glicoproteína ZP2 (90 kDa) se corta de forma específica en fragmentos de 65 kDa y 25 kDa aproximadamente (Hedrick y Wardrip, 1987; Hatanaka *et al.*, 1992).

En algunas especies como la porcina y bovina está descrito que la ZP presenta modificaciones cuando el ovocito está en contacto con el epitelio oviductal. Estas modificaciones incluyen un aumento a la resistencia de la proteólisis denominada endurecimiento ("hardening") de la ZP que participa en la regulación de la polispermia (Hunter, 1991; Kim *et al.*, 1996; McCauley *et al.*, 2003). El endurecimiento de la ZP está regulado por la glicoproteína oviductina que se sintetiza y secreta de forma específica en las distintas fases del ciclo estral. Recientemente se ha descrito que la oviductina interactúa en conjunto con la heparina regulando la interacción del espermatozoide con la ZP y contribuyendo a la regulación de la polispermia en la especie porcina (Coy *et al.*, 2008a).

Entre la ZP y el oolema se encuentra un espacio virtual denominado **espacio perivitelino (EPV)**. El EPV se asemeja a una matriz extracelular formado durante la ovogénesis y su tamaño varía considerablemente durante el desarrollo del ovocito. El EPV tiene un papel importante antes, durante y después de la fecundación (Yanagimachi, 1994a). Contiene una matriz rica en ácido hialurónico y componentes que son filtrados a través de la ZP como fluido del antro folicular y proteínas producidas por las células del cúmulus (Talbot y Dandekar, 2003). El contenido proteico del EPV es modificado durante el paso del ovocito por el oviducto, entre otros procesos está descrito que la glicoproteína oviductina se incorpora al EPV (Buhi, 2002). Durante la fecundación también se ve modificado el contenido proteico del EPV puesto que tras la exocitosis de los GCs las proteínas contenidas en estas organelas se dispersan en el EPV (Hoodbhoy y Talbot, 1994) y se produce un significativo incremento en su tamaño (Talbot y Dandekar, 2003). La presencia de moléculas descritas como reguladores de la polispermia entre las que se encuentran la ácido hialurónico, la oviductina y las proteínas de los GCs en el EPV sugieren que esta estructura ovocitaria tiene un considerable papel durante la fecundación especialmente en la regulación de la polispermia (Talbot y Dandekar, 2003).

El **oolema** o membrana plasmática del ovocito, es una estructura que engloba a la célula, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior y exterior de ésta. El oolema, al igual que la membrana plasmática de las células somáticas, está formado por fosfolípidos, colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas). Sin embargo, poco se sabe acerca de las proteínas del oolema implicadas en el bloqueo de la polispermia. En el apartado 4.2.2 de esta revisión profundizaremos en estas proteínas.

El **ooplasma** del ovocito maduro contiene diferentes tipos de organelas incluyendo las básicas de la mayoría de las células somáticas como núcleo, mitocondrias, lisosomas, retículo endoplasmático liso (REL), retículo endoplasmático rugoso (RER) y aparato de Golgi (Sathananthan *et al.*, 2006). En los ovocitos porcinos, aparentemente el núcleo es la organela más prominente seguido por las gotas de lípidos con un diámetro de  $3\text{'}3\mu\text{m}$  aproximadamente y que representan un 20% del volumen celular. Estas gotas de lípidos varían en estructura y diámetro dependiendo de la fase de maduración del ovocito. Otra

organela abundante en los ovocitos son las mitocondrias morfológicamente esféricas u ovaladas, con densas matrices y pocas cisternas. Algunas de las mitocondrias pueden presentar vacuolas dentro de estas matrices (Cran, 1985; Bielanska-Osuchowska, 2006). En el ovocito el REL existe en dos formas, una formando vesículas y otra pequeñas agregaciones tubulares. Los lisosomas en los ovocitos se presentan en una gran variedad de formas dependiendo del estadio de maduración de éstos. El ovocito también presenta una matriz clara en la que no se observan organelas y que se corresponde con el citosol que tiene una textura granular (Bielanska-Osuchowska, 2006). A diferencia de otros mamíferos, en el ovocito porcino en MII se puede observar una inusual estructura formada por RER cuya función se desconoce en la actualidad (Bielanska-Osuchowska, 2006). Mientras que el aparato de Golgi está ausente en los ovocitos maduros, no es así en el estadio de VG donde la principal función del aparato de Golgi es la síntesis de los gránulos corticales.

#### **4.1.1.5. Gránulos corticales**

Las principales vesículas secretoras de los ovocitos de mamífero son los **gránulos corticales (GCs)** y, al igual que ocurre con las vesículas secretoras de las células somáticas, su contenido es específicamente empaquetado y concentrado dentro de estas vesículas de secreción. Los GCs difieren de las vesículas secretoras en que no son renovables. Una vez liberado su contenido, tras la reacción cortical, no vuelven a sintetizarse (Wessel *et al.*, 2001). Estas organelas son específicas de los ovocitos de mamíferos no fecundados y consideradas como unas de las más importantes dentro del citoplasma por su implicación en la reacción de zona para prevenir la polispermia (Guraya, 1982)

La primera publicación que recoge la presencia de los GCs en ovocitos de mamífero es de Austin en 1956, que los describió mediante microscopía de contraste de fases y, posteriormente, mediante microscopía electrónica (Austin, 1961). En la especie porcina, el uso de la microscopía de campo claro no permite su observación, debido a la cantidad de lípidos presentes en el citoplasma, por lo que se tardó más de 30 años en describirlos mediante microscopía electrónica en esta especie (Cran, 1985). La presencia de estas organelas despertó gran interés debido a su posible relación con la fecundación y el bloqueo de la polispermia. La

introducción de nuevas técnicas y los avances de la microscopía han podido aportar más información relacionada con la función y contenido de los GCs, aunque este conocimiento sigue siendo muy limitado en la especie porcina.

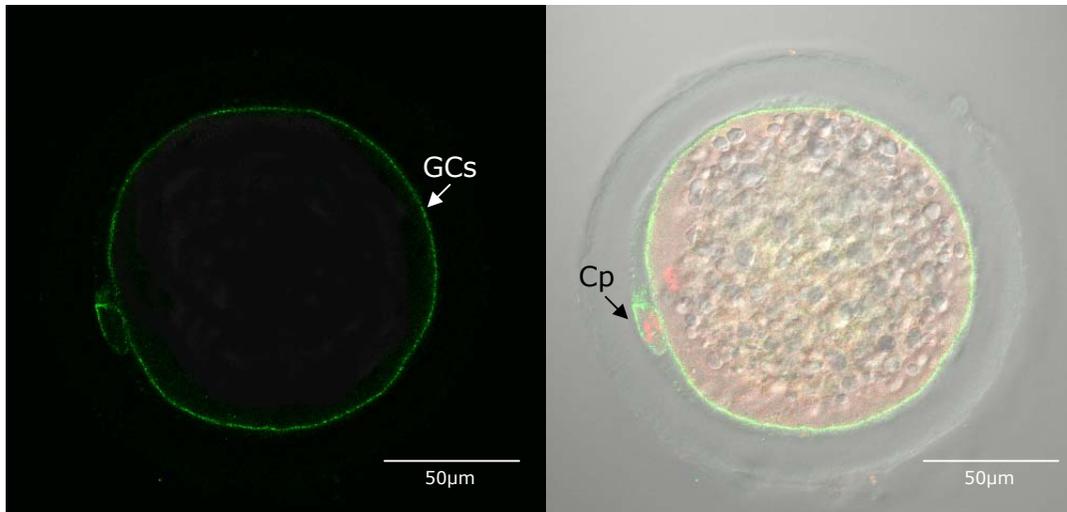
#### **4.1.1.5.1. Características morfológicas de los gránulos corticales**

Los GCs se forman a partir del complejo de Golgi y del RER (Anderson, 1968) en un proceso continuo hasta que se produce la ovulación, después de la cual este proceso se detiene (Guraya, 1982). Como una importante excepción, en ovocitos de coneja la formación de estas organelas continúa después de la ovulación ya que su número aumenta en ovocitos envejecidos (Longo, 1974), mientras que en la ratona la formación de los GCs concluye en el oviducto justo antes de la fecundación (Zamboni, 1970).

Los GCs de mamíferos están limitados por una membrana bien definida, tienen un diámetro de 0´2µm a 0´6µm y son, de morfología, aparentemente similares entre ellos. En la especie porcina estas organelas tienen un diámetro de 0´16µm (Wang *et al.*, 1997a). En ovocitos nuclearmente maduros, la mayoría de los GCs se localizan dentro de los primeros 4µm del citoplasma cortical dispuestos en forma rectilínea o fila a modo de monocapa justo por debajo del oolema (Figura 2), aunque también se pueden encontrar algunos distribuidos en el citoplasma (Yoshida *et al.*, 1993; Wessel *et al.*, 2001).

El número de GCs se incrementa durante los estadios tempranos de maduración (Zamboni, 1970) y de forma sincronizada con el aumento de tamaño del ovocito (Ducibella *et al.*, 1994). El número de estas organelas varía dependiendo de la especie. En ovocitos de cerda el número de GCs se estima en 13´0 GCs por cada 10µm de oolema (Cran, 1985) siendo mayor si se compara con el número de GCs observados en ovocitos de ratón, rata y conejo (3´3, 9´2 y 6´0 GCs respectivamente en 10µm de oolema) (Cran, 1985).

**Figura 2.** Localización de los GCs en un ovocito porcino madurado marcados con PNA-FITC y observados mediante microscopía confocal (Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia). GCs: gránulos corticales, Cp: corpúsculo polar



La localización de los GCs en el ovocito maduro es fundamental. Previo a la fecundación, la proximidad de los GCs al oolema asegura una rápida excitosis de los mismos que puede tener lugar en segundos o minutos dependiendo de la especie (Cran, 1985). Los GCs migran durante el crecimiento y maduración del ovocito (Ducibella *et al.*, 1994; Hoodbhoy y Talbot, 1994). En la especie porcina, entre las 24 y 36h de maduración *in vitro* (paso de MI a MII) ocurre una migración centrífuga en la que muchos de los GCs se alinean por debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Cran, 1985; Yoshida *et al.*, 1993). En esta especie, la distribución de los GCs durante la maduración *in vivo* está relacionada con la administración de la hormona hCG ya que la migración de los mismos, tiene lugar entre las 20 y 30h post-hCG (Cran, 1985; Sun *et al.*, 2001). Otros estudios realizados marcando los GCs con la lectina PNA (*Arachis hypogaea* agglutinin) muestran que la migración de los GCs *in vitro* se presenta durante las primeras 24h de cultivo, lo que es similar al tiempo que tarda *in vivo* (Yoshida *et al.*, 1993). Por otro lado, en la especie bovina, la migración de los GCs en el oolema es muy diferente a lo que se presenta en la especie porcina. En ovocitos bovinos, los GCs migran en grupos dependiendo del estadio de maduración (Hosoe y Shioya, 1997) y el tiempo que tardan en distribuirse en el

ooplasma es mayor en ovocitos madurados *in vitro* que *in vivo* (Hyttel *et al.*, 1989).

La densidad óptica de estas organelas varía de oscuro a claro. Aunque inicialmente esta particularidad se atribuyó a un artefacto óptico (Nicosia *et al.*, 1977), estudios posteriores realizados en la especie porcina por medio de microscopía electrónica han demostrado la existencia de dos poblaciones de GCs: una con un contenido opaco que produce una imagen casi negra (GCs oscuros) y otra con un contenido de poca electrodensidad que produce una imagen muy grisácea (GCs claros). Estas observaciones sugieren una diferencia en la composición bioquímica del contenido de los GCs porcinos (Cran, 1985), aunque hasta la fecha no existen evidencias de que esto sea así. Otros estudios indican que durante la maduración ovocitaria porcina el tipo de GCs observados varía, la población de GCs claros disminuye mientras que los GCs oscuros aumentan (Cran, 1985). Por el contrario en el ratón se observa un aumento en el número de GCs claros mientras que el número de GCs oscuros no presenta cambios importantes (Ducibella *et al.*, 1988a). Recientes estudios realizados en ratones han confirmado la existencia de, por lo menos, dos poblaciones de GCs bioquímicamente diferentes. Una población con afinidad únicamente a la lectina LCA (*Lens culinaris* agglutinin) y una segunda población con afinidad a LCA y a un anticuerpo policlonal (ABL2). Estas dos poblaciones de GCs tienen una redistribución compleja en el cortex del ovocito durante la reanudación de la meiosis y la transición de vesícula germinal a metafase II (Liu *et al.*, 2003). La probabilidad de que existan dos poblaciones de GCs bioquímicamente diferentes hacen más complejas estas organelas debido a que aún no se tiene suficiente información sobre el contenido de los mismos.

#### **4.1.1.5.2. Contenido y función de los gránulos corticales**

El número total de proteínas contenidas en los GCs de ovocitos de mamífero se ha estimado en un rango comprendido entre 4-14, aunque podría ser incluso superior. Estas proteínas tienen su origen de forma coordinada con la aparición de la organela, durante la oogenésis temprana. Cada proteína es sintetizada y empaquetada para dar origen a un GC maduro (Laidlaw y Wessel, 1994). La concentración proteica de los GCs limita mucho su estudio ya que se

estima que cada ovocito contiene tan sólo cerca de 20ng de proteínas totales, de las cuales únicamente de 50 a 100pg son liberados durante su exocitosis de los GCs (Moller y Wassarman, 1989).

El exudado de los GCs liberado al espacio perivitelino en ovocitos de mamífero, durante la fecundación o activación artificial contiene diferentes moléculas como carbohidratos, una enzima (N-acetilglucosaminidasa), proteasas, peroxidasas y una serie de proteínas clasificadas en base a su peso molecular como p75, p62, p56 y p32. A excepción de p75 identificada como PAD (peptidil arginina diaminasa), la identidad del resto de las proteínas no está bien establecida. En los últimos años, proteínas tipo chaperonas como calreticulina también se han asociado con estas organelas (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). Un resumen general de estas moléculas se describe en la tabla 1 y detallándose las características y posible papel de estas moléculas en la fecundación de ovocitos de mamífero.

La descripción de las moléculas contenidas en los GCs de mamíferos se inicia mediante análisis generales utilizando técnicas de citoquímica, observando así la presencia de **carbohidratos** (Yanagimachi y Chang, 1961; Luft, 1971). El material glicosilado proveniente de estas organelas se localiza en el oolema y EPV de cigotos de ratón, hámster y conejo (Szollosi, 1967; Gordon *et al.*, 1975). Estudios posteriores, utilizando diferentes lectinas conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC), permitieron conocer otras características del material glicosilado de los GCs, encontrándose que estos carbohidratos incluyen residuos  $\alpha$ -D-GalNAc,  $\alpha$ -D-manosa y  $\beta$ -D-Gal (1,3)-GalNAc. En ovocitos porcinos, la lectina PNA conjugada a FITC es una lectina específica para marcar los GCs (Yoshida *et al.*, 1993). Hasta la fecha el marcaje en ovocitos porcinos con PNA-FITC es la única herramienta para la visualización de los GCs mediante microscopía confocal ya que no existe descrita ninguna otra molécula contenida en los GCs de esta especie. A pesar de que estas técnicas no revelan con especificidad el tipo de carbohidratos presente en los GCs, proporcionan la primera aproximación que describe las características bioquímicas de los componentes de los GCs.

**Tabla 1.** Moléculas identificadas en los GCs de ovocitos de mamíferos.

<b>Molécula</b>	<b>Especie</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
Calreticulina	Hámster y ratón	Unión de Ca <sup>2+</sup> , molécula chaperona que participa en el plegamiento de proteínas y mediadora de adhesión de la superficie celular.	Muñoz-Gotera <i>et al.</i> , 2001, Tutuncu <i>et al.</i> , 2004
N-acetilglucosaminidasa	Ratón	Modifica la ZP3 y bloqueo de la polispermia a nivel de unión espermatozoide-ovocito.	Miller <i>et al.</i> , 1993
Ovoperoxidasa	Ratón	Cataliza la formación de di- y tri-tirosina originando enlaces entre proteínas ("crosslinking").	Gulyas, 1980
Proteasa ZP2	Ratón	Proteólisis la glicoproteína ZP2 tras la activación ovocitaria.	Moller y Wassarman, 1989
p75 (PAD)	Ratón	Enzimas calcio dependientes que catalizan en las proteínas la conversión de arginina a citrulina.	Pierce <i>et al.</i> , 1990 ; Liu <i>et al.</i> , 2005
p62, p56	Cerda, vaca, ratón, rata y hámster	Posible asociación con el bloqueo de la polispermia.	Gross <i>et al.</i> , 2000
p32	Ratón	Posible asociación con la embriogénesis temprana.	Hoodbhoy <i>et al.</i> , 2001,2000
tPA (activador de plasminógeno tipo tisular)	Vaca y ratón	Serin proteasa que convierte el plasminogéno en plasmina.	Zhang <i>et al.</i> , 1992; Kim y Menino, 1995; Rekkas <i>et al.</i> , 2002

Debido a su implicación en el bloqueo de la polispermia, el estudio e interés por estas organelas aumenta y con ello el número de trabajos publicados. Desgraciadamente la investigación de las moléculas concretas contenidas en los GCs continúa apoyándose básicamente en los resultados obtenidos de estudios realizados en ovocitos de estrella de mar y anfibios (Foerder y Shapiro, 1977; Hall, 1978) tal y como se detalla en la tabla 2.

**Tabla 2.** Moléculas identificadas en los GCs de ovocitos de estrella de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) y sapo (*Xenopus leavis*).

Molécula	Especie	Referencia
Glicoproteínas (bindina)	Estrella de mar	Folzt y Shilling, 1993
Glicosaminoglicanos	Estrella de mar	Runnstrom, 1966
$\beta$ -1,3-Glucanasa	Estrella de mar	Epel <i>et al.</i> , 1969
Hialina	Estrella de mar	Yazaki, 1968
Lectina calcio-dependiente y específica de lactosa	Sapo	Grey <i>et al.</i> , 1974
N-acetilglucosaminidasa	Sapo	Wessel, 1995
Ovoperoxidasa	Estrella de mar	Foerder y Shapiro, 1977; Hall, 1978
Proteína SFE 1 (Soft Fertilization Envelope clone 1)	Estrella de mar	Laidlaw y Wessel, 1994
Proteína SFE 9 (Soft Fertilization Envelope clone 9)	Estrella de mar	Wessel <i>et al.</i> , 1987
Proteasa tipo tripsina	Estrella de mar	Carroll, 1976
Proteolisina	Estrella de mar	Somers <i>et al.</i> , 1989

En base a la información que se tiene de las proteínas de GCs en ovocitos de estrella de mar y anfibios se han identificado proteínas en los GCs de ovocitos

de mamífero. Un ejemplo es la **ovoperoxidasa**, una proteína de 70 kDa específica del ovocito, almacenada en los GCs y liberada al EPV durante la reacción cortical (Foerder y Shapiro, 1977; Deits *et al.*, 1984). Esta proteína cataliza la formación de di- y tri-tirosina originando enlaces entre proteínas ("crosslinking") produciendo un endurecimiento de la ZP y protegiendo al ovocito de cambios bioquímicos y mecánicos, así como de la entrada de más de un espermatozoide, lo que está directamente relacionado con el bloqueo de la polispermia (Foerder y Shapiro, 1977; Heinecke y Shapiro, 1990). Hasta la fecha, en mamíferos esta proteína únicamente se ha descrito en GCs de ratón. En esta especie, ovocitos activados con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan actividad peroxidasa en la superficie celular, ZP y EPV en asociación con el exudado de GCs (Gulyas y Schmell, 1980). Por otra parte, diferentes estudios en ratón indican que una peroxidasa, que es activa y/o secretada por los ovocitos durante su activación, produce enlaces entre los residuos tirosina de la ZP produciendo un endurecimiento de la misma (Schmell y Gulyas, 1980b). En la especie porcina se desconoce la existencia de esta ovoperoxidasa pero no existe un endurecimiento de la ZP tras la fecundación en condiciones *in vitro* (Iwamoto *et al.*, 1999; Coy *et al.*, 2002, 2005; Kolbe y Holtz, 2005).

En los GCs también se ha descrito la presencia de la enzima **N-acetilglucosaminidasa**. Esta enzima inicialmente descrita en ovocitos de sapo (*Xenopus leavis*; Wessel *et al.*, 1987) también ha sido detectada en el exudado de ovocitos de ratona activados con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y posteriormente localizada por microscopía electrónica en los GCs de esta especie (Miller *et al.*, 1993). Su papel en la fecundación se ha corroborado mediante inhibidores o anti-N-acetilglucosaminidasa, observándose que durante la fecundación tienen un papel importante en el bloqueo de la polispermia a nivel de unión del espermatozoide mediante la modificación de la ZP (Miller *et al.*, 1993). Hasta la fecha la presencia de N-acetilglucosaminidasa no ha sido descrita en los GCs de otras especies de mamíferos, como la porcina o bovina.

Otras moléculas como **proteasas** se asocian con los GCs tras observar que la fecundación *in vitro* de ovocitos de ratona activados en presencia de inhibidores de proteasa tipo tripsina y serina aumenta el nivel de polispermia (Tawia y Lopata, 1992). La Serin proteasa, como el activador tisular de

plasminógeno se han localizado en el espacio perivitelino de ovocitos de ratón tras la fecundación *in vitro* o la activación artificial, sugiriendo que es liberado a partir de los GCs (Zhang *et al.*, 1992). Los activadores de plasminógeno tipo tisular (tPA) y tipo uroquinasa (uPA) convierten el plasminógeno (proenzima extracelular) en plasmina, una proteasa tipo tripsina con amplia especificidad de sustratos que presenta la habilidad de activar formas latentes de algunas proteinasas (Saksela, 1985; Longstaff, 2002).

El tema de la localización de tPA en los GCs ha sido muy controvertido. Por un lado el hecho de que las células de la granulosa secreten tPA en presencia de la hormona LH (Canipari y Strickland, 1985) abren la posibilidad de que el tPA pueda ser asociado con el ovocito mediante las células de la granulosa a través de las uniones gap y, por otro lado, la falta de pruebas histoquímicas o citoquímicas que sitúen al tPA directamente en los GCs. Sin embargo, la localización de tPA en el ooplasma de ovocitos de ratón (Bicsak *et al.*, 1989), cerda (Kim y Menino, 1995) y en el extracto de GCs de ovocitos de vaca (Rekkas *et al.*, 2002) mantienen la posibilidad de que los GCs contengan tPA.

Como se mencionó anteriormente, las proteasas presentes en los GCs modifican la ZP favoreciendo el bloqueo de la polispermia. Sin embargo, después de la fecundación se ha comprobado un aumento de la solubilidad de la ZP favoreciendo la eclosión del embrión cuando se adiciona plasmina al medio de cultivo de embriones (Menino *et al.*, 1989). A pesar de que la información respecto al sistema plasminógeno-plasmina en los GCs es confusa, se sabe que este sistema está implicado en la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario temprano (Papanikolaou *et al.*, 2008), así como en la regulación de la interacción espermatozoide-ovocito en esta misma especie (Grullón *et al.*, 2008a) y en la porcina (Grullón *et al.*, 2008b)

Otra proteína clasificada en base a su peso molecular como la **proteína p75**, inicialmente caracterizada mediante un anticuerpo sintetizado a partir de blastómeras, se sintetiza en el ovocito, se empaqueta en los GCs y se secreta durante la fecundación o activación artificial del ovocito de ratona (Pierce *et al.*, 1990). Esta proteína está presente en el exudado de ovocitos de ratona activado con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha observado mediante microscopía electrónica dentro

de los GCs y es la única proteína detectada mediante inmunoprecipitación del exudado de ovocitos en esta especie (Pierce *et al.*, 1992). La síntesis de la proteína p75 presenta su máxima expresión en las etapas tempranas del desarrollo ovocitario y disminuye en ovocitos en MII (Pierce *et al.*, 1992). Recientemente esta proteína p75 se ha caracterizado mediante proteómica en ovocitos de ratona como **peptidil arginina diaminasa (PAD)** (Liu *et al.*, 2005). Esta proteína pertenece a una familia de enzimas-calcio dependientes que catalizan la conversión de arginina a citrulina en las proteínas (Vossenaar *et al.*, 2003). La PAD es secretada por los GCs durante la fecundación o activación artificial observándose tras la reacción cortical en el EPV, oolema y en la membrana de las blastómeras (Liu *et al.*, 2005). Esto explica por qué un anticuerpo obtenido a partir de blastómeras reconoce una proteína (p75) de los GCs. La proteína PAD no se ha descrito en ovocitos de la especie porcina ni bovina hasta la fecha.

La **proteína p32** es otra proteína caracterizada en base a su peso molecular y el uso de un anticuerpo, en este caso sintetizado a partir del exudado obtenido tras la activación con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  de mil ovocitos de ratona. Este anticuerpo monoclonal (3E10) reconoce mediante Western blot una proteína de 32 kDa del exudado de GCs de ratona tanto a partir de ovocitos en estadio de vesícula germinal como en MII (Gross *et al.*, 2000). A diferencia de la proteína PAD (p75), p32 no se detecta en ovocitos fecundados ni en la membrana plasmática de las blastómeras. La función específica de p32 se desconoce, aunque ovocitos tratados con el anticuerpo 3E10 incrementan su capacidad de bloqueo de la polispermia sin afectar el porcentaje de fecundación, indicando que en estas condiciones experimentales p32 tiene una posible función en el bloqueo de la polispermia (Gross *et al.*, 2000). El estudio de esta proteína a fecha de hoy no se ha realizado en otras especies y no existen más datos de su función o caracterización.

Por su parte, las **proteínas p62** y **p56** presentes en GCs de ovocitos de cerda, vaca, ratona, rata y hámster (Hoodbhoy *et al.*, 2001a) se caracterizaron utilizando un anticuerpo policlonal (IL2) sintetizado a partir de ovocitos de estrella de mar (Gray *et al.*, 1986). Las proteínas p62 y p56 son retenidas en el EPV y sobre el oolema después de la fecundación de ovocitos de hámster. Su

función probablemente esté asociada a la embriogénesis temprana puesto que tratamientos *in vitro* de embriones de dos células con anticuerpos IL2 inhiben la división de las blastómeras (Hoodbhoy *et al.*, 2000). Sin embargo, la caracterización bioquímica de estas proteínas se desconoce.

Recientemente se ha descrito la primera proteína chaperona relacionada con los GCs de mamíferos, **calreticulina** (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). Es una proteína ubicua altamente conservada con un 90% de similitud entre los aminoácidos de la proteína en humanos, conejo, ratón y rata. La similitud de calreticulina entre estas diferentes especies sugiere que esta proteína ha tenido una importante función biológica durante más de 359 millones de años (Coppolino y Dedhar, 1998). La proteína calreticulina participa en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y actúa como una molécula chaperona en el plegamiento de proteínas (Michalak *et al.*, 1998,1999; Gelebart *et al.*, 2005). También participa en muchos otros aspectos fisiológicos de la célula y recientemente se le ha atribuido una función como mediadora de adhesión de la superficie celular (Johnson *et al.*, 2001). La forma madura de esta proteína contiene 400 aminoácidos y un peso molecular de 46´6 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente de calreticulina es de aproximadamente 60 kDa (Coppolino y Dedhar, 1998). Esto posiblemente se debe a una migración incorrecta en geles SDS-PAGE, su carga negativa (pI=4´7) y/o a características estructurales de la propia proteína. Otros autores han demostrado que calreticulina tiene dos isoformas con pesos moleculares aparentes de 52 y 62 kDa. Por un lado, la isoforma de 52 kDa (endocalreticulina) tiene localización transmembrana y no ha sido detectada directamente debido a su baja concentración y alta labilidad. Por otro lado, la isoforma de 62 kDa (ectocalreticulina) está asociada con la membrana plasmática y con la fusión de membranas (Zhu *et al.*, 1997). Las isoformas de esta proteína se localizan en diferentes compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático, núcleo y citoplasma) y extracelulares (superficie externa de la membrana plasmática y suero) (Zhu *et al.*, 1997). Dependiendo de la especie, calreticulina puede tener uno o más sitios potenciales de N-glicosilación (Navazio *et al.*, 1996).

En el ovocito, calreticulina se ha localizado recientemente en la región cortical mediante microscopía confocal y tras la activación de ovocitos de ratona y hámster se ha observado que la concentración de esta proteína aumenta en el

oolema y en el EPV (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001; Tutuncu *et al.*, 2004). La presencia de calreticulina en el medio de cultivo después de la activación ovocitaria sugiere que se libera después de la excitosis de los GCs tras la activación ovocitaria (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). Sin embargo, en imágenes de microscopía confocal de alta resolución de ovocitos de ratona marcados para GCs con lectina LCA y anti-calreticulina no se observa localización conjunta (colocalización) de calreticulina y lectina en los GCs (Tutuncu *et al.*, 2004), lo que sugeriría que esta proteína podría no estar presente en los GCs de esta especie. En la ratona, calreticulina se localiza en los dominios libres de GCs en la región del huso mitótico del ovocito durante la MII. Por lo tanto, se sugiere que su localización después de la activación ovocitaria en roedores, es probablemente a partir de la secreción de vesículas localizadas en la región cortical del ovocito que no se corresponden con los GCs. A pesar de esto, se señala la posibilidad de que el origen de calreticulina observada en el EPV de los ovocitos activados de ratona y hámster tenga una participación en la fecundación, proponiéndose un papel en la traducción de señales durante la fecundación (Tutuncu *et al.*, 2004). Hasta la fecha esta proteína no se ha descrito en ovocitos de cerda y vaca.

Resumiendo, el estudio del contenido de los GCs se ha realizado de forma lenta debido a la mínima cantidad de proteínas que se pueden obtener de estas organelas. Sin embargo, existen datos muy importantes de las proteínas contenidas en los GCs de ovocitos de diferentes especies y su posible función en el proceso de fecundación, especialmente durante el bloqueo de la polispermia. En la especie porcina no existe ningún estudio respecto al contenido de los GCs, a pesar de que es una especie en la que el índice de polispermia sigue siendo extremadamente elevado, lo que dificulta el aumento del porcentaje de embriones viables que se obtienen en los laboratorios. Hasta la fecha el único método de marcaje específico para GCs en esta especie sigue siendo la lectina PNA conjugada a FITC.

#### **4.1.3. Espermatozoide de mamífero**

En los mamíferos, el espermatozoide es la única célula diseñada para abandonar el organismo y así realizar su función biológica de unión al ovocito maduro durante la fecundación formando el cigoto. En mamíferos, la capacidad

reproductiva de los machos adultos está condicionada por la producción continuada de un número adecuado de gametos masculinos (espermatozoides), lo que dependerá de la maduración y diferenciación de las células primordiales germinales mediante el proceso de **espermatogénesis**.

La continua producción de espermatozoides está regulada por la espermatogénesis que tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos cuyo epitelio está formado por dos tipos de células, las germinales y las somáticas o también llamadas células de Sertoli (Courrot et al., 1970; Russell et al., 1990). En las especies porcina y bovina la espermatogénesis se prolonga aproximadamente durante 41 días (Parks et al., 2003; Almeida et al., 2006) en lo que supone un proceso de transformación gradual de las células germinales a espermatozoides y que se divide en tres importantes fases:

- **Espermatocitogénesis:** durante esta fase las células primordiales germinales se diferencian en espermatogonias y se dividen por mitosis de forma acelerada originando espermatogonias latentes y activas. Las espermatogonias latentes permanecen en el epitelio germinal cerca de la membrana basal repitiendo el proceso de división y manteniendo de esta forma el reservorio de gametos. Mientras, las espermatogonias activas inician la meiosis (Hess, 1999).

- **Meiosis:** caracterizada por dos divisiones sucesivas del material hereditario seguido por un único periodo de síntesis de ADN. La meiosis se inicia en los espermatocitos primarios ( $4n$ ,  $4c$ ) dando lugar cada uno de ellos a dos espermatocitos secundarios ( $2n$ ,  $2c$ ). Posteriormente se produce la segunda división meiótica dando lugar a las espermátidas ( $1n$ ,  $1c$ ). Al final, cada célula contará con un cromosoma del par homólogo recombinado y las cromátidas estarán unidas únicamente a nivel del centrómero. De esta forma, por cada espermatogonia que entra en meiosis se obtienen cuatro células haploides (con una única copia de ADN) y genéticamente diferentes, dos de ellas portadoras del cromosoma X y las otras dos del Y, llamadas espermátidas (Holstein et al., 2003).

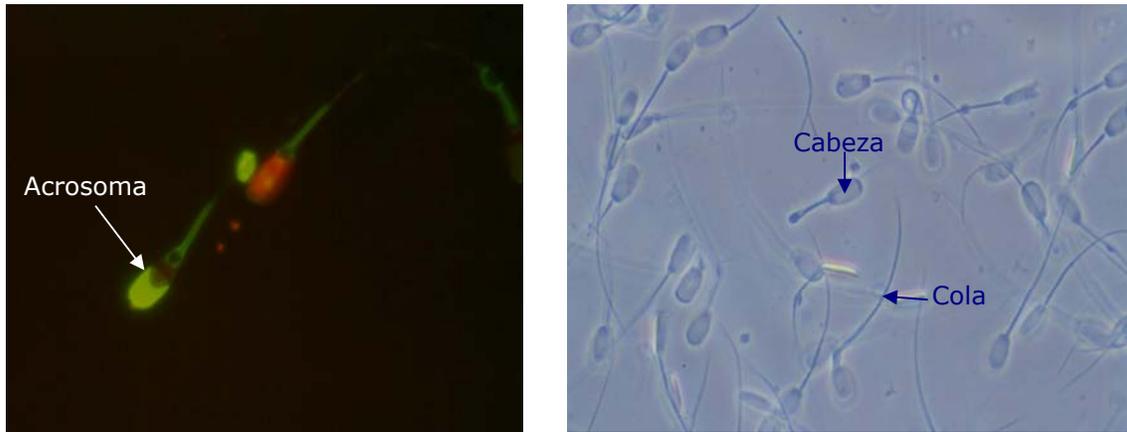
- **Espermiogénesis:** incluye la diferenciación y maduración de las espermátidas. En esta fase experimentan un conjunto de modificaciones

(condensación de la cromatina nuclear, elongación del núcleo, formación de la cola o flagelo y desarrollo del capuchón acrosómico) que las lleva a convertirse en las células altamente especializadas que son los espermatozoides. Finalmente, los espermatozoides se liberan del túbulo seminífero en un proceso que se conoce como espermiación y que está regulado por las células de Sertoli. Durante la espermiación los espermatozoides son desplazados al borde del lumen del túbulo seminífero mediante una compleja cooperación entre filamentos y túbulos citoplásmicos de las células de Sertoli (Russell et al., 1993).

En este punto nos encontramos ante una célula (espermatozoide) cuyas características son: genoma haploide ( $1n$ ,  $1c$ ), ADN altamente condensado y transcripcionalmente inactivo, proteínas nucleares específicas llamadas protaminas (que sustituyen a las histonas) relacionadas con la compactación del material genético, un compartimento acrosomal con enzimas hidrolíticas localizado en la parte anterior de la cabeza espermática, un axonema preparado para producir movilidad con características estructurales no vistas en otras células eucariotas o procariotas y, por último, una membrana plasmática que presenta una polaridad extrema en la distribución de sus proteínas y lípidos (Gillette, 1999).

Los espermatozoides de mamíferos se componen de cabeza, cuello y flagelo (Figura 3), rodeados por una membrana plasmática caracterizada por su composición de glicoproteínas y lípidos que varía dependiendo de la región y función. Un ejemplo es la membrana del segmento ecuatorial responsable del contacto con la membrana del ovocito durante la fecundación, una vez producida la reacción acrosómica. La longitud del espermatozoide es especie-específica y varía de  $50\ \mu\text{m}$  (verraco) a  $90\ \mu\text{m}$  (toro) (Pesch y Bergmann, 2006).

**Figura 3.** Espermatozoides de verraco con acrosoma reaccionada marcado con PNA-FITC, y en fresco (Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia).



La cabeza del espermatozoide está formada por el acrosoma y el núcleo, ambos rodeados por la membrana plasmática, y tanto su forma como su estructura son altamente especie-específicas (Downing Meisner *et al.*, 2005). El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas tipo acrosina (Barros *et al.*, 1992), hialuronidasa y algunas más tipo hidrolasas y esterases (Tulsiani *et al.*, 1998). Estas enzimas son liberadas durante la reacción acrosómica, cuando la membrana acrosómica externa se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide (Abou-Haila y Tulsiani, 2000) y participan en la digestión de la ZP del ovocito (De los Reyes y Barros, 2000) facilitando así su paso. El acrosoma es una estructura tipo capuchón que cubre los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide y está delimitado por una membrana acrosomal interna y una externa que se divide en tres diferentes segmentos: apical, principal y ecuatorial (Downing Meisner *et al.*, 2005).

#### **4.1.3.1. Maduración del espermatozoide**

Cuando los espermatozoides abandonan el testículo y son liberados hacia la luz del túbulo seminífero han alcanzado la madurez morfológica, pero aún no han desarrollado completamente la capacidad de fecundar al ovocito. Esta capacidad se adquiere durante su paso a través del epidídimo en un proceso denominado maduración epididimaria. El epidídimo se divide en tres regiones

(cabeza, cuerpo y cola) y es un órgano especializado en la maduración y almacenamiento de espermatozoides que serán posteriormente eyaculados (Djakiew y Jones, 1983; Jones *et al.*, 2007).

Los espermatozoides de mamíferos presentan significativos cambios bioquímicos en su membrana durante su paso a través del epidídimo. Esta fase posttesticular de remodelación proporciona la adquisición de la movilidad progresiva y la habilidad para reconocer y fecundar al ovocito. Las modificaciones que presenta el espermatozoide durante su paso a través del epidídimo comprenden principalmente cambios de las proteínas y lípidos de la membrana plasmática (Cooper, 1998) y están reguladas por la actividad secretora del epitelio epididimal (Cooper, 1995).

Una vez que el espermatozoide ha terminado su tránsito por el epidídimo, es almacenado en la cola de éste y permanece inmóvil hasta el momento de la eyaculación. En muchas especies de mamíferos la movilidad es inducida en el eyaculado cuando los espermatozoides interactúan con las secreciones de las glándulas accesorias masculinas (plasma seminal). El plasma seminal es una compleja mezcla de componentes entre los que se encuentran factores decapacitantes, es decir que evitan la capacitación espermática, siendo el principal factor el colesterol (Cross, 1996).

En el verraco, la mayoría de las proteínas del plasma seminal son proteínas que pertenecen a la familia de las espermadhesinas como AQN (alanina-glutamina-asparagina), AWN (alanina-triptófano-asparagina) y PSP (proteína de plasma seminal porcino). Todas estas proteínas son multifuncionales y tienen capacidad de unirse a carbohidratos, glucosaminoglicanos sulfatados, fosfolípidos e inhibidores de proteasas (Topfer-Petersen *et al.*, 1998). En el eyaculado, las espermadhesinas forman una capa protectora alrededor de la región acrosomal y probablemente de esta forma previenen la reacción acrosómica prematura. Durante la capacitación la mayoría de estas espermadhesinas se pierden. Las espermadhesinas representan una nueva clase de lectinas implicadas en pasos secuenciales de la fecundación, al menos en la especie porcina (Topfer-Petersen *et al.*, 1998; Manaskova *et al.*, 2003; Jonakova *et al.*, 2007; Manaskova y Jonakova, 2008).

#### 4.1.3.2. Capacitación espermática

La capacitación espermática se inicia después de la eliminación o modificación de factores adquiridos por el espermatozoide durante su contacto con en el plasma seminal, continúa durante su paso a través del tracto reproductor femenino y finaliza cuando los espermatozoides interactúan con la ZP del ovocito para experimentar la reacción acrosómica (De Jonge, 2005). En la especie porcina, el espermatozoide necesita de 5 a 6 horas en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978).

La purificación de las distintas fracciones del plasma seminal bovino indica que también existen factores capacitantes entre los que se encuentran los fosfolípidos (Ehrenwald *et al.*, 1988) y moléculas de bajo peso molecular que promueven la capacitación espermática (Clark *et al.*, 1993). Por ejemplo, existe una familia de proteínas llamadas proteínas de plasma seminal bovino (BPS) entre las que se encuentran BPS-A1, BPS-A2, BPS-A3 y BPS-30 kDa (Desnoyers *et al.*, 1994). Estas proteínas regulan el flujo de colesterol y fosfolípidos (Therien *et al.*, 1998) que son esenciales en las primeras etapas de la capacitación espermática (Davism 1981; Cross, 2003).

El plasma seminal de los diferentes mamíferos también contiene vesículas secretadas por la próstata (prostosomas). La principal característica de estas vesículas es el almacenamiento de calcio, lípidos (colesterol, esfingomielina y fosfatidilcolina), pequeñas moléculas (GDP, ADP y ATP), iones ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) y enzimas como fosfolipasa A, ATPasa y peptidasa. Durante el contacto del espermatozoide con el plasma seminal los prostosomas se fusionan con el espermatozoide y liberan su contenido de calcio al citosol del espermatozoide (Arienti *et al.*, 1997, 2004). A pesar de que en la especie porcina no se han descrito los prostosomas, existen unas vesículas parecidas llamadas vesículas tipo prostosoma (Piehl *et al.*, 2006). Recientemente se ha llegado a la conclusión de que estas vesículas tipo prostosomas que están presentes en la fracción rica del eyaculado tienen la capacidad de estimular la reacción acrosómica *in vitro* (Siciliano *et al.*, 2008). En el plasma seminal porcino también se han identificado mediante proteómica alrededor de 139 proteínas diferentes entre las que se

encuentran proteínas chaperona, de transporte y de traducción de señales (Manaskova *et al.*, 2003).

Tras la eyaculación, el espermatozoide atraviesa el moco cervical y la membrana plasmática presenta modificaciones en su cantidad de colesterol y glicofosfolípidos. Así pues, el colesterol de la membrana espermática se reduce a la mitad gracias a la mediación de la albúmina, que es un conocido receptor de colesterol y está presente en el moco cervical. También se cree que una o más de las numerosas enzimas presentes en el moco cervical pueden ayudar o facilitar el cambio en el contenido de lípidos en la membrana mediante la eliminación de lípidos y proteínas (mecanismo denominado "stripping" de moléculas) (Feki *et al.*, 2004).

La capacitación espermática va asociada con cambios en los patrones de movilidad del espermatozoide (hiperactivación). Esta hiperactivación permitirá la liberación de los espermatozoides retenidos en el epitelio oviductal y el desplazamiento a través del medio viscoso presente en la luz del istmo (Demott y Suarez, 1992). En la especie porcina, del total de los espermatozoides presentes en el reservorio, sólo unos pocos miles alcanzan la región inicial del istmo y finalmente sólo unos cientos llega al lugar de la fecundación (Murray y Smith, 1997) minimizando de esta forma la fecundación polispermica (Hunter, 1991).

Una vez capacitado el espermatozoide, y antes de que penetre en el ovocito maduro, interactúa con las células del cúmulus que lo rodean y recubren la ZP. El espermatozoide debe estar capacitado y con el acrosoma intacto para atravesar el cúmulus. La proteína PH-20 localizada en la superficie del espermatozoide facilita el paso de éste a través de la densa capa de células del cúmulus gracias a su actividad hialuronidasa que es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico que une las células de cúmulus del ovocito maduro (Myles y Primakoff, 1997; Kim *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado que otra proteína (Hyal5), que al igual que la PH-20 también tiene actividad hialuronidasa, facilita el paso del espermatozoide a través de las células del cúmulus (Kim *et al.*, 2005). Una vez que el espermatozoide ha atravesado las

células del cúmulus interactúa con el ovocito, iniciando así las primeras etapas de reconocimiento entre gametos para dar paso a la fecundación.

## **4.2. Fecundación en mamíferos**

### **4.2.1. Reconocimiento entre gametos**

La unión del espermatozoide al ovocito está mediada por receptores y ligandos con gran afinidad presentes en la superficie de ambos gametos. La primera interacción espermatozoide-ovocito está mediada por carbohidratos de la ZP y proteínas tipo lectinas localizadas en la superficie de la cabeza del espermatozoide (Topfer-Petersen *et al.*, 1997; Hoodbhoy y Dean, 2004; Clark y Dell, 2006). A pesar de que la unión de los espermatozoides de mamíferos a la ZP del ovocito no es estrictamente especie-específica, la ZP representa una importante barrera en muchas, si no todas, de las interacciones *in vitro* de especies heterólogas. Esta barrera se atribuye a la presencia de receptores del espermatozoide en la ZP que restringen la unión de espermatozoides de especies heterólogas (Gwatkin *et al.*, 1977; Gulyas y Schmell, 1981; Yanagimachi, 1994b; Schmell y Gulyas, 1980a).

En el ratón, el modelo ampliamente estudiado para explicar las primeras interacciones entre el espermatozoide y la ZP del ovocito, están asociadas a cadenas glucídicas tipo O-unidas localizadas cerca del grupo carboxilo terminal de la glicoproteína ZP3. Este modelo se apoya en el hecho de que ratonas knockout para ZP3 son infértiles (Liu *et al.*, 1996) y diferentes experimentos han demostrado que los receptores de ZP3 son activos únicamente en ovocitos no fecundados (Bleil y Wassarman, 1980b; Florman *et al.*, 1984; Florman y Wassarman, 1985). La función de los oligosacáridos en la interacción espermatozoide-ovocito en ratón es apoyada por una gran cantidad de literatura (Benoff, 1997; Tulsiani *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios realizados en macaco (*Macaca radiata*) muestran que la ZP3 recombinante no glicosilada puede unirse a espermatozoides de éste (Govind *et al.*, 2001), indicando así que no solamente los oligosacáridos presentes en la ZP3 son receptores para el espermatozoide.

En la especie porcina, la interacción espermatozoide-ovocito está regulada por proteínas de unión localizadas en la membrana del espermatozoide que reconocen el complejo ZP3-ZP4, mientras que la ZP3 libre no tiene capacidad de unir las proteínas de la membrana del espermatozoide (Yurewicz *et al.*, 1998). Las glicoproteínas de la ZP porcina y bovina comparten un 75% de homología, aunque en los ovocitos bovinos se ha demostrado que la interacción espermatozoide-ovocito está regulada únicamente por ZP3 (Yonezawa *et al.*, 2001).

Tras el primer contacto del espermatozoide con la ZP del ovocito se presenta la **reacción acrosómica (RA)**. La RA es una forma de exocitosis celular caracterizada por la fusión de la membrana acrosómica externa con la membrana plasmática del espermatozoide, formación de vesículas híbridas, exposición de la membrana acrosómica interna y, finalmente, liberación del contenido acrosomal compuesto por diferentes glicohidrolasas y proteasas (Yanagimachi, 1981). Se ha establecido que sólo los espermatozoides que presentan RA en el momento de contactar con la ZP pueden penetrar la ZP, probablemente mediante la acción de una o más enzimas acrosómicas. Por otra parte, sólo el espermatozoide que ha llevado a cabo la RA puede fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994b).

Diferentes líneas de investigación indican que la RA se completa después de la unión del espermatozoide a la ZP del ovocito y sugieren que uno o más componentes de la ZP inducen la RA del espermatozoide. Actualmente se cree que la ZP3 es el receptor del espermatozoide que induce la RA en la mayoría de los mamíferos (Tulsiani *et al.*, 1998; Wassarman *et al.*, 2005).

En 1975, Austin propuso que sólo la unión o penetración de la ZP durante la fecundación era cien por cien efectiva para estimular la RA en mamíferos. Sin embargo, estudios recientes en el modelo murino indican que la unión del espermatozoide a la ZP no es suficiente para inducir la reacción acrosómica (Baibakov *et al.*, 2007). Observaciones con microscopía electrónica de espermatozoides con el acrosoma intacto unidos a la ZP después de 2h de incubación y ensayos de penetración espermática a través de un filtro de policarbonato con 1'2µm de poro (comparable al de la ZP) indican que la RA

probablemente tenga lugar durante el paso del espermatozoide a través de la ZP. Se ha observado que el 98% de los espermatozoides que atraviesan este filtro presentan una RA total, mientras que utilizando filtros con poro de más de 5µm sólo un 10-11% de espermatozoides presenta RA (Baibakov *et al.*, 2007).

Recientemente se ha propuesto que la ZP3 no es el único factor implicado en el estímulo de la RA, planteando así que la RA total se presenta en el EPV, después de atravesar la ZP o bien cuando los espermatozoides están en contacto con el oolema, asociando este efecto a la tetraspanina CD81 del ovocito. En ratones se ha observado que algunos de los espermatozoides que atraviesan la ZP no presentan RA y se sugiere que probablemente estos espermatozoides presenten la RA una vez que contacten con el oolema e interaccionen con la tetraspanina CD81. Esta teoría se apoya con la observación de que ovocitos de ratonas CD81-/- presentan disminuida la fertilidad comparados con ovocitos de animales CD81+/+ (Tanigawa *et al.*, 2008). Estos mismos autores indican que en las células de la granulosa y del cúmulus existen altos niveles de CD81, sin embargo el paso del espermatozoide a través de estas células no estimula la RA. Esto podría explicarse en base a la integridad y la especificidad del acrosoma del espermatozoide que evitan que interaccione con células somáticas durante su paso a través del oviducto (Abou-Haila y Tulsiani, 2000; Tulsiani y Abou-Haila, 2001). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la modificación genética de los ovocitos CD81-/- altere la reacción zonal de la ZP afectando el paso del espermatozoide a través de la misma (Tanigawa *et al.*, 2008).

Una vez concluida la RA en el espermatozoide, tiene lugar una segunda interacción espermatozoide-ovocito que está mediada por la glicoproteína ZP2 y la proteína PH-20 (Bleil y Wassarman, 1983; Myles y Primakoff, 1997). El papel que tiene la interacción secundaria dentro del proceso de fecundación se desconoce (Myles y Primakoff, 1997). Tras la RA y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la ZP para alcanzar el EPV y contactar con el oolema desencadenando señales que conducen a la activación del ovocito y a la reacción cortical.

Durante la fusión de gametos o activación artificial (química o eléctrica) del ovocito maduro, los GCs se fusionan con el oolema y liberan su contenido

dentro del EPV en un evento de exocitosis llamado **reacción cortical** que es regulada por procesos moleculares que incluyen al  $\text{Ca}^{2+}$  (Abbott y Ducibella, 2001), el inositol 1,4,5-trifosfato que induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los compartimentos intracelulares (Abbott *et al.*, 1999), la proteína G y proteínas calcio-dependientes como protein kinasas y una proteína de 25 kDa asociados a sinaptosomas (SNAP-25) (Sun, 2003).

Durante la reacción cortical los GCs liberan enzimas que participan en la eliminación de los receptores para los espermatozoides que están localizados en la glicoproteína ZP3, previniendo la unión e inicio de la reacción acrosómica en la superficie externa de la ZP de más espermatozoides, regulando así la polispermia (Florman y Wassarman, 1985; Yanagimachi, 1994b; Green, 1997).

#### **4.2.2. Fusión de gametos**

Una vez el espermatozoide se encuentra en el EPV, la membrana plasmática del segmento ecuatorial de éste se une a la membrana plasmática (oolema) del ovocito, dando lugar a la fusión de las mismas. Este proceso está regulado por una serie de proteínas localizadas en el propio oolema y en la región ecuatorial del espermatozoide y que están especialmente estudiadas en las especies murina y humana. Entre estas proteínas son las siguientes:

##### **Proteínas ovocitarias:**

- Proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (P-GPI)

En distintos animales como hámster (Coonrod *et al.*, 1999a) y ratón (Coonrod *et al.*, 1999b), las P-GPI del oolema están implicadas en la fusión espermatozoide-ovocito. Los primeros trabajos que asocian a P-GPI con la fusión espermatozoide-ovocito se realizaron utilizando un tratamiento enzimático con fosfatidilinositol-fosfolipasa C específica (PI-PLC) para eliminar la P-GPI de la membrana de ovocitos libres de ZP, produciendo una reducción del número de espermatozoides unidos al ovocito y un completo bloqueo de fusión sugiriendo una función de las P-GPI en este proceso (Coonrod *et al.*, 1999a,b). Trabajos más recientes han demostrado que la disminución en la fusión y unión

espermatozoide-ovocito producido por el tratamiento enzimático utilizando PI-PLC está relacionado con el corte de proteínas de 70 y 45-35 kDa del oolema (Alfieri *et al.*, 2003). Por otro lado, para confirmar la importancia de P-GPI en el oolema y su papel en la fecundación *in vivo*, se realizó un knockout del gen *Pig-A*, una enzima involucrada en la biosíntesis de P-GPI. Se observó que ratonas -/- para *Pig-A* eran infértiles, presentaban menos del 1% de ovocitos fecundados *in vivo* y múltiples espermatozoides en el EPV (Alfieri *et al.*, 2003). Puesto que la fusión de gametos está regulada por un gran número de proteínas que actúan de forma directa o indirecta en la membrana de ambos gametos, los avances en este área dependerán de la identificación de las proteínas unidas a P-GPI en el oolema para de esta forma conocer el papel de P-GPI durante la fusión de gametos.

#### ■ Tetraspaninas

Las tetraspaninas fueron descubiertas inicialmente en 1990 (Oren *et al.*, 1990), sin embargo la importancia biológica de estas proteínas ha sido descrita recientemente (Seigneuret *et al.*, 2001). Las tetraspaninas son proteínas adaptadoras que modulan funciones celulares claves que incluyen la fusión, la adhesión, la migración, la diferenciación y la transducción de señales. La mayoría de los miembros de la familia contienen 4-6 residuos extracelulares de cisteína unidos por 2-3 puentes de disulfuro (Hemler, 2003). Una de las principales características de las tetraspaninas es la habilidad de interactuar con un gran número de proteínas de superficie como integrinas, con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, factores de desarrollo anclados a la membrana y otras tetraspaninas (Hemler, 2005).

La tetraspanina CD9 fue la primera proteína implicada en la fecundación cuando se observó *in vitro* que anticuerpos contra esta tetraspanina inhibían la unión y fusión ovocito-espermatozoide de forma dependiente (Chen *et al.*, 1999). Una inequívoca función se estableció más tarde cuando tres laboratorios diferentes generaron ratones deficientes en CD9 ayudando a establecer su función en la fusión del ovocito y el espermatozoide. En estos animales, tras la fecundación *in vivo* se observaba un gran número de espermatozoides en el EPV de los ovocitos, indicando que la interacción del espermatozoide y el ovocito en

la etapa temprana es normal y que el fallo de la fecundación ocurre durante la unión y fusión de las membranas plasmáticas (Le Naour *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000; Kaji y Kudo, 2004). A pesar de la pérdida de la capacidad de fusión, el uso de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) puede dar lugar a un embrión viable que se desarrolla a término (Miyado *et al.*, 2000). Estas observaciones aportaron obvios y determinantes datos de la función de CD9 en la fusión de gametos. En la especie porcina, CD9 está presente en el oolema de ovocitos de folículos preantrales y su síntesis es continua hasta que el ovocito completa su desarrollo. Durante la maduración *in vitro* también se observa un aumento en la síntesis de CD9 desde la etapa de VG hasta MII. De la misma forma que se describió inicialmente en otras especies, la fecundación en la especie porcina se puede bloquear con anti-CD9 (Li *et al.*, 2004).

#### ■ Proteínas integrinas

Las integrinas son una familia de moléculas de adhesión celular que en diferentes sistemas median en la interacción célula-célula así como célula-matriz extracelular. Existen en heterodímeros, dos subunidades bien identificadas denominadas subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ . Diferentes combinaciones de subunidades dan lugar a un total de 24 integrinas diferentes. Se ha descrito, que al menos 6 miembros de la familia de las integrinas interactúan con por lo menos 8 proteínas diferentes de la familia ADAM (desintegrina y metaloproteasa) (Eto *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos de una serie de experimentos *in vitro*, enfocados a identificar la posible función de las integrinas del ovocito durante la fusión de membranas de los gametos en el modelo murino, indican que en particular la integrina  $\alpha 6\beta 1$  está implicada como receptor de ADAM-2 y ADAM-3 localizadas en el espermatozoide (Almeida *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios utilizando ratones knockout para confirmar estos resultados, no se ha podido demostrar una posible función de las integrinas del ovocito en la fusión de membranas de gametos, ya que estos animales presentan una fertilidad normal (He *et al.*, 2003). La presencia de las integrinas en el oolema y de proteínas de la familia ADAM en el espermatozoide apoya la posibilidad de que éstas tengan un papel durante la fecundación, en procesos como la fusión de membranas, mecanismo que ha sido estudiado como

prioritario. Sin embargo, el oolema no sólo participa en la fusión de membranas, también tiene un importante papel en el bloqueo de la polispermia. A pesar de que el oolema es una estructura formada por una importante cantidad de proteínas, en la actualidad la información relacionada con la función y caracterización de éstas es escasa.

Las proteínas localizadas en los gamentos pueden interactuar como ligando-receptor tal y como se ha descrito entre las integrinas y proteínas miembros de la familia ADAM. En la actualidad, ningún miembro de la familia de estas proteínas ha sido descrito en el oolema, a pesar de que la expresión del gen que codifica para la metaloproteasa ADAM-10 ha sido descrito recientemente en ovocitos de ratona (Evsikov *et al.*, 2006).

### **Proteínas espermáticas**

#### ■ ADAM (desintegrina y metaloproteasa)

Estas proteínas tienen dominios estructurales similares entre ellas incluyendo una región extracelular, un dominio metaloproteasa, un dominio desintegrina, un dominio rico en cisteína y una secuencia tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico). Durante dos décadas, distintos miembros de la familia ADAM localizados en el espermatozoide se han considerado proteínas con un importante papel en la unión y fusión de los gametos (Evans, 2001; Primakoff y Myles, 2002). Una de las primeras proteínas ADAM descritas implicada en el proceso de reconocimiento espermatozoide-ovocito en el conejo de Indias fue la ADAM-2 (fertilina- $\beta$ ; Primakoff *et al.*, 1987). En el ratón existen otras proteínas ADAM con posible implicación en reproducción entre las que se encuentran ADAM-3 (ciritestina), cuya expresión está restringida al testículo y ADAM-4 y ADAM-5 que también están presentes en testículo y en otros órganos (Evans, 2002).

Para analizar de forma directa la función de las ADAM se han creado ratones knockout para ADAM-2 o ADAM-3 esperando que los machos presentaran importantes alteraciones en su fertilidad. Sin embargo, los espermatozoides de ratones knockout, tanto para ADAM-2 como ADAM-3,

presentan una disminuida capacidad para unirse al oolema y conservan la habilidad de fusionar las membranas, observándose en los espermatozoides de estos machos una reducida capacidad de unirse a la ZP. Por otra parte, espermatozoides de animales knockout para ADAM-2 presentan un defecto adicional durante el tránsito por el tracto reproductivo femenino, mientras que la migración de espermatozoides knockout para ADAM-3 es normal (Cho *et al.*, 1998; Shamsadin *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001).

#### ■ Proteínas de secreción ricas en cisteína (CRISP)

Como se mencionó anteriormente en el apartado 4.1.3.2, los espermatozoides interactúan con proteínas secretadas por las células epiteliales durante su paso a través del epidídimo. La incorporación de alguna de estas proteínas en la membrana del espermatozoide produce una importante remodelación de la organización de la superficie celular. En el epidídimo de varias especies de mamíferos como la porcina (Vadnais *et al.*, 2008), murina y humana son secretadas una serie de proteínas ricas en cisteína (CRISP) entre las que se encuentran las proteínas CRISP-1 que se expresa en el epidídimo de manera andrógeno-dependiente (Cameo y Blaquier, 1976); CRIPS-2 expresada en el testículo y CRISP-3 que se localiza en distintos tejidos (Mizuki y Kasahara, 1992; Schambony *et al.*, 1998).

Estudios realizados en ratón demuestran que CRISP-1 es un posible mediador de la interacción espermatozoide-ovocito. Mediante ensayos *in vivo* se ha demostrado que la preincubación de espermatozoides con anticuerpos anti-CRISP-1 inhibe la fusión ovocito-espermatozoide durante la inseminación artificial (Cuasnicu *et al.*, 1984). De forma similar, anti-CRISP-1 presente en el medio de fecundación *in vitro* inhibe la interacción espermatozoide-ovocito. Otros estudios han demostrado que la proteína CRISP-1 purificada de epidídimo de ratón se une al oolema de ovocitos de ratón y de rata produciendo niveles bajos de fecundación en ensayos *in vitro* (Cohen *et al.*, 2000). Por otra parte, ratones inmunizados con CRISP-1 presentan una importante disminución en el nivel de fecundación. Recientes estudios indican que la proteína CRISP-2 recombinante estimula la reacción acrosómica de espermatozoides de verraco (Vadnais *et al.*, 2008).

## ■ Proteína Izumo

La proteína Izumo es una molécula de 56 kDa en el ratón y 37 kDa en el hombre localizada en la membrana acrosomal interna y en el segmento ecuatorial del espermatozoide no descrita hasta la fecha en especies porcina y bovina. Esta proteína es un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Inoue *et al.*, 2005). Inicialmente se caracterizó como una proteína específica del testículo (Cameo y Blaquier, 1976; Kohane *et al.*, 1983). Los primeros ensayos *in vitro* para establecer la función de Izumo se realizaron con un anticuerpo (OBF-13), con el objetivo de bloquear proteínas del espermatozoide que son clave para la fusión espermatozoide-ovocito en hombre y ratón, observándose que los espermatozoides incubados con anti-OBF13 inhibían la fecundación (Okabe *et al.*, 1987). Estos resultados se han confirmado con estudios *in vivo* con animales knockout en los que hembras Izumo *-/-* tienen una fertilidad normal, mientras que machos Izumo *-/-* son estériles. En ovocitos de hembras cruzadas con machos Izumo *-/-* se puede observar un gran número de espermatozoides en el EPV, indicando un defecto en la fusión con el oolema pero no en la capacidad de atravesar la ZP. Este posible defecto en la fusión fue confirmado con ensayos *in vitro* de fecundación mostrando que los ovocitos no pueden ser fecundados con espermatozoides de animales Izumo *-/-*. Se estableció así que la esterilidad en estos ratones knockout para Izumo es específica debida al fallo en la fusión del espermatozoide con el oolema (Inoue *et al.*, 2005).

## ■ Enzima mSLLP1 (proteína espermática tipo lisosoma de ratón)

La enzima tipo lisosoma mSLLP1 ha sido localizada en el segmento ecuatorial del espermatozoide humano y de ratón durante la reacción acrosómica. En el espermatozoide de ratón parece tener un papel importante en la unión espermatozoide-ovocito y durante la fecundación (Herrero *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha observado que la exposición de ovocitos con mSLLP1 recombinante o anticuerpos anti-mSLLP1 presentan una significativa inhibición de la unión espermatozoide-ovocito. Hasta la fecha esta enzima no ha sido descrita en la especie porcina ni en la bovina.

## ■ Proteínas chaperonas

Recientemente, se han descrito en la membrana del espermatozoide proteínas características del retículo endoplasmático que participan en el plegamiento de las proteínas. Estas proteínas son principalmente miembros de la familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDI). En los últimos años se ha confirmado que estas proteínas también se localizan en la membrana de diferentes células somáticas (Turano *et al.*, 2002). En estudios realizados mediante un análisis global por proteómica de la membrana del espermatozoide murino se han identificado diferentes miembros de la familia PDI. Las proteínas ERp57 (ER-60), ERp72 y P5 se han localizado en la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del espermatozoide (Ellerman *et al.*, 2006). En ensayos para conocer su función, se ha observado que espermatozoides preincubados con inhibidores de la actividad PDI reducen sustancialmente el grado de fusión del espermatozoide y el ovocito, y el uso de anti-ERp57 inhibe la fusión espermatozoide-ovocito de ratón (Ellerman *et al.*, 2006).

La implicación de proteínas presentes en el ovocito (oolema y GCs), así como proteínas presentes en la membrana de los espermatozoides es fundamental para una fecundación exitosa, por un lado apoyando el paso del espermatozoide a través de la ZP, y por otro durante la fusión de las membranas de los gametos y durante el bloqueo de la polispermia.

### **4.2.3. Reanudación de la meiosis y formación del pronúcleo masculino y femenino**

La fusión de los gametos regulada por las proteínas antes mencionadas da paso a la activación nuclear del ovocito a través del aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ . El ovocito, que antes de la fecundación había quedado detenido en estadio de MII, reanuda la meiosis dando lugar finalmente a la extrusión del segundo CP.

Tras la entrada del espermatozoide al ovocito se presentan una serie de procesos sincronizados y fundamentales para la fecundación. En el espermatozoide, la membrana nuclear de éste se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma

una nueva membrana nuclear dando lugar al pronúcleo masculino (PNM). El factor que controla la formación del PNM se conoce como factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Motlik *et al.*, 1980) y aparece en el ovocito durante la fase final de la maduración (Ding y Foxcroft, 1994). Por otra parte y tras la extrusión del segundo CP, el genoma haploide materno restante también se descondensa, se forma la membrana nuclear y el pronúcleo femenino. La síntesis de ADN comienza de forma simultánea en los dos pronúcleos.

En la mayoría de las especies, el ovocito contiene factores citoplasmáticos que reaccionan con la cromatina espermática induciendo cambios moleculares que incluyen: la rotura de puentes disulfuro, la degradación enzimática parcial de proteínas nucleares y la liberación de las protaminas asociadas a la cromatina y su inmediata sustitución por histonas procedentes del ovocito (Ding *et al.*, 1992; Sun y Nagai, 2003). Entre estos factores citoplasmáticos se encuentra el glutatión. El glutatión (GSH) es el principal compuesto sulfhidrilo no proteico presente en las células mamíferas y tiene múltiples funciones, incluyendo un efecto en el transporte de los aminoácidos, síntesis de ADN y proteínas, reducción de los puentes disulfuro y una acción antioxidante que protege a las células contra el daño oxidativo (Meister, 1983,1988; Yoshida, 1993). La síntesis de GSH durante la maduración de los ovocitos es un requisito previo para que se produzca la descondensación de la cromatina del espermatozoide penetrado y, por tanto, para que se consiga la formación del PNM (Perreault *et al.*, 1988) ya que el GSH reduce los puentes disulfuro (S-S) de las protaminas del núcleo espermático, promoviendo su rotura (Nagai *et al.*, 1990) descondensándose así su cromatina.

Una vez completamente formados, los pronúcleos migran hacia el centro del citoplasma, se aproximan el uno al otro hasta quedar frente a frente, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian (singamia) antes de efectuar la primera división mitótica. La unión o fusión de los pronúcleos dura aproximadamente 12 horas en los mamíferos y es considerada el fin del proceso de fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988).

#### 4.2.4. Polispermia

La entrada de un único espermatozoide al interior del ooplasma del ovocito (monospermia) es una característica esencial para los procesos reproductivos en los mamíferos. La entrada de más de un espermatozoide al ovocito se ha considerado un proceso patológico denominado **polispermia** (Hunter, 1976, 1991). La polispermia en mamíferos tiene como consecuencia el desarrollo fallido del cigoto. Cuando se presenta un nacimiento en mamíferos a partir de un embrión polispérmico, éste se caracteriza por presentar severas malformaciones y múltiples anormalidades (Pitt *et al.*, 1981, Kjaer *et al.*, 1997; Nolting *et al.*, 2002). La polispermia es un problema común y aún sin resolver en los sistemas de fecundación *in vitro* en la especie porcina (Coy y Romar, 2002; Hao *et al.*, 2006). El índice de polispermia que presenta esta especie limita la obtención de embriones para su uso en áreas de investigación aplicada como la producción de animales transgénicos para xenotrasplantes, obtención de células madre, investigación sobre terapias génicas, transferencias nucleares o biomedicina experimental.

En la especie porcina, algunos autores indican que durante la fecundación *in vivo* existe un 5%-35% de polispermia (Hunter, 1973), mientras que en ovocitos madurados y fecundados *in vitro* puede alcanzar un 65% (Wang *et al.*, 1998a). Estos índices de polispermia son considerablemente elevados comparados con otras especies. Por ejemplo, en ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* el índice de polispermia no supera un 10% (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki y Nakahara, 1990; Kawarsky *et al.*, 1996). A diferencia de la situación *in vivo*, en la cual la proporción ovocito:espermatozoide es cercana a la unidad (Hunter, 1993), *in vitro* los ovocitos son expuestos a un elevado número de espermatozoides capacitados dando lugar en muchos casos a penetraciones polispérmicas (Nagai *et al.*, 1984; Coy *et al.*, 1993). Por otra parte, de acuerdo con Wang *et al.* (1999), en la especie porcina la polispermia *in vitro* podría deberse a un retraso en el establecimiento de la reacción de zona favorecida por el elevado número de espermatozoides en las cercanías del ovocito, aumentado así la posibilidad de penetraciones simultáneas.

Se ha propuesto que la polispermia pudiera ser un proceso fisiológico en la especie porcina y que los ovocitos tienen algún mecanismo por el cual eliminan los espermatozoides excedentes en el ooplasma (Han *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2001). Sin embargo, aún se considera que la entrada al ooplasma de más de un espermatozoide es letal para el desarrollo embrionario y que el bloqueo de la polispermia en la especie porcina es más complejo (o ineficiente, según los autores que se consulten) en comparación con otras especies. En esta especie, se ha abordado el problema de la polispermia en sistemas *in vitro* tomando en cuenta diferentes factores como la inadecuada maduración nuclear y citoplasmática asociada a una incompleta exocitosis de los GCs (Wang *et al.*, 1997b), la capacitación espermática *in vitro* (Hunter y Nichol, 1988) y el cocultivo de los gametos con células oviductales *in vitro* (Romar *et al.*, 2005). Según Abeydeera (2002), el sistema ideal de FIV porcina sería aquél con el que se lograsen tasas de penetración superiores al 80% con una polispermia inferior al 10%.

En la actualidad, se sabe que un gran número de variables contribuyen al aumento de la polispermia. En mamíferos, por ejemplo, se ha observado un aumento en el índice de polispermia en ovocitos inmaduros comparado con ovocitos maduros (Ducibella y Buetow, 1994). En especies como la porcina, los ovocitos inmaduros incrementan en diez veces la incidencia de una fecundación polispermica y disminuyen hasta un 10% la fecundación monospermica (Hunter *et al.*, 1976), lo que se atribuye a una insuficiente liberación del contenido de los GCs debido a un número inadecuado de estas organelas en el cortex de los ovocitos inmaduros (Cran, 1985; Abbott y Ducibella, 2001). Por otra parte, los ovocitos envejecidos también presentan una mayor polispermia tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Hunter, 1991; Wortzman y Evans, 2005), atribuyéndose esta situación a una exocitosis prematura y espontánea de los GCs (Ducibella, 1996; Xu *et al.*, 1997). La polispermia también se ha asociado a anomalías en la ZP ya que ovocitos con una ZP de aspecto irregular tienen un mayor índice de polispermia (Familiari *et al.*, 1992; Keefe *et al.*, 1997).

Los mamíferos utilizan diferentes mecanismos para reducir el índice de polispermia entre los que se encuentran la capacitación espermática, el número de espermatozoides en el lugar de la fecundación y el paso a través del tracto

reproductor femenino (Yanagimachi, 1994b) durante el cual los ovocitos interactúan con las secreciones oviductales (Hunter, 1991; Wang *et al.*, 2003). La interacción del ovocito con proteínas oviductales origina un endurecimiento de la ZP que favorece la monospermia. Se ha descrito que la exposición de ovocitos porcinos y bovinos a fluido oviductal en condiciones *in vitro* aumenta la resistencia a la digestión de la ZP con pronasa y que estos cambios en la ZP favorecen la monospermia (Coy *et al.*, 2008a) y el desarrollo embrionario (Lloyd *et al.*, 2009). La implicación de las proteínas oviductales durante la fecundación se ha confirmado tras la localización de éstas en la ZP, EPV y oolema de ovocitos porcinos extraídos del oviducto (Brown y Cheng, 1986; Buhi *et al.*, 1993). También se ha sugerido que estas glicoproteínas regulan la excitosis sincronizada de los GCs y/o incrementan la sensibilidad de la ZP al contenido de los mismos (Hunter, 1991; Kim *et al.*, 1996). Recientemente se ha descrito que la proteína responsable de las modificaciones en la ZP es una glicoproteína específica del fluido oviductal (oviductina) en asociación con la heparina (Coy *et al.*, 2008a).

Por otro lado, durante la interacción de los gametos, la polispermia se previene mediante la modificación de dos estructuras ovocitarias: la ZP y/o el oolema, dependiendo de la especie (Wolf, 1981). Especies como la porcina y bovina utilizan ambas estructuras para bloquear la polispermia (Hunter y Nichol, 1988; Hunter, 1990).

El bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP, también conocido como **reacción de zona**, está asociado con el contenido de los GCs que es liberado al EPV tras la reacción cortical. Las distintas enzimas (ovoperoxidasa, enzimas tipo tripsina, proteinasas, N-acetilglucosaminidasa, tPA) y proteínas (p75 (PAD), p62 y p56, p32) liberadas de los GCs (Gulyas y Schmell, 1980; Gwatkin *et al.*, 1993; Pierce *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Hoodbhoy y Talbot, 1994) trabajan de forma individual o sinérgica produciendo modificaciones en las glicoproteínas que forman la ZP. Estas modificaciones alteran los receptores de los espermatozoides en la ZP, siendo un ejemplo la conversión de ZP2 a ZP2f (Moller y Wassarman, 1989). Tras ser modificada, la ZP pierde la habilidad de unir espermatozoides y de inducir la reacción acrosómica de éstos, por lo que se previene la entrada de más de un espermatozoide al ovocito (Wang *et al.*, 2003). Las posteriores

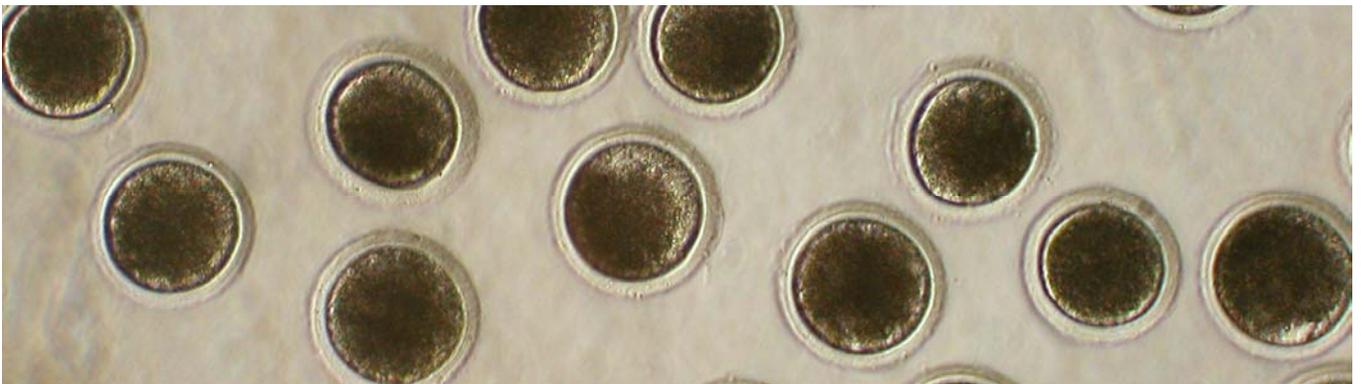
modificaciones enzimáticas catalizadas por proteínas de los GCs que generan enlaces entre proteínas ("crosslinking"), forman una barrera mecánica para futuras interacciones del espermatozoide. En la especie porcina se ha comprobado *in vitro* la formación de "crosslinking" utilizando diferentes sustancias químicas observándose que tras la formación de los crosslinking disminuye notablemente la polispermia (Coy et al., 2008b; Cánovas et al., 2009).

En contraste con la reacción de zona, el papel del contenido de los GCs en el bloqueo de la polispermia a nivel del **oolema** es muy controvertido (Wolf y Hamada, 1979; Horvath et al., 1993; Tatone et al., 1994), puesto que diferentes ensayos *in vitro* indican que el contenido de los CGs de ratona liberado tras la activación eléctrica no evita o disminuye el número de espermatozoides que penetran los ovocitos libres de ZP comparados con el control, indicando así que el contenido de los GCs en el oolema no produce ningún tipo de modificación como sucede en la ZP (Horvath et al., 1993; Sengoku et al., 1995). Poco se conoce del mecanismo que regula el bloqueo de la polispermia a nivel del oolema, lo que si está claro es su participación en conjunto con la ZP en especies como la porcina (Hunter y Nichol, 1988; Hunter, 1990). Estas conclusiones se obtienen tras la incubación de ovocitos libres de ZP de diferentes especies, en las que se puede observar que pocos ovocitos son penetrados por más de un espermatozoide, reforzando así el papel del oolema en el bloqueo de la polispermia (Wolf, 1978; Zuccotti et al., 1991; Horvath et al., 1993; Sengoku et al., 1995). Algunos autores indican que el oolema de los embriones pierde la capacidad de fusionar espermatozoides (Binor et al., 1982; McAvey et al., 2002) y que, de alguna manera, el oolema de cigotos es diferente al de ovocitos no fecundados, especialmente a nivel de su distribución lipídica (Wolf, 1978). El bloqueo de la polispermia a nivel de oolema también se ha asociado con la pérdida o enmascaramiento de receptores localizados en éste y que participan en la fusión del espermatozoide (Zuccotti et al., 1991; Blobel et al., 1992).

Como podemos ver, el bloqueo de la polispermia involucra proteínas localizadas tanto en el tracto reproductor femenino como en los GCs y en el oolema. En la especie porcina, no existe abundante información relacionada con las proteínas localizadas en los GCs y el oolema de ovocitos. Sería por tanto

complicado resolver en la especie porcina la polispermia sin antes conocer el papel de los GCs, en particular el contenido de estas organelas y su posible función, así como el de proteínas localizadas en el oolema.

## 5. Material y Métodos



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Medios de cultivo y suplementos

Los reactivos químicos empleados se obtienen de Sigma Aldrich Química (Madrid, España) salvo que se indique lo contrario. Los medios de cultivo se preparan con agua bidestilada tratada con un sistema de desionización MilliQ-plus (Milli-Q, Millipore, EEUU), hasta alcanzar una resistencia final de 18.2 M $\Omega$ /cm. Las lectinas *Arachis hypogaea* (PNA) y Wheat germen agglutinin (WGA) y los anticuerpos secundarios monoclonales anti-HRP (peroxidasa de rábano picante) producidos en conejo y anti-TRITC (isotiocianato de tetrametil rodamina) producido en conejo se compraron en Roche (Barcelona, España). Los anticuerpos policlonales anti-ER-60, anti-Calreticulina, anti-ADAM-10 y anti-ADAM-17 utilizados son de la casa comercial Abcam (Cambridge, Reino Unido).

La composición y suplementos de los medios para transporte y lavado de ovarios, maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, capacitación de espermatozoides y fecundación *in vitro* (FIV) se detallan a continuación.

Para el lavado de los ovarios se utiliza primeramente una solución atemperada de cetrimida (bromuro de hexadecil-trimetilamonio) al 0'04% (p/v) en agua bidestilada y posteriormente solución salina fisiológica al 0'9% NaCl (p/v) con 100UI/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina.

La recogida de los ovocitos porcinos se realiza en PBS (tampón fosfato salino) suplementado con PVA (alcohol de polivinilo) (1g/L) y rojo fenol (0'005g/L). A este tampón suplementado le llamaremos PBS. La recogida de los ovocitos bovinos se realiza en medio TCM-199 con sales de Hanks, L-glutamina y bicarbonato sódico a pH 7'4, suplementado con Hepes (10mM), 2% (v/v) de suero fetal bovino (previamente inactivado a 57°C durante 30 minutos) (Beitz Haemek, Israel), glutamina (200mM), penicilina (10.000UI/ml) y estreptomicina (10.000UI/ml).

Medio **NCSU-37**. Se prepara una solución stock (Tabla 3) con agua ultrapura. A continuación se esteriliza por filtración haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana de 0'22µm de diámetro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EEUU) y se conserva en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

**Tabla 3.** Composición del medio NCSU-37 stock (Petters y Wells, 1993) para MIV de ovocitos porcinos.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108'73
NaHCO <sub>3</sub>	25'07
KCl	4'78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1'19
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1'19
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1'70
Glucosa	5'55
D-Sorbitol	12'00
Penicilina G sódica	0'18
Sulfato de estreptomicina	39'00UI/ml

Medio **TALPp**. Se utiliza para la FIV de ovocitos porcinos. La solución stock (Tabla 4) se prepara con agua ultrapura tal y como describen Rath *et al.* (1999). Se esteriliza por filtración y se conserva bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de cuatro semanas.

Medio **TALPb**. Se utiliza para la FIV de ovocitos bovinos. La solución stock (Tabla 5) se prepara con agua ultrapura tal y como describen Parrish *et al.* (1988). Se esteriliza por filtración y se conserva bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de cuatro semanas.

Medio **spermTALPb**. Se utiliza para la capacitación de espermatozoides bovinos. La solución stock (Tabla 6) se prepara con agua ultrapura tal y como

describen Parrish *et al.* (1988). Se esteriliza por filtración y se conserva bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de cuatro semanas.

**Tabla 4.** Composición del medio **TALPp** stock (Rath *et al.*, 1999) para FIV de ovocitos porcinos.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114'06
NaHCO <sub>3</sub>	25'07
KCl	3'20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0'35
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'50
Lactato Ca•5H <sub>2</sub> O	8'00
Lactato sódico	10'00
Glucosa	5'00
Cafeína	2'00
Sulfato de kanamicina	0'17
Rojo fenol	0'003
Alcohol de polivinilo (PVA)	1'00mg/ml

**Tabla 5.** Composición del medio **TALPb** stock (Parrish *et al.*, 1988) para FIV de ovocitos bovinos.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114'06
NaHCO <sub>3</sub>	25'07
KCl	3'20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0'35
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'50
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	2'00
Lactato sódico	10'00
Penicilina	50'00UI/ml
Estreptomomicina	50'00µg/ml

**Tabla 6.** Composición del medio **spermTALPb** stock (Parrish *et al.*, 1988) para la capacitación de espermatozoides bovinos.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl	100'00
NaHCO <sub>3</sub>	25'00
KCl	3'20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0'30
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'40
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	2'00
Lactato sódico	20'50
Hepes	10'00
Penicilina	50UI/ml
Estreptomicina	50µg/ml

Para la **MIV de ovocitos porcinos** el medio NCSU-37 stock se suplementa con cisteína, β-mercaptoetanol, insulina, glutamina, dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG (Foligón, Intervet, Holanda) y HCG (Veterin corion, Divasa Farmavic, Barcelona, España) tal y como describen Funahashi *et al.* (1997) y en la proporción indicada en la tabla 7.

**Tabla 7.** Suplementos del medio NCSU-37 stock para MIV de ovocitos de la especie porcina (Funahashi y Day, 1997).

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Cisteína	0'57mM
β-mercaptoetanol	50'00µM
Insulina	5'00mg/L
Glutamina	1'00mM
dbAMPc	1'00mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10UI/ml
HCG	10UI/ml

Para la **FIV de ovocitos porcinos**, el medio TALPp stock se suplementa con 3mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) y 0'12mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen Rath *et al.* (1999).

Para la **MIV de ovocitos bovinos** se utiliza medio TCM-199 modificado con sales de Earle, suplementado con L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (0'2mM), 10% v/v suero fetal bovino inactivado, gentamicina (50µg/ml), PMSG y HCG.

Para la **FIV de ovocitos bovinos**, el medio TALPb stock se suplementa con BSA (6mg/ml), piruvato sódico (1mM) y heparina (1'75UI/ml) tal y como describen Parrish *et al.* (1988).

Tanto para la MIV como para la FIV en ambas especies, los medios se equilibran 4 horas antes de su uso en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 38'5°C y atmósfera saturada de humedad.

## **5.2. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos**

### **5.2.1. Especie porcina**

Los ovocitos se obtienen a partir de ovarios procedentes de cerdas prepúberes, híbridas (Landrance X Large White), sacrificadas en el matadero y transportados en un recipiente atemperado con solución salina a 38°C. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavan con la solución de cetrimida y abundante solución salina, ambos a 38°C. La obtención de los ovocitos se realiza sobre una placa calefactora a 38°C, en cabina de flujo laminar y aspirando los folículos de 3-6mm de diámetro con una aguja de 18G conectada a una jeringuilla de 5ml. El contenido folicular obtenido se coloca en tubos y se deja sedimentar durante 5min. Pasado este tiempo, se elimina el sobrenadante, se adicionan 1-2ml de PBS atemperado y se pasa el contenido a placas de Petri. Bajo el estereomicroscopio se seleccionan los complejos cúmulus-ovocito (COCs) que presenten un citoplasma de aspecto homogéneo y granuloso rodeado al menos de 3-4 capas de células del cúmulus.

Una vez seleccionados, los COCs se lavan en medio de maduración NSCU-37 suplementado y tras el lavado se cultivan en este mismo medio durante 20-22h. Pasado este tiempo, los COCs se lavan y se transfieren a medio NSCU-37 sin hormonas ni dbAMPc durante otras 20-22h (Funahashi y Day, 1997). El cultivo se realiza en atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% CO<sub>2</sub>, a razón de 1 ovocito por cada 10µl de medio, cultivándose en grupos de 50 COCs.

### **5.2.2. Especie bovina**

Los ovocitos se obtienen a partir de ovarios procedentes de hembras bovinas (razas Asturiana, Charolés, Limussine y Simental) de entre 14 y 18 meses de edad sacrificadas en el matadero. El transporte, lavado y obtención de los ovocitos se realiza de forma similar a la descrita para la especie porcina. El contenido folicular obtenido se coloca en una placa de Petri y bajo el estereomicroscopio se seleccionan los COCs con citoplasma homogéneo y al menos 3-4 capas de células del cúmulus.

Una vez seleccionados los COCs, se lavan en medio TCM-199 suplementado para MIV. El cultivo se realiza en atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 22-24h a razón de 1 ovocito por cada 10µl de medio, cultivándose en grupos de 50 COCs.

## **5.3. Fecundación *in vitro***

### **5.3.1. Especie porcina**

Las muestras de espermatozoides porcinos proceden de verracos (Landrance X Large White) de 12-24 meses de edad y de fertilidad probada propiedad del centro de inseminación artificial Dalland Hybrid (Murcia, España). El semen se obtiene mediante el método manual recogiendo únicamente la fracción rica del eyaculado. Tras la recogida el semen se diluye 1:1 (v/v) en diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution) (Pursel y Jonson, 1975) (Tabla 8) a temperatura ambiente. La muestra se transporta al laboratorio en recipiente protegidos de la luz.

**Tabla 8.** Diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution) (Pursel y Jonson, 1975) para dilución del semen porcino.

Componentes	Concentración (mM)
Glucosa	0'0002
Na <sub>2</sub> •EDTA•2H <sub>2</sub> O	3'36
NaHCO <sub>3</sub>	15
Citrato de sodio	20
KCl	5

La capacitación de los espermatozoides se realiza en una columna de gradientes de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 90% (Tabla 9, Parrish *et al.*, 1995). A partir de esta solución se prepara una solución de Percoll al 45% (dilución 1:1 v/v de Percoll 90% y BTS). Se depositan 2ml de Percoll 90 en un tubo y, cuidadosamente, otros 2ml de Percoll 45% encima. Una vez preparada la columna de gradientes de Percoll se deposita 1ml de la muestra seminal. Se centrifuga a 2500g durante 30min, el sedimento formado por los espermatozoides que atraviesan los gradientes se recupera y se lava en TALPp suplementado mediante centrifugación (2500g, 10min). El sobrenadante se elimina y el sedimento se resuspende en medio TALPp suplementado fresco. Una alícuota de esta muestra se utiliza para comprobar la motilidad en fresco y medir la concentración espermática utilizando una cámara de Thoma. La motilidad espermática se evalúa en una escala subjetiva de 0-5 y el porcentaje de espermatozoides móviles en una escala de 0 a 100. Todas las muestras mostraron una calidad de movimiento superior a 3 y un porcentaje de espermatozoides móviles superior al 70% por lo que se emplearon para FIV.

La fecundación *in vitro* se realiza en medio TALPp suplementado. El pH del medio se ajusta a 7'4 y se equilibra 4 horas antes de su uso en un ambiente de atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de 40-44h de la MIV, los ovocitos se decumulan de forma mecánica (repetido pipeteo) y, posteriormente, se cultivan para la fecundación a razón de 1 ovocito por cada 10µl de medio. El

cocultivo de gametos se realiza en pocillos de 500µl de medio y la concentración de espermatozoides se ajusta a  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml.

**Tabla 9.** Solución de Percoll al 90% (Parrish *et al.*, 1995) para la preparación de espermatozoides porcinos.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	0'97
HEPES	0'10
KCl	1'00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0'10
NaHCO <sub>3</sub>	0'15
CaCl <sub>2</sub>	1'00
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'10
Lactato sódico	0'001
Percoll	90'00ml

### 5.3.2. Especie bovina

Los espermatozoides de toro utilizados proceden de dosis seminales congeladas de machos adultos de fertilidad probada de la raza autóctona Asturiana de los Valles, cedidas por la Asociación de Criadores (ASEAVA, Gijón, España). Las pajuelas de 0'5ml se conservan en nitrógeno líquido en el laboratorio hasta su uso.

La capacitación de los espermatozoides se realiza en medio spermTALPb suplementado con piruvato sódico (1'00mM) y BSA (6mg/ml). El semen se descongela 30min antes de la FIV colocando una pajuela de 0'5ml durante 30 segundos en un baño maría a 38°C. Pasado este tiempo se cortan los extremos de la pajuela y el contenido se deposita en un tubo que contiene 5ml de medio spermTALPb suplementado y se deja en este medio durante 10min a 38°C. Pasado este tiempo se centrifuga (2500g, 3min). Finalmente, se elimina el sobrenadante y al sedimento se le adiciona 1ml de medio spermTALPb

suplementado. Una alícuota de esta muestra se utiliza para comprobar la motilidad espermática en fresco y medir la concentración espermática utilizando una cámara de recuento celular (Thoma). En todas las muestras se observó una motilidad vigorosa y progresiva con un porcentaje de espermatozoides móviles superior al 60% por lo que se emplearon para FIV.

La fecundación *in vitro* se realiza en medio TALPb suplementado como se ha mencionado anteriormente. El medio se equilibra 4 horas antes de su uso en un ambiente de atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para la fecundación, 30min antes de incorporar los gametos en el medio, se adicionan 50µl/ml de una solución penicilamina-epinefrina-hipotaurina (PHE) preparada como se indica en la tabla 10. Los ovocitos se cultivan para la fecundación a razón de 1 ovocito por cada 10µl de medio. La concentración de espermatozoides utilizada para fecundar es de 1X10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

**Tabla 10.** Solución Epinefrina-Hipotaurina-Penicilina (PHE).

<b>Solución</b>	<b>Volumen (ml)</b>
Hipotaurina (1mM) en solución salina	2'5
Penicilamina (2mM) en solución salina	2'5
Ácido láctico (29'43mM) y metabisulfato sódico (5'29mM) en PBS	12'5
Epinefrina (1mM) en la solución anterior de ácido láctico y metabisulfato sódico	1
PBS (Tampón fosfato salino)	4

### **5.3.3. Tinción y valoración microscópica de los resultados de fecundación *in vitro* porcina**

Tras el cocultivo de gametos durante 20h, los ovocitos se lavan mediante repetido pipeteo en medio PBS con el objetivo de eliminar los espermatozoides adheridos a la ZP. Tras el lavado, los ovocitos se fijan en glutaraldehído al 0'5% en PBS durante 15min. Pasado este tiempo, los ovocitos se lavan en PBS y se

tiñen con Hoescht 33342 (1mg/ml en PBS) durante 30 minutos protegidos de la luz. Finalmente, los ovocitos se lavan de nuevo en PBS y se colocan sobre un portaobjetos dentro de una microgota de medio de montaje (Hoescht 1mg/ml en PBS y glicerol (1:1 v/v)). Se coloca un cubre objetos sobre la microgota y los bordes del cubreobjetos se sellan con esmalte de uñas para evitar la deshidratación de la muestra. Las preparaciones se visualizan a 200-400 aumentos en un microscopio (Leica) equipado con fluorescencia y filtro UV (Figura 4).

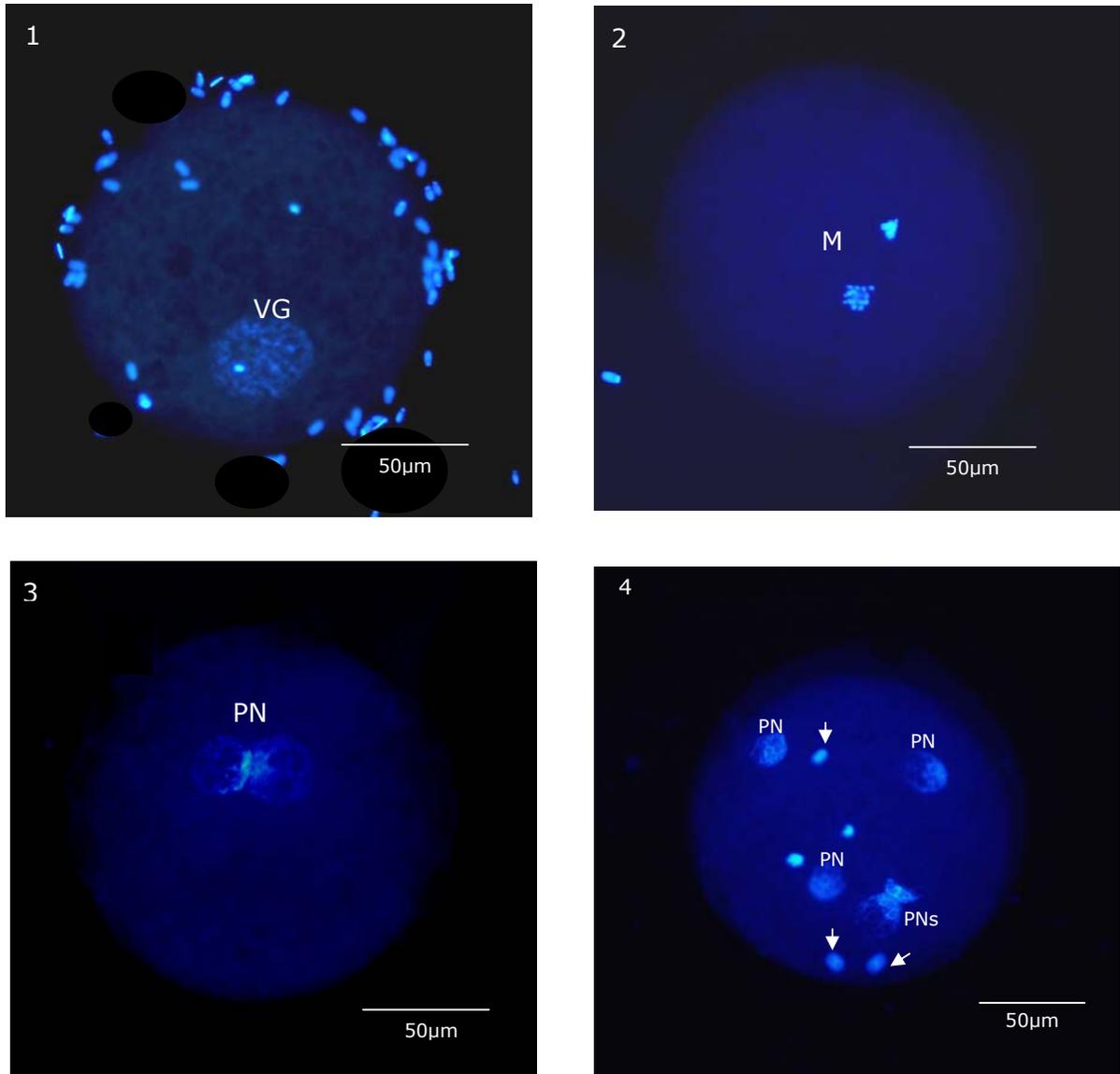
Las variables analizadas tras la FIV fueron las siguientes.

- Porcentaje de ovocitos penetrados (**% Penetración**): número de ovocitos penetrados sobre el total de ovocitos maduros.
- Numero medio de espermatozoides por ovocito (**E/O**): número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.
- Porcentaje de formación de pronúcleo masculino (**% PNM**): número de ovocitos que presentan al menos un pronúcleo masculino sobre el total de ovocitos penetrados.
- Porcentaje de monospermia (**% Monospermia**): número de ovocitos monospermicos en relación al número total de ovocitos penetrados.
- Porcentaje de espermatozoides adheridos a la ZP del ovocito (**SPZ-ZP**): número medio de espermatozoides unidos a la ZP.

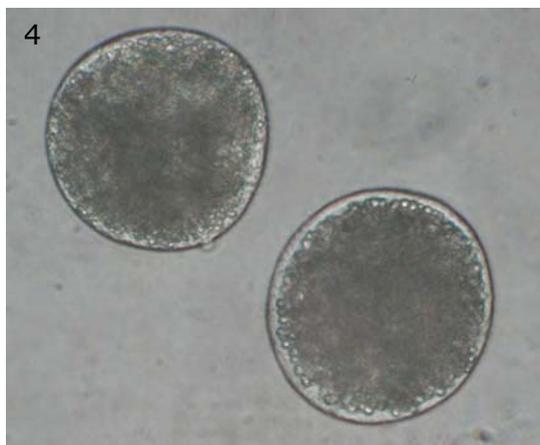
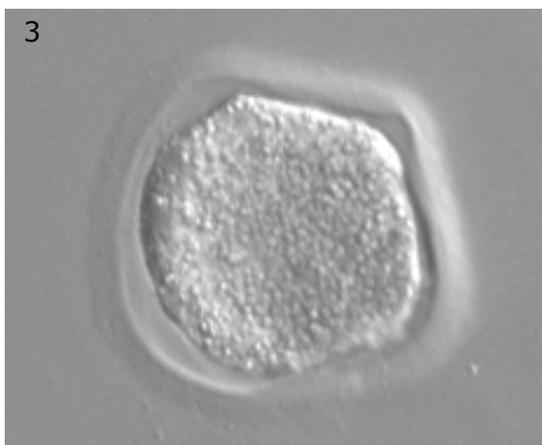
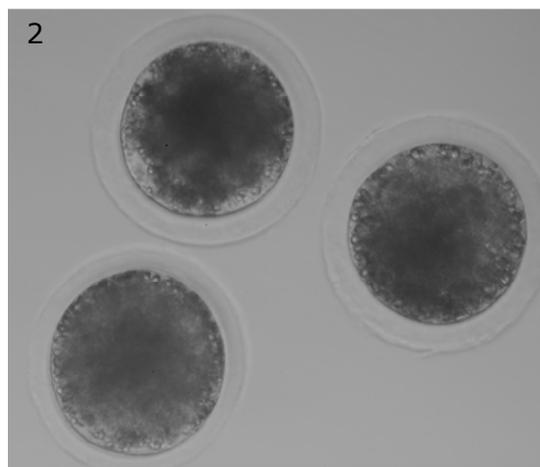
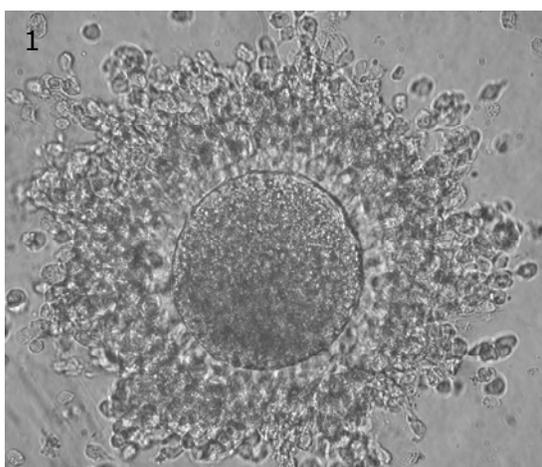
#### **5.4. Digestión de la zona pelúcida**

Para la digestión de la ZP se sigue el protocolo descrito por Coy *et al.* (2002) con ligeras adaptaciones. Los ovocitos madurados *in vitro* libres de células del cúmulus se colocan en gotas de 50µl de pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*) al 0'5% en PBS y se observan continuamente bajo el estereomicroscopio (200 aumentos), a 38°C y hasta la total digestión de la ZP (Figura 5). El tiempo que transcurre desde el contacto de los ovocitos con la pronasa hasta la total desaparición de la ZP se anota como tiempo de digestión de la ZP.

**Figura 4.** Evaluación en microscopio de fluorescencia de los ovocitos fijados (glutaraldehído 0'5%) y teñidos (Hoechst 33342 1mg/ml). 1) Ovocito en estadio de vesícula germinal (VG). 2) Ovocito en estadio de metafase II (M). 3) Ovocito monospérmico con dos pronúcleos (PN). 4) Ovocito polispérmico con 5 PN y 5 cabezas de espermatozoides descondensadas (flecha).



**Figura 5.** Digestión de la zona pelúcida porcina. 1) Ovocito con células del *cumulus oophorus*. 2) Ovocitos denudado donde se observa la ZP. 3) Ovocito en proceso de digestión de la ZP con pronasa al 0'5%. 4) Ovocitos sin ZP, tras la digestión con pronasa.



## **5.5. Obtención del contenido de los gránulos corticales de ovocitos porcinos y bovinos mediante interacción de gametos**

Para obtener el exudado de los GCs de forma fisiológica se realiza una FIV mediante la cual se permite durante un tiempo de 2h la interacción de los espermatozoides con ovocitos libres de ZP. El objetivo es que los espermatozoides interactúen directamente con el oolema de los ovocitos produciendo la reacción cortical y tras ésta, el contenido de los GCs se libere al medio de cultivo.

La obtención del exudado de los gránulos corticales (GCs) de forma fisiológica se realiza mediante la interacción de gametos para cada especie (Figura 6). Tras la maduración *in vitro* los ovocitos se decumulan de forma mecánica y la ZP se digiere con pronasa como se ha descrito previamente. Una vez digerida, los ovocitos se lavan en abundante PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  y los ovocitos libres de ZP se transfieren a 2ml de medio TALP suplementado para realizar un segundo lavado. Posteriormente los ovocitos sin ZP se cultivan en microgotas de 50 $\mu\text{l}$  de medio TALP suplementado (1 ovocito:1 $\mu\text{l}$  de medio) y se añaden espermatozoides capacitados como se ha descrito previamente. El cocultivo de ovocitos sin ZP y espermatozoides se realiza durante 2h en un ambiente de atmósfera humidificada a 38'5°C y 5%  $\text{CO}_2$ . A modo de control se incubaron microgotas únicamente con espermatozoides. Pasado este tiempo las microgotas de medio donde han interactuado los gametos y las que contenían únicamente los espermatozoides se aspiran utilizando una pipeta Pasteur, se depositan en tubos ependorf y se centrifugan (14.000g, 5 minutos, 4°C). Finalmente, el sobrenadante se aspira y se separa en alícuotas de 50 $\mu\text{l}$  que se almacenan a -80°C hasta su uso.

La excitosis de los gránulos corticales tras la interacción de gametos se confirma posteriormente mediante la fijación y tinción de los ovocitos (bovinos y porcinos) con lectinas y su observación bajo el microscopio confocal tal y como se describe en el apartado 5.8.1.

## 5.6. Precipitación del lisado de ovocitos porcinos con las lectinas PNA y WGA

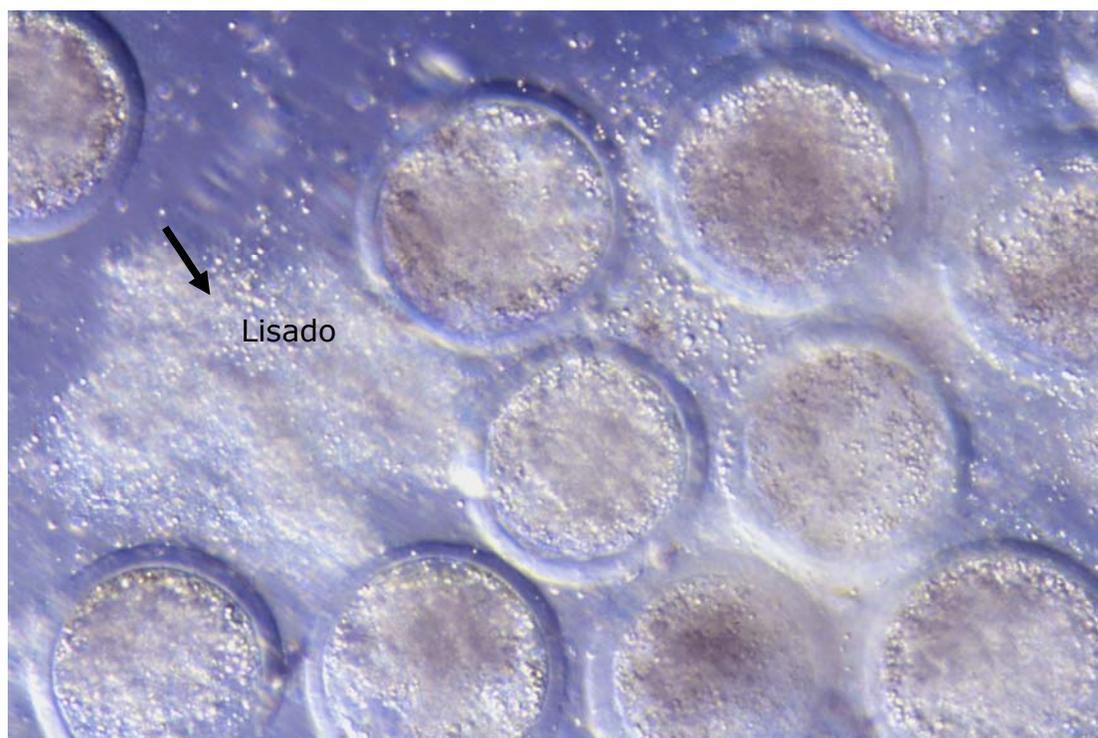
Pasadas 40-44h de la MIV, los ovocitos se lavan en PBS y de forma mecánica (repetido pipeteo) se eliminan todas las células del cúmulus. En un volumen mínimo se seleccionan los ovocitos decumulados y se transfieren a microgotas de agua ultrapura con inhibidor de proteasas 10x (una tableta en 10ml de agua ultra pura) (Tabletas de cóctel de inhibidores de proteasas, Roche, Barcelona, España) en las que, haciéndolos pasar a través de una pipeta Pasteur de diámetro menor al del ovocito, se lisan hasta romperlos (Figura 7). Una vez lisados, se separa el contenido citoplasmático (lisado) de las ZPs. La obtención del lisado se realiza a temperatura ambiente y en un tiempo que no supere los 10min. Las muestras de lisado de ovocitos se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La precipitación de glicoproteínas presentes en el lisado de los ovocitos porcinos se realiza con las lectinas PNA (lectina de *Arachis hypogaea*) y WGA (Wheat germe agglutinin) conjugadas con agarosa a razón de 3'5mg/ml por cada 1.000 ovocitos lisados. La mezcla lisado de ovocitos:lectina-agarosa se mantiene en agitación constante 2h a temperatura ambiente y pasado ese tiempo se centrifuga (7.000g, 5min) y se elimina el sobrenadante. Para separar las glicoproteínas unidas a las lectinas, al sedimento de esferas lectina-agarosa se le agrega tampón Laemmli 1X (Laemmli, 1970), se calienta ( $100^{\circ}\text{C}$ , 5min), se centrifuga (5.000g, 3min), se aspira el sobrenadante que se liofiliza (Alpha 1-2 LD plus, Christ, Berlín, Alemania) y el liofilizado se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 8).

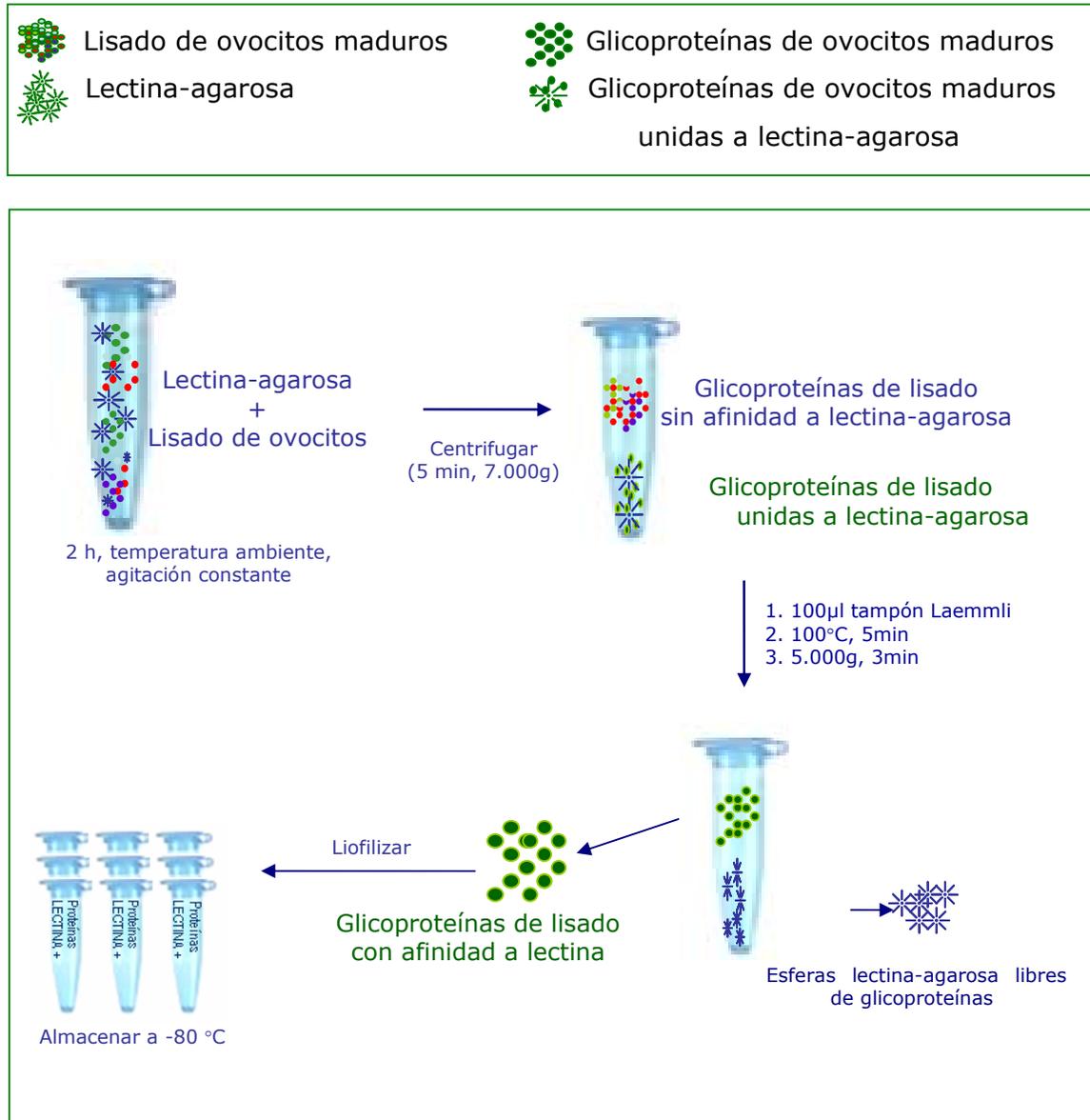
**Figura 6.** Obtención de exudado de GCs mediante interacción de gametos. 1) Ovocito porcino madurado *in vitro* con el primer corpúsculo polar (cp) extruído en el espacio perivitelino. 2) Ovocitos porcinos maduros en los que la zona pelúcida se ha digerido. 3 y 4) Interacción de gametos porcinos donde se observan los espermatozoides contactando directamente con el oolema.



**Figura 7.** Obtención de lisado de ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Los ovocitos decumulados se rompen con una pipeta y se obtiene el contenido citoplasmático (flecha).



**Figura 8.** Esquema de la precipitación de glicoproteínas del lisado de ovocitos porcinos madurados *in vitro* incubado con lectinas conjugadas a bolas de agarosa.



## 5.7. Estudio bioquímico de las glicoproteínas con afinidad a las lectinas PNA y WGA precipitadas del lisado obtenido de ovocitos porcinos

Las proteínas precipitadas con las lectinas se estudiaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, Western blot, tinción de plata y proteómica.

### 5.7.1. Electroforesis en SDS-PAGE

Las muestras que contienen las proteínas de interés obtenidas del lisado de ovocitos porcinos se resuspenden en tampón Laemmli 1:1 (v/v) que contiene 2% de SDS (dodecilsulfato de sodio), 2'5% de mercaptoetanol, 62'5mM Tris/HCl (pH 6'8) y 10% (v/v) de glicerol (Laemmli, 1970). La muestra y el tampón Laemmli se calientan a 95°C durante 5 minutos en baño maría. Para permitir la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se separan en geles discontinuos de poliacrilamida siendo la parte superior del gel el concentrador, con una concentración de poliacrilamida del 4% (Tabla 11), y la parte inferior el gel separador con una concentración de poliacrilamida del 12% (Tabla 12). La electroforesis se realiza a temperatura ambiente durante 1h a un voltaje constante de 150V y 39mA en tampón de recorrido compuesto por Tris-Base (0'025M), glicina (0'192M) y SDS al 0'1% (p/v) en agua. Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas analizadas, se corren en paralelo con las muestras, unos estándares preteñidos de peso molecular conocido (Invitrogen-Life Technologies, Santa Clara, California, EEUU).

**Tabla 11.** Composición del gel concentrador 4% acrilamida bis-acrilamida.

Componentes	Volumen
Agua destilada	3'05ml
Tris-HCl 1'5M, pH 6'8	1'20ml
SDS 10% (p/v)	50'00µl
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	650µl
Persulfato de amonio 10% recién preparado (p/v en agua)	25'00µl
Agitar y añadir TEMED (N,N,N',N',Tetrametiletildiamina)	5'00µl

**Tabla 12.** Composición del gel separador 12% acrilamida bis-acrilamida.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
Agua destilada	4'00ml
Tris-HCl 1'5M, pH: 8'8	2'5ml
SDS 10% (p/v)	100µl
Acrilamida-bis-acrilamida 30%	3'3ml
Persulfato de amonio 10% recién preparado (p/v en agua)	50µl
Agitar y añadir TEMED (N,N,N',N',Tetrametiletilendiamina)	10µl

### 5.7.2. Western blot

Los geles realizados como se ha descrito en el apartado anterior se equilibran durante 30 minutos en metanol al 20% (v/v) con una concentración 25mM de Tris y 192mM de glicina. Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF de 0'45 µm de tamaño de poro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EEUU), mediante la aplicación durante 1 hora de una corriente eléctrica de 100V en una cámara a 4°C. Una vez transferidas las proteínas, la membrana de PVDF se lava en tampón TBS (Tris, pH 7'4 (50mM), NaCl (150mM) y Tween 20 (0'1%)). Las uniones inespecíficas se bloquean con tampón TBS-T con 1% de BSA (p/v) durante 1 hora en agitación constante. Posteriormente, las membranas se incuban con diferentes anticuerpos y lectinas diluidos en TBS-T suplementado con 1% de BSA (p/v) a las concentraciones indicadas en la tabla 13.

El revelado de la membrana se realiza con reactivo ECL+Plus (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Alemania). Este sistema utiliza un sustrato quimioluminiscente que, en presencia de HRP (peroxidasa presente en el anticuerpo secundario) y en condiciones alcalinas, produce un compuesto luminiscente que puede ser detectado por el equipo de escáner (Typhoon 9410, Amersham Biosciences, Alemania).

**Tabla 13.** Concentración de lectinas y anticuerpos utilizados para el Western blot.

		Dilución
Lectinas-HRP	<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	10µg/ml
	Wheat germen agglutinin (WGA)	30µg/ml
Anticuerpos primarios (policlonales)	anti-ER-60	1:1.000
	anti-Calreticulina	1:1.000
Anticuerpo secundario (policlonal)	anti-HRP producido en conejo	1:20.000
	anti-HRP producido en ratón	1:5000

### 5.7.3. Tinción de plata

El gel obtenido tras la electroforesis como se describió en el apartado 5.7.1, se fija durante 30min en una solución de ácido acético-metanol 1:10 (v/v). Pasado este tiempo se hacen dos lavados de 15min cada uno, el primero en una solución de metanol al 50% en agua ultrapura y el segundo en agua ultrapura. El gel se sensibiliza con una solución de tiosulfato sódico al 0'01% en agua ultrapura (1min), y se realizan dos lavados en agua ultrapura de un minuto cada uno. Posteriormente, el gel se coloca en una solución de nitrato de plata al 0'1% en agua ultrapura y se mantiene a 4°C durante 20min. A continuación se realizan dos lavados de un minuto en agua ultrapura. Por último, el gel se revela con una solución de carbonato sódico al 2% en formol al 35%. En este paso se observa continuamente el gel hasta la aparición de las diferentes bandas proteicas. El gel se fija utilizando una solución de ácido acético al 5% en agua ultrapura y se conserva en una solución de ácido acético al 1% en agua ultrapura a 4°C. Excepto la incubación con nitrato de plata todo el procedimiento se realiza en agitación suave.

#### **5.7.4. Análisis por proteómica de las bandas proteicas de interés**

El análisis por espectrometría de masas se realiza en el laboratorio de proteómica de la sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

Tras realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida y teñir con la solución de plata descrita anteriormente, las bandas de interés se recortan y se lavan dos veces con agua ultrapura. Posteriormente, las bandas se destiñen siguiendo las indicaciones del kit comercial (Proteo Silver Plus, Silver Staining Kit). A continuación, se lavan dos veces con tampón bicarbonato amónico 25mM (pH 8'5) durante 30 minutos a 37°C y otras dos veces con tampón bicarbonato amónico 25mM (pH 8'5) en 50% de acetonitrilo. Las bandas se secan usando un concentrador-evaporador por vacío (Eppendorf 5301, Hamburgo, Alemania) durante 15-30min y tras el secado se incuban con 50µl de tampón bicarbonato amónico 25mM (pH 8'5) con tributilfosfina 10mM, a 60°C durante 15 minutos.

Después de eliminar el sobrenadante, se añaden radicales alquilo a las muestras reducidas utilizando 50µl de tampón de bicarbonato amónico 25mM (pH 8'5) con iodoacetamida 100mM durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realiza nuevamente un lavado y secado de las bandas como se indica anteriormente. Posteriormente, las muestras se rehidratan con tampón de bicarbonato amónico 25mM (pH 8'5) conteniendo aproximadamente 0'3µg de tripsina (grado proteómica) durante 45 minutos a 4°C y finalmente son sometidas a digestión durante 16-18 horas a 37°C en agitación.

Pasado este tiempo, la reacción de digestión se detiene con 0'5% de ácido trifluoro acético (ATF) y se recoge el sobrenadante. Las bandas se lavan con 50µl de una solución 50% de acetonitrilo y 0'5% de ATF durante 30 minutos y a 37°C. Estos lavados se repiten 3 veces y permiten mejorar la extracción de los fragmentos digeridos de las bandas del gel. El sobrenadante que contendrá los péptidos liberados del gel se almacena en un tubo y se seca usando el concentrador-evaporador por vacío.

La separación y análisis de las muestras se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS-MS). Para ello, se utiliza un sistema que consiste en un HPLC serie 1100 de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU), equipado con un muestreador automático termostatzado y una bomba capilar. Este HPLC se conecta a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones (Agilent Ion Trap XCT Plus) usando una interfase tipo electrospray.

Las muestras evaporadas se resuspenden en 10µl de tampón A que consiste en una mezcla de agua ultra pura:acetonitrilo:ácido fórmico (94'9:5:0'1; v/v). La muestra es inyectada en una columna de HPLC tipo Zorbax SB-C18 (5µm, 150 x 0'5mm, Agilent Technologies), la cual se encuentra en un compartimiento termostatzado a 40°C, utilizando un flujo de 10µl/min. Después de la inyección, la columna se lava con el tampón A durante 10min y los péptidos digeridos se eluyen usando un gradiente lineal 0-80% en un tampón compuesto por agua ultra pura:acetonitrilo:ácido fórmico (10:89'9:0'1; v/v) durante 120min.

El análisis de los datos obtenidos se realiza con la plataforma Spectrum Mill (Agilent Technologies) utilizando la última actualización de la base de datos NCBIInr (Centro Nacional de Información Biotecnológica no redundante).

## **5.8. Inmunocitoquímica**

### **5.8.1. Microscopía confocal**

Tras la MIV, los ovocitos se decumulan de forma mecánica en PBS y la ZP se elimina utilizando pronasa como se describe anteriormente. Los ovocitos se fijan en paraformaldehído al 3'7% (p/v) en PBS durante 30min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los ovocitos se lavan tres veces en PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, se permeabilizan con tritón X-100 al 0'1% (v/v) en PBS durante 10min y posteriormente se lavan 2 veces en PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Para diferenciar la localización de las proteínas entre región cortical y oolema del ovocito ciertos grupos experimentales se trataron sin permeabilizar, de esta forma los anticuerpos no acceden a la región cortical.

Una vez fijados y dependiendo del grupo experimental permeabilizados o no permeabilizados, los ovocitos se incuban 1h en cámara húmeda y protegidos de la luz en microgotas que contienen el anticuerpo primario, posteriormente se lavan 3 veces en PBS y se incuban nuevamente 1h en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario conjugado a TRITC (isotiocianato de tetrametil rodamina). En el caso del marcaje con lectina, los ovocitos porcinos se incuban 30min protegidos de la luz con la lectina PNA conjugada a FITC (isotiocianato de fluoresceína; Yoshida *et al.*, 1993). Para los ovocitos bovinos se realiza el mismo protocolo pero empleando lectina LCA (*Lens culinaris* agglutinin) conjugada a FITC (Hosoe y Shioya, 1997). Después del tratamiento con anticuerpos y/o lectina, los ovocitos se lavan en PBS y se colocan sobre un portaobjetos con medio de montaje (Slow Fade, Antifade Kit, Invitrogen, Eugen, Oregón, EEUU). Las muestras se almacenan a 4°C en oscuridad hasta su estudio. La concentración de anticuerpos y lectinas empleadas se describen en la tabla 14.

**Tabla 14.** Concentración de lectinas y anticuerpos utilizados para microscopía confocal.

		Dilución
Lectinas-FITC	<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin (PNA)	100µg/ml
	<i>Lens culinaris</i> agglutinin (LCA)	20µg/ml
Anticuerpos primarios (policlonales)	anti-ER-60	1:5
	anti-Calreticulina	1:10
	anti-ADAM-10	1:5
	anti-ADAM-17	1:5
Anticuerpo secundario (policlonal)	anti-TRICT producido en conejo	1:400

Para el análisis de colocalización (localización conjunta de proteínas y GCs), se realiza una tinción doble. Los ovocitos se incuban en primer lugar con el anticuerpo primario y secundario y, posteriormente, con la lectina PNA en las condiciones descritas previamente. Una vez capturada la imagen, y con el propio software del microscopio, se calcularon los índices de colocalización de Pearson y

de Manders. Estos índices nos muestran el grado de superposición, en un pixel de una misma imagen, del marcaje conjunto de lectina y anticuerpo. Los valores de los índices son negativos cuando no existe superposición entre lectina y anticuerpo, o positivos cuando el marcaje coincide y existe superposición en un mismo pixel de la imagen (colocalización). Los valores de los índices oscilan de 0 (cuando el marcaje conjunto no coincide) a 1 (cuando la coincidencia de marcaje es total). Los valores intermedios indican coincidencia parcial entre anticuerpo y lectina. Mientras que el índices de Manders se refiere directamente al porcentaje de superposición entre el marcaje con la lectina y el anticuerpo, el índice de Pearson no tiene una interpretación tan directa.

Las muestras se visualizan en un microscopio (Leica) con un módulo confocal TCS NT equipado con un láser de Krypton-Argón y Helio-Neón para la excitación de la fluoresceína (FITC) y la rodamina (TRITC) respectivamente. Las imágenes se obtienen utilizando un objetivo de inmersión (Leica PL APO UV 63'5 x 1.32NA) y se graban digitalmente. Las imágenes se capturan con el software informático integrado en el equipo de microscopía siendo el grosor de cada corte de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .

### **5.8.2. Microscopía electrónica**

Los ovocitos se fijan con glutaraldehído al 0'5% en tampón cacodilato 0'1M a pH 7'4 durante 2h a 4°C. Posteriormente las muestras se lavan dos veces en este mismo tampón.

Las muestras se procesan para su inclusión en la resina LR White siguiendo el procedimiento descrito previamente por Newman (1999). Las muestras se deshidratan con etanol al 50% durante 15 minutos y a continuación en dos pasos más de 15 minutos con etanol al 70%. En ambiente oscuro se pasan a una solución 2:1 (LR White:etanol 70%) durante una hora. Posteriormente las muestras pasan en cuatro tiempos de 1, 1, 12 y 1 horas respectivamente a solución LR White pura. Todos los pasos anteriores se realizan en condiciones de agitación constante a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este proceso, se depositan en cápsulas completamente llenas de resina LR White pura (100 g LR White mezclados previamente con un catalizador de 1'98g

de benzil peroxidasa durante 24 horas en oscuridad). Se tapan con una laminilla y se dejan polimerizar colocando los bloques en una estufa a 50°C durante 24 horas.

Tras la obtención de los bloques de microscopía electrónica se realizan cortes semifinos de 1µm aproximadamente en un ultramicrotomo LKB III (Leica, Barcelona, España). Los cortes se tiñen con azul de toluidina al 0'3% en agua bidestilada. Tras la localización de los ovocitos se procede a la obtención de secciones ultrafinas (aproximadamente 50nm) en el ultramicrotomo y se depositan en rejillas de níquel de 100 y 150 mesh recubiertas con una película de formvar.

Las secciones ultrafinas se tiñen mediante una técnica de flotación. Este método consiste en depositar las rejillas sobre unas gotas de los distintos tampones y reactivos. Primero los cortes ultrafinos se lavan durante 5 minutos en PBS. Posteriormente, se pasa la rejilla en la misma posición a una nueva gota para realizar un bloqueo de la posible unión inespecífica en PBS suplementado con 1% BSA durante 10 minutos. Al terminar el bloqueo, se incuba con la lectina diluida en PBS-BSA durante 60 minutos (10µl/ml). Se lava tres veces durante 5 minutos en PBS y se incuba con anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA durante 60 minutos. Nuevamente se lava tres veces durante 5 minutos con PBS. Finalmente se realiza un nuevo lavado y se incuban con una tercera capa durante 1 hora. Esta capa viene marcada con oro coloidal (1:70) en PBS-BSA para la visualización al microscopio electrónico.

Las secciones ultrafinas se contrastan en gotas con acetato de uranilo durante 8 minutos, tras ello se lavan con abundante agua y se secan 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 en el cual se colocan pastillas de NaOH próximas a las rejillas para retener el CO<sub>2</sub>. Finalmente, las rejillas se lavan con agua ultrapura, se secan y almacenan hasta su observación en el microscopio electrónico (Phillips Tecnai 12, Eindhoven, Holanda). Como control negativo se sustituye las moléculas conjugadas y no conjugadas por el correspondiente tampón.

## **5.9. Estudio de las metaloproteasas ADAM-10 Y ADAM-17 en ovocitos porcinos y bovinos madurados *in vitro***

### **5.9.1. Síntesis *in vitro* de ADNc de ovocitos porcinos y bovinos y amplificación mediante PCR de fragmentos correspondientes a ADAM-10 y ADAM-17**

Se extrae el ARNm de 100 ovocitos madurados *in vitro* libres de células de la granulosa utilizando las recomendaciones del RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania). El proceso consiste en lisar los ovocitos en una solución de tiocianato de guanidinio que inhibe la acción de las ribonucleasas endógenas. Una vez lisados, el contenido se diluye en una solución de etanol y se transfiere a una columna con una membrana. Las proteínas, el ADN y otros contaminantes son eliminados del lisado mediante tres lavados, el ARN se queda adherido a la membrana y posteriormente es eluído.

Una vez obtenido el ARN, se realiza una variante de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) donde primero se realiza una transcripción reversa (RT) a partir del ARN obtenido para sintetizar el ADN complementario (ADNc) que luego es amplificado. La síntesis *in vitro* del ADNc se realiza con el kit SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen-Life Technologies, Santa Clara, California, EEUU) mediante la RT-PCR según el protocolo descrito por el fabricante. El procedimiento consiste en desnaturalizar el ARN molde partiendo de 5µg de ARN. El ARN se incuba durante 5min a 65°C en presencia de oligo(dT) y dNTPs (desoxinucleósidos-trifosfato), tras lo cual la muestra se deja enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, se añade el volumen necesario de tampón DTT (ditiotreitól), RNaseOUT (inhibidor de RNasas) y MgCl<sub>2</sub> a las concentraciones recomendadas por el fabricante hasta completar un volumen final de 20µl. Las muestras se incuban 2min a 42°C y se añade 1µl de enzima retrotranscriptasa (50U). La síntesis de ADNc tiene lugar a 42°C durante 50min y se termina con una incubación a 70°C durante 15min para desnaturalizar la enzima. Para hidrolizar el ARN molde se utiliza la enzima RNasa H suministrada con el kit (1µl a 37°C durante 20 minutos). Las muestras se almacenan a -20°C hasta su uso.

El ADNc obtenido se utiliza como molde para amplificar por PCR los fragmentos de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17. Los cebadores usados se diseñaron con las secuencias de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 de las especies bovina y porcina (Tabla 15).

**Tabla 15.** Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de un fragmento de ADAM-10 y ADAM-17 de las especies bovina y porcina.

Nombre	Especie	Bases (d/r)	Secuencia (5'→3')
Fw ADAM-10	Porcina	18 (d)	5'-GGAGAATCTAAGAATTTAGG-3'
Rv ADAM-10		20 (r)	5'-CAGATAGGCTGGCCAGATTC-3'
Fw ADAM-17	Porcina	18 (d)	5'-GTGAAGAGAAGAGCCGACCC-3'
Rv ADAM-17		20 (r)	5'-GACTTGAGAATGCGAATCTG-3'
Fw ADAM-10	Bovina	18 (d)	5'-CGAGTGCTGCTACGATGC-3'
Rv ADAM-10		20 (r)	5'-GATAGAACCTGCACATTGCC-3'
Fw ADAM-17	Bovina	22 (d)	5'-CAGGATAACAGCAGCGAGTGC-3'
Rv ADAM-17		21 (r)	5'-GTTCTTCTGTTCGGCGTTGAC-3'

Las amplificaciones por PCR se realizan en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADNc son: 2µl del ADNc, 1µl de cada cebador (0'5µg/µl), MgCl<sub>2</sub> 2mM, 1 µl de cada dNTP (10mM) y 1 unidad de polimerasa en un volumen final de 50µl. El programa de amplificación consiste en 30 ciclos y, una vez completados éstos, una extensión final de 10min a 72°C. Cada ciclo de la PCR consta de tres pasos:

1. Desnaturalización de ADNc: 1 minuto a 95°C.
2. Hibridación de los cebadores con el molde: 1min a la T<sub>m</sub> que dependerá del cebador. La temperatura de hibridación o temperatura de "melting" (T<sub>m</sub>) se calcula para cada oligonucleótido empleando la fórmula: T<sub>m</sub> (°C)=2(A+T)+4(C+G). Se eligió la menor de las dos temperaturas

calculadas para cada reacción de amplificación. En la medida de lo posible se buscan cebadores con una  $T_m$  similar.

5. Extensión de la cadena naciente: 1min a 72°C.

Para analizar el tamaño y la cantidad de los amplicones en cada reacción de PCR se utiliza un volumen de 4 $\mu$ l de cada reacción, se les añade tampón de carga de muestras de ADN y la mezcla se aplica en geles de agarosa (Pronadisa, Hispanlab, Madrid, España) de concentración comprendida entre el 1 y el 2%. La electroforesis se realiza en tampón de recorrido TAE (Tabla 16) a 100V, a temperatura ambiente y en soporte horizontal. El gel de agarosa se visualiza mediante tinción del mismo con bromuro de etidio (2 $\mu$ g/ml) y observándolo bajo lámpara de luz ultravioleta (TFL-20M, Vilber Lourmat, Francia).

**Tabla 16.** Composición del tampón de recorrido TAE para electroforesis.

Componentes	Concentración mM
Tris	40'00
EDTA	1'00
Ácido acético	30'00

## 5.10. Diseño experimental

El desarrollo de este trabajo se llevó acabo en 3 fases experimentales. En estos experimentos se estudian desde diferentes perspectivas las proteínas de los gránulos corticales y su participación en el bloqueo de la polispermia durante la fecundación *in vitro* de la especie porcina. Igualmente se estudian metaloproteasas presentes en el oolema de ovocitos porcinos y bovinos.

**5.10.1. Fase experimental 1.** Obtención del exudado de GCs porcinos y bovinos mediante interacción de gametos. Efecto del exudado sobre la FIV y la digestión de la ZP porcina (Figura 9).

Para evaluar la posible función del exudado de los GCs obtenido mediante interacción de gametos, los ovocitos porcinos maduros, decumulados y con ZP se incuban 2h a 38°C, 5% CO<sub>2</sub> con el exudado de GCs de especie homóloga, heteróloga y medio TALPp suplementado (control). Pasado este tiempo se colocan en pocillos con 250µl de medio TALPp suplementado y posteriormente se adicionan los espermatozoides capacitados. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- **Exudado porcino.** FIV de ovocitos porcinos incubados con exudado de GCs de especie homóloga.
  
- **Exudado bovino.** Ovocitos porcinos incubados con exudado de GCs de especie heteróloga.
  
- **Control.** Ovocitos porcinos incubados con medio TALPp-suplementado.

**5.10.2. Fase experimental 2.** Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos (Figura 10). El objetivo de esta fase es estudiar el contenido de los GCs mediante distintas técnicas:

5.10.2.1. Análisis del contenido del exudado de GCs obtenido mediante la interacción de gametos mediante proteómica

En este experimento, se realiza el estudio de las moléculas liberadas durante la interacción de gametos. La muestra obtenida tras 2h de cultivo de gametos, espermatozoides y un control (medio de cultivo) como se describe anteriormente, se separan mediante electroforesis SDS-PAGE y el gel obtenido se tiñe con plata. Las bandas visibles se analizan mediante proteómica.

5.10.2.2. Análisis del contenido de los GCs de mediante el uso de lectinas PNA y WGA

El objetivo de este experimento es localizar glicoproteínas afines a las lectinas PNA y WGA en el interior de los gránulos corticales de ovocitos porcinos

mediante microscopía electrónica. Para obtener glicoproteínas afines a las lectinas PNA y WGA, se obtiene el lisado de ovocitos porcinos y se precipita con estas lectinas unidas a agarosa. Posteriormente, este precipitado se analiza mediante lectin blot y proteómica.

#### 5.10.2.3 Análisis de la presencia y localización de las proteínas calreticulina y ER-60 en ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*

El análisis de estas proteínas se realiza mediante microscopía confocal de ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro* y Western blot del lisado de ovocitos maduros precipitado con PNA unida a agarosa.

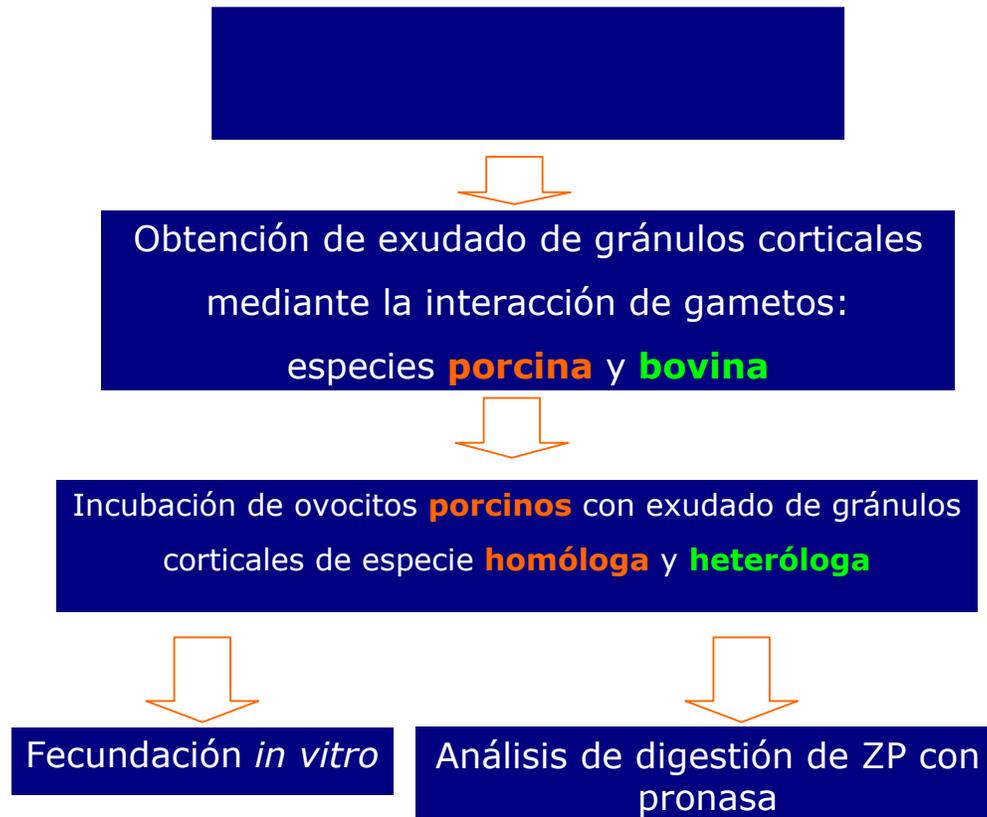
**5.10.3. Fase experimental 3.** Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos (Figura 11). Se amplifican fragmentos de ambas proteasas y se realiza la localización de éstas mediante microscopia confocal.

### **5.11. Análisis estadístico**

El programa utilizado para el análisis estadístico fue SYSTAT versión 9.0 para Windows.

Los resultados de las variables estudiadas en la fase experimental 1 (tiempo de digestión de la ZP con pronasa, porcentajes de penetración, formación de pronúcleo masculino y monospermia, número de espermatozoides por ovocito penetrado, número de espermatozoides unidos a la ZP), se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando este análisis reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de *Tukey*, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad  $P < 0'05$ .

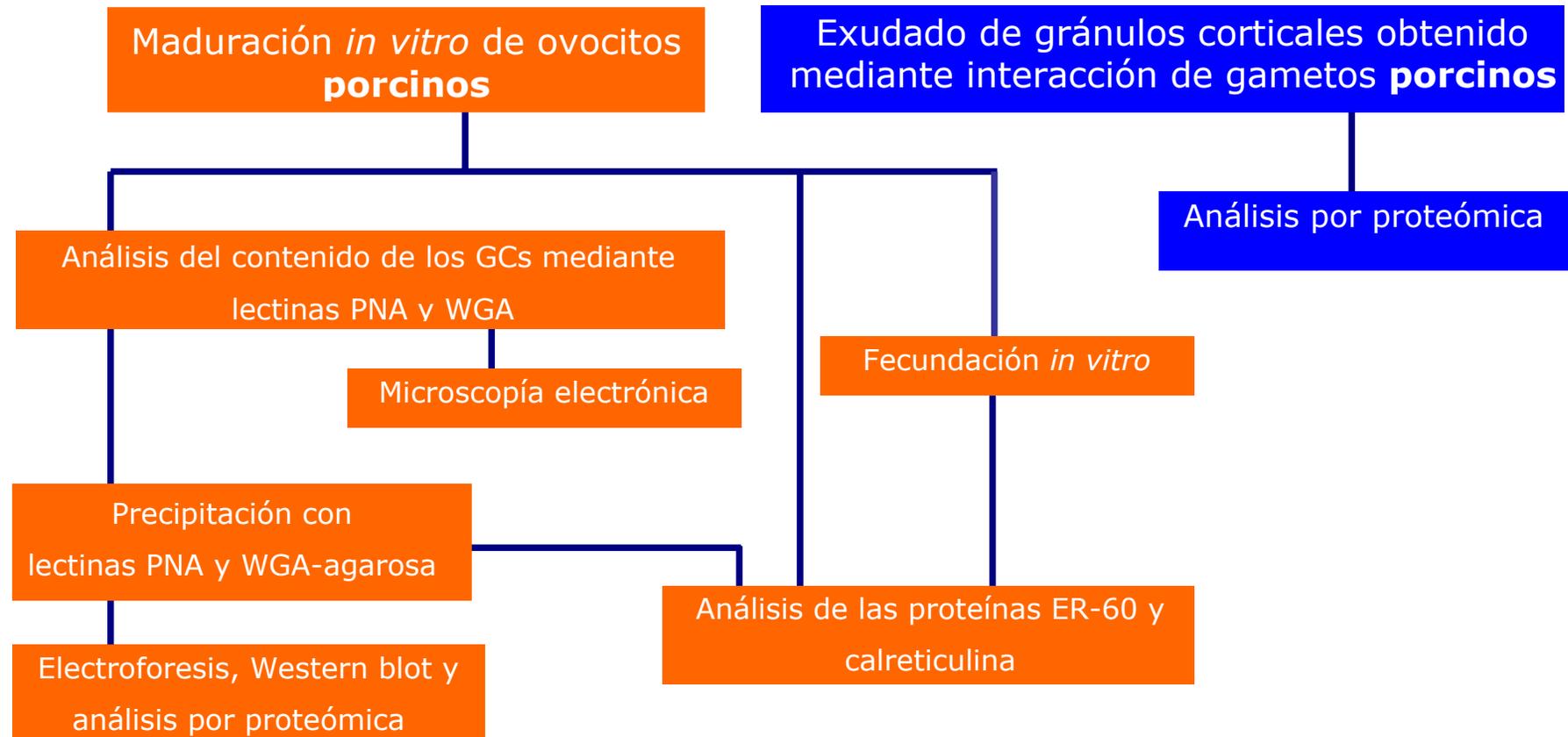
**Figura 9.** Esquema de la fase experimental 1. Obtención del exudado de GCs porcinos y bovinos mediante interacción de gametos. Efecto del exudado sobre la FIV y la digestión de la ZP porcina.



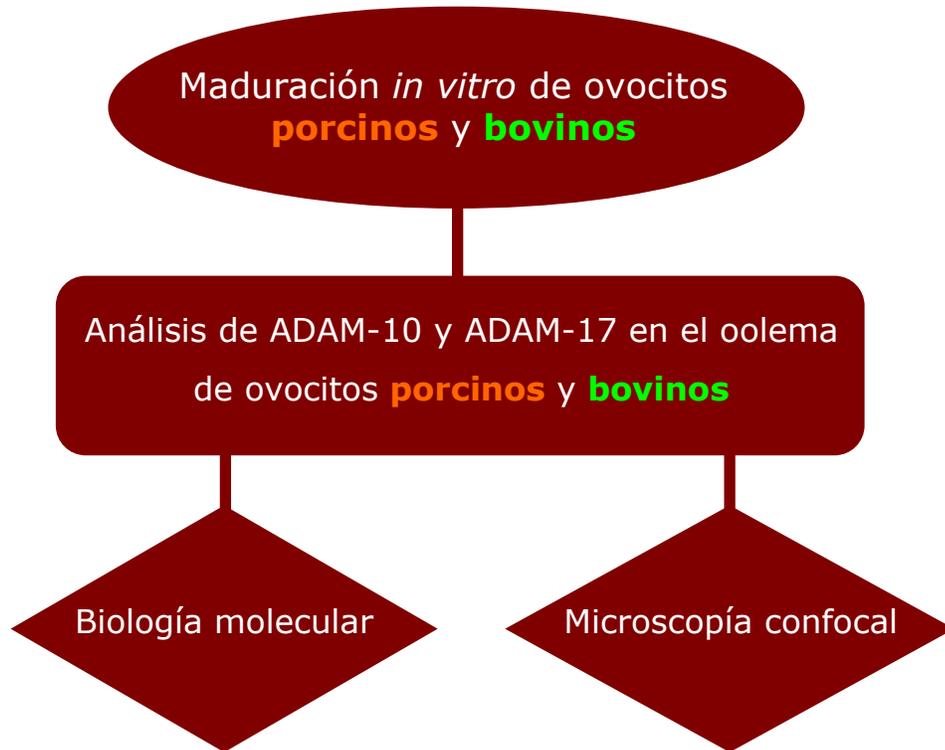
#### Grupos experimentales

- **Exudado porcino.** FIV de ovocitos porcinos incubados con exudado de GCs de especie homóloga.
- **Exudado bovino.** Ovocitos porcinos incubados con exudado de GCs de especie heteróloga.
- **Control.** Ovocitos porcinos incubados con medio TALPp-suplementado.

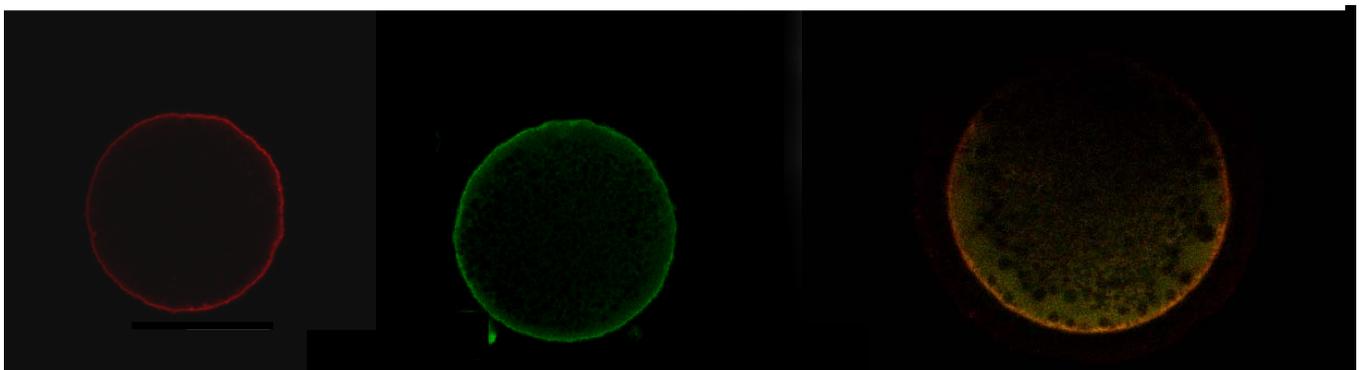
**Figura 10.** Esquema de la fase experimental 2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos.



**Figura 11.** Esquema de la fase experimental 3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos porcinos y bovinos



## 6. Resultados



## 6. RESULTADOS

En este apartado se detallan los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita anteriormente.

### **6.1. Efecto del exudado de los gránulos corticales porcinos y bovinos, obtenido mediante interacción de gametos, sobre la fecundación *in vitro* y la digestión de la zona pelúcida de ovocitos porcinos**

Antes del uso del contenido de los GCs obtenido mediante interacción de gametos, se evaluaron parámetros como la salida al medio de cultivo del contenido de los GCs tras 2h de interacción entre gametos, mediante la tinción de los ovocitos porcinos y bovinos con lectinas PNA y LCA respectivamente, corroborando así la exocitosis de estas organelas (Figura 12).

La incubación de ovocitos porcinos maduros durante 2h, antes de la FIV, con el exudado obtenido mediante interacción de gametos porcinos y bovinos, afecta a los resultados de la FIV observándose en todas las variables estudiadas un efecto más marcado cuando los ovocitos porcinos se incubaron con el exudado obtenido de la interacción de gametos bovinos (exudado bovino) (Tabla 17). Así pues, el porcentaje de penetración descendió drásticamente a la mitad en el grupo de ovocitos incubados con exudado bovino en comparación con el grupo control (43'5 vs 98'3%. respectivamente). Mientras, los ovocitos incubados con exudado porcino también mostraron un menor porcentaje de penetración que el grupo control (84'0% vs. 98'3), aunque este descenso no fue tan marcado como con el exudado bovino. Esta disminución en la penetración espermática fue acompañada de un menor número de espermatozoides por ovocito penetrado, un descenso en el número medio de espermatozoides unido a la ZP con respecto al control (Figura 13 y tabla 17) y un aumento de los valores de monospermia que, en el caso de ovocitos porcinos incubados con exudado de los GCs de ovocitos bovinos, llegó casi al 70%. La incubación de ovocitos porcinos, tanto con exudado homólogo como heterólogo, no afectó al porcentaje de formación de pronúcleo masculino que se mantuvo por encima del 95% en todos los grupos.

**Tabla 17.** Efecto del exudado de gránulos corticales obtenido de la interacción de gametos porcinos y bovinos sobre la fecundación *in vitro* de ovocitos porcinos. N (número de ovocitos), %PEN (porcentaje de penetración), E/O (número medio de espermatozoides por ovocito penetrado), %PNM (porcentaje de formación de pronúcleo masculino), %MONO (porcentaje de monospermia) y SPZ-ZP (número medio de espermatozoides adherido a la ZP).

Grupo	N	% PEN	E/O	% PNM	% MONO	SPZ-ZP
Control	172	98'3 ± 1'0 a	11'7 ± 0'5 a	100	6'5 ± 1'9 a	95'0 ± 1'4 a
Exudado porcino	169	84'0 ± 2'8 b	8'6 ± 0'4 b	100	12'8 ± 2'8 a	66'4 ± 1'2 b
Exudado bovino	193	43'5 ± 3'6 c	1'5 ± 0'1 c	98'8 ± 1'2	69'9 ± 5'1 b	52'5 ± 1'5 c
P		<0'001	<0'001	0'154	<0'001	<0'001

a, b Diferentes letras en la misma columna indican diferencias entre grupos.

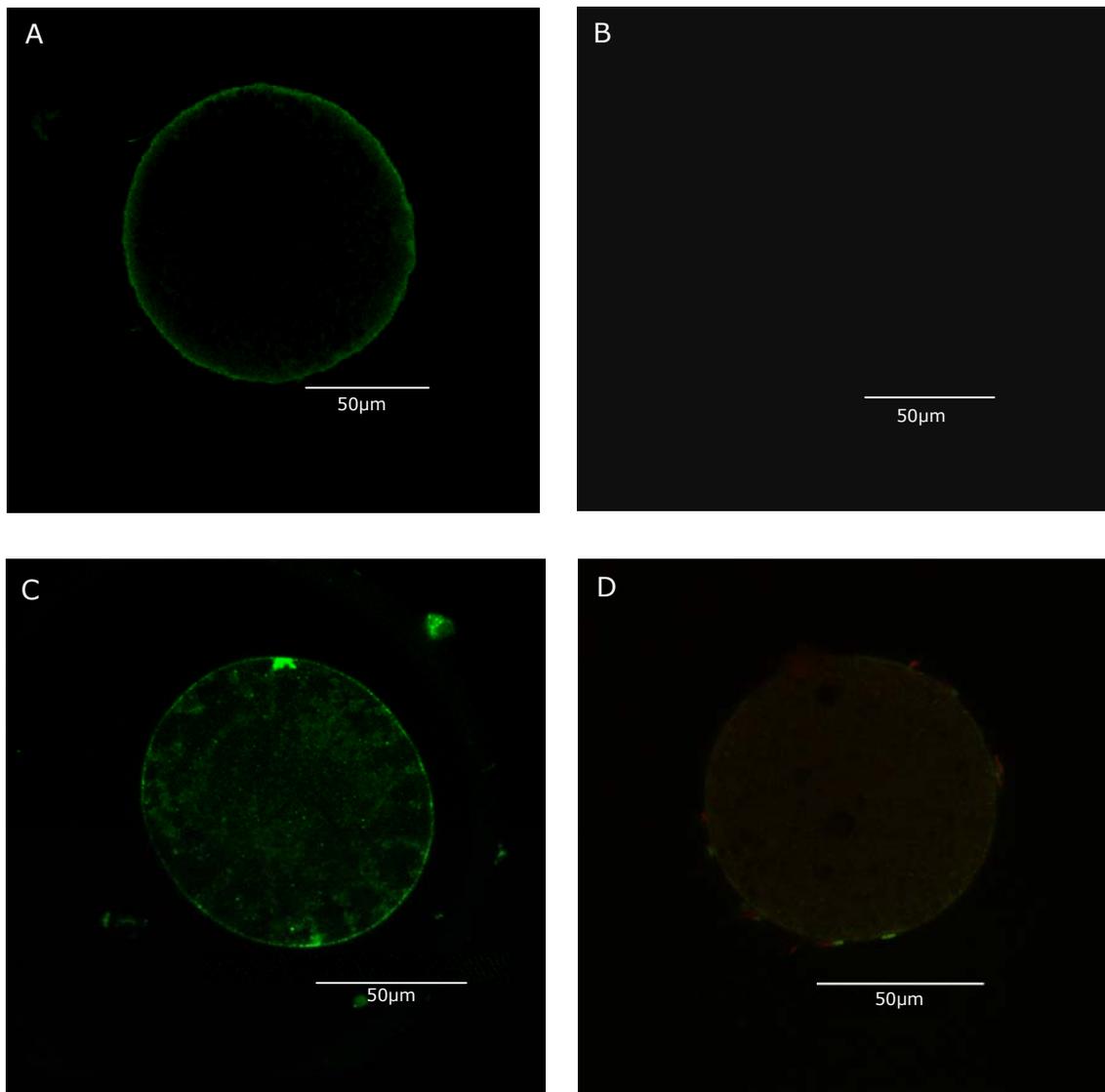
En cuanto al efecto de la incubación de ovocitos porcinos con exudado de GCs porcino y bovino sobre la digestión de la ZP, observamos que la incubación con el exudado bovino no afectó al tiempo de digestión de la ZP que alcanzó valores similares al grupo control en el que la ZP se digirió en aproximadamente un minuto y medio (Tabla 18). Sin embargo, la incubación con el exudado porcino disminuyó muy ligeramente el tiempo necesario para disolver la ZP en comparación con el grupo control.

**Tabla 18.** Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos porcinos incubados 2h con exudado obtenido de la interacción de gametos porcinos y bovinos. N (número de ovocitos).

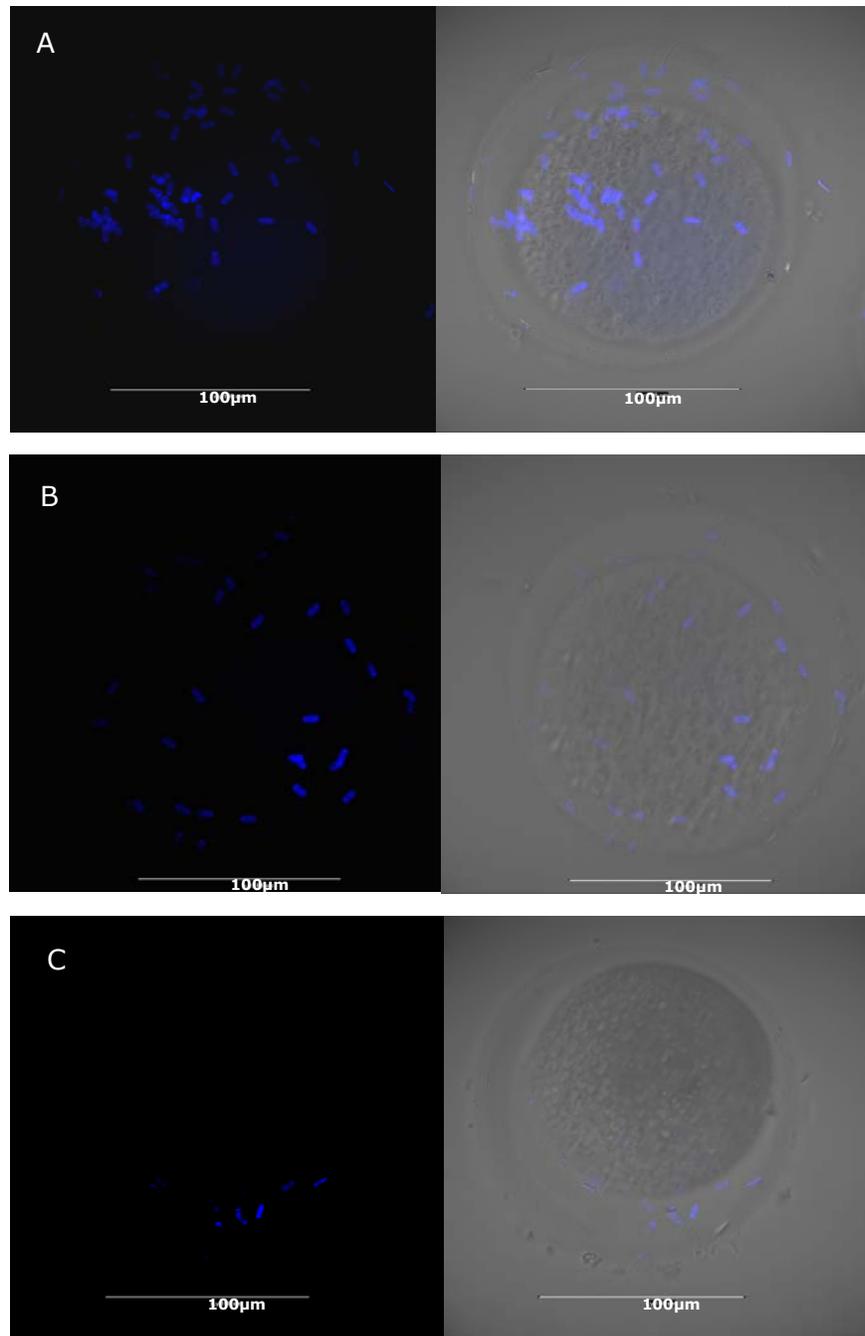
Grupo	N	Tiempo de digestión de ZP (seg)
Control	25	94'28 ± 1'08 a
Exudado porcino	25	82'60 ± 3'54 b
Exudado bovino	26	88'53 ± 3'47 a
P		0'025

a, b Diferentes letras en la misma columna indican diferencias entre grupos.

**Figura 12.** Gránulos corticales de ovocitos porcinos y bovinos. **A)** Ovocito porcino madurado *in vitro* mostrando marcaje en la zona cortical. **B)** Ovocito porcino madurado *in vitro* tras 2h de interacción con espermatozoides donde se observa la desaparición del marcaje en la región cortical. **C)** Ovocito bovino madurado *in vitro* mostrando marcaje en la zona cortical. **D)** Ovocito bovino madurado *in vitro* tras 2h de interacción con espermatozoides donde se observa la desaparición del marcaje en la banda cortical.



**Figura 13.** Ovocitos porcinos fecundados *in vitro* tras ser incubados 2h con exudado obtenido de la interacción de gametos y teñidos con Hoescht mostrando los espermatozoides adheridos a la ZP. **A)** Ovocito del grupo control. **B)** Ovocito incubado con exudado de la interacción de gametos porcinos. **C)** Ovocito incubado con exudado de la interacción de gametos bovinos. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

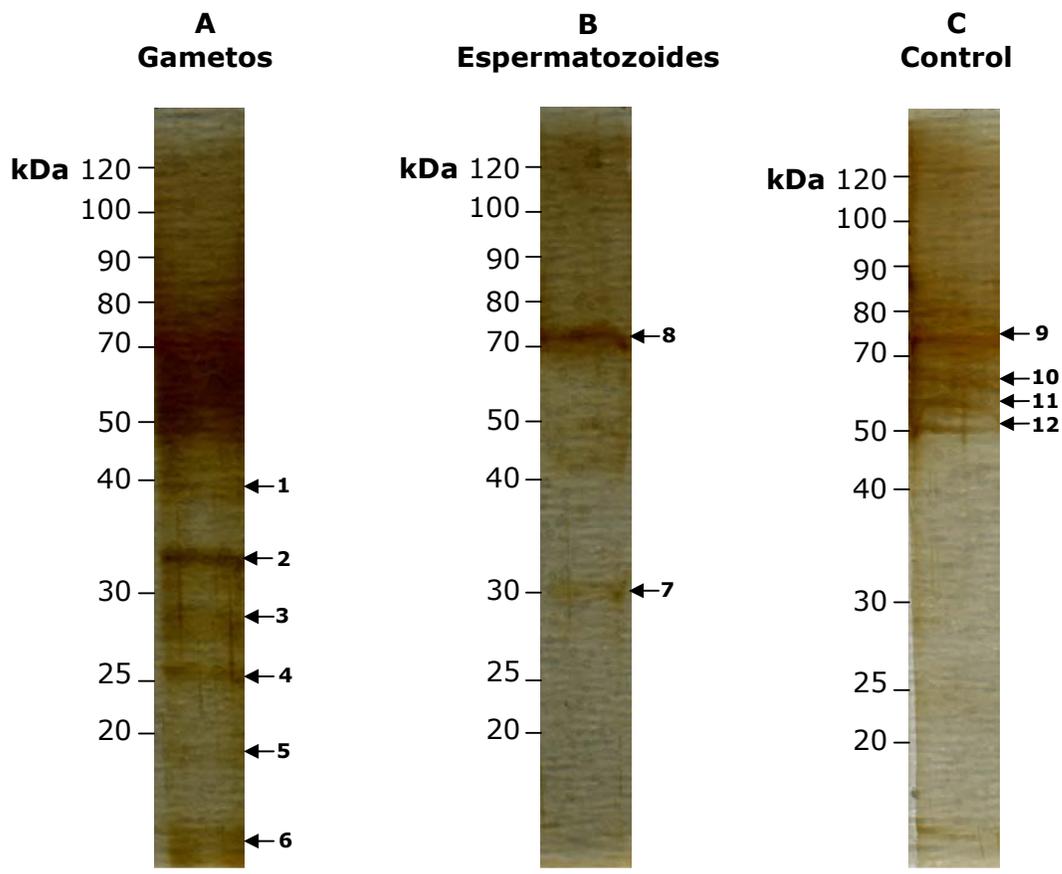


## **6.2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos**

Este estudio se inicia mediante la separación por electroforesis SDS-PAGE y análisis por proteómica del contenido de los GCs liberado durante la interacción de gametos porcinos. Posteriormente, se estudian las moléculas contenidas en los GCs de ovocitos porcinos mediante el uso de lectinas PNA y WGA.

El medio de cultivo en el que interaccionaron durante 2h los gametos porcinos reveló la presencia de numerosas bandas polipeptídicas (Figura 14). Por un lado, una banda continua de peso molecular (PM) aproximado de 80 a 50 kDa y, por otro lado, seis bandas de PM inferior a 40 kDa (40, 35, 29, 25, 19 y 10 kDa aproximadamente) (Figura 14A, bandas numeradas del 1 al 6). Mientras, en el medio en el que solamente se incubaron espermatozoides se observan dos bandas de aproximadamente 70 y 30 kDa (Figura 14B, bandas 7 y 8). Por último, en el medio de cultivo que permaneció 2h en el incubador sin entrar en contacto con ningún gameto (control) no se observa ninguna banda de PM inferior a 40 kDa (Figura 14C). Sin embargo, en este medio se observan 4 bandas de PM 75, 65, 55 y 50 kDa aproximadamente que podrían corresponder a componentes del aceite mineral trasferidos al medio durante el cultivo o contaminantes propios de la manipulación de muestras muy pequeñas (Figura 14C, bandas 9 a 12). Por está razón, las bandas de PM superior a 40 kDa que aparecieron en el grupo gametos (gel A) y grupo espermatozoides (gel B) no se consideraron para futuros análisis.

**Figura 14.** Electroforesis de SDS-PAGE y tinción de plata de los medios de cultivo obtenidos tras la interacción de gametos porcinos. **A)** Medio obtenido de la interacción durante 2h de 200 ovocitos porcinos con espermatozoides porcinos. **B)** Medio de cultivo obtenido tras incubar únicamente espermatozoides porcinos durante 2h. **C)** Medio de cultivo sin gametos (control).



Como hemos mencionado anteriormente, el análisis por proteómica se realiza únicamente en las bandas de menos de 40 kDa. Esto es en las bandas 1 a 6 correspondientes al grupo de la interacción de gametos (Figura 14A) y en la banda 7 perteneciente al grupo espermatozoides (Figura 14B). En los resultados de proteómica de las bandas 1 a 6 correspondientes al medio de cultivo de interacción de gametos se identificaron distintas proteínas (tabla 19). Las proteasas **Tripsina-4** y **Tripsina V-A** identificadas en las bandas 2 y 3. El péptido detectado por proteómica para la proteasa Tripsina-4 se corresponde con esta proteína en *Macaca mulatta* (Figura 15) y el péptido detectado para la

proteasa Tripsina V-A corresponde a la secuencia de esta proteína en *Rattus norvegicus* (Figura 16). En la especie porcina no están identificadas las secuencias de ninguna de estas dos proteasas. Como era de esperar, en estas muestras también se encontró **acrosina** (bandas 1 tabla 19). En las bandas 4,5 y 6 (figura 14A) no se identifican péptidos con un score considerable y puesto que el rendimiento en proteómica a partir de un gel es de un 20%, por lo tanto que no se tengan resultado en determinadas bandas entra dentro de lo esperado.

Por otro lado, en la banda recortada del medio de cultivo donde habían permanecido los espermatozoides (Figura 14B, banda 7) se identificaron las proteínas **pancreastatina** y **acrosina**. Los péptidos detectados tanto para la pancreastatina (Figura 17) como para la acrosina (Figura 18) se corresponden con la secuencia de estas proteínas en la especie porcina.

**Tabla 19.** Proteínas aisladas del medio de cultivo que contiene el exudado de gametos porcinos obtenido mediante interacción (bandas 1,2 y 3) y exudado de espermatozoides porcinos (banda 7) identificadas por HPLC/MS con su respectivo número de acceso NCBI y GenBank.

Banda	Proteína	Péptido	NCBI GenBank	PM de la proteína (kDa)
1	Acrosina	(r)wyngrirstnvcagyp (r)	47522886 NP_9991981	45'0
2	Tripsina-4	(r)lgehnievlegteqfinaak(i)	58257842 AAW69361	26'7
3	Tripsina-4	(r)lgehnievlegteqfinaak(i)	58257842 AAW69361	26'7
3	Tripsina V-A	(k)wtvdndimlik(l)	157822923 NP_001101326	26'9
7	Pancreastatina	(r)xyleekkeeegsanr(r)	164417 AAA310161	49'3
7	Acrosina	(r)wyngrirstnvcagyp (r)	47522886 NP_9991981	45'0

**Figura 15.** Secuencia de aminoácidos de la proteasa **Tripsina-4** (Acceso NCBI/GenBank: 58257842/AAW69361) de *Macaca mulatta*. La secuencia en rojo y subrayada representa el péptido detectado por proteómica en el medio de cultivo obtenido tras la interacción de gametos porcinos.

```
Tripsina-4 de Macaca mulatta
  1 MNPLLLILAFV GAAVAAPFDD DDKIVGGYTC EENSVPYQVS LNYGYHFCGG SLINKQWVVS
 61 AAHCYKPRIQ VRLGEHNIEV LEGTEQFINA AKIIPHPKYN EVKYNNDIM LIKLSTPAVI
121 NARVSTISLP TAPPAPGTVC LISGWGNTLS SGADYPDELK CLDAPVLTQA ECEASYPGKI
181 TSNMFCVGFL EGGKDSCQGD SGGPVVYNGQ LQGVVSWGYG CAQKNRPGVY TKVYNYLAWI
241 KDTIAANS
```

**Figura 16.** Secuencia de aminoácidos de la proteasa **Tripsina V-A** (Acceso NCBI/GenBank: 157822923/NP\_001101326) de *Rattus norvegicus*. La secuencia en rojo y subrayada representa el péptido obtenido por proteómica en el medio de cultivo obtenido tras la interacción de gametos porcinos.

```
Tripsina V-A de Rattus norvegicus
  1 MKICIFFTLL GTVAAPFTEG NDDRIVGGYT CQEHSVPYQV SLNAGSHICG GSLITDQWVL
 61 SAAHCYHPQL QVRLGEHNIY EIEGAEQFID AAKMILHPDY DKWTVNDIM LIKLKSPATL
121 NSKVSTIPLP QYCPTAGTEC LVSGWGVLFK GFESPSVLQC LDAPVLSDSV CHKAYPRQIT
181 NNMFCFLGFLE GGGKDSCQYDS GGPVVCNGEV QGIVSWGDCG ALEGKPGVYT KVCNYLNIWH
241 QTIAEN
```

**Figura 17.** Secuencia de aminoácidos de **pancreastatina** (Acceso NCBI/GenBank: 164417/AAA31016.1) para la especie porcina. La secuencia en rojo y subrayada representa el péptido obtenido por proteómica en el medio de cultivo obtenido tras la incubación de espermatozoides porcinos.

```

Pancreastatina porcina
  1 SAAALALLLC AGQVIALPVN SPMNKGDETEV MKCIVEVISD TLSKPSPMPV SQECFETLRG
 61 DERILSILRH QNLLKELQDL ALQGAKERSH QQKKQSSYED ELSEVLEKQN DQAELKEGTE
121 EASSKEAAEK RGDSKEVEKN DEDADGAKPQ ASLEPPXXE AEDQTPGEEE AASTHPLASL
181 PSKKRPGAQA EEDHEGPSQG PVDREKGPSA EQGPQAEREE EEEAEAGEKA VPEEEGPRSE
241 AFDSHPSLGY KEMQRGWPQA PAMDGAGKTG AEEAQPEEGK GAREHSRQEE EETAGAPQG
301 LFRGGKRGEP AQEEEEERLSE EWENAKRWSK MDRLAKELTA EKRLQGEEEE EEEEEPDRS
361 MKLSFRAPAY GFRGPGLQLR RGWRPSSRED SVEAGLPLQV RXYLEEKKEE EGSANRRPED
421 QELESLSAIE AELEKVAPQL QSLRRG

```

**Figura 18.** Secuencia de aminoácidos de **acrosina** (Acceso NCBI/GenBank: 47522886/NP\_999198.1) para la especie porcina. La secuencia en rojo y subrayada representa el péptido obtenido por proteómica en el medio de cultivo obtenido tras la incubación de espermatozoides porcinos.

```

Acrosina porcina
  1 MLPTAVLLVL AVSVAARDNA TCDGPCGLRF RQKLESGMRV VGGMSAEPGA WPWMVSLQIF
 61 MYHNNRRYHT CGGILLNSHW VLTAACHCFKN KKKVTDWRLI FGANEVVWGS NKPVKPPLQE
121 RFVEEIIIHE KYVSGLEIND IALIKITPPV PCGPFIGPGC LPQFKAGPPR APQTCWVTGW
181 GYLKEKGPRT SPTLQEARVA LIDLELCNST RWYNGRIRST NVCAGYPRGK IDTCQGDSGG
241 PLMCRDRAEN TFVVVGITSW GVGCAKAKRP GVYTSTWPYL NWIASKIGSN ALQMVQLGTP
301 PRPSTPAPPV RPPSVQTPVR PPWFYQRPFG PSQQPGSRPR PPAPPPAPP PPAPPPPPPP
361 PPPPPPQQVS AKPPQALSFA KRLQQLIEAL KGTAFFSSGRS YYETETDLDQ ELPAS

```

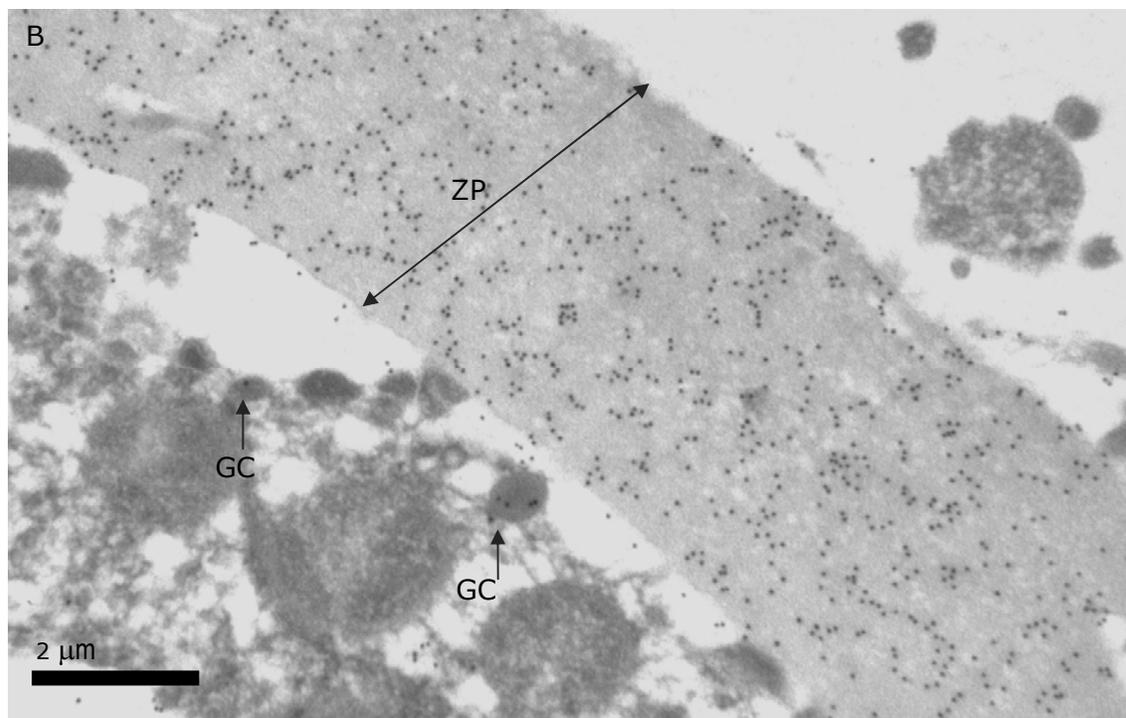
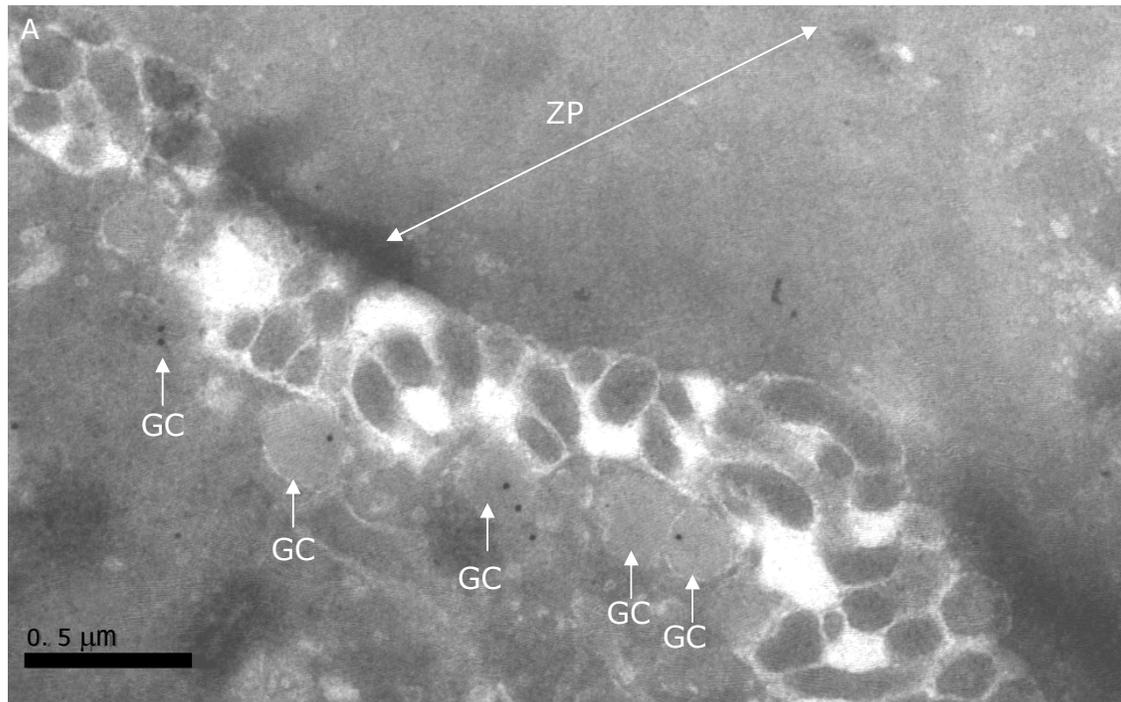
El estudio de las moléculas contenidas en los GCs de ovocitos porcinos mediante el uso de las lectinas PNA y WGA se realiza aplicando diferentes técnicas como citoquímica, precipitación, lectina blot, proteómica e inmunocitoquímica.

La **citoquímica** a nivel ultraestructural utilizando las lectinas PNA y WGA en ovocitos porcinos madurados *in vitro* indica que ambas marcan el contenido de los GCs porcinos (Figura 19). Las lectinas PNA y WGA tienen afinidad por residuos glucídicos diferentes, así PNA se une al disacárido Gal $\beta$ 1-3GalNAc (Lotan *et al.*, 1975), mientras que WGA se une a residuos N-acetilglucosamina y ácido siálico (Neu5Ac) (Debray *et al.*, 1981). Nuestros resultados muestran que la lectina PNA marca específicamente los GCs porcinos mientras que WGA, además de tener afinidad por el contenido de los GCs, también marca la ZP. También se observa un contenido heterogéneo de los azúcares entre los distintos GCs.

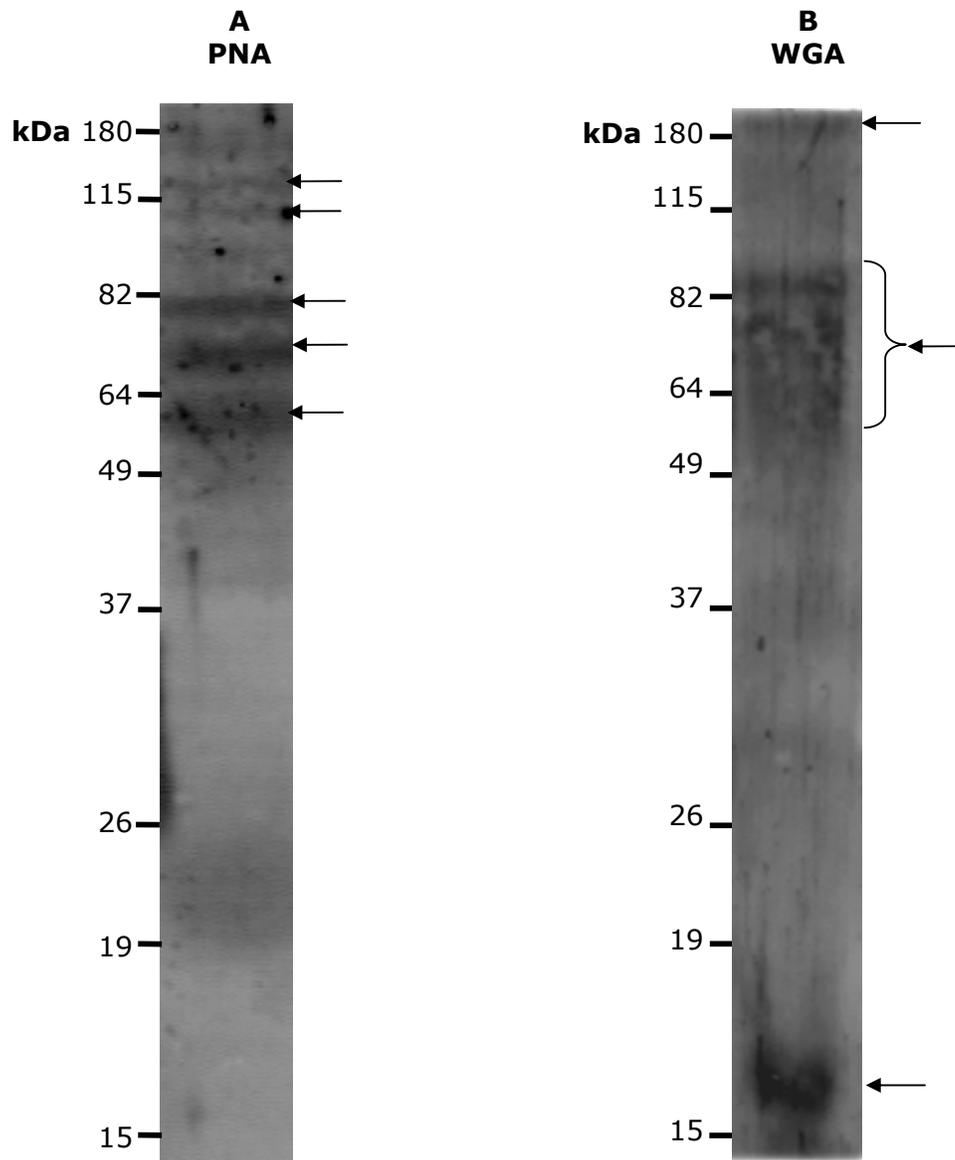
Conociendo la afinidad de las lectinas PNA y WGA por componentes de los GCs, se precipita lisado de los ovocitos maduros porcinos utilizando estas lectinas unidas a agarosa y se realizan diferentes análisis en los que se obtienen los siguientes resultados.

El **lectina blot** realizado a partir del lisado de ovocitos porcinos maduros precipitado con lectinas PNA y WGA-agarosa e incubado con las lectinas PNA y WGA conjugadas con peroxidasa (HRP) se observan cinco bandas positivas a PNA-HRP, bien definidas y de 120, 100, 80, 65 y 55 kDa aproximadamente (Figura 20A). Mientras, en el blot incubado con WGA-HRP se observan dos bandas definidas de 180 y 15 kDa aproximadamente, y una banda continua de 85 a 50 kDa aproximadamente (Figura 20B).

**Figura 19.** Ovocito porcino madurado *in vitro* marcado con lectinas PNA y WGA. **A)** Lectina PNA: se observa marcaje (punteado) en el interior de cada gránulo cortical (GC) mientras que en la zona pelúcida (ZP) no aparece marcaje. **B)** Lectina WGA: se observa marcaje en el interior de los GCs y la ZP se marca intensamente.



**Figura 20.** Lectina blot de lisado de ovocitos porcinos madurados *in vitro*. **A)** Lisado de ovocitos (n=150) precipitado con PNA-agarosa e incubado con PNA-HRP (10µg/ml). Las flechas indican 5 bandas proteicas definidas. **B)** Lisado de ovocitos (n=200) precipitado con WGA-agarosa e incubado con WGA-HRP (30µg/ml). Las flechas indican dos bandas proteicas definidas y una banda continua.



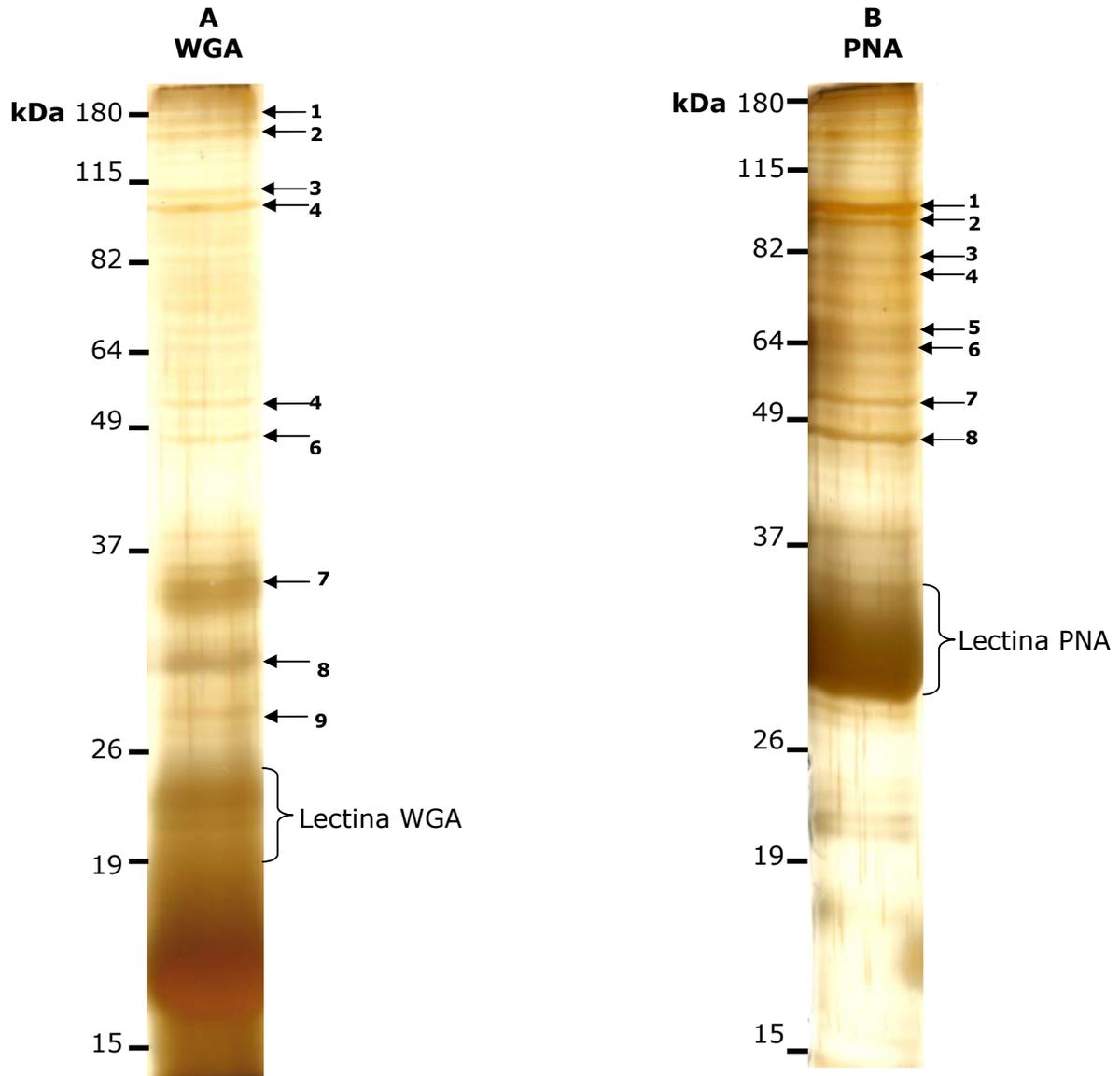
El lisado de ovocitos porcinos **precipitado con las lectinas PNA y WGA** unidas a agarosa también se evalúa en un gel revelado con tinción de plata, obteniendo los siguientes resultados: en el gel del lisado precipitado con WGA se observan bandas polipeptídicas de un peso molecular (PM) que oscila entre 180 y 26 kDa (Figura 21A) y se observan bandas polipeptídicas de entre 37 y 26 kDa además de la banda que corresponde a la propia lectina (WGA, 24 kDa). Las bandas señaladas en el gel de WGA (bandas 1 a 9) no se recortaron para su estudio por proteómica puesto que esta lectina, aparte de tener reactividad con los GCs, tiene gran afinidad con las glicoproteínas de la ZP.

En el caso del lisado precipitado con PNA se observan numerosas bandas polipeptídicas de PM que oscila entre 115 y 37 kDa (Figura 21B) y por encima de 115 kDa aparecen bandas cuya tonalidad es más tenue comparada con las anteriores, mientras que entre 37 y 26 kDa se observa una banda continua que se corresponde con la propia lectina (PNA, 27 kDa). Las bandas del gel de PNA se recortaron para su estudio más detallado por proteómica. Para este análisis se seleccionan las bandas más intensas, con un PM superior a 49 kDa y en base a la similitud con bandas observadas como PNA positivas en el lectina blot (Figura 20).

En los resultados obtenidos tras el análisis por **proteómica**, de las bandas observadas en gel de poliacrilamida del lisado de ovocitos porcinos maduros precipitados con PNA agarosa (Figura 21, bandas 1 a 8) permitieron la identificación de diferentes proteínas entre las que se encuentran proteínas chaperonas (Hsp-70 y ER-60) y glicoproteínas de la ZP (ZP4 y ZP3) (Tabla 20). Todas las proteínas se identificaron con un score por encima de 13.

Así pues, para la proteína Hsp-70, los cinco péptidos identificados corresponden a la secuencia de la proteína Hsp-70 tipo 1A (Figura 22). Mientras, los péptidos identificados para las glicoproteínas de la ZP se corresponden a las proteínas ZP4 (Figura 24) y ZP3 (Figura 25) en la especie porcina.

**Figura 21.** Lisado de ovocitos porcinos madurados *in vitro* precipitados con PNA y WGA-agarosa. **A)** Lisado de ovocitos (n=1000) precipitados con WGA-agarosa. **B)** Lisado de ovocitos (n=2000) precipitado con PNA-agarosa.



**Tabla 20.** Proteínas aisladas del gel de electroforesis del lisado de ovocitos porcinos obtenidos por precipitación con lectina PNA identificadas por HPLC/MS con su respectivo número de acceso NCBI.

Banda	Proteína	Péptidos	Score	NCBI/GenBank
1	Proteína de choque térmico 70 proteína 1A (Hsp-70)	(k)nqvalnpqntvfdak(r) (r)feelcsdlfr(s) (k)aqihdlvlvggstr(i) (r)lvnhfveefk(r) (k)qtqifttysdnqpgvliqvyeg(a)	95	<b>GenBank:</b> CAN13333.1
5,6,7	ZP3	(r)vtgnqavyenelvaar(d) (k)llrepiyveysir(h) (r)ctqdghfsiavs(r)	59'33	47522906/ NP_999210
5,6,7	ZP4	(k)lirpadlslgpak(c)	46'23	1177051/P42098
6	Proteína disulfuro isomerasa (ER-60)	(-)sdvleltddnfesr(v) (k)dlliayydvdye(n) (k)ygvsgyptlk(i) (k)fisdkdasvvgffk(d) (k)gfptiyfspank(k) (r)elsdfisylqr(e) (r)fledyfdgnlk(r)	44'8	729433/P38657

**Figura 22.** Secuencia de aminoácidos de las isoformas de la proteína **Hsp-70 proteína 1A** (acceso GenBank:CAN13333.1) de la especie porcina. Las secuencias en rojo y subrayadas representan los péptidos obtenidos por proteómica.

```
Heat shock 70kDa protein 1A porcina
  1 MAKSVAIGID LGTTYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTPS YVAFTDTERL IGDAAKNOVA
 61 LNPQNTVFDA KRLLIGRKFQD PVVQADMKHW PFRVINDGDK PKVQVSYKGE TKAFYPEEIS
121 SMVLTKMKEI AEAYLGHPVS NAVITVPAYF NDSQRQATKD AGVIAGLNVL RIINEPTAAA
181 IAYGLDRTGK GERNVLIFDL GGGTFDVSIL TIDDGIFEVK ATAGDTHLGG EDFDNRLVNH
241 FVEEFKRKHK KDISQNKRAV RRLRTACERA KRTLSSSTQA SLEIDSLFEG IDFYTSITRA
301 RFEELCSDLF RSTLEPVEKA LRDAKLDKAQ IHDLVLVGGS TRIPKVQKLL QDFFNDRDLN
361 KSINPDEAVA YGAAVQAAIL MGDKSENVQD LLLLDVAPLS LGLETAGGVM TALIKRNSTI
421 PTKQTQIFTT YSDNQGVLI QVYEGERAMT RDNNLLGRFE LSGIPPAPRG VPQIEVTFDI
481 DANGILNVTA TDKSTGKANK ITITNDKGR L SKEEIERMVQ EAEKYKAEDE IQRERVSANK
541 ALESYAFNMK SAVEDEGLKG KISEADKKKV LDKCQEVISW LDANTLAEKD EFEHKRKELE
601 QVCNPIISGL YQGAGGPGAG GFGAQAPKGG SGSGPTIEEV D
```

**Figura 23.** Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína **ZP4** (Acceso NCBI/GenBank: 47522906/NP\_999210) de la especie porcina. Las secuencias en rojo y subrayadas representan los péptidos obtenidos por proteómica.

```
ZP4 porcina
  1 MWLRPSIWLC FPLCLALPGQ SQPKAADDLG GLYCGPSSFH FSINLLSQDT ATPPALVVWD
 61 RRGRHLHLQON DSGCGTWVHK GPGSSMGVEA SYRGCYVTEW DSHYLMPIGL EADAGGHRT
121 VTETKLFKCP VDFLALDVPT IGLCDVAVPW DRLPCAPPPI TQGECKQLGC CYNSEEVVPS
181 YYGNTVTSRC TQDGHFSIAV SRNVTSPPLL WDSVHLAFRN DSECKPVMET HTFVLFREFP
241 SSCGTAKRVT GNQAVYENEL VAARDVRTWS HGSITRDSIF RLRVSCIYSV SSSALPVNIQ
301 VFTLPPPLPE THPGPLTLEL QIAKDERYGS YYNASDYPVV KLLREPIYVE VSIRHRTDPS
361 LGLHLHQWA TPGMSPLLQP QWPMLVNGCP YTGDNVQTKL IPVQKASNLL FPSHYQRFSV
421 STFSFVDSVA KQALKGPVYL HCTASVCKPA GAPICVTTCP AARRRRSSDI HFQNGTASIS
481 SKGPMILLQA TRDSSERLHK YSRPPVDSHA LWVAGLLGSL IIGALLVSYL VFRKWR
```

**Figura 24.** Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína **ZP3** (Acceso NCBI/GenBank: 1177051/P42098) de la especie porcina. La secuencia en rojo y subrayada representa el péptido obtenido por proteómica.

```

ZP3 porcina
  1 MAPSWRFFVC FLLWGGTELC SPQPVWQDEG QRLRPSKPPT VMVECQEAQL VVIVSKDLFG
 61 TGKLIRPADL SLGPAKCEPL VSQDTDAVVR FEVGLHECGS SIQVTDDALV YSTFLRHDP
121 PAGNLSILRT NRAEVPIECH YPRQGNVSSW AILPTWVPFR TTVFSEEKLV FSLRLMEENW
181 SAEKMTPTFQ LGDRAHLQAQ VHTGSHVPLR LFVDHCVATL TPDWNTSPSH TIVDFHGCLV
241 DGLTEASSAF KAPRPGPETL QFTVDVFHFA NDSRNTIYIT CHLKVTPADR VPDQLNKACS
301 FSKSSNRWSP VEGPAVICRC CHKGQCGTFS LSRKLSMPKR QSAPRSRRHV TDEADVTVGP
361 LIFLGKTS DH GVEGSTSSPT SVMVGLGLAT VVTLTLATIV LGVPRRRRAA AHLVCPVSAS
421 Q

```

Para la proteína ER-60, los siete péptidos identificados se corresponden con la secuencia de esta proteína en la especie bovina (Figura 25). La proteína ER-60 no está descrita en la especie porcina.

**Figura 25.** Secuencia de aminoácidos de la proteína **ER-60** (Acceso NCBI/GenBank: 729433/P38657) de la especie bovina. Las secuencias en rojo y subrayadas representan los péptidos obtenidos por proteómica.

```

ER-60 bovina
  1 MRLRRLALFP GLALLLAAAR LAAASDVLEL TDDNFESRIT DTGSSGLMLV EFFAPWCGHC
 61 KKLAPYEYEA ATRLKGIVPL AKVDCTANTN TCNKYGVSGY PTLKIFRDGE ESGAYDGPRT
121 ADGIVSHLKK QAGPASVPLK SEEEFEKFIS DKDASVVGFF KDLFSEAHSE FLKAASNLRD
181 NYRFAHTNVE SLVKNYDDDG EGITLFRPSH LTNKFEDKTV AYTEQKMTSG KIKRFIQENI
241 FGICPHMTED NKDLLQGKDL LIAYYDVDYE KNAKGSNYWR NRVMMAKVF LDAGQKLHFA
301 VASRKTFSHE LSDFGLESTT GEIPVAVVRT AKGEKFVMQE EFSRDGKALE RFLEDYFDGN
361 LKRYLKSEPI PESNDGPVKV VVAENFDEIV NNENKDVLE FYAPWCGHCK NLEPKYKELG
421 EKLKDPNIV IAKMDATAND VPSPYEVRF PTIYFSPANK KQNPKKYEGG RELSDFISYL
481 KREATNPPVI QEEKPKKKKK AQEDL

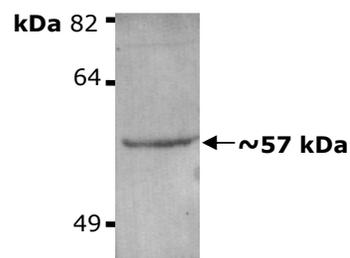
```

Una vez analizados los resultados de las proteínas identificadas por proteómica en el lisado de ovocitos porcinos maduros precipitado con la lectina

PNA-agarosa, se elige para un estudio más detallado la proteína ER-60. La elección de esta proteína se hace en base a sus características multifuncionales (Michalak *et al.*, 1998, 1999, Johnson *et al.*, 2001, Gelebart *et al.*, 2005) y a su papel en la regulación de diferentes procesos biológicos en colaboración con la proteína calreticulina (Jessop *et al.*, 2007). Aunque la calreticulina no ha sido detectada directamente en los resultados de proteómica de nuestro trabajo, sí que ha sido descrita como componente de los GCs de los ovocitos de hámster y ratón (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001; Tutuncu *et al.*, 2004) por lo que igualmente la seleccionamos para su estudio en ovocitos porcinos.

Para el análisis de la proteína **ER-60** se realiza en primer lugar un Western blot de lisado de ovocitos precipitados con PNA-agarosa. El blot se incuba con anti-ER-60 y en su revelado se puede observar una banda con PM de 57 kDa aproximadamente (Figura 26), lo que se corresponde con el PM de esta proteína. De forma paralela se realiza un control negativo incubando la membrana únicamente con el anticuerpo secundario.

**Figura 26.** Western blot de lisado de ovocitos porcinos precipitado con la lectina PNA-agarosa, incubado con anti-ER-60 (1:1.000) y un anticuerpo secundario conjugado a HRP (1:20.000).

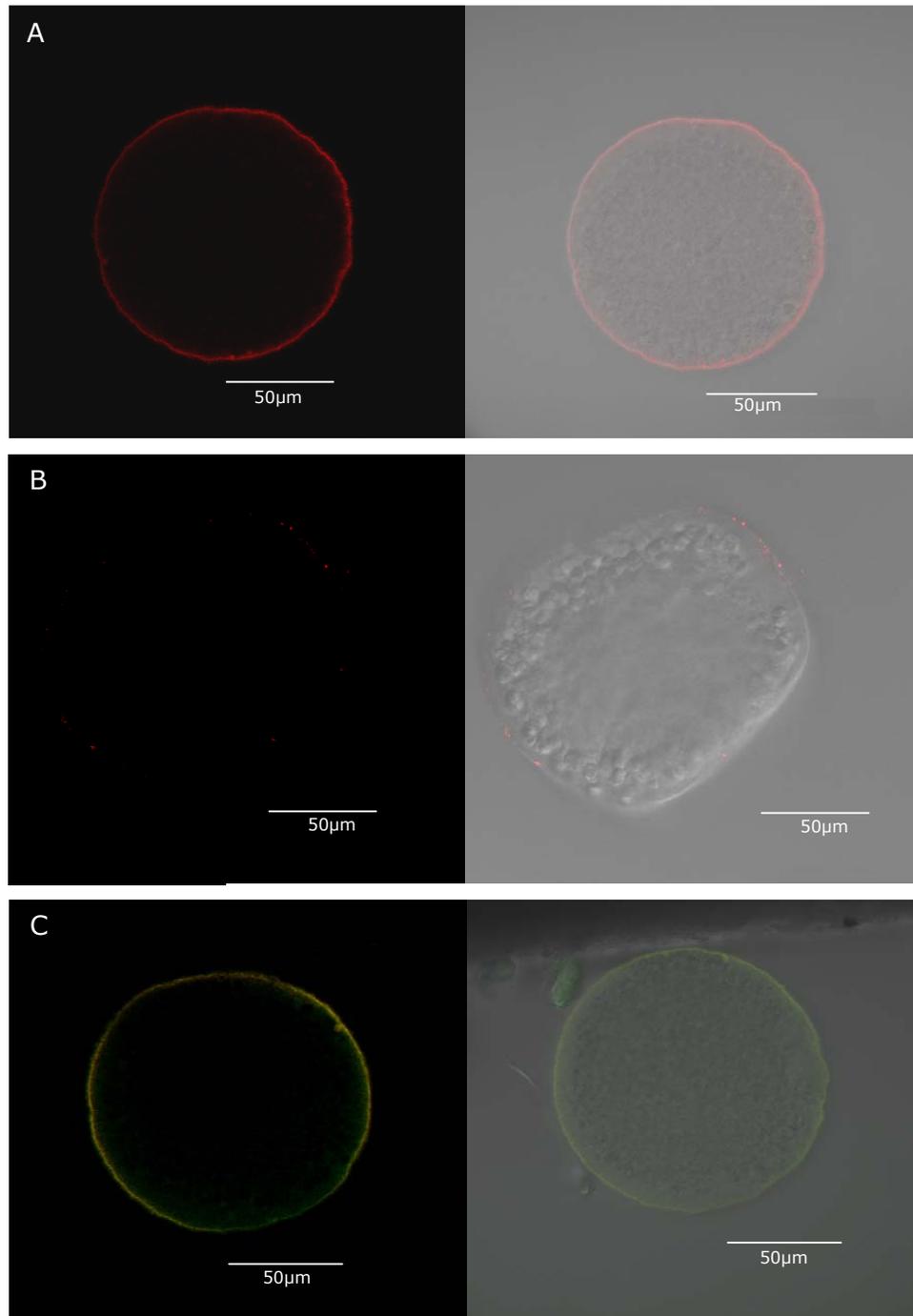


La proteína ER-60 es una proteína descrita ampliamente en el citoplasma de diferentes tipos de células. Para el estudio de su localización en ovocitos se realiza **inmunofluorescencia** indirecta en ovocitos porcinos maduros y fecundados permeabilizados y no permeabilizados para comprobar si se localiza en la zona cortical de los mismos. Como control negativo se incubaron ovocitos

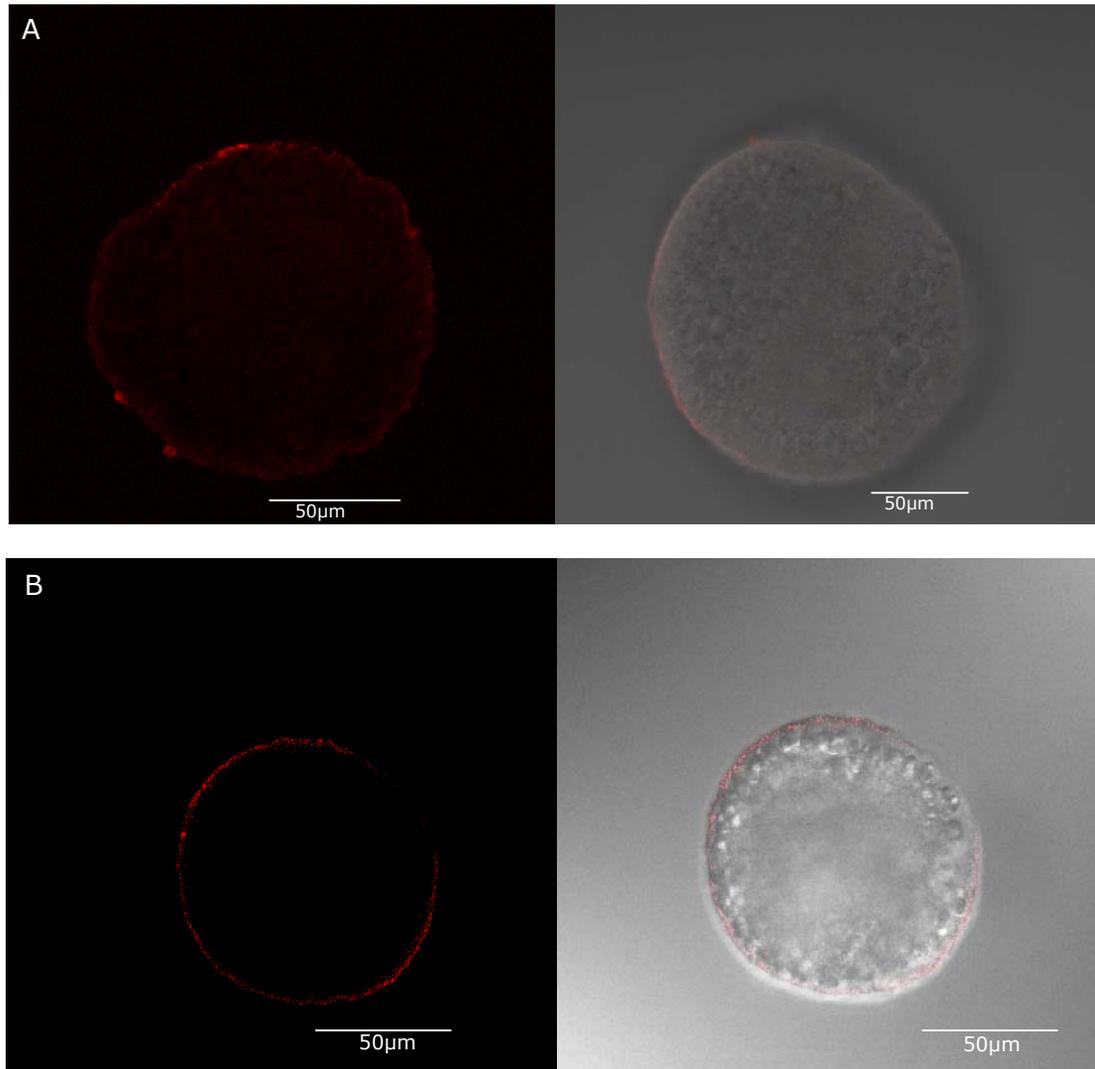
únicamente con el anticuerpo secundario conjugado a TRITC. En estos ovocitos no se observa señal.

El análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal indica que la proteína ER-60 está localizada en la región cortical de ovocitos porcinos maduros permeabilizados (Figura 27A), sin embargo los ovocitos no permeabilizados no presentan señal (Figura 27B). La colocalización entre el marcaje de los GCs (PNA-FITC) y el de la proteína ER-60 (anti-ER-60) en ovocitos maduros permeabilizados (Figura 27C) muestra un índice de Pearson para colocalización de 0´1 y un índice de Manders de 0´23. Todos los índices se mueven en valores de 0 (ausencia de colocalización) a 1 (colocalización total). Por otro lado, en este mismo ensayo realizado en ovocitos porcinos fecundados, permeabilizados y con doble tinción (anti-ER-60 y PNA-FITC) se observa que la proteína ER-60 continúa presente en la región cortical de los ovocitos (Figura 28A), aunque el marcaje con PNA no muestra presencia de GC indicando la lógica excitosis de estas organelas tras la fecundación. Este marcaje está presente también en ovocitos fecundados y no permeabilizados (Figura 28B).

**Figura 27.** Localización de la proteína ER-60 y GCs en ovocitos porcinos madurados *in vitro*. **A)** Ovocito permeabilizado e incubado con anti-ER-60 (1:10) y anticuerpo secundario conjugado a TRITC (1:400). **B)** Ovocito no permeabilizado incubado con anti-ER-60. **C)** Ovocito permeabilizado incubado conjuntamente con anti-ER-60 y PNA-FITC.

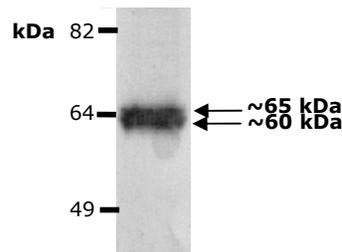


**Figura 28.** Localización de la proteína ER-60 en ovocitos porcinos fecundados *in vitro*. **A)** Ovocito permeabilizado incubado con anti-ER-60 (1:10) y anticuerpo secundario conjugado a TRITC (1:400). **B)** Ovocito no permeabilizado incubado con anti-ER-60.



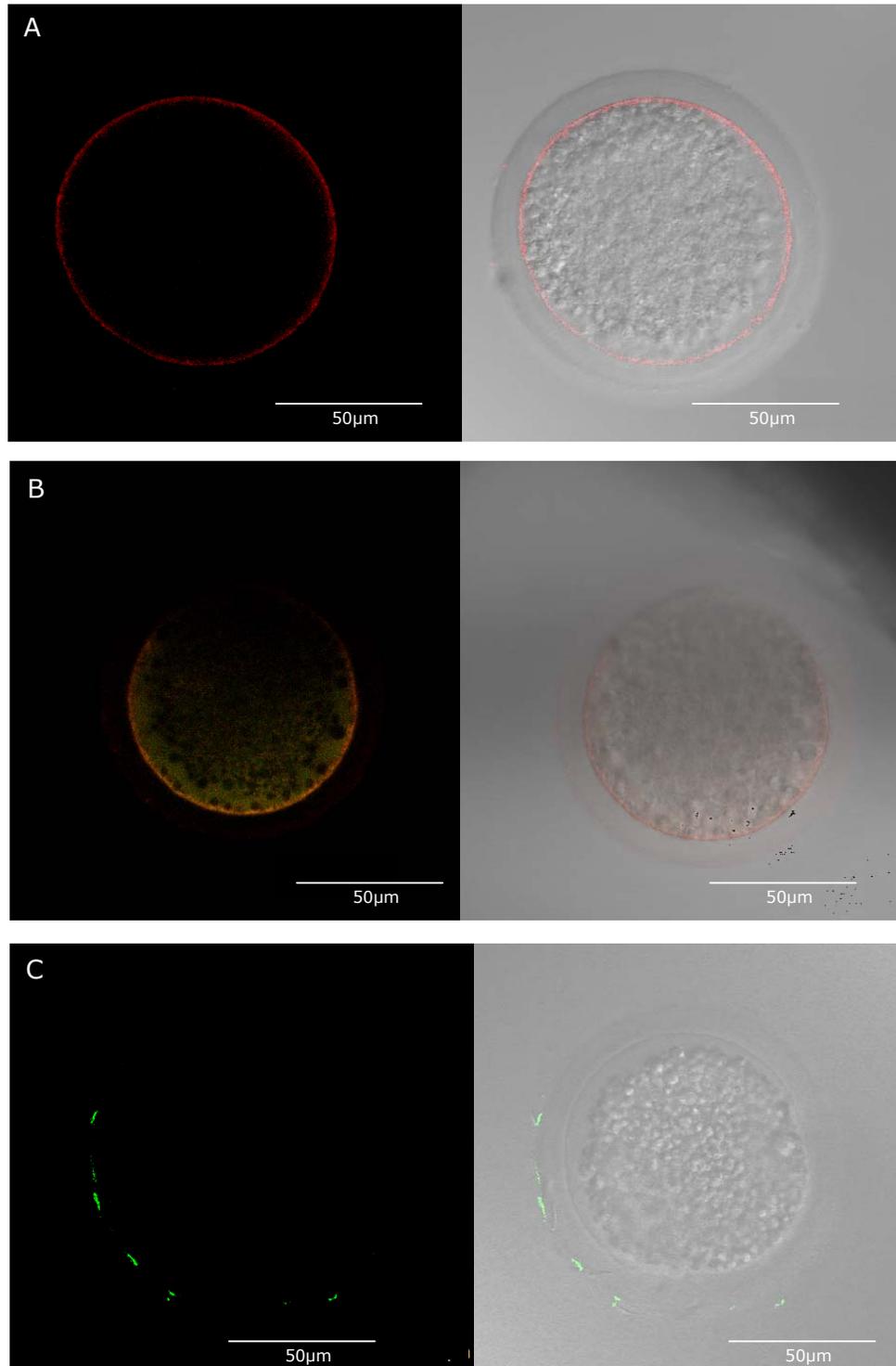
La proteína **calreticulina**, al igual que ER-60, también se analiza a partir del lisado de ovocitos porcinos maduros precipitado con PNA-agarosa. En la membrana incubada con el anticuerpo anti-calreticulina se observó la presencia de dos bandas con PM de 65 y 60 kDa aproximadamente (Figura 29) lo que coincide con el PM de dos isoformas de esta proteína. De forma paralela se realiza un control negativo incubando la membrana únicamente con el anticuerpo secundario

**Figura 29.** Lisado de ovocitos porcinos precipitado con la lectina PNA-agarosa, incubado con anti-calreticulina (1:1.000) y anticuerpo secundario conjugado a HRP (1:20.000).



Mientras, la inmunolocalización de ovocitos porcinos maduros indica que la proteína calreticulina está localizada en la región cortical de los mismos (Figura 30A). La colocalización entre el marcaje de los GCs (PNA-FITC) y el de la proteína calreticulina (anti-calreticulina) en ovocitos maduros permeabilizados (Figura 30B), muestra un índice de Pearson para colocalización de 0´61 y un índice de Manders de 0´277. Por otro lado, se observa que el marcaje para la proteína calreticulina y los GCs utilizando PNA desaparece de la región cortical en los ovocitos fecundados *in vitro* (Figura 30C). Estos datos nos indican que la calreticulina se encuentra asociada a los GCs.

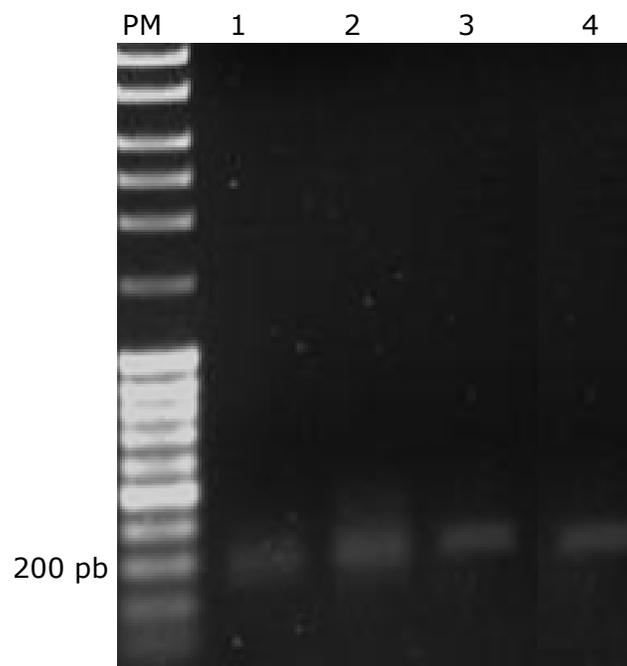
**Figura 30.** Localización de la proteína calreticulina y GCs en ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*. **A)** Ovocito maduro incubado con anti-calreticulina (1:10) y anticuerpo secundario conjugado a TRITC (1:400). **B)** Ovocito maduro marcado con anti-calreticulina y PNA-FITC. **C)** Ovocito fecundado incubado con anti-calreticulina y PNA-FITC.



### 6.3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos

A partir del ARN total de ovocitos porcinos y bovinos se sintetiza el ADNc que se utiliza como molde para PCR con el objetivo de amplificar los fragmentos de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17. Como resultado se obtuvieron en el gel de agarosa bandas que coinciden con el PM esperado para los fragmentos amplificados de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 para ambas especies (200 pares de bases, pb) (Figura 31).

**Figura 31.** Fragmentos amplificados de 200 pares de bases por PCR que corresponden a ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos porcinos (calles 1 y 3) y bovinos (calles 2 y 4) madurados *in vitro*.



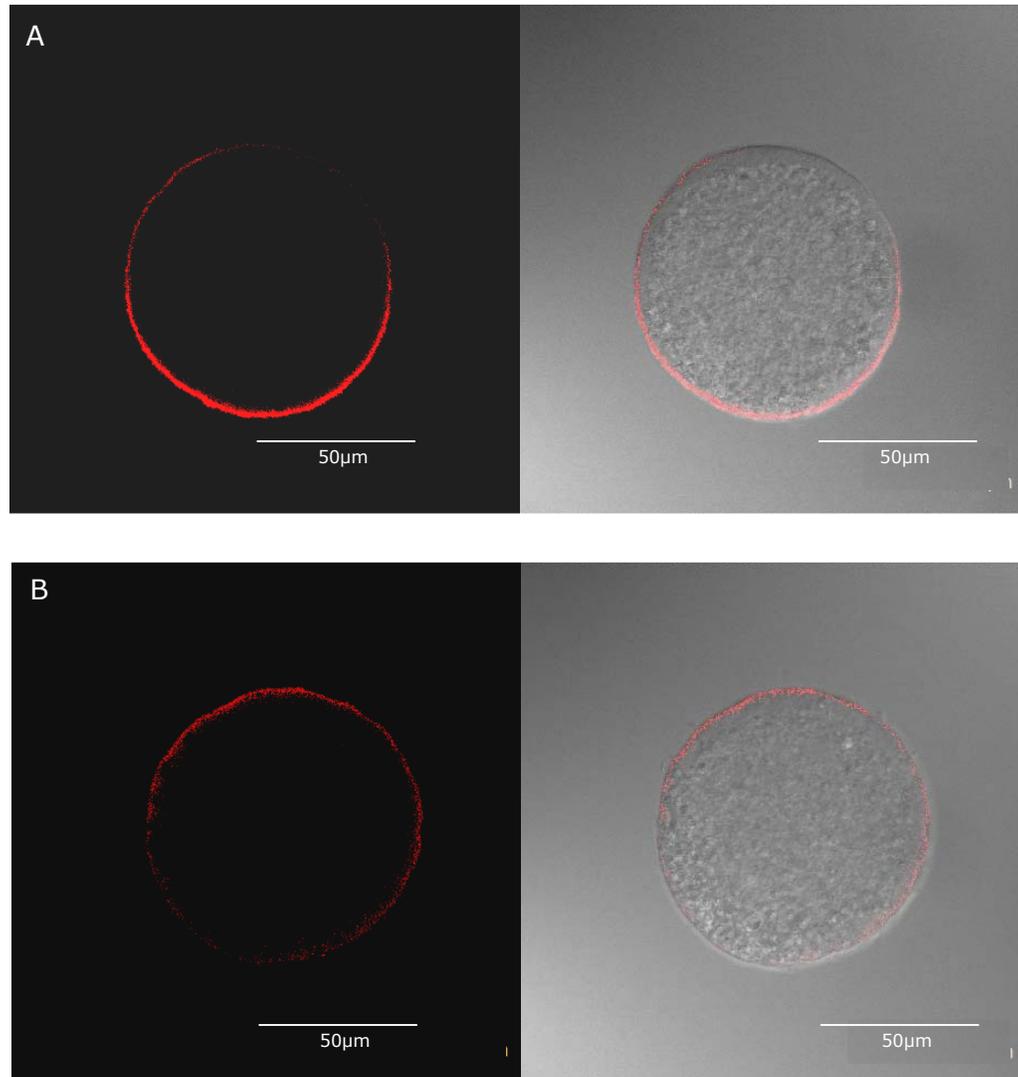
El ADN extraído de estas bandas se analiza mediante secuenciación automática obteniéndose fragmentos que corresponden a las secuencias de las metaloproteasa ADAM-10 y ADAM-17 para ambas especies (Tabla 21).

**Tabla 21.** Secuencias de nucleótidos de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 de las especies porcina y bovina.

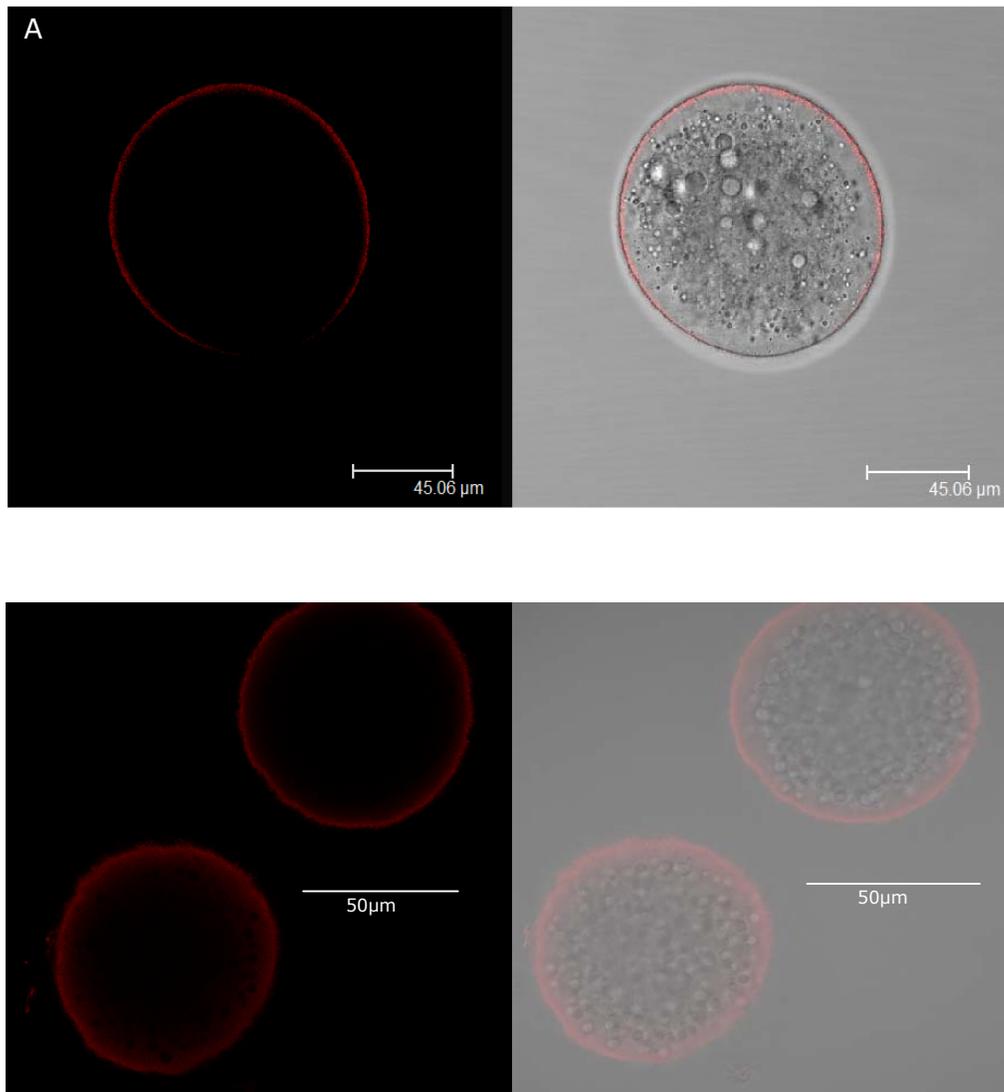
<b>Especie</b>	<b>Proteasa</b>	<b>Nucleótidos de los fragmentos secuenciados</b>
Porcina	ADAM-10	CATCNTGTATGCAAGANCAACATCTGGGGACAACTT AACAACAATAAATTCTCACTCTGTAGTATTAGAAATATA ANTNNAGTTCTTGAGAAGAAGAGAAACACTGTTTTGTT GAATCTGGCCAGCCTATCTG
	ADAM-17	GAGTCCTGTGCGTGTAATGAAACCGACAACCTCGTGCA AGGTGTGCTGCAGGGACCC
Bovina	ADAM-10	AGTNNAGGTCCCTGTTGTACAGCACATTGTGCATTCAA GTCAAAAAGTAAAAAGTGTCTGGGATGATTCAGACTGT GCAAAAAGAAGGAATATGTAATGGCATCACAGCTCTCT GCCAGCCTCTGATCCTAAACCGAACTTCACAGACTGT AATAGACATACGCAAGTGTGCATTAATGGGCAATGTG CAGGTTCTATCA
	ADAM-17	CGGCAAGTGTAAGGNCNGCAAGTGCGTGCCCTTCTGC GANNNNNNGCAGAGGCTGGAGTCTGTGCGTGTAAT GAAACCGACAACCTCGTGCAAGGTGTGCTGCAGGGACC CCTCGGGCCGCTGCGTGCCTTACGTCAACGCCGAACA GAAGAACA

Por otro lado, la localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 se realizó mediante la incubación de ovocitos porcinos maduros con anticuerpos anti-ADAM-10 y anti-ADAM-17, y su posterior análisis con microscopía confocal observándose que existe un marcaje en el oolema para ambas proteínas (Figura 32). La incubación de ovocitos bovinos arrojó resultados similares observándose marcaje en el oolema para ambas metaloproteasas (Figura 33).

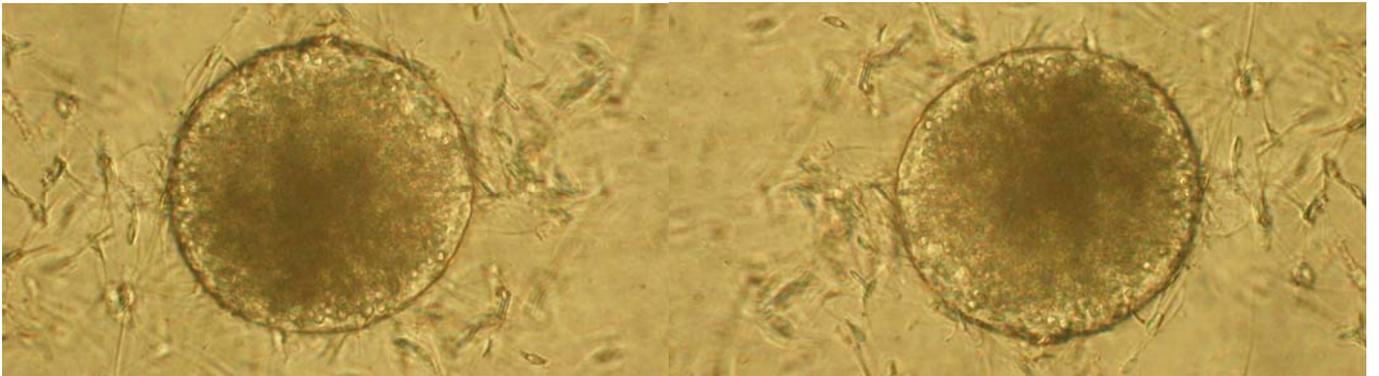
**Figura 32.** Localización de las proteínas ADAM-10 y ADAM-17 mediante inmunofluorescencia indirecta en ovocitos porcinos madurados *in vitro* incubados con anticuerpos primarios anti-ADAM (1:5) y anticuerpo secundario conjugado a TRITC (1:400). **A)** Ovocito incubado con anti-ADAM-10 mostrando marcaje en el oolema. **B)** Ovocito incubado con anti-ADAM-17 mostrando marcaje en el oolema.



**Figura 33.** Localización de las proteínas ADAM-10 y ADAM-17 mediante inmunofluorescencia indirecta en ovocitos bovinos madurados *in vitro* incubados con anticuerpos primarios anti-ADAM (1:5) y anticuerpo secundario conjugado a TRITC (1:400). **A)** Ovocito incubado con anti-ADAM-10 mostrando marcaje en el oolema. **B)** Ovocitos incubados con anti-ADAM-17 mostrando marcaje en el oolema.



# 7. Discusión



## 7. DISCUSIÓN

Las proteínas contenidas en el espermatozoide y el ovocito, y en particular las de los gránulos corticales (GCs) y el oolema, tienen un papel muy importante durante las diferentes etapas de la fecundación. Las proteínas localizadas en los GCs y el oolema participan en procesos tan cruciales como es el bloqueo de la polispermia. Sabemos que la fecundación *in vitro* en mamíferos presenta elevados índices de polispermia comparados con la fecundación *in vivo* y que la especie más afectada, en la cual la polispermia continúa siendo un problema, es la especie porcina. Es conocido que tras la entrada del espermatozoide se produce la exocitosis de los GCs y que las moléculas liberadas de estas organelas favorecen el bloqueo de la polispermia, pero poco se sabe acerca de la composición y función de los GCs presentes en los ovocitos de mamíferos. Sin embargo, está ampliamente descrito que las moléculas liberadas por estas organelas durante la fecundación o la activación ovocitaria mediante estimulación química o eléctrica producen importantes modificaciones, particularmente en la zona pelúcida (reacción de zona), espacio perivitelino (EPV) y probablemente en el oolema del ovocito. Estas modificaciones están asociadas directamente con el bloqueo de la polispermia (Gwatkin *et al.*, 1973; Horvath *et al.*, 1993; Sengoku *et al.*, 1995; Evans y Kopf, 1998; Sun, 2003; Gardner y Evans, 2006).

A continuación discutiremos los resultados obtenidos en el presente trabajo en los distintos experimentos realizados.

### **7.1. Efecto del exudado de los gránulos corticales porcinos y bovinos, obtenido mediante interacción de gametos, sobre la fecundación *in vitro* y la digestión de la zona pelúcida de ovocitos porcinos**

En el trabajo realizado con motivo de esta Tesis Doctoral, tras la activación fisiológica mediante la interacción de gametos porcinos y bovinos para la obtención del contenido de los GCs, se observó que la incubación de ovocitos porcinos con el contenido liberado al medio de cultivo disminuye el índice de penetración, polispermia y el número de espermatozoides unidos a la ZP en

ovocitos de la especie porcina. La disminución de la polispermia y unión del espermatozoide se observa cuando los ovocitos porcinos se incuban con el contenido de los GCs tanto de la especie porcina como bovina. Sin embargo, la disminución en el porcentaje de penetración y unión del espermatozoide a la ZP, así como el aumento de la monospermia fue mayor en el exudado bovino en comparación con el grupo control y exudado porcino. Esto indica que el exudado de los GCs obtenido de ovocitos bovinos parece ser más eficiente que el de ovocitos porcinos para bloquear la fecundación porcina, lo que sin duda es un efecto heterólogo.

Está ampliamente descrito que durante la fusión de gametos o la activación artificial del ovocito maduro, los GCs se fusionan con el oolema y liberan su contenido al EPV (Ducibella, 1996; Abbott y Ducibella, 2001). Para recoger este contenido solo hace falta seleccionar un buen método de reacción cortical en ovocitos libres de ZP. Así pues, la activación artificial del ovocito de forma eléctrica o química es ampliamente utilizada para la obtención de embriones partenogénicos en muchas especies, incluyendo la porcina (Paffoni *et al.*, 2008). Sin embargo, en esta especie se ha observado que la activación ovocitaria (química o eléctrica) y la exocitosis de los GCs son procesos en cierta medida independientes, lo que indica que los ovocitos pueden ser activados sin que se produzca la exocitosis del 100% de los GCs (Sun *et al.*, 1997; Petr *et al.*, 2005). La reacción cortical *in vitro* en la especie porcina, utilizando activación con diferentes concentraciones de ionóforo de  $Ca^{2+}$ , oscila entre un 35-74'6% como máximo (Wang *et al.*, 1998b). Mientras, el porcentaje de exocitosis de GCs tras la penetración espermática alcanza valores de 86'3% (Wang *et al.*, 1998b) y hasta el 99'0% (Kim *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que el porcentaje de GCs que presentan exocitosis tras la penetración espermática es mayor comparada con la activación química. Igualmente, la exocitosis de los GCs mediante activación eléctrica en ovocitos porcinos es incompleta (Sun *et al.*, 1992). En nuestro caso, la activación eléctrica de ovocitos porcinos libres de ZP para obtener el exudado de los GCs no tuvo éxito ya que, tras la activación, aproximadamente un 60-70% de los ovocitos presentaban una fragilidad extrema lo que dificultaba su manejo y aumentaba la posibilidad de contaminación de las muestras con proteínas citoplasmáticas. Estas observaciones no se presentan en este estudio pero fueron el motivo que nos

llevó a que optásemos por realizar una activación fisiológica mediante la interacción de gametos (ovocito libre de ZP-espermatozoide) para obtener el exudado de los GCs. Como hemos mencionado, la interacción de gametos asegura un alto porcentaje de exocitosis de los GCs y en ausencia de la ZP este contenido es depositado en el medio de cultivo (Wolf, 1978; Takahashi *et al.*, 1995). En nuestro trabajo corroboramos que tras la interacción de gametos se presenta la exocitosis de los GCs utilizando las lectinas PNA para ovocitos porcinos y LCA para ovocitos bovinos. El medio que se obtiene tras la interacción de gametos contiene componentes del contenido acrosomal y secreciones del ovocito, siendo las principales organelas secretoras de éste los GCs (Wessel *et al.*, 2001) por lo que nos referiremos al medio de interacción de gametos como exudado de GCs.

La obtención del exudado de los GCs mediante interacción de gametos ya ha sido utilizada por otros autores, describiendo que el contenido de los GCs liberado al medio de cultivo es capaz de inducir la reacción de zona y disminuir el índice de penetración en ovocitos de hámster cuando éstos se incuban con este contenido antes de ser sometidos a FIV (Barros y Yanagimachi, 1971). Además en ovocitos de ratón, el contenido de los GCs obtenido mediante interacción de gametos produce una disminución en el porcentaje de penetración y fecundación en ovocitos con y sin ZP, indicando así que el contenido de los GCs liberado al medio de cultivo interactúa tanto con la ZP como con el oolema (Wolf y Hamada, 1977). También se ha observado que este efecto beneficioso del exudado de los GCs obtenido mediante interacción de gametos sobre los ovocitos previa FIV se mantiene incluso cuando se aumenta la concentración de espermatozoides (Wolf y Hamada, 1977). Si bien es cierto que utilizando la interacción de gametos para obtener el contenido de GCs se obtiene una muestra contaminada con los componentes espermáticos liberados tras la reacción acrosómica, Barnes y Yanagimachi (1971) y más tarde Wolf y Hamada (1977), demostraron que los componentes liberados al medio de cultivo tras la incubación de los espermatozoides sin ovocitos, no ejercen ningún efecto sobre el índice de polispermia, encontrando que el nivel de penetración en estos ovocitos es igual al control. Por otro lado, el hecho de que espermatozoides cultivados sin ovocitos no tengan el mismo nivel de reacción acrosómica generaría incertidumbre respecto a la veracidad del control utilizado para descartar la posibilidad de que

el contenido acrosomal tenga un papel en la disminución de la fecundación y penetración que observan Barnes y Yanagimachi (1971) y Wolf y Hamada (1977). En nuestro caso, estudios en nuestro laboratorio han mostrado que los espermatozoides de verraco capacitados con gradientes de percoll y cultivados en medio de fecundación presentan mayores porcentajes de reacción acrosómica conforme se mantienen en cultivo (Matas *et al.*, 2003) indicando que el espermatozoide capacitado mantenidos en condiciones de cultivo puede presentar reacción acrosómica en ausencia del ovocito, puesto que el medio en el que se incuban contiene calcio y bicarbonato que estimulan la reacción acrosómica (Harrison *et al.*, 1993; Green y Watson, 2001; Birck *et al.*, 2008). Además, en nuestro trabajo evaluamos la reacción acrosómica de los espermatozoides en las diferentes condiciones de cultivo observando para ambas especies que los porcentajes de reacción acrosómica son similares entre los espermatozoides incubados solos y aquellos incubados con ovocitos (datos no mostrados). Con todas estas observaciones, podríamos atribuir el efecto del medio obtenido tras la interacción de gametos sobre la FIV principalmente a las secreciones del ovocito y no al contenido secretado por el espermatozoide.

El bloqueo de la polispermia en ovocitos de mamífero está regulado por una gran variedad de mecanismos en cierta medida especie-específicos (Wolf, 1981; Sun, 2003; Talbot y Dandekar, 2003; Gardner y Evans, 2006). Sin embargo, en nuestros resultados, existe un efecto heterólogo muy evidente. Nuestros resultados indican que tras la interacción de gametos las moléculas secretadas por el ovocito bovino, probablemente en su mayoría las que provienen de los GCs, tienen un efecto sobre el ovocito porcino, en particular favoreciendo la monospermia. El efecto heterólogo de los GCs de los ovocitos bovinos sobre los ovocitos de la especie porcina no es tan ilógico puesto que diferentes proteínas descritas en los GCs (N-acetilglucosaminidasa, ovoperoxidasa y proteasa) son similares en diferentes especies como ratón, hámster, erizo de mar y sapo (Foerder y Shapiro, 1977; Hall, 1978; Miller *et al.*, 1993). Un efecto heterólogo más directo lo han descrito Moller *et al.* (1990) con la presencia de una proteasa liberada tras la activación de ovocitos de ratón que es capaz de convertir ZP2 en ZP2f en los ovocitos de hámster y de forma inversa, la proteasa liberada de los GCs de ovocitos de hámster es capaz de convertir ZP2 en ZP2f en los ovocitos de ratón. Estas observaciones apoyan la posibilidad de un efecto heterólogo del

contenido de los GCs como el que hemos hallado en nuestro estudio. Además nuestros resultados sugieren que los GCs de las especies porcina y bovina deben compartir componentes similares que estarían implicados en mecanismos de bloqueo de la polispermia conservados evolutivamente como, ha sido descrito previamente para la proteólisis de ZP2 (Hedrick y Wardrip, 1986).

En los ovocitos de mamíferos, el bloqueo de la polispermia *in vivo* inicia su regulación durante el paso de los gametos por el oviducto, por un lado regulando el número de espermatozoides que tendrá acceso al ovocito (Hunter, 1990, 1991) y, por otro, mediante la incorporación de moléculas (oviductina) que interactúan con la ZP durante su paso a través del oviducto (Broermann *et al.*, 1989; Coy *et al.*, 2008a). Además, también se ha sugerido que las glicoproteínas presentes en el oviducto regulan la exocitosis sincronizada de los GCs y/o incrementan la sensibilidad de la ZP al contenido de los mismos (Hunter, 1991; Kim *et al.*, 1996). Posteriormente, la polispermia es regulada por la exocitosis de los GCs mediante la interacción de su contenido con la ZP y posiblemente con el oolema (Gwatkin *et al.*, 1973; Dandekar y Talbot, 1992; Tatemoto y Terada, 1999; Sun, 2003). En los sistemas *in vitro*, los ovocitos mamíferos carecen del primer mecanismo que contribuye al bloqueo de la polispermia (oviductina) puesto que en la actualidad no se adicionan secreciones oviductales en los medios de cultivo para FIV de forma rutinaria, por lo que el ovocito contará únicamente con este segundo mecanismo proporcionado por los GCs. Sin embargo, existe una importante diferencia entre especies en cuanto al bloqueo de la polispermia en los sistemas *in vitro*, observándose que la especie bovina presenta un índice de polispermia que no supera el 10% (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki y Nakahara, 1990; Kawarsky *et al.*, 1996), mientras que la porcina alcanza niveles superiores al 50% (Wang *et al.*, 1991; Abeydeera y Day, 1997; Wang *et al.*, 1998c). Es verdad que otros factores están implicados en el bloqueo de la polispermia en los sistemas *in vitro*, como son el número de espermatozoides utilizados para la fecundación así como las características de los mismos (Hunter, 1991; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001) y el estado de maduración citoplasmática del ovocito.

Los sistemas de FIV de las especies porcina y bovina se realizan poniendo especial atención a la maduración de los ovocitos, la capacitación espermática,

los medios de cultivo y las condiciones de cocultivo de los gametos. La regulación de todos estos parámetros en la mayoría de los mamíferos en los que en la actualidad se realiza FIV tiene buenos resultados, no así en la especie porcina. Factores como la exocitosis de los GCs no se regulan de una forma directa puesto que sólo esta especie presenta elevados índices de polispermia en sistemas *in vitro*. Al parecer, en esta especie, a pesar de que tanto los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* como *in vivo* son capaces de liberar el contenido de los GCs tras la penetración del espermatozoide, existen diferencias en el porcentaje de GCs que son liberados por exocitosis así como en la dispersión de su contenido en el EPV siendo más rápido en los ovocitos madurados *in vivo* que *in vitro* (Cran y Cheng, 1986; Kim *et al.*, 1996). La exocitosis de los GCs de ovocitos porcinos *in vivo* es de un 100% con una distribución del contenido en el EPV completa, mientras que en ovocitos madurados y fecundados *in vitro* se observa un 24-42% de exocitosis de los GCs y una distribución irregular de su contenido en el EPV (Kim *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1997). En nuestro trabajo, encontramos que la incubación previa con un medio de cultivo que contiene el exudado de los GCs tiene la capacidad de reducir de forma importante la penetración espermática, en especial cuando el exudado de los GCs provienen de ovocitos bovinos, indicando así que el contenido de los GCs tienen un papel biológico sobre el ovocito que previene la polispermia.

En nuestro trabajo también encontramos que ovocitos porcinos maduros tras la incubación con el contenido de los GCs de ambas especies no muestran un aumento ni diferencia en el tiempo de digestión con pronasa de la ZP comparado con el control. Estos resultados coinciden con diferentes autores que indican que las modificaciones de la ZP que presentan estas especies no pueden ser evaluadas mediante digestión proteolítica de la ZP (Iwamoto *et al.*, 1999; Coy *et al.*, 2002, 2005; Kolbe y Holtz, 2005). Asano *et al.* (2004) describe que tras la activación con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  el tiempo de digestión de la ZP con pronasa no varía respecto al control. Sin embargo, probablemente el efecto venéfico del exudado de los GCs de ovocitos bovinos sobre la FIV porcina se debe a una mayor proteólisis de ZP2 producida por este en comparación con exudado de los GCs del propio porcino y por esta razón es más eficiente en el bloqueo de la polispermia. Para apoyar esta teoría se requieren futuros experimentos en los que se pueda evaluar la presencia de proteólisis de ZP2 tras la incubación con el

exudado de los GCs obtenido mediante interacción de gametos, además del uso de inhibidor de proteasas en el exudado bovino para comprobar si pierde su efecto lo que demostraría que éste se debe fundamentalmente a la actividad proteolítica.

Por otro lado, en nuestro trabajo también observamos una importante diferencia en el número de espermatozoides unidos a la ZP entre los distintos grupos, siendo el número menor en los ovocitos incubados con el exudado de los GCs bovinos. Está descrito que en los ovocitos de la especie bovina, después de la fecundación, la ZP disminuye los residuos de ácido siálico sugiriendo que estos residuos participan en la unión espermatozoide-ZP en ovocitos bovinos y que la neuraminidasa liberada tras la exocitosis de los GCs regula la polispermia mediante la eliminación del ácido siálico (Katsumata *et al.*, 1996; Velásquez *et al.*, 2007). Probablemente, el exudado de los GCs bovinos elimine el ácido siálico de la ZP porcina, como sucede en la especie bovina, proponiendo que la naturaleza bioquímica de los GCs de la especie porcina y bovina son similares y que estas especies probablemente tengan un mecanismo de unión similar, por ejemplo que usen ácido siálico como receptor del espermatozoide a la ZP.

Somos conscientes de que se requieren más estudios para definir de forma concreta el proceso de exocitosis, el contenido y la función de los GCs en relación al bloqueo de la polispermia en la especie porcina. Sin embargo, creemos que la metodología desarrollada en nuestro trabajo mediante la obtención de exudado de GCs tras la interacción de gametos arroja resultados esperanzadores en el bloqueo de la polispermia porcina y parece ser un mecanismo eficaz que puede permitir en el futuro continuar con el estudio de diferentes aspectos acerca de la composición y función de los GCs.

## **7.2. Estudio de las moléculas contenidas en los gránulos corticales de ovocitos porcinos**

La naturaleza bioquímica de los componentes de los GCs de mamíferos es en gran parte desconocida, aunque se estima que los GCs contienen entre 4-14 proteínas diferentes, y no se descarta la posibilidad de que sea un número superior (Gulyas, 1980; Pierce *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 2000; Hoodbhoy *et al.*, 2000, 2001; Muñoz-

Gotera *et al.*, 2001; Rekkas *et al.*, 2002; Tutuncu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Algunos autores, en base al uso de diferentes inhibidores específicos, sugieren que moléculas como las proteasas tipo tripsina y serina contenidas en los GCs pueden ser responsables de la reacción de zona y por tanto contribuir al bloqueo de la polispermia (Gwatkin *et al.*, 1973; Wolf y Hamada, 1977; Moller y Wassarman, 1989; Tawia y Lopata, 1992). En nuestro trabajo, fue posible identificar mediante análisis por proteómica dos proteasas tipo tripsina (**tripsina-4 y tripsina V-A**) en el medio de cultivo tras la interacción de gametos porcinos. La presencia de proteasas tipo tripsina en el medio de cultivo tras la interacción de gametos ya ha sido descrita por otros autores en hámster (Wolf y Hamada, 1977). Estos mismos autores sugieren que las proteasas tipo tripsina liberadas al medio de cultivo que provienen de los GCs son capaces de regular la penetración espermática tanto a nivel de la ZP como del oolema en el ovocito. Tripsina-4 y tripsina V-A tienen un PM de 26 y 27 kDa respectivamente, lo que coincide con el PM de las bandas analizadas en nuestro trabajo. Las proteasas tipo tripsina son sintetizadas como precursores inactivos en altos niveles en el páncreas de mamíferos y están implicadas en la digestión de los alimentos (Rogers y Harper, 1966; Snook, 1973). Poco se sabe de la expresión y función de las proteasas tipo tripsina en otros tejidos que no sea el páncreas. Sin embargo, en el testículo de ratón se ha identificado la expresión de 5 diferentes genes que codifican para proteasas tipo tripsina (Stevenson *et al.*, 1986) y los espermatozoides de ratón durante la reacción acrosómica liberan una tripsina que recibe el nombre de serina proteasa testicular 4 (TESP4) que está relacionada con la penetración espermática de la ZP del ovocito (Ohmura *et al.*, 1999). La secuencia de aminoácidos de TESP4 de ratón depositada en el banco de genes (BAA74760) tiene un 76% de identidad con la secuencia de tripsina-4 (NP\_001101326) de *Macaca mulatta*, a la cual corresponde el péptido identificado por proteómica en nuestro trabajo. Esto indica que TESP4 descrita en el espermatozoide no se corresponde con la tripsina-4 descrita en nuestro trabajo. Mientras, la secuencia de aminoácidos depositada en el banco de genes para tripsina V-A (NP\_001101326) de *Rattus norvegicus*, a la cual corresponde el péptido que identificamos por proteómica, tiene un 64% de identidad con TESP4 de ratón lo que indica que la TESP4 descrita en el espermatozoide no se corresponde con la tripsina V-A descrita en nuestro trabajo.

Consideramos nuestros resultados como valiosos puesto que la presencia de proteasas en el ovocito es un hecho así como su papel en el bloqueo de la polispermia (Gwatkin *et al.*, 1973; Wolf y Hamada, 1977; Moller y Wassarman, 1989; Tawia y Lopata, 1992), a pesar de que actualmente las proteasas tripsina-4 y tripsina V-A, no se han descrito en ovocitos o espermatozoides de ninguna especie. Es por ello que ambas proteasas proporcionan una nueva fuente de información relacionada con las primeras etapas de fecundación tanto si están presentes en el ovocito como en el espermatozoide porcino. Es importante considerar estos resultados para futuros estudios en los que nos planteamos corroborar la presencia de estas proteasas analizando la existencia de ARNm que codifica para estas proteasas mediante la amplificación con PCR diseñando cebadores específicos o degenerados.

Como era de esperar, la acrosina fue identificada tanto en el medio de cultivo tras la incubación de gametos y espermatozoides solos. La acrosina, una serina proteasa relacionada con la hidrólisis de la ZP del ovocito durante las primeras etapas de fecundación, tiene especificidad de corte tipo tripsina y está ampliamente descrita en el espermatozoide de diferentes mamíferos (Adham *et al.*, 1997; Buffone *et al.*, 2008). Otra molécula, la pancreastatina se identificó únicamente en el medio de cultivo de espermatozoides. La pancreastatina es sintetizada a partir de cromogranina A. Ha sido descrita en el citoplasma de las células de Leydig en el hombre (Davidoff *et al.*, 1993) y recientemente en testículo de la especie bovina, específicamente en los túbulos seminíferos y células de Leydig (Payan-Carreira *et al.*, 2006). La pancreastatina no está descrita en espermatozoides, sin embargo su localización en testículo está relacionada con la espermatogénesis (Ortega *et al.*, 2004).

Por otro lado, en nuestro estudio de moléculas de los GCs utilizando las lectinas PNA y WGA y microscopía electrónica de transmisión encontramos que las moléculas afines a la lectina PNA están localizadas en el interior de los GCs de ovocitos porcinos y que la lectina WGA también marca el contenido de los GCs aunque, a diferencia de PNA, además es afín a la ZP. Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente por Avilés *et al.* (1996, 1997) y Jiménez-Movilla *et al.* (2004) quienes describen que las moléculas de los GCs y las glicoproteínas de la ZP de ovocitos de mujer, ratón y rata tienen un patrón de

glicosilación similar. En nuestros resultados observamos que los GCs porcinos presentan un contenido heterogéneo de los azúcares Gal $\beta$ 1-3GalNAc y N-acetilglucosamina, detectados con las lectinas PNA y WGA respectivamente indicando así una diferencia bioquímica entre GCs. Cran (1985) describió en ovocitos porcinos, mediante microscopía electrónica, la presencia de dos poblaciones de GCs bioquímicamente diferentes. Esta descripción se realizó apoyándose únicamente en el aspecto de las organelas, sin aportar datos concretos de la composición de los mismos. El hecho de que los ovocitos porcinos presenten GCs bioquímicamente diferentes no es ilógico ya que recientemente, en los GCs de ovocitos de ratón se han identificado dos poblaciones de GCs bioquímicamente diferentes, por un lado GCs que se marcan con la lectina LCA y un anticuerpo y por otro, GCs que se marcan solo con LCA (Liu *et al.*, 2003).

También está descrito que los GCs de ovocitos mamíferos liberan diferentes glicoconjugados (Szollosi, 1967; Gordon *et al.*, 1975; Yoshida *et al.*, 1993, Hoodbhoy y Talbot, 2001). En mamíferos, los glicoconjugados tienen un papel crucial en el bloqueo de la polispermia a nivel de ZP y/o oolema. En la ZP algunos glicoconjugados inician la reacción de zona al interactuar específicamente con la glicoproteína ZP3 (Lee *et al.*, 1988) y se ha sugerido que pueden favorecer el bloqueo de la polispermia de forma efectiva en el oolema de los ovocitos de mamífero de una forma análoga a lo que sucede en los ovocitos de erizo de mar (Citkowitz, 1971; McBlaine y Carroll, 1980) mediante modificaciones del potencial eléctrico del oolema (Jaffe y Cross, 1986) o un rápido bloqueo de los receptores del espermatozoide localizados en el mismo (Ahuja, 1985). Estas moléculas han sido descritas mediante citología de lectinas a nivel ultraestructural en diferentes especies como ratón, rata, hámster y humanos. En los GCs de estas especies se han identificado residuos de  $\alpha$ -L-Fuc y Neu5Ac (Lee *et al.*, 1988; Avilés *et al.*, 1997),  $\alpha$ -D-Man (Cherr *et al.*, 1988; Ducibella *et al.*, 1988b; Ducibella *et al.*, 1990), así como el azúcar GlcNAc (Avilés *et al.*, 1997), el disacárido Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Avilés *et al.*, 1996, 1997; Jiménez-Movilla *et al.*, 2004) y otros como Gal $\beta$ 1-3GalNAc y GalNAc. Estudios recientes indican que en los ovocitos de hámster existen 12 glicoconjugados, nueve de éstos localizados en los GCs, y que se asocian con la ZP y el oolema durante la fecundación. Estos glicoconjugados pueden ser identificados mediante el uso de diferentes lectinas (Hoodbhoy y Talbot, 2001). En ovocitos porcinos los

glicoconjugados de los GCs son reconocidos de forma específica por la lectina PNA (Yoshida *et al.*, 1993), lo que indica que contienen moléculas que incluyen residuos Gal $\beta$ 1,3GalNAc que permite la unión de la lectina PNA, específica para estos disacáridos. Esta lectina no reacciona con la ZP de los ovocitos de esta especie, siendo esta característica una ventaja que permite la observación de los GCs mediante microscopía confocal (Yoshida *et al.*, 1993).

En nuestro trabajo, la precipitación del lisado de ovocitos porcinos utilizando las lectinas PNA y WGA conjugadas a proteína agarosa y transferidas a una membrana que posteriormente se incubó con estas lectinas, muestra bandas positivas a PNA de 120, 100, 80, 65 y 55 kDa aproximadamente. Estos resultados concuerdan con algunas de las bandas positivas a PNA descritas en ovocitos de hámster maduros sin ZP (110, 100, 87, 62, 56, 52 y 48 kDa aproximadamente) (Hoodbhoy y Talbot, 2001). Por otro lado, en nuestro trabajo también observamos bandas positivas a WGA de 180 kDa aproximadamente, así como una banda continua de 85 a 60 kDa y otra de 18 kDa aproximadamente. Diferentes autores han descrito que tras la reacción cortical se liberan al EPV moléculas de 32 kDa (p32), 56 kDa (p56), 62 kDa (p62) y 75 kDa (p75), ésta última recientemente caracterizada como peptidil arginina diaminasa (PAD) (Pierce *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 2000; Hoodbhoy *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005).

Cada una de las bandas identificadas tras la precipitación con lectinas en nuestro trabajo puede contener múltiples proteínas y probablemente representen glicoproteínas de los GCs y/o del oolema y/o ZP, puesto que todas las glicoproteínas presentes en estas estructuras entran en la vía secretora y pueden estar glicosiladas en mayor o menor medida (Palade, 1975; Van vliet *et al.*, 2003). Las proteínas que forman los GCs (Anderson, 1968), el oolema, los lisosomas y también la ZP siguen la vía secretora (Wassarman y Josefowicz, 1978; Dennis *et al.*, 1999). Por lo tanto, las bandas reactivas a las lectinas PNA y WGA pueden corresponderse con cualquiera de los componentes anteriormente mencionados.

En la separación mediante electroforesis de las proteínas del lisado de ovocito precipitadas con la lectina PNA se pueden observar proteínas con un PM que oscila entre 115 y 49 kDa para la lectina PNA y entre 180 y 26 kDa para

WGA. Algunos autores han descrito que en el exudado de GCs obtenido tras la activación química de ovocitos de ratón se pueden encontrar proteínas con un PM de 70, 50, 45, 34, 32 y 20 kDa aproximadamente (Gross *et al.*, 2000). A pesar de que en nuestro trabajo se utilizaron lectinas específicas con afinidad a moléculas de los GCs, como PNA, el hecho de que se trabaje con una muestra que contiene glicoproteínas de todo el ovocito y considerando, por un lado, que los GCs sólo tienen de 50 a 100pg de proteínas (Moller y Wassarman, 1989) y, por otro, que cada una de las bandas que se obtienen tanto en el Western blot como en el gel contienen más de una glicoproteína, indica que se requiere de otros análisis que nos permitan saber de una forma más específica qué proteínas están en estas bandas. Para ello se realizó el análisis por proteómica de las bandas de PM 100 a ~40 kDa del lisado de ovocitos porcinos precipitado con PNA. El análisis por proteómica de estas bandas arrojó diferentes moléculas entre las que se encuentran glicoproteínas de la ZP y proteínas tipo chaperonas como la proteína de choque térmico Hsp-70 y la proteína disulfuro isomerasa ER-60.

Las proteínas Hsp-70 y ER-60 son descritas originalmente en el retículo endoplasmático. Estas proteínas también se han localizado en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares incluyendo el espermatozoide, en el cual su actividad chaperona es importante en la capacitación y reacción acrosómica (Bohring y Krause, 2003; Nixon *et al.*, 2005). Otros autores describen diferentes moléculas chaperonas como Hsp-70 y miembros de la familia PDI (disulfuro isomerasa) en el oolema de ovocitos de ratón (Calvert *et al.*, 2003). En los últimos años, las proteínas chaperonas como Hsp-70 y ER-60 han sido relacionadas con la fecundación en mamíferos, especialmente regulando procesos claves en los que está implicado el espermatozoide (Nixon *et al.*, 2005). Igualmente se ha sugerido que en el ovocito, una proteína chaperona, calreticulina, se encuentra presente en los GCs de hámster (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001).

En particular **Hsp-70** (proteína de choque térmico de 70 kDa) se expresa en bajos niveles en muchos tipos celulares y su expresión está regulada en respuesta al estrés celular (Feder y Hofmann, 1999). Las proteínas Hsp-70 son funcional y estructuralmente las más prominentes y evolutivamente conservadas

de todas las proteínas de estrés (Lindquist y Craig, 1988). Sin embargo, algunos miembros de esta familia se expresan en condiciones normales. Una de las principales funciones de estas proteínas es su papel tipo chaperona durante el plegamiento y estabilización de proteínas de nueva síntesis (Gething y Sambrook, 1992). La familia de las proteínas Hsp-70 está formada por diferentes isoformas que incluyen las proteínas inducibles y una proteína que se expresa de forma constitutiva. La Hsp-70 constitutiva está ampliamente localizada en diferentes compartimentos intracelulares y participa en la translocación de proteínas de secreción (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Las Hsp-70 tienen un PM que oscila entre 68 y 74 kDa (Daugaard *et al.*, 2007) lo que coincide con el PM de la banda analizada por proteómica del lisado de ovocitos precipitado con PNA en nuestro trabajo, en la que se identificaron 5 péptidos diferentes con 100% de identidad a la secuencia de Hsp-70 proteína 1A (también llamada Hsp-70, Hsp-72, Hsp-70 1).

El papel de las proteínas de choque térmico está ampliamente descrito en relación con la protección del estrés celular apoyado por un aumento en la síntesis de estas proteínas en condiciones de estrés (Li y Werb, 1982) incluso en gametos. A pesar de que es posible que la Hsp-70 tenga un papel como protector del estrés en el espermatozoide durante la fecundación (Miller *et al.*, 1992), estudios recientes describen un importante papel de estas proteínas en la fecundación y desarrollo temprano de embriones de mamífero (Dix *et al.*, 1998; Neuer *et al.*, 1998, 1999). Además en ovocitos porcinos y de estrella de mar, Hsp-70 se expresa de forma independiente al estrés (Geraci *et al.*, 2003; Lánská *et al.*, 2006), indicando que su síntesis está asociada a la protección de proteínas de nueva síntesis durante el crecimiento ovocitario. Esta proteína, también se ha caracterizado mediante proteómica en ovocitos bovinos (Bhojwani *et al.*, 2006).

En fecundación, se han descrito en los últimos años otras posibles funciones y localizaciones celulares de las Hsp-70. En ovocitos de sapo Hsp-70 se localiza en la membrana de los GCs y participa regulando etapas de la exocitosis de éstos que no dependen del  $\text{Ca}^{2+}$  (Smith *et al.*, 2005). A pesar de que está ampliamente descrito que en mamíferos la exocitosis de los GCs está mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Abbott y Ducibella, 2001), en nuestro laboratorio hemos observado que la exocitosis de los GCs utilizando ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  es incompleta comparada

con lo que se observa en fecundación. Otros autores reportan un 35-75'7% de exocitosis en los GCs tras la utilizar ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang *et al.*, 1998b). Estos datos deja abierta la posibilidad de que en ovocitos porcinos existan etapas durante la reacción cortical que sean calcio independiente, de una forma análoga a lo que sucede en los ovocitos de sapo.

Por otro lado, se ha descrito en la especie bovina que la incubación de los espermatozoides y ovocitos con el anticuerpo anti-Hsp-70 disminuye significativamente la unión del espermatozoide a la ZP así como el número de cigotos con más de 2PN. Estas observaciones sugieren que esta familia de proteína tiene un importante papel en la interacción de gametos (Matwee *et al.*, 2001). No es de extrañar que las proteínas de la familia Hsp-70 tengan un papel clave en la fecundación dada su versatilidad en localización y función. Sin embargo, estas características también generan incertidumbre en el momento de relacionarlas con algún proceso específico, por lo que se requiere un amplio estudio para la asociación de estas proteínas con procesos específicos en la fecundación.

**ER-60** también conocida como P58, ER60, ERp57, ERp61, GRP57, GRP58, PI-PCL, HsT17083 y PDIA3 es un miembro de la familia de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) (Ellgaard y Ruddock, 2005), original del retículo endoplasmático y recientemente descrita en la membrana celular (Terada *et al.*, 1995; Turano *et al.*, 2002). Algunos miembros de la familia de las proteínas PDI se localizan en la membrana del espermatozoide tras la reacción acrosómica y se ha sugerido que ER-60 participa en la fusión de gametos (Ellerman *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Esta proteína también es secretada por diferentes tipos de células somáticas (Terada *et al.*, 1995). ER-60 es una proteína multifuncional con actividad proteolítica (Urade y Kito, 1992; Okudo *et al.*, 2000), oxidoreductasa (Lindquist *et al.*, 2001) y tiene dominios responsables de actividad transglutaminasa (Okudo *et al.*, 2002). ER-60 es necesaria para la eficiente formación de puentes disulfuro de las glicoproteínas en el retículo endoplasmático en conjunto con otras proteínas chaperonas como calreticulina y calnexina (Jessop *et al.*, 2007). Por otra parte, la proteína ER-60 localizada en la membrana plasmática de las células también presenta actividad oxidoreductasa, en este caso sobre moléculas que están en contacto con ER-60 o bien que están

presentes en la membrana plasmática (Mandel *et al.*, 1993). Se ha descrito que ER-60 interactúa exclusivamente con glicoproteínas (Oliver *et al.*, 1997).

El carácter oxidoreductasa es necesario para la formación de puentes disulfuro y por tanto la estabilidad de las glicoproteínas. El carácter transglutaminasa es necesario para el entrecruzamiento entre proteínas mediante la formación de enlaces polipeptídicos ("crosslinking"); su función como proteasa y el hecho de que sea secretada hacen de ER-60 una posible candidata para formar parte de las moléculas de los GCs o desempeñar un importante papel durante la fecundación. Existen evidencias de que el bloqueo de la polispermia involucra procesos como formación de puentes disulfuro en las glicoproteínas de la ZP en mamíferos (Iwamoto *et al.*, 1999) y en ovocitos de sapo se han descrito dos tipos de proteínas responsables de la formación de puentes disulfuro, una transglutaminasa-calcio dependiente y una peroxidasa (Wong y Wessel, 2006).

Está ampliamente descrito que los GCs liberan moléculas que tienen la capacidad de formar enlaces entre proteínas mediante puentes disulfuro (Wang *et al.*, 2003) y modifican la ZP previniendo de este modo la polispermia. La formación de puentes disulfuro puede ser responsable de cambios conformacionales en las diferentes glicoproteínas de la ZP (Nara *et al.*, 2006) y del oolema que pueden ser responsables de un cambio en su actividad biológica. Recientemente, se ha descrito que proteínas PDI extracelulares activan glicoproteínas de membrana plasmática mediante la formación de puentes disulfuro (Manukyan *et al.*, 2008).

En la actualidad la proteína ER-60 no ha sido descrita en ovocitos de la especie porcina, sin embargo recientemente se ha caracterizado mediante proteómica en ovocitos bovinos (Bhojwani *et al.*, 2006). La proteína ER-60 tiene un peso molecular de 56´93 kDa en células somáticas de la especie bovina (Kimura *et al.*, 2005). Este peso molecular se corresponde con la banda identificada de 57 kDa aproximadamente en nuestros resultados obtenidos utilizando un anticuerpo específico para esta proteína en el lisado de ovocitos porcinos maduros y precipitado con PNA, lo que indica que la proteína ER-60 está presente en los ovocitos de la especie porcina. En nuestro trabajo, mediante

proteómica se identificaron 6 péptidos con un 100% de identidad con la secuencia de la proteína en la especie bovina a partir de una banda de ~60 kDa del lisado de ovocitos porcinos maduros y precipitado con PNA. A pesar de que no está descrito que la estructura de ER-60 cuente con residuos  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc con afinidad a PNA, algunos autores han precipitado proteínas tipo chaperonas que tampoco presentan residuos afines con lectina WGA, proponiendo una interacción indirecta de la proteína con la lectina (Zhu *et al.*, 1997). Además, algunos miembros de la familia de las proteínas PDI son glicosilados como ocurre con la proteína PDIP que presenta glicosilación en el hombre, la oveja y la rata (Desilva *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito un nuevo miembro de la familia PDI (PDILT) en testículo de ratón que también está altamente glicosilado (van Lith *et al.*, 2005).

En nuestro trabajo hemos localizado ER-60 mediante inmunocitoquímica en la región cortical de ovocitos porcinos maduros permeabilizados. Sin embargo, en ovocitos maduros no permeabilizados no se observa la localización de estas proteínas. Estos resultados indican que ER-60 en ovocitos maduros no está localizada en el oolema, limitando su localización a la región cortical. Por otro lado, mediante colocalización entre GCs marcados con PNA y ER-60 indican unos índices de localización de 0'1 (índice de Pearson) y 0'23 (Manders). Estos índices se mueven en valores de 0 (ausencia de colocalización) a 1 (colocalización total). Esto indicaría que no existe una colocalización total entre GCs y ER-60. Sin embargo, no significa que la proteína no esté en los GCs, sino que el marcaje de ambas no coincide en el mismo pixel. Una posible forma de definir la localización exacta de esta proteína es mediante su análisis en ovocitos fecundados, esperando que tras la fecundación y la reacción cortical sea liberada al espacio perivitelino como se ha descrito en otras moléculas contenidas en los GCs (Wessel *et al.*, 2001). En nuestros resultados obtenidos tras el análisis de ovocitos porcinos fecundados *in vitro* permeabilizados y no permeabilizados observamos que el marcaje de los ovocitos con el anticuerpo específico para la proteína ER-60 continúa en ambos ovocitos. El hecho de que continúe presente en ovocitos fecundados permeabilizados y no permeabilizados puede asociarse a la interacción de ER-60 con proteínas del oolema tras su secreción de los GCs. Está descrito que ER-60 tras su secreción se une a la membrana celular mediante interacciones electrostáticas, o bien que tras ser secretada interactúa

con moléculas ancladas a la membrana plasmática en células somáticas (Terada *et al.*, 1995). También, se ha descrito que en el oolema existen receptores para las proteínas ER-60, ERp72 y P5 (miembros de la familia PDI) que están localizadas en la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del espermatozoide (Ellerman *et al.*, 2006) y que al bloquear estas proteínas en el espermatozoide reducen sustancialmente el grado de fusión del espermatozoide y el ovocito. Por otro lado, el uso de anti-ER-60 en espermatozoides para FIV inhibe la fusión espermatozoide-ovocito en ratón (Ellerman *et al.*, 2006). Con nuestros resultados podemos proponer que la proteína ER-60 es secretada por los GCs durante la fecundación y se une a su receptor en el oolema bloqueando de esta forma la unión de la proteína ER-60 localizada en el espermatozoide, o a otras proteínas del oolema. Este mecanismo sería una forma de disminuir la interacción y por tanto fusión de membranas entre gametos, una vez que se ha producido la fecundación. Evidentemente son necesarios futuros estudios para confirmar o descartar esta hipótesis.

Por otro lado, la primera proteína chaperona descrita como posible candidata para formar parte de las moléculas de los GCs es **calreticulina** (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). Esta proteína al igual que ER-60, es una proteína multifuncional que participa en el almacenamiento y regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para una gran variedad y diversidad de funciones celulares incluyendo la secreción (Ghosh y Greenberg, 1995; Gelebart *et al.*, 2005). Durante la fecundación en mamíferos, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas tras la interacción espermatozoide-ovocito estimulan la excitosis de los GCs y este proceso es clave para desencadenar una serie de eventos moleculares encaminados al bloqueo de la polispermia (Schultz y Kopf, 1995; Ducibella y Fissore, 2008). La proteína calreticulina tiene otras funciones como la regulación de la expresión de genes, la actividad chaperona tipo lectina que en asociación con ER-60 regula el plegamiento de glicoproteínas (Michalak *et al.*, 1998, 1999; Gelebart *et al.*, 2005) y recientemente se ha propuesto como mediadora de la adhesión celular (Johnson *et al.*, 2001). Esta proteína está localizada en diferentes compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático, núcleo y citoplasma), compartimentos extracelulares (suero) y membrana plasmática (Zhu *et al.*, 1997). En ovocitos de ratón y hámster maduros ha sido localizada en la región cortical mediante microscopía confocal y, tras la activación química

ovocitaria, en la superficie celular y en el espacio perivitelino (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001; Tutuncu *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, esta proteína no se ha descrito en ovocitos de la especie porcina. En nuestros resultados tras la precipitación con lectina PNA y análisis mediante Western blot con un anticuerpo específico para esta proteína se pueden observar dos bandas de 60 y 65 kDa aproximadamente correspondientes a dos isoformas de la proteína. Otros autores ya han descrito que en las células existen diferentes isoformas de calreticulina (Zhu *et al.*, 1997). A pesar de que no está reportado que calreticulina tenga residuos  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc específicos para PNA, Zhu *et al.* (1997) precipitaron dos isoformas de 75 y 62 kDa aproximadamente con la lectina WGA.

En nuestro estudio hemos demostrado que calreticulina está localizada en la región cortical de ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Estos mismos resultados se han observado en ovocitos de ratón y hámster (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001; Tutuncu *et al.*, 2004). Sin embargo, a diferencia de la proteína ER-60, cuando analizamos mediante microscopía confocal ovocitos fecundados *in vitro*, calreticulina desaparece de la zona cortical. Tomando en cuenta que diferentes tipos de células somáticas secretan calreticulina, estos resultados podrían explicarse asociando esta proteína con los GCs, como ya lo han descrito otros autores en hámster (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). Sin embargo, esta conclusión puede ser controvertida ya que recientemente se ha descrito que en ovocitos de ratón los GCs marcados con una lectina y calreticulina no muestran colocalización, indicando que la presencia de calreticulina en el espacio perivitelino tras la activación se relaciona con otras vesículas diferentes a los GCs (Tutuncu *et al.*, 2004). Ducibella *et al.* (1988b) describen la presencia de vesículas en la región cortical de ovocitos de ratón diferentes a los GCs. En ovocitos porcinos no existen referencias sobre estas vesículas y tampoco sobre su posible función durante la fecundación en ovocitos de mamíferos. En nuestros resultados la colocalización entre GCs marcados con PNA y calreticulina indican unos índices de localización de 0'61 (índice de Pearson) y 0'277 (Manders). Estos índices se mueven en valores de 0 (ausencia de colocalización) a 1 (colocalización total). Esto indicaría que no existe una colocalización total entre GCs y calreticulina. Sin embargo, no significa que la proteína no esté en los GCs,

sino que el marcaje de ambas no coincide en el mismo pixel. Está descrito en ovocitos de cerda (Cran, 1985) y ratón (Ducibella *et al.*, 1988a) que existen al menos dos subpoblaciones de GCs. Actualmente se tienen datos más concretos de la diferencia bioquímica de GCs en ovocitos de ratón, en los cuales existe una población de GCs que se marca con la lectina LCA y el anticuerpo ABL2 y otra únicamente con la lectina (Liu *et al.*, 2003), lo que indica que las dos poblaciones de GCs son bioquímicamente diferentes y que los resultados de colocalización pueden generar duda puesto que cabe la posibilidad de que los GCs que contengan moléculas afines a la lectina no contengan la proteína calreticulina. Esto podría explicar por qué los GCs y calreticulina no colocalizan (Tutuncu *et al.*, 2004). Como hemos mencionado anteriormente, en nuestro trabajo también observamos con lectinas PNA y WGA esta heterogeneidad entre GCs.

### **7.3. Estudio de la expresión y localización de las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos maduros porcinos y bovinos**

Al igual que la ZP, el oolema tiene un importante papel en el bloqueo de la polispermia, probablemente en una interacción directa con el contenido de los GCs o en un proceso de modificación de proteínas localizadas en éste. En el oolema de ovocitos en diferentes estadios de maduración han sido descritas más de 13 bandas polipeptídicas (Ji *et al.*, 1997). Sin embargo, la información sobre la función y caracterización de proteínas del oolema del ovocito es muy limitada y está relacionada con el proceso de fusión de membranas espermatozoide-ovocito (Coonrod *et al.*, 1999a,b; Alfieri *et al.*, 2003). Algunos autores indican que tras la exocitosis de los GCs el oolema no se ve modificado por las moléculas liberadas de estas organelas (Horvath *et al.*, 1993; Sengoku *et al.*, 1995), proponiendo así que el bloqueo de la polispermia a nivel de oolema está relacionado con otros mecanismos moleculares que no implican al contenido de los GCs.

Se sabe que un importante número de proteínas de membrana de diferentes células, incluyendo el espermatozoide (Thimon *et al.*, 2006), sufren un corte proteolítico que conduce a la liberación de su dominio extracelular. Este proceso es conocido como "shedding" (del inglés despojar o deshacer) y remodela la superficie de la célula. La mayoría, si no todos, los procesos de

“shedding” descritos están regulados por metaloproteasas dependientes de zinc, en particular ADAM-10 y ADAM-17 (Kheradmand y Werb, 2002; Sahin *et al.*, 2004; Huovila *et al.*, 2005). Otros miembros de esta familia se han descrito en la membrana del espermatozoide y tienen un papel fundamental durante la fusión de membranas (Evans, 2001; Primakoff y Myles, 2002), mientras que en el ovocito sólo se ha descrito la expresión del gen que codifica para la proteasa ADAM-10 en ratón (Evsikov *et al.*, 2006).

En nuestro trabajo se describe por primera vez la expresión de los genes que codifican para estas metaloproteasas y su localización utilizando los anticuerpos específicos para las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 en ovocitos madurados *in vitro* de las especies porcina y bovina, y por primera vez la expresión de la proteína ADAM-17 en ovocitos de mamífero. Como era de esperar, las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 están localizadas en el oolema del ovocito en ambas especies, como ya se ha descrito en la membrana de otros tipos celulares (Black y White, 1998; Edwards *et al.*, 2008). Al ser la primera vez que se describen estas metaloproteasas en el oolema del ovocito, se abre una línea de investigación muy interesante que requiere de futuros experimentos ya que estas metaloproteasas actúan sobre múltiples sustratos (Huovila *et al.*, 2005).

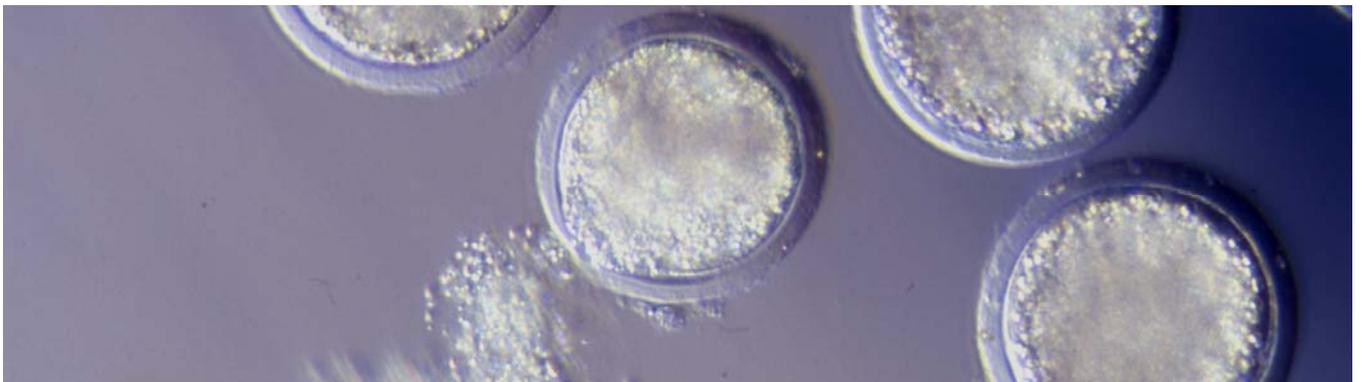
Está ampliamente descrito en células somáticas que las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 participan como “sheddasas” sobre diferentes sustratos entre los que se encuentran factores de crecimiento, proteínas de adhesión, citoquinas, receptores y proteasas (Huovila *et al.*, 2005). Estas moléculas, una vez cortadas por las metaloproteasas ADAM-10 y/o ADAM-17 regulan diferentes procesos biológicos como adhesión célula-célula, fusión y de forma directa o indirecta la traducción de señal a través del citoplasma de las células (Werb y Yan, 1998).

Algunos de los procesos biológicos que realizan las moléculas cortadas por las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 están relacionados con la reproducción. Un ejemplo es el TNF- $\alpha$ , citoquina que es cortada por ambas metaloproteasas siendo la más activa ADAM-17 (Black *et al.*, 2003). El TNF- $\alpha$  participa en importantísimos procesos reproductivos como la regulación de la

esteroidogénesis (Adashi *et al.*, 1989; Ghersevich *et al.*, 2001), la foliculogénesis (Marcinkiewicz *et al.*, 1994; Lanuza *et al.*, 2002), la ovulación (Brannstrom *et al.*, 1995) y la fecundación (Cianci *et al.*, 1996; Roby *et al.*, 1999). En numerosas especies, incluyendo la bovina, murina y humana, esta citoquina regula la apoptosis, la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa (Darbon *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1993; Sasson *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha descrito que citoquinas como el TNF- $\alpha$  y IL6 reducen la motilidad espermática y la reacción acrosómica de los espermatozoides humanos (Lampiao y Plessis, 2008a,b,c).

En la actualidad la descripción del genoma de diferentes especies ha facilitado mucho el estudio de proteínas y de los genes que las codifican, desafortunadamente el genoma del cerdo aún no está descrito, lo que complica el estudio de proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos en esta especie. Sin embargo, en este trabajo se ha logrado aportar nuevos datos acerca de diferentes proteínas que podrían desempeñar un papel biológico relevante durante el proceso de la fecundación.

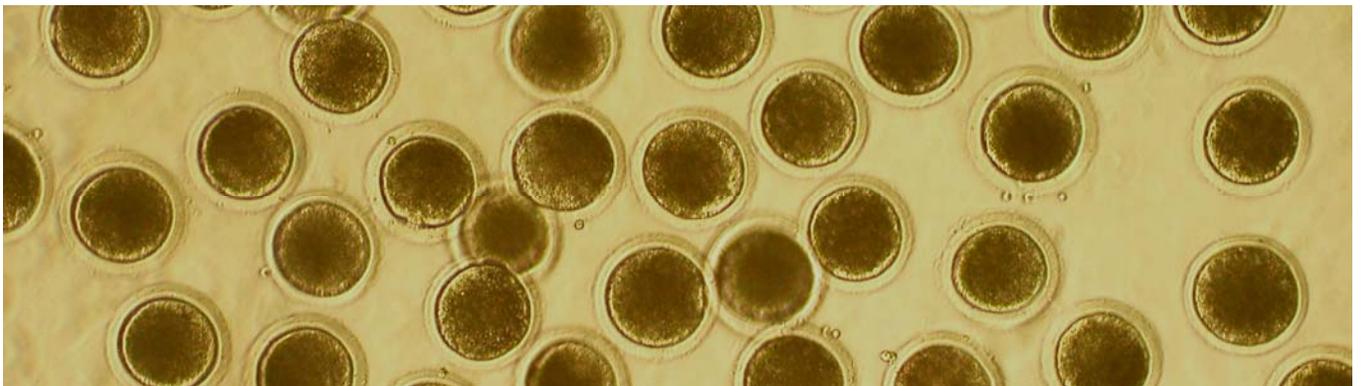
## 8. Conclusiones



## 8. CONCLUSIONES

1. El exudado obtenido de la interacción de gametos porcinos y bovinos aumenta la monospermia y disminuye la penetrabilidad y la unión del espermatozoide a la ZP en la especie porcina.
2. El exudado obtenido de la interacción de gametos bovinos es más eficiente que el porcino en la reducción de la interacción espermatozoide-ovocito en la especie porcina.
3. El exudado obtenido de la interacción de gametos porcinos y bovinos no provoca endurecimiento de la ZP de ovocitos porcinos.
4. Las proteasas tripsina-4 y tripsina V-A podrían estar presentes en los GCs porcinos.
5. Los GCs de los ovocitos porcinos presentan un contenido heterogéneo de los azúcares Gal $\beta$ 1-3GalNAc y N-acetilglucosamina.
6. Los GCs porcinos contienen, al menos, 5 glicoproteínas de 120, 100, 80, 65 y 55 kDa aproximadamente.
7. El lisado de ovocitos porcinos precipitado con WGA contiene glicoproteínas de 180, 15 kDa y una banda continua de 85 a 50 kDa aproximadamente que podrían corresponderse con proteínas de los GCs y la ZP.
8. Las proteínas ER-60 y calreticulina están presentes en los GCs de ovocitos porcinos.
9. Las metaloproteasas ADAM-10 y ADAM-17 se expresan en ovocitos porcinos y bovinos, y se localizan en el oolema.

# 9. Abreviaturas



## 9. ABREVIATURAS

- ADAM:** desintegrina y metaloproteasa
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ácido desoxirribonucleótido complementario
- ADP:** adenosín difosfato
- ATP:** adenosín trifosfato
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ARN:** ácido ribonucleico
- BMP15:** proteína morfogénica ósea 15
- BSA:** albúmina sérica bovina
- COCs:** complejos cumulus-ovocito
- CP:** corpúsculo polar
- CPGs:** células primordiales germinales
- dNTPs:** desoxinucleótidos-trifosfato
- EPV:** espacio perivitelino
- E/O:** número medio de espermatozoides por ovocito penetrado
- PFF:** fluido folicular porcino
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- FIV:** fecundación *in vitro*
- FSH:** hormona folículo estimulante
- GCs:** gránulos corticales
- GDF9:** factor de crecimiento y diferenciación 9.
- GTP:** guanosil difosfato
- VG:** vesícula germinal
- hCG:** gonadotropina coriónica humana
- HRP:** peroxidasa de rábano picante
- LCA:** *Lens culinaris* agglutinin
- LH:** hormona luteinizante
- kDa:** kilodalton
- mA:** miliamperios
- MI:** estadio nuclear de metafase I
- MII:** estadio nuclear de metafase II
- MIV:** maduración *in vitro*
- MPF:** factor promotor de la maduración o metafase

**NCSU-37**: medio North Carolina State University-37  
**uPA**: activador de plasminógeno tipo uroquinasa  
**PAGE**: electroforesis en gel de poliacrilamida  
**PBS**: tampón fosfato salino  
**PM**: peso molecular  
**PNA**: *Arachis hypogaea* agglutinin  
**PNM**: pronúcleo masculino  
**p/v**: peso/volumen  
**PVA**: alcohol de polivinilo  
**RA**: reacción acrosómica  
**REL**: retículo endoplasmático liso  
**RER**: retículo endoplasmático rugoso  
**SDS**: dodecilsulfato de sodio  
**TCM199**: medio de cultivo 199 (Tissue Culture Medium-199)  
**T<sub>m</sub>**: temperatura de "melting" o de hibridación  
**tPA**: activador de plasminógeno tipo tisular  
**TRICT**: isotiocianato de tetrametil rodamina  
**V**: voltios  
**VG**: vesícula germinal  
**v/v**: volumen/volumen  
**WGA**: wheat germen agglutinin  
**ZP**: zona pelúcida

# 10. Bibliografía



---

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott AL, Fissore RA y Ducibella T** 1999 Incompetence of preovulatory mouse oocytes to undergo cortical granule exocytosis following induced calcium oscillations. *Developmental biology* **207** 38-48.
- Abbott AL y Ducibella T** 2001 Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **6** D792-806.
- Abeydeera LR y Day BN** 1997 In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* **48** 537-544.
- Abeydeera LR** 2002 In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* **57** 256-273.
- Abou-Haila A y Tulsiani DR** 2000 Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379** 173-182.
- Adashi EY, Resnick CE, Croft CS y Payne DW** 1989 Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property. *The Journal of biological chemistry* **264** 11591-11597.
- Adams EC y Hertiga AT** 1964 Studies on Guinea Pig Oocytes. I. Electron Microscopic Observations on the Development of Cytoplasmic Organelles in Oocytes of Primordial and Primary Follicles. *The Journal of cell biology* **21** 397-427.
- Adham IM, Nayernia K y Engel W** 1997 Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molecular reproduction and development* **46** 370-376.
- Ahuja KK** 1985 Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *The American Journal of Anatomy* **174** 207-223.
- Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG y Primakoff P** 2003 Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *Journal of cell science* **116** 2149-2155.
- Alliegro MC, Black SD y McClay DR** 1992 Deployment of extracellular matrix proteins in sea urchin embryogenesis. *Microscopy research and technique* **22** 2-10.
- Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG y White JM** 1995 Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* **81** 1095-1104.
- Almeida FF, Leal MC y Franca LR** 2006 Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of reproduction* **75** 792-799.
- Anderson E** 1968 Oocyte differentiation in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. *The Journal of cell biology* **37** 514-539.
- Arienti G, Carlini E y Palmerini CA** 1997 Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *The Journal of membrane biology* **155** 89-94.
- Arienti G, Carlini E, Saccardi C y Palmerini CA** 2004 Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **8** 77-84.

- Austin CR** 1956 Cortical granules in hamster eggs. *Experimental cell research* **10** 533-540.
- Austin CR** 1961 In *The Mammalian Egg* Blackwell **1** 90-120
- Austin CR** 1975 Membrane fusion events in fertilization. *Journal of reproduction and fertility* **44** 155-166.
- Aviles M, Jaber L, Castells MT, Kan FK y Ballesta J** 1996 Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. *Molecular reproduction and development* **44** 370-381.
- Asano A y Niwa K** 2004 Activation and penetration in vitro of pig oocytes treated with calcium ionophore. *The Journal of reproduction and development* **50** 77-85.
- Aviles M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J y Kan FW** 1997 Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biology of reproduction* **57** 1155-1163.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL y Dean J** 2007 Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134** 933-943.
- Barros C y Yanagimachi R** 1971 Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* **233** 268-269.
- Barros C, Capote C, Perez C, Crosby JA, Becker MI y De Ioannes A** 1992 Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biological research* **25** 31-40.
- Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J y Wylie C** 1998 The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in cell and developmental biology* **9** 393-400.
- Benoff S** 1997 Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular human reproduction* **3** 599-637.
- Bhojwani M, Rudolph E, Kanitz W, Zuehlke H, Schneider F y Tomek W** 2006 Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning and stem cells* **8** 259-274.
- Bicsak TA, Cajander SB, Peng XR, Ny T, LaPolt PS, Lu JK, Kristensen P, Tsafiriri A y Hsueh AJ** 1989 Tissue-type plasminogen activator in rat oocytes: expression during the periovulatory period, after fertilization, and during follicular atresia. *Endocrinology* **124** 187-194.
- Bielanska-Osuchowska Z** 1974 Histochemical studies on development of the ovary in embryos of the domestic pig. *Folia morphologica* **33** 413-425.
- Bielanska-Osuchowska Z** 2006 Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology* **6** 161-193.
- Binor Z, Sokoloski JE y Wolf DP** 1982 Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *The Journal of experimental zoology* **222** 187-193.

- Birck A, Labouriau R y Christensen P** 2008 Dynamics of the induced acrosome reaction in boar sperm evaluated by flow cytometry. *Animal Reproduction Science* **3725** 1-13.
- Black JL y Erickson BH** 1968 Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record* **161** 45-55.
- Black RA y White JM** 1998 ADAMs: focus on the protease domain. *Current opinion in cell biology* **10** 654-659.
- Black RA, Doedens JR, Mahimkar R, Johnson R, Guo L, Wallace A, Virca D, Eisenman J, Slack J, Castner B, Sunnarborg SW, Lee DC, Cowling R, Jin G, Charrier K, Peschon JJ y Paxton R** 2003 Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochemical Society symposium* (**70**) 39-52.
- Bleil JD y Wassarman PM** 1980a Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental biology* **76** 185-202.
- Bleil JD y Wassarman PM** 1980b Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20** 873-882.
- Bleil JD, Beall CF y Wassarman PM** 1981 Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental biology* **86** 189-197.
- Bleil JD y Wassarman PM** 1983 Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental biology* **95** 317-324.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P y White JM** 1992 A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356** 248-252.
- Bohring C y Krause W** 2003 Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *American journal of reproductive immunology* **50** 411-419.
- Bolamba D y Sirard MA** 2000 Ovulation and follicular growth in gonadotropin-treated gilts followed by in vitro fertilization and development of their oocytes. *Theriogenology* **53** 1421-1437.
- Brannstrom M, Bonello N, Wang LJ y Norman RJ** 1995 Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary. *Reproduction, fertility, and development* **7** 67-73.
- Broermann DM, Xie S, Nephew KP y Pope WF** 1989 Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *Journal of animal science* **67** 1324-1329.
- Brown CR y Cheng WK** 1986 Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* **92** 183-191.

- Buccione R, Schroeder AC y Eppig JJ** 1990 Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of reproduction* **43** 543-547.
- Buffone MG, Foster JA y Gerton GL** 2008 The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International journal of developmental biology* **52** 511-522.
- Buhi WC, O'Brien B, Alvarez IM, Erdos G y Dubois D** 1993 Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biology of reproduction* **48** 1274-1283.
- Buhi WC** 2002 Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* **123** 355-362.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M y Upadhyaya NB** 2004 Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive biology and endocrinology* **2** 20.
- Calvert ME, Digilio LC, Herr JC y Coonrod SA** 2003 Oolemmal proteomics--identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. *Reproductive biology and endocrinology* **1** 1-27.
- Cameo MS y Blaquier JA** 1976 Yrogen-controlled specific proteins in rat epididymis. *The Journal of endocrinology* **69** 47-55.
- Canipari R y Strickly S** 1985 Plasminogen activator in the rat ovary. Production and gonadotropin regulation of the enzyme in granulosa and thecal cells. *The Journal of biological chemistry* **260** 5121-5125.
- Canipari R** 1994 Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* **2** 343-345.
- Canovas S, Romar R, Grullon LA, Aviles M y Coy P** 2009 Pre-fertilization zona pellucida hardening by different cross-linkers affects in vitro fertilization in pigs and cattle and improves embryo production in pigs. *Reproduction (Cambridge, England)* **8** 803-812
- Carroll EJ,Jr** 1976 Cortical granule proteases from sea urchin eggs. *Methods in enzymology* **45** 343-353.
- Chen HL, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS y Terranova PF** 1993 Tumor necrosis factor-alpha gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biology of reproduction* **48** 707-714.
- Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC y White JM** 1999 Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 11830-11835.
- Cherr GN, Drobnis EZ y Katz DF** 1988 Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *The Journal of experimental zoology* **246** 81-93.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P y Myles DG** 1998 Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* **281** 1857-1859.

- Cianci A, Calogero AE, Palumbo MA, Burrello N, Ciotta L, Palumbo G y Bernardini R** 1996 Relationship between tumour necrosis factor alpha and sex steroid concentrations in the follicular fluid of women with immunological infertility. *Human reproduction* **11** 265-268.
- Citkowitz E** 1971 The hyaline layer: its isolation and role in echinoderm development. *Developmental biology* **24** 348-362.
- Clark EN, Corron ME y Florman HM** 1993 Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *The Journal of biological chemistry* **268** 5309-5316.
- Clark GF y Dell A** 2006 Molecular models for murine sperm-egg binding. *The Journal of biological chemistry* **281** 13853-13856.
- Courot M, Hochereau MT, Ortavant R** 1970 Spermatogenesis. In: AD Johnson, WR Gomes, NL Vandemark (eds.). *The Testis* New York: Academic 339-432.
- Cohen DJ, Ellerman DA y Cuasnicu PS** 2000 Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biology of reproduction* **63** 462-468.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C y Tsafiriri A** 2002 Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology* **187** 153-159.
- Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J y Herr J** 1999a PI-PLC releases a 25-40 kDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay. *Molecular human reproduction* **5** 1027-1033.
- Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J, Shibahara H, Chen M, White JM y Herr JC** 1999b Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. *Developmental Biology* **207** 334-349.
- Cooper TG** 1995 Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **377** 87-101.
- Cooper TG** 1998 Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **53** 119-136.
- Coppolino MG y Dedhar S** 1998 Calreticulin. *The international journal of biochemistry and cell biology* **30** 553-558.
- Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J y Matás C** 1993 Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology* **40** 539-546.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C y Garcia E** 2002 Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* **124** 279-288.
- Coy P y Romar R** 2002 In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, fertility, and development* **14** 275-286.
- Coy P, Romar R, Payton RR, McCann L, Saxton AM y Edwards JL** 2005 Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on

maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* **129** 19-26.

**Coy P, Canovas S, Mondejar I, Saavedra MD, Romar R, Gullon L, Matás C y Aviles M** 2008a Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** 15809-15814.

**Coy P, Gullon L, Canovas S, Romar R, Matás C y Aviles M** 2008b Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* **135** 19-27.

**Cran DG** 1985 Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of reproduction and fertility* **74** 237-245.

**Cran DG. y Cheng WTK** 1986 The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete research* **13** 241-251.

**Cross NL** 1996 Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of reproduction* **54** 138-145.

**Cross NL** 2003 Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of reproduction* **69** 529-534.

**Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza AD, Cameo MS y Blaquier JA** 1984 Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *Journal of reproduction and fertility* **72** 467-471.

**Dandekar P y Talbot P** 1992 Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Molecular reproduction and development* **31** 135-143.

**Darbon JM, Oury F, Laredo J y Bayard F** 1989 Tumor necrosis factor-alpha inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in cultured rat granulosa cells. *Biochemical and biophysical research communications* **163** 1038-1046.

**Daugaard M, Rohde M y Jaattela M** 2007 The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters* **581** 3702-3710.

**Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R y Holstein AF** 1993 The Leydig cell of the human testis--a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell and tissue research* **271** 429-439.

**Davis BK** 1981 Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78** 7560-7564.

**De Jonge C** 2005 Biological basis for human capacitation. *Human reproduction update* **11** 205-214.

**De los Reyes M y Barros C** 2000 Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Animal Reproduction Science* **58** 215-228.

- Dean J** 2004 Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26** 29-38.
- Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G y Montreuil J** 1981 Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European journal of biochemistry / FEBS* **117** 41-55.
- Deits T, Farrance M, Kay ES, Medill L, Turner EE, Weidman PJ y Shapiro BM** 1984 Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of the sea urchin egg. *The Journal of biological chemistry* **259** 13525-13533.
- Dekel N** 1996 Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of reproduction* **1** 82-88.
- Demott RP y Suarez SS** 1992 Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of reproduction* **46** 779-785.
- Dennis JW, Granovsky M y Warren CE** 1999 Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **21** 412-421.
- Desilva MG, Notkins AL y Lan MS** 1997 Molecular characterization of a pancreas-specific protein disulfide isomerase, PDip. *DNA and cell biology* **16** 269-274.
- Desnoyers L, Therien I y Manjunath P** 1994 Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular reproduction and development* **37** 425-435.
- Ding J, Moor RM y Foxcroft GR** 1992 Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. *Molecular reproduction and development* **33** 59-66.
- Ding J y Foxcroft GR** 1994 Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Molecular reproduction and development* **39** 30-40.
- Dix DJ, Garges JB y Hong RL** 1998 Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. *Molecular reproduction and development* **51** 373-380.
- Djakiew D y Jones RC** 1983 Sperm maturation, fluid transport, and secretion and absorption of protein in the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. *Journal of reproduction and fertility* **68** 445-456.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N y Matzuk MM** 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383** 531-535.
- Downing Meisner A, Klaus AV y O'Leary MA** 2005 Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology* **263** 179-202.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ y Matzuk MM** 1998 The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular endocrinology* **12** 1809-1817.

- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J y Rangarajan S** 1988a Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental biology* **130** 184-197.
- Ducibella T, Rangarajan S y Anderson E** 1988b The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Developmental biology* **130** 789-792.
- Ducibella T, Kurasaawa S, Rangarajan S, Kopf GS y Schultz RM** 1990 Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Developmental biology* **137** 46-55.
- Ducibella T y Buetow J** 1994 Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Developmental biology* **165** 95-104.
- Ducibella T, Duffy P y Buetow J** 1994 Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biology of reproduction* **50** 467-473.
- Ducibella T** 1996 The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human reproduction update* **2** 29-42.
- Ducibella T y Fissore R** 2008 The roles of Ca<sup>2+</sup>, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Developmental biology* **315** 257-279.
- Ehrenwald E, Parks JE y Foote RH** 1988 Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete research* **20** 145-157.
- Edwards DR, Handsley MM y Pennington CJ** 2008 The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* **29** 258-289.
- Ellerman DA, Myles DG y Primakoff P** 2006 A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Developmental cell* **10** 831-837.
- Ellgaard L y Ruddock LW** 2005 The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO reports* **6** 28-32.
- El-Mestrah M, Castle PE, Borossa G y Kan FW** 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. *Biology of reproduction* **66** 866-876.
- Epel D, Weaver AM, Muchmore AV y Schimke RT** 1969 Beta-1,3-glucanase of sea urchin eggs: release from particles at fertilization. *Science* **163** 294-296.
- Epifano O, Liang LF, Familari M, Moos MC, Jr y Dean J** 1995 Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* **121** 1947-1956.
- Eppig JJ** 1979 Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *The Journal of experimental zoology* **208** 111-120.
- Eppig JJ y O'Brien MJ** 1996 Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of reproduction* **54** 197-207.

- Eto K, Huet C, Tarui T, Kupriyanov S, Liu HZ, Puzon-McLaughlin W, Zhang XP, Sheppard D, Engvall E y Takada Y** 2002 Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *The Journal of biological chemistry* **277** 17804-17810.
- Evans JP y Kopf GS** 1998 Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* **30** 297-307.
- Evans JP** 2001 Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **23** 628-639.
- Evans JP** 2002 The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human reproduction update* **8** 297-311.
- Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE, Singh P, Eppig JJ, Solter D y Knowles BB** 2006 Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes and development* **20** 2713-2727.
- Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C y Motta PM** 1992 Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbonylhydrazide. *Molecular reproduction and development* **32** 51-61.
- Feder ME y Hofmann GE** 1999 Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61** 243-282.
- Feki NC, Therond P, Couturier M, Limea G, Legrand A, Jouannet P y Auger J** 2004 Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Molecular human reproduction* **10** 137-142.
- Florman HM, Bechtol KB y Wassarman PM** 1984 Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Developmental biology* **106** 243-255.
- Florman HM y Wassarman PM** 1985 O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* **41** 313-324.
- Foerder CA y Shapiro BM** 1977 Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 4214-4218.
- Fortune JE** 2003 The early stages of follicular development: activation of primordial follicles growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **78** 135-163.
- Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL y Day BN** 1993 Effects of electrical stimulation before or after in vitro fertilization on sperm penetration and pronuclear formation of pig oocytes. *Molecular reproduction and development* **36** 361-367.
- Funahashi H y Day BN** 1997 Advances in in vitro production of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **52** 271-283.
- Gadea J y Matás C** 2000 Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* **54** 1343-1357.

- Ganguly A, Sharma RK y Gupta SK** 2008 Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. *Molecular reproduction and development* **75** 156-166.
- Gardner AJ y Evans JP** 2006 Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reproduction, fertility, and development* **18** 53-61.
- Geisert, RD** 1999 Pigs In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA **3**: 792-799.
- Gelebart P, Opas M y Michalak M** 2005 Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *The international journal of biochemistry and cell biology* **37** 260-266.
- Geraci F, Agueli C, Giudice G y Sconzo G** 2003 Localization of HSP70, Cdc2, and cyclin B in sea urchin oocytes in non-stressed conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **310** 748-753.
- Gething MJ y Sambrook J** 1992 Protein folding in the cell. *Nature* **355** 33-45.
- Ghersevich S, Isomaa V y Vihko P** 2001 Cytokine regulation of the expression of estrogenic biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology* **172** 21-30.
- Ghosh A y Greenberg ME** 1995 Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science (New York, N.Y.)* **268** 239-247.
- Gilula NB, Epstein ML y Beers WH** 1978 Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *The Journal of cell biology* **78** 58-75.
- Gordon M, Fraser LR y Dandekar PV** 1975 The effect of ruthenium red and Concanavalin A on the vitelline surface of fertilized and unfertilized rabbit ova. *The Anatomical Record* **181** 95-111.
- Gosden RG y Telfer EE** 1987 Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology London* **211** 169-175.
- Govind CK, Gahlay GK, Choudhury S y Gupta SK** 2001 Purified and refolded recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli* binds to spermatozoa. *Biology of reproduction* **64** 1147-1152.
- Gray J, Justice R, Nagel GM y Carroll EJ, Jr** 1986 Resolution and characterization of a major protein of the sea urchin hyaline layer. *The Journal of biological chemistry* **261** 9282-9288.
- Green CE y Watson PF** 2001 Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* **122** 889-898.
- Green DP** 1997 Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of reproduction* **2** 147-156.
- Grey RD, Wolf DP y Hedrick JL** 1974 Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **36** 44-61.

- Gross VS, Wessel G, Florman HM y Ducibella T** 2000 A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. *Biology of reproduction* **63** 575-581.
- Gullón L, Saavedra MD, Matás C y Coy P** 2008a Effect of plasminogen on ZP resistance to proteolysis and IVF results in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* **43** (4) 63.
- Gullón L, Saavedra MD, Waldschmitt N y P Coy** 2008b Effect of plasminogen on zona pellucida resistance to proteolysis and in vitro fertilization results in pig *Reproduction in Domestic Animals* **43** (5) 80.
- Gulyas BJ y Schmel ED** 1980 Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. I. Electron microscopic localization. *Gamete research* **3** 267-277.
- Guraya SS** 1982 Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *International review of cytology* **78** 257-360.
- Gwatkin RB, Williams DT, Hartmann JF y Kniazuk M** 1973 The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *Journal of reproduction and fertility* **32** 259-265.
- Gwatkin RBL** 1977 Fertilization Mechanism in Man and Mammals. Plenum Press, NY. Hardy, D.M. (Ed.), 2002. Fertilization. Academic Press, San Diego, pp 161.
- Hall HG** 1978 Hardening of the sea urchin fertilization envelope by peroxidase-catalyzed phenolic coupling of tyrosines. *Cell* **15** 343-355.
- Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN y Prather RS** 1999 Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biology of reproduction* **61** 1340-1346.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J y Prather RS** 2006 Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of reproduction* **75** 726-733.
- Harrison RA, Mairet B y Miller NG** 1993 Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in boar sperm populations. *Molecular reproduction and development* **35** 197-208.
- Hartl FU y Hayer-Hartl M** 2002 Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295** 1852-1858.
- Hatanaka Y, Nagai T, Tobita T y Nakano M** 1992 Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. *Journal of reproduction and fertility* **95** 431-440.
- Hess RA** 1999 Spermatogenesis, Overview. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA **4**: 539-545.
- He ZY, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg JA, Primakoff P y Myles DG** 2003 None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental biology* **254** 226-237.
- Hedrick JL y Wardrip NJ** 1986 Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry* **157** 63-70.

- Hedrick JL y Wardrip NJ** 1987 On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental biology* **121** 478-488.
- Heinecke JW y Shapiro BM** 1990 Superoxide peroxidase activity of ovoperoxidase, the cross-linking enzyme of fertilization. *The Journal of biological chemistry* **265** 9241-9246.
- Hemler ME** 2003 Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19** 397-422.
- Hemler ME** 2005 Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews.Molecular cell biology* **6** 801-811.
- Herrero MB, Mandal A, Digilio LC, Coonrod SA, Maier B y Herr JC** 2005 Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Developmental biology* **284** 126-142.
- Holstein AF, Schulze W y Davidoff M** 2003 Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology: RBandE* **1** 1-107.
- Hoodbhoy T y Talbot P** 1994 Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Molecular reproduction and development* **39** 439-448.
- Hoodbhoy T, Carroll EJ,Jr y Talbot P** 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. *Biology of reproduction* **62** 979-987.
- Hoodbhoy T, Dandekar P, Calarco P y Talbot P** 2001 P62/p56 are Cortical Granule Proteins that Contribute to Formation of the Cortical Granule Envelope and Play a Role in Mammalian Preimplantation Development. *Molecular reproduction and development* **59** 78-89.
- Hoodbhoy T y Talbot P** 2001 Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Molecular reproduction and development* **58** 223-235.
- Hoodbhoy T y Dean J** 2004 Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* **127** 417-422.
- Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P y Dean J** 2005 Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *The Journal of biological chemistry* **280** 12721-12731.
- Horvath PM, Kellom T, Caulfield J y Boldt J** 1993 Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Molecular reproduction and development* **34** 65-72.
- Hosoe M y Shioya Y** 1997 Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote* **5** 371-376.
- Hunter RH** 1967 Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *The Veterinary record* **81** 21-23.
- Hunter RH** 1973 Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *The Journal of experimental zoology* **183** 57-63.
- Hunter RH, Cook B y Baker TG** 1976 Dissociation of response to injected gonadotropin between the Graafian follicle and oocyte in pigs. *Nature* **260** 156-158.

- Hunter RH** 1976 Sperm-egg interactions in the pig: monospermy, extensive polyspermy, and the formation of chromatin aggregates. *Journal of anatomy* **122** 43-59.
- Hunter RH y Nichol R** 1988 Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete research* **21** 255-266.
- Hunter RH** 1990 Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **40** 211-226.
- Hunter RH** 1991 Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular reproduction and development* **29** 385-391.
- Hunter RH** 1993 Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Molecular reproduction and development* **35** 324-327.
- Hunter MG** 2000 Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction* **5** 122-130.
- Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I y Ortiz RM** 2005 Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in biochemical sciences* **30** 413-422.
- Hyttel P, Greve T y Callesen H** 1989 Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **38** 35-47.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A y Okabe M** 2005 The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434** 234-238.
- Iwamoto K, Ikeda K, Yonezawa N, Noguchi S, Kudo K, Hamano S, Kuwayama M y Nakano M** 1999 Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida. *Journal of reproduction and fertility* **117** 395-402.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A y Nakahara T** 1989 Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Gamete research* **22** 83-91.
- Iwasaki S y Nakahara T** 1990 Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenology* **34** 683-690.
- Izquierdo-Rico MJ, Jimenez-Movilla M, Llop E, Perez-Oliva AB, Ballesta J, Gutierrez-Gallego R, Jimenez-Cervantes C y Aviles M** 2009 Hamster Zona Pellucida Is Formed by Four Glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of proteome research* **8** 926-941
- Jaffe LA y Cross NL** 1986 Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annual Review of Physiology* **48** 191-200.
- Jamnongjit M y Hammes SR** 2005 Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Seminars in reproductive medicine* **23** 234-241.
- Jessop CE, Chakravarthi S, Garbi N, Hammerling GJ, Lovell S y Bulleid NJ** 2007 ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *The EMBO journal* **26** 28-40.

- Ji YZ, Bomsel M, Jouannet P y Wolf JP** 1997 Modifications of the human oocyte plasma membrane protein pattern during preovulatory maturation. *Molecular reproduction and development* **47** 120-126.
- Jimenez-Movilla M, Aviles M, Gomez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, Castells MT, de Juan J, Romeu A y Ballesta J** 2004 Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Human reproduction* **19** 1842-1855.
- Johnson S, Michalak M, Opas M y Eggleton P** 2001 The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends in cell biology* **11** 122-129.
- Jonakova V, Manaskova P y Ticha M** 2007 Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *Journal of chromatography.B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **849** 307-314.
- Jones RC, Dacheux JL, Nixon B y Ecroyd HW** 2007 Role of the epididymis in sperm competition. *Asian Journal of Andrology* **9** 493-499.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E y Wassarman PM** 2002 The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature cell biology* **4** 457-461.
- Kaji K y Kudo A** 2004 The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* **127** 423-429.
- Katsumata T, Noguchi S, Yonezawa N, Tanokura M y Nakano M** 1996 Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *European journal of biochemistry/FEBS* **240** 448-453.
- Kawarsky SJ, Basrur PK, Stubbings RB, Hansen PJ y King WA** 1996 Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of reproduction* **54** 53-59.
- Keefe D, Tran P, Pellegrini C y Oldenbourg R** 1997 Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Human reproduction* **12** 1250-1252.
- Kelly SJ** 1977 Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *The Journal of experimental zoology* **200** 365-376.
- Kezele P, Nilsson E y Skinner MK** 2002 Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7** 1990-1996.
- Kikuchi K, Naito K, Daen FP, Izaike Y y Toyoda Y** 1995 Histone H1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **43** 523-532.
- Kim NH y Menino AR,Jr** 1995 Effects of stimulators of protein kinases A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocyte-cumulus cell complexes during in vitro maturation. *Molecular reproduction and development* **40** 364-370.

- Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Prather RS y Day BN** 1996 Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *Journal of reproduction and fertility* **107** 79-86.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S y Baba T** 2005 Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 18028-18033.
- Kimura T, Imaishi K, Hagiwara Y, Horibe T, Hayano T, Takahashi N, Urade R, Kato K y Kikuchi M** 2005 ERp57 binds competitively to protein disulfide isomerase and calreticulin. *Biochemical and biophysical research communications* **331** 224-230.
- Kjaer I, Keeling JW, Smith NM y Hansen BF** 1997 Pattern of malformations in the axial skeleton in human triploid fetuses. *American Journal of Medical Genetics* **72** 216-221.
- Kheradmand F y Werb Z** 2002 Shedding light on sheddases: role in growth and development. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24** 8-12.
- Kohane AC, Pineiro L y Blaquier JA** 1983 Androgen-controlled synthesis of specific proteins in the rat epididymis. *Endocrinology* **112** 1590-1596.
- Kolbe T y Holtz W** 2005 Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* **63** 1695-1705.
- Kolle S, Sinowatz F, Boie G y Palma G** 1998 Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Molecular reproduction and development* **49** 435-443.
- Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Laidlaw M y Wessel GM** 1994 Cortical granule biogenesis is active throughout oogenesis in sea urchins. *Development* **120** 1325-1333.
- Lampiao F y du Plessis SS** 2008a Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 on progesterone and calcium ionophore-induced acrosome reaction. *International journal of andrology* **32** 247-272.
- Lampiao F, Krom D y du Plessis SS** 2008b The in vitro effects of *Mondia whitei* on human sperm motility parameters. *Phytotherapy Research: PTR* **22** 1272-1273.
- Lampiao F y du Plessis SS** 2008c TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reproductive biomedicine online* **17** 628-631.
- Lánská V, Chmelikova E, Sedmikova M, Petr J, Rajmon R, Jeseta M y Rozinek J** 2006 Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. *Animal Reproduction Science* **96** 154-164.
- Lanuza GM, Saragueta PE, Bussmann UA y Baranao JL** 2002 Paradoxical effects of tumour necrosis factor-alpha on rat granulosa cell DNA synthesis. *Reproduction, fertility, and development* **14** 133-139.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M y Boucheix C** 2000 Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287** 319-321.

- Lee SH, Ahuja KK, Gilbert DJ y Whittingham DG** 1988 The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. *Development* **102** 595-604.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC y Barratt CL** 2004 Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human reproduction* **19** 1580-1586.
- Li GC y Werb Z** 1982 Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79** 3218-3222.
- Li YH, Hou Y, Ma W, Yuan JX, Zhang D, Sun QY y Wang WH** 2004 Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm-egg interaction. *Reproduction* **127** 151-157.
- Li HK, Kuo TY, Yang HS, Chen LR, Li SS y Huang HW** 2008 Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal Reproduction Science* **103** 312-322.
- Lindquist S y Craig EA** 1988 The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22** 631-677.
- Lindquist JA, Hammerling GJ y Trowsdale J** 2001 ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15** 1448-1450.
- Liu C, Litscher ES, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch RA, Stewart CL y Wassarman PM** 1996 Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** 5431-5436.
- Liu M, Sims D, Calarco P y Talbot P** 2003 Biochemical heterogeneity, migration, and pre-fertilization release of mouse oocyte cortical granules. *Reproductive biology and endocrinology: RBandE* **1** 1-77.
- Liu M, Oh A, Calarco P, Yamada M, Coonrod SA y Talbot P** 2005 Peptidylarginine deiminase (PAD) is a mouse cortical granule protein that plays a role in preimplantation embryonic development. *Reproductive biology and endocrinology: RBandE* **3** 1-42.
- Lloyd RE, Romar R, Matás C, Gutierrez-Adan A, Holt WV y Coy P** 2009 Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* **137** 679-687.
- Longo FJ** 1974 Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biology of reproduction* **11** 22-39.
- Longstaff C** 2002 Plasminogen activation on the cell surface. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **7** 244-255.
- Lotan R, Skutelsky E, Danon D y Sharon N** 1975 The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *The Journal of biological chemistry* **250** 8518-8523.
- Luft JH** 1971 Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *The Anatomical Record* **171** 347-368.

- Manaskova P, Balinova P, Kraus M, Ticha M y Jonakova V** 2003 Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *American journal of reproductive immunology* **50** 399-410.
- Manaskova P y Jonakova V** 2008 Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *Journal of reproductive immunology* **78** 40-48.
- Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M y Peak D** 1993 Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90** 4112-4116.
- Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S y Engelmann B** 2008 Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thrombosis research* **122 Suppl 1** 19-22.
- Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM y Terranova PF** 1994 Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biology of reproduction* **50** 1251-1260.
- Masui Y y Markert CL** 1971 Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of experimental zoology* **177** 129-145.
- Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J y Ruiz S** 2003 Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs. *Reproduction* **125** 133-141.
- Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur PK y King WA** 2001 The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Molecular human reproduction* **7** 829-837.
- McAvey BA, Wortzman GB, Williams CJ y Evans JP** 2002 Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biology of reproduction* **67** 1342-1352.
- McBlaine PJ y Carroll EJ,Jr** 1980 Sea urchin egg hyaline layer: evidence for the localization of hyalin on the unfertilized egg surface. *Developmental biology* **75** 137-147.
- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA y Day BN** 2003 Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of reproduction* **69** 828-834.
- McGee EA y Hsueh AJ** 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews* **21** 200-214.
- Meister A** 1983 Selective modification of glutathione metabolism. *Science* **220** 472-477.
- Meister A** 1988 Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of biological chemistry* **263** 17205-17208.
- Menino AR,Jr, Dyk AR, Gardiner CS, Grobner MA, Kaaekuahiwi MA y Williams JS** 1989 The effects of plasminogen on in vitro ovine embryo development. *Biology of reproduction* **41** 899-905.
- Michalak M, Mariani P y Opas M** 1998 Calreticulin, a multifunctional Ca<sup>2+</sup> binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemistry and cell biology* **76** 779-785.

- Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K y Opas M** 1999 Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal* **344 Pt 2** 281-292.
- Miller D, Brough S y al-Harbi O** 1992 Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Human reproduction* **7** 637-645.
- Miller DJ, Gong X, Decker G y Shur BD** 1993 Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *The Journal of cell biology* **123** 1431-1440.
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P y Myles DG** 2000 Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *The Journal of cell biology* **149** 1289-1296.
- Millette CF** 1999 Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA **4**: 586-596
- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M y Mekada E** 2000 Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287** 321-324.
- Mizuki N yKasahara M** 1992 Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Molecular and cellular endocrinology* **89** 25-32.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA y Wassarman PM** 1990 Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Developmental biology* **137** 276-286.
- Moller CC y Wassarman PM** 1989 Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Developmental biology* **132** 103-112.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J y Nagai T** 1990 Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **40** 197-210.
- Moor R y Dai Y** 2001 Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction Supplement* **58** 91-104.
- Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL y Britt JH** 1992 Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of reproduction* **47** 485-491.
- Motlik J, Kopecny V, Pivko J y Fulka J** 1980 Distribution of proteins labelled during meiotic maturation in rabbit and pig eggs at fertilization. *Journal of reproduction and fertility* **58** 415-419.
- Motlik J, Crozet N y Fulka J** 1984 Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of reproduction and fertility* **72** 323-328.
- Motlik J, Fulka J y Flechon JE** 1986 Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility* **76** 31-37.
- Muñoz-Gotera RJ, Hernandez-Gonzalez EO, Mendoza-Hernandez G, Contreras RG y Mujica A** 2001 Exocytosis of a 60 kDa protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Molecular reproduction and development* **60** 405-413.

- Murray SC y Smith TT** 1997 Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertility and sterility* **68** 351-357.
- Myles DG, Primakoff P y Koppel DE** 1984 A localized surface protein of guinea pig sperm exhibits free diffusion in its domain. *The Journal of cell biology* **98** 1905-1909.
- Myles DG y Primakoff P** 1997 Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of reproduction* **56** 320-327.
- Nagai T, Niwa K y Iritani A** 1984 Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *Journal of reproduction and fertility* **70** 271-275.
- Nagai T, Takahashi T, Shioya Y y Oguri N** 1990 Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology* **34** 195-204.
- Nakano M y Yonezawa N** 2001 Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells tissues, organs* **168** 65-75.
- Nakayama M, Manabe N, Inoue N, Matsui T y Miyamoto H** 2003 Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) alpha, TNFalpha receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biology of reproduction* **68** 530-535.
- Nara M, Yonezawa N, Shimada T, Takahashi K, Tanokura M, Yumoto F, Nakagawa H, Ohashi K, Hamano S y Nakano M** 2006 Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the intact zona pellucida of the mammalian egg: changes in the secondary structure of bovine zona pellucida proteins during fertilization. *Experimental biology and medicine* **231** 166-171.
- Navazio L, Baldan B, Mariani P, Gerwig GJ y Vliegenthart JF** 1996 Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of Calreticulin from spinach leaves. *Glycoconjugate journal* **13** 977-983.
- Neuer A, Mele C, Liu HC, Rosenwaks Z y Witkin SS** 1998 Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Human reproduction* **13** 987-990.
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Jeremias J, Dieterle S, Korneeva I, Liu HC, Rosenwaks Z y Witkin SS** 1999 Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* **7** 10-16.
- Newman GR** 1999 LR White embedding for immunoelectron microscopy. *The Histochemical journal* **31** 1-79.
- Nicosia SV, Wolf DP y Inoue M** 1977 Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Developmental biology* **57** 56-74.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG y Primakoff P** 2001 Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Developmental biology* **233** 204-213.
- Nixon B, Asquith KL y John Aitken R** 2005 The role of molecular chaperones in mouse sperm-egg interactions. *Molecular and cellular endocrinology* **240** 1-10.

- 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* **1201** 7-14.
- Nolting D, Hansen BF, Keeling JW y Kjaer I** 2002 Histological examinations of bone and cartilage in the axial skeleton of human triploidy fetuses. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **110** 186-192.
- Ohmura K, Kohno N, Kobayashi Y, Yamagata K, Sato S, Kashiwabara S y Baba T** 1999 A homologue of pancreatic trypsin is localized in the acrosome of mammalian sperm and is released during acrosome reaction. *The Journal of biological chemistry* **274** 29426-29432.
- Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y y Mimura T** 1987 Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of reproductive immunology* **11** 91-100.
- Okudo H, Urade R, Moriyama T y Kito M** 2000 Catalytic cysteine residues of ER-60 protease. *FEBS letters* **465** 145-147.
- Okudo H, Kito M, Moriyama T, Ogawa T y Urade R** 2002 Transglutaminase activity of human ER-60. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66** 1423-1426.
- Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ y High S** 1997 Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275** 86-88.
- Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R y Levy S** 1990 TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molecular and cellular biology* **10** 4007-4015.
- Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C y Salvetti NR** 2004 Constant light exposure causes dissociation in gonadotrophin secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reproduction in domestic animals* **39** 417-423.
- Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F y Ragni G** 2008 Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* **29 Suppl B** 121-125.
- Palade G** 1975 Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* **189** 347-358.
- Pangas SA, Yan W, Matzuk MM y Rajkovic A** 2004 Restricted germ cell expression of a gene encoding a novel mammalian HORMA domain-containing protein. *Gene expression patterns: GEP* **5** 257-263.
- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM y Rajkovic A** 2006 Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 8090-8095.
- Papanikolaou T, Amiridis GS, Dimitriadis I, Vainas E y Rekkas CA** 2008 Effect of plasmin, plasminogen activators and a plasmin inhibitor on bovine in vitro embryo production. *Reproduction, fertility, and development* **20** 320-327.
- Parks JE, Lee DR, Huang S y Kaproth MT** 2003 Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* **59** 73-86.

- Parrish JJ, Krogenaes A y Susko-Parrish JL** 1995 Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* **44** 859-869.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA y First NL** 1988 Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction* **38** 1171-1180.
- Payan-Carreira R, Rodrigues P y Carvalho PR** 2006 Chromogranin-A expression in the bovine testis. *Animal Reproduction Science* **96** 146-153.
- Perreault SD, Barbee RR y Slott VL** 1988 Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental biology* **125** 181-186.
- Pesch S y Bergmann M** 2006 Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37** 597-612.
- Petr J, Rajmon R, Rozinek J, Sedmikova M, Jeseta M, Chmelikova E, Svestkova D y Jilek F** 2005 Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular reproduction and development* **71** 115-122.
- Petters RM y Wells KD** 1993 Culture of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **48** 61-73.
- Picton HM** 2001 Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* **55** 1193-1210.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W y Chambers EL** 2008 The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction (Cambridge, England)* **136** 703-715.
- Piehl LL, Cisale H, Torres N, Capani F, Sterin-Speziale N y Hager A** 2006 Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Animal Reproduction Science* **92** 401-410.
- Pierce KE, Siebert MC, Kopf GS, Schultz RM y Calarco PG** 1990 Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Developmental biology* **141** 381-392.
- Pierce KE, Grunvald EL, Schultz RM y Kopf GS** 1992 Temporal pattern of synthesis of the mouse cortical granule protein, p75, during oocyte growth and maturation. *Developmental biology* **152** 145-151.
- Pitt D, Leversha M, Sinfield C, Campbell P, Anderson R, Bryan D y Rogers J** 1981 Tetraploidy in a liveborn infant with spina bifida and other anomalies. *Journal of medical genetics* **18** 309-311.
- Polge C** 1978 Fertilization in the pig and horse. *Journal of reproduction and fertility* **54** 461-470.
- Primakoff P, Hyatt H y Tredick-Kline J** 1987 Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology* **104** 141-149.
- Primakoff P y Myles DG** 2002 Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* **296** 2183-2185.

- Pursel VG y Johnson LA** 1975 Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science* **40** 99-102.
- Rankin T, Talbot P, Lee E y Dean J** 1999 Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* **126** 3847-3855.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL y Johnson LA** 1999 In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of animal science* **77** 3346-3352.
- Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, Vainas E y Brem G** 2002 Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* **57** 1897-1905.
- Roby KF, Son DS y Terranova PF** 1999 Alterations of events related to ovarian function in tumor necrosis factor receptor type I knockout mice. *Biology of reproduction* **61** 1616-1621.
- Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE y Albertini DF** 2008 Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *Journal of cellular physiology*.
- Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H y Johannisson A** 2001 Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction Supplement* **58** 129-145.
- Rogers QR y Harper AE** 1966 Protein digestion: nutritional and metabolic considerations. *World review of nutrition and dietetics* **6** 250-291.
- Romar R, Coy P, Gadea J y Rath D** 2005 Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **85** 287-300.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikin AP, Clegg ED** 1990 Histological and Histopathological Evaluation of the Testis Clearwater. Cache River 119-161.
- Runnstrom J** 1966 The vitelline membrane and cortical particles in sea urchin eggs and their function in maturation and fertilization. *Advances in Morphogenesis* **5** 221-325.
- Saksela O** 1985 Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochimica et biophysica acta* **823** 35-65.
- Sasson R, Winder N, Kees S y Amsterdam A** 2002 Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. *Biochemical and biophysical research communications* **294** 51-59.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P y Trounson AO** 2006 From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy research and technique* **69** 396-407.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P y Blobel CP** 2004 Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* **164** 769-779.
- Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U y Topfer-Petersen E** 1998 Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et biophysica acta* **1387** 206-216.

- Schmell ED y Gulyas BJ** 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. *Biology of reproduction* **23** 1075-1085.
- Schmell ED y Gulyas, BJ** 1980b Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzymes role in hardening the zona pelucida. *Gamete research* **3** 279-290
- Schultz RM y Kopf GS** 1995 Molecular basis of mammalian egg activation. *Current topics in developmental biology* **30** 21-62.
- Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudriere-Gesbert C y Conjeaud H** 2001 Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *The Journal of biological chemistry* **276** 40055-40064.
- Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Takaoka Y, Ishikawa M y Dukelow WR** 1995 Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *Journal of reproduction and fertility* **105** 85-90.
- Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H y Engel W** 1999 Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biology of reproduction* **61** 1445-1451.
- Siciliano L, Marciano V y Carpino A** 2008 Protasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reproductive biology and endocrinology: RBandE* **6** 1-5.
- Sinowatz F, Kolle S y Topfer-Petersen E** 2001 Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells, tissues, organs* **168** 24-35.
- Smith GB, Umbach JA, Hirano A y Gundersen CB** 2005 Interaction between constitutively expressed heat shock protein, Hsc 70, and cysteine string protein is important for cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry* **280** 32669-32675.
- Snook JT** 1973 Protein digestion. Nutritional and metabolic considerations. *World review of nutrition and dietetics* **18** 121-176.
- Somers CE, Battaglia DE y Shapiro BM** 1989 Localization and developmental fate of ovoperoxidase and proteoliasin, two proteins involved in fertilization envelope assembly. *Developmental biology* **131** 226-235.
- Stevenson BJ, Hagenbuchle O y Wellauer PK** 1986 Sequence organisation and transcriptional regulation of the mouse elastase II and trypsin genes. *Nucleic acids research* **14** 8307-8330.
- Stroband HW, Taverne N, Langenfeld K y Barends PM** 1986 The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. *Cell and tissue research* **246** 81-89.
- Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W y Moor RM** 1992 A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* **115** 947-956.
- Sun QY, Wang WH, Hosoe M, Taniguchi T, Chen DY y Shioya Y** 1997 Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca(2+)-independent manner,

but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Development, growth and differentiation* **39** 523-529.

**Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS y Schatten H** 2001 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. *Molecular reproduction and development* **59** 192-198.

**Sun QY** 2003 Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy research and technique* **61** 342-348.

**Sun QY y Nagai T** 2003 Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *The Journal of reproduction and development* **49** 347-359.

**Suzumori N, Yan C, Matzuk MM y Rajkovic A** 2002 Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of development* **111** 137-141.

**Szollosi D** 1967 Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *The Anatomical Record* **159** 431-446.

**Takahashi Y, Meno C, Sato E y Toyoda Y** 1995 Synchronous sperm penetration of zona-free mouse eggs in vitro. *Biology of reproduction* **53** 424-430.

**Takahashi Y, Bigler D, Ito Y y White JM** 2001 Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Molecular biology of the cell* **12** 809-820.

**Talbot P y Dandekar P** 2003 Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microscopy research and technique* **61** 349-357.

**Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M y de Kruif A** 2002 Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development* **61** 414-424.

**Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A y Miyado K** 2008 Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Molecular reproduction and development* **75** 150-155.

**Tatemoto H y Terada T** 1999 Analysis of zona pellucida modifications due to cortical granule exocytosis in single porcine oocytes, using enhanced chemiluminescence. *Theriogenology* **52** 629-640.

**Tatone C, Van Eekelen CG y Colonna R** 1994 Plasma membrane block to sperm entry occurs in mouse eggs upon parthenogenetic activation. *Molecular reproduction and development* **38** 200-208.

**Tawia SA yLopata A** 1992 The fertilization and development of mouse oocytes following cortical granule discharge in the presence of a protease inhibitor. *Human reproduction* **7** 1004-1009.

**Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ y Schilsky ML** 1995 Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **270** 20410-20416.

- Therien I, Moreau R y Manjunath P** 1998 Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of reproduction* **59** 768-776.
- Thimon V, Belghazi M, Dacheux JL y Gatti JL** 2006 Analysis of furin ectodomain shedding in epididymal fluid of mammals: demonstration that shedding of furin occurs in vivo. *Reproduction* **132** 899-908.
- Thibault C, Szollosi D, y Gerard M** 1987 Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, nutrition and development* **27** 856-896.
- Topfer-Petersen E, Dostalova Z y Calvete JJ** 1997 The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **424** 301-310.
- Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L y Calvete JJ** 1998 Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30** 217-224.
- Totzauer I, Kolle S, Sinowatz F, Plendl J, Amselgruber W y Topfer-Petersen E** 1998 Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. *Annals of Anatomy* **180** 37-43.
- Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H y Araki Y** 1997 Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biology of reproduction* **57** 487-494.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR y Pereira BM** 1998 The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental cell research* **240** 151-164.
- Tulsiani DR y Abou-Haila A** 2001 Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* **9** 51-69.
- Turano C, Coppari S, Altieri F y Ferraro A** 2002 Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *Journal of cellular physiology* **193** 154-163.
- Tutuncu L, Stein P, Ord TS, Jorgez CJ y Williams CJ** 2004 Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption. *Developmental biology* **270** 246-260.
- Urade R y Kito M** 1992 Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum. *FEBS letters* **312** 83-86.
- Vadnais ML, Foster DN y Roberts KP** 2008 Molecular cloning and expression of the CRISP family of proteins in the boar. *Biology of reproduction* **79** 1129-1134.
- van Lith M, Hartigan N, Hatch J y Benham AM** 2005 PDILT, a divergent testis-specific protein disulfide isomerase with a non-classical SXXC motif that engages in disulfide-dependent interactions in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **280** 1376-1383.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D y de Kruif A** 2002 Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in domestic animals* **37** 144-151.
- Van vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA** 2003 Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **83** 1-45.

- Velasquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jimenez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Aviles M y Coy P** 2007 Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Molecular reproduction and development* **74** 617-628.
- Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ y Pruijn GJ** 2003 PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25** 1106-1118.
- Wang WH, Niwa K y Okuda K** 1991 In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* **93** 491-496.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y y Day BN** 1997a Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of reproduction* **56** 1376-1382.
- Wang WH, Hosoe M y Shioya Y** 1997b Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *Journal of reproduction and fertility* **109** 247-255.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS y Day BN** 1998a Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Molecular reproduction and development* **49** 308-316.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS y Day BN** 1998b Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Molecular reproduction and development* **51** 346-353.
- Wang WH, Machaty Z, Abeydeera LR, Prather RS y Day BN** 1998c Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biology of reproduction* **58** 1357-1366.
- Wang WH, Machaty Z, Abeydeera LR, Prather RS y Day BN** 1999 Time course of cortical and zona reactions of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal. *Zygote* **7** 79-86.
- Wang WH, Day BN y Wu GM** 2003 How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microscopy research and technique* **61** 335-341.
- Wassarman PM y Josefowicz WJ** 1978 Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology* **156** 209-235.
- Wassarman PM** 1988 Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* **57** 415-442.
- Wassarman PM y Mortillo S** 1991 Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *International review of cytology* **130** 85-110.
- Wassarman PM, Liu C y Litscher ES** 1996 Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of cell science* **109** 2001-2004.
- Wassarman PM** 1999 Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* **96** 175-183.

- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C y Litscher ES** 2005 Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and cellular endocrinology* **234** 95-103.
- Werb Z y Yan Y** 1998 A cellular striptease act. *Science* **282** 1279-1280.
- Wessel GM, Truschel MR, Chambers SA y McClay DR** 1987 A cortical granule-specific enzyme, B-1,3-glucanase, in sea urchin eggs. *Gamete research* **18** 339-348.
- Wessel GM** 1995 A protein of the sea urchin cortical granules is targeted to the fertilization envelope and contains an LDL-receptor-like motif. *Developmental biology* **167** 388-397.
- Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V y Conner S** 2001 The biology of cortical granules. *International review of cytology* **209** 117-206.
- Wolf DP y Hamada M** 1977 Induction of zonal and egg plasma membrane blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate. *Biology of reproduction* **17** 350-354.
- Wolf DP** 1978 The block to sperm penetration in zonal-free mouse eggs. *Developmental biology* **64** 1-10.
- Wolf DP y Hamada M** 1979 Sperm binding to the mouse egg plasmalemma. *Biology of reproduction* **21** 205-211.
- Wolf DP** 1981 The mammalian egg's block to polyspermy. In: Mastroianni L Jr, Giggers JD (eds) Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum, New York, pp 183-196.
- Wong JL y Wessel GM** 2006 Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. *Current topics in developmental biology* **72** 1-151.
- Wortzman GB y Evans JP** 2005 Membrane and cortical abnormalities in post-ovulatory aged eggs: analysis of fertilizability and establishment of the membrane block to polyspermy. *Molecular human reproduction* **11** 1-9.
- Xia P, Wang Z, Yang Z, Tan J y Qin P** 2001 Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell and tissue research* **303** 271-275.
- Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM y Ducibella T** 1997 Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of reproduction* **57** 743-750.
- Yanagimachi R y Chang MC** 1961 Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *The Journal of experimental zoology* **148** 185-203.
- Yanagimachi R** 1981 Mechanisms of fertilization in mammals. In: Fertilization and Embryonic Development *In Vitro*. Ed: L. Mastroianni and JD. Biggers. Plenum Press, New York, USA, 81-182
- Yanagimachi R** 1994a Mammalian fertilization. En: Physiology of reproduction, Knobil y Neil J. New York, USA, 189-317.

- Yanagimachi R** 1994b Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2** 371-372.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S y Nakano M** 2001 Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *European journal of biochemistry/FEBS* **268** 3587-3594.
- Yoshida M** 1993 Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Molecular reproduction and development* **35** 76-81.
- Yoshida M, Cran DG y Pursel VG** 1993 Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular reproduction and development* **36** 462-468.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N y Gage DA** 1998 Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry* **273** 7488-7494.
- Zamboni L** 1970 Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biology of reproduction, Supplement* **2**:44-63.
- Zhang J, Wu J, Huo R, Mao Y, Lu Y, Guo X, Liu J, Zhou Z, Huang X y Sha J** 2007 ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. *Molecular human reproduction* **13** 633-639.
- Zhang X, Rutledge J, Khamsi F y Armstrong DT** 1992 Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Molecular reproduction and development* **32** 28-32.
- Zhu Q, Zelinka P, White T y Tanzer ML** 1997 Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochemical and biophysical research communications* **232** 354-358.
- Zuccotti M, Yanagimachi R y Yanagimachi H** 1991 The ability of hamster oolemma to fuse with spermatozoa: its acquisition during oogenesis and loss after fertilization. *Development* **112** 143-152.

## María Dolores Saavedra Leos.

[mariadolores.saavedra@alu.um.es](mailto:mariadolores.saavedra@alu.um.es)

Miguel de Unamuno No 3 6A Murcia, **España**. Cp. 30009. Tel: 660011143

Hermanos infante 225 Col: Tequis, Cp: 78250, San Luís Potosí, **México**. Tel: 01 44 4 8 13 13 23.

### Formación académica

**Doctorado** en Biología de la Reproducción de Mamíferos. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, España. **2009**. Línea de investigación: Identificación de moléculas implicadas en el mecanismo de bloqueo de la polispermia.

**DEA (Diploma en estudios avanzados)**. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, España. **2007**.

**Maestría en Ciencias Médicas**. Instituto de investigaciones Médicas. Facultad de Medicina. Universidad de Guanajuato, México. **2005**. Línea de investigación: Apoptosis de células de ovarios de mujeres perimenopáusicas.

**Licenciatura en Químico Fármaco Biólogo**. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luís Potosí, México. **2000**.

### Publicaciones

Jiménez-Movilla M, Martínez-Alonso E, Castells MT, Izquierdo-Rico MJ, **Saavedra MD**, Gutiérrez-Gallego R, Fayrer-Hosken R, Ballesta J y Avilés M. Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histology and Histopathology* **2009**; 24 (5): 599-609.

Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Romar R, **Saavedra MD**, Grullón L, Matás M, Avilés M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**; 105 (41): 15809-15814.

### Comunicaciones a congresos

**Saavedra MD**, Izquierdo-Rico MJ, Mondéjar I, Zomeño-Abellán MT, Gutiérrez-Adán A, Coy P, Romar R, Avilés M. *Expression of ADAM10 and ADAM17 in bovine and porcine oocytes*. Conferencia internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) y la Sociedad Británica de Andrología (BAS). *Reproduction in Domestic Animals* **2008**; 43 (51): 83. Comunicación oral.

Grullón L, **Saavedra MD**, Matas C, Coy P. *Effect of plasminogen on ZP resistance to proteolysis and IVF results in cattle*. Conferencia internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) y la Sociedad Británica de Andrología (BAS). *Reproduction in Domestic Animals* **2008**; 43 (51): 63. Póster.

Grullón L, **Saavedra MD**, Waldschmitt1 N, P Coy. *Effect of plasminogen on zona pellucida resistance to proteolysis and in vitro fertilization results in pig*. Conferencia internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) y la Sociedad Británica de Andrología (BAS). *Reproduction in Domestic Animals* **2008**; 43 (51): 80. Póster.

**Saavedra MD**, Romar R, Coy P, Avilés M. *Study of cortical granule content in vitro matured porcine oocytes by means of PNA lectin precipitation*. 34<sup>th</sup> Annual conference of the International Embryo Transfer Society Denver, Colorado USA. *Reproduction Fertility and Development* **2008**; 20 (1): 196. Póster.

Avilés M, **Saavedra MD**, Mondéjar I, Canovas S, Romar R, Coy P. *Evidences for different molecular weight oviductins in the bovine oviductal fluid. A proteomic approach.* 41<sup>st</sup> Annual conference of Society for Study of Reproduction (SSR), Kailua-Kona, Hawai, (EEUU). *Biology of Reproduction Special Issue* **2008**; 137 (abstract nº353). Póster.

Romar R, **Saavedra MD**, Coy P, Avilés M. 2008. *ER-60 and HSP-70 proteins are candidates to be contained in cortical granules of in vitro matured porcine oocytes.* 41<sup>st</sup> Annual conference of Society for Study of Reproduction (SSR), Kailua-Kona, Hawai, (EEUU). *Biology of Reproduction Special Issue* **2008**; 168 (abstract nº485). Póster.

Coy P, **Saavedra MD**, Mondéjas I, Canovas S, Romar R, Avilés M, 2008. *Biological modifications of zona pellucida affecting resistance to proteases digestion, sperm binding and monospermy are mediate by oviduct-specific glycoprotein in pig and cow.* 41<sup>st</sup> Annual conference of Society for Study of Reproduction (SSR), Kailua-Kona, Hawai, (EEUU). *Biology of Reproduction Special Issue* **2008**; 211 (abstract nº667). Póster.

**Saavedra MD**, Barbosa-Sabanero G, Sabanero M, Fajardo M, Malacara JM. *Actividad de la enzima caspasa-3 de lisis de células de ovarios humanos.* Congreso de Biomedicina. Monterrey, México. **2005**. Proceedings 113 (abstract nº 38). Comunicación oral.

**Saavedra MD**, Barbosa-Sabanero G, Sabanero M, Fajardo M, Malacara JM. *Análisis de la enzima caspasa-3 en ovario de mujeres perimenopáusicas.* Congreso de Biología de la Reproducción. Guanajuato, México. **2004**. Proceedings 13 (abstract nº 25) Póster.

## Estancias

**Universidad de Okayama**, Okayama, Japón. Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Agricultura. Programa de relaciones académicas con instituciones educativas en Asia 2007, Universidad de Murcia. Línea de investigación: Activación mediante estimulación eléctrica de ovocitos porcinos madurados in vitro. 6/09/2007-5/10/2007.

**Hospital Ángeles, México DF**, México. Financiación: Hospital Aranda de la Parra León Guanajuato, Mexico. Diplomado Introducción a la Medicina Reproductiva, Laboratorio de Reproducción Asistida. 01/09/2001-15/12/2001.

**Universidad Autónoma de México (UNAM)**, México. Departamento de microbiología y parasitología, Facultad de Medicina. Diplomado en Micología Médica. 240h (20 créditos) 15/06/2001-15/07/1998.

## Becas, ayudas y premios recibidos

**Universidad de Murcia:** Ayuda para curso, Universidad de Murcia, España. I Curso criométricos en microscopía y su aplicación al estudio del material biológico. **2009**.

**Universidad de Murcia:** Beca de colaboración para la investigación. Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España. Resolución del rectorado (R 314/2008). Beca financiada con cargo al proyecto fp00-255 "estudio morfológico de glucoproteínas y melaninas". **2008**.

**Universidad de Murcia:** Ayudas al personal docente e investigador para la actividad en Asia, Servicio de Relaciones Internacionales, Universidad de Murcia, España. Resolución rectoral R-446/2006. Ayuda para estancia en la Universidad de Okayama, Japón. **2007**.

**Ministerio de Educación de Guanajuato**, México: Premio al mejor promedio en la maestría, ciclo 2003-2004. **2005**.

**CONCyTEG** (Consejo de Ciencia y Tecnología de Guanajuato, México): Beca para realización de tesis de maestría. Convenio: 05-16-k119-020. **2005**

**CONACyT** (Consejo de Ciencia y Tecnología de México): Beca para estudios de posgrado. Número de becario: 184946. 2004.

## Cursos y seminarios recibidos

I Curso criométodos en microscopía y su aplicación al estudio del material biológico. Universidad de Murcia, Murcia, España. 3 ECTS. 09 /03/09-09 /13/09

### Cursos de Doctorado

Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia, España. Bienio 2005-2007. Programa “Biología de la Reproducción en los mamíferos”.

- Reconocimiento entre gametos, fecundación y desarrollo embrionario temprano. 3 créditos. Sobresaliente.
- Maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo de embriones. 4 créditos. Sobresaliente.
- Aspectos ético-legales del comienzo de la vida y de la reproducción asistida. 4.5 créditos. Sobresaliente.
- Reproducción asistida en la especie humana. 4 créditos. Sobresaliente.
- Aspectos genéricos de la investigación científica. 3 créditos. Sobresaliente.

### Inglés

Centro de idiomas de la universidad autónoma de San Luís Potosí SLP, Mexico. 1998-2000

## Experiencia Profesional

2008-2009 **Universidad de Murcia, España.**

Colaboración en la línea de investigación: estudio de la expresión y localización de proteínas en el oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados *in vitro*. Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España. Junio 2008- Febrero 2009.

2003-2005 **Hospital Aranda de la Parra, León Guanajuato, México.** Área de Reproducción Asistida Humana.

2002-2003 **Instituto de reproducción humana VIDA, León Guanajuato, México.**  
Área de Reproducción Asistida Humana.

2001-2002 **Hospital la Luz, León Guanajuato, México.**  
Análisis clínicos, área de urgencias.

## Otros datos de interés

Experiencia y manejo de técnicas:

- **Reproducción asistida en la especie humana:** andrología, banco de semen, congelación de gametos, FIV, ICSI y transferencia de embriones.

- **Biología de la reproducción en las especies porcina y bovina:** recogida y manipulación de gametos, maduración y fecundación *in vitro*, cultivo embrionario,...

- Proteómica, electroforesis en una dimensión, microscopía confocal y electrónica, PCR (básico), cultivos celulares, western blot, .....

Pertenencia a grupos de investigación:

- Grupo “Estudio morfológico de glucoproteínas y melaninas”, Universidad de Murcia. 2008.