

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CASA ABIERTA AL TIEMPO**

**“IDENTIFICACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE  
ESPERMATOZOIDES DE CERDO EXPRESADAS DURANTE  
LA CAPACITACIÓN”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**

**M. EN C. IRMA JIMÉNEZ MORALES**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA**

**DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ**

**ASESOR:**

**DR. SALVADOR ROMO GARCÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**FEBRERO DE 2006**

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

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

IRMA JIMÉNEZ MORALES

El día 24 de Febrero de 2006.

Sinodales:

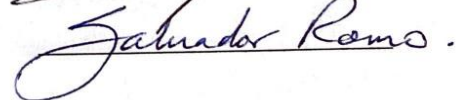
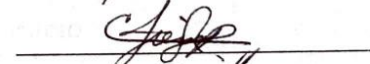
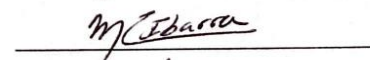
Dr. Humberto González Márquez (Presidente)

Dra. María Elena Ibarra Rubio (Secretaria)

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana (Vocal)

Dra. Elia Roldán Reyes (Vocal)

Dr. Salvador Romo García (Vocal)



## COMITÉ TUTORIAL

### DIRECTORES DE TESIS

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

**Dr. Humberto González-Márquez**

Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

### ASESOR

**Dr. Salvador Romo García**

Profesor Titular “B”, FES-Cuauhtitlán  
Universidad Nacional Autónoma de México

### SINODALES

**Dra. María Elena Ibarra Rubio**

Profesor de Carrera Titular “B”, Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

**Dra. Elia Roldán Reyes**

Profesor Titular “A”, FES-Zaragoza  
Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del  
Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma  
Metropolitana Iztapalapa.

Bajo la dirección de:

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Dr. Humberto González Márquez

## Dedicatoria

- ❖ *Con todo mi amor dedico esta tesis a la memoria de mi padre, aunque no estás conmigo cierro los ojos y te veo tan FELIZ porque tu niña ha logrado un sueño más en su vida. Tu recuerdo estará siempre en mi corazón.*
  
- ❖ *Con todo mi amor dedico esta tesis a mi madre por darme la vida y ser un gran ejemplo de amor, de lucha y superación. Gracias MAMITA por estar siempre conmigo.*
  
- ❖ *A mis hermanos Rosy, Rubén, Gerardo, Carlos y Alma por que con su amor, comprensión y paciencia han sido siempre mi gran apoyo para alcanzar todas mis metas.*

- ❖ *A mis niñas Ange, Anis y Aylin por su cariño y comprensión, son sin duda lo mejor que la vida me ha dado.*
  
- ❖ *A mis niños Yael, Chucho, Isra, Migue y Gerardito por compartir los momentos más felices y formar parte de mi vida.*
  
- ❖ *A MI FAMILIA por su cariño y apoyo que me han brindado en todo momento.*
  
- ❖ *A Lety y Moni por su amistad y ser el ejemplo de fortaleza para seguir adelante.*
  
- ❖ *A la memoria de LETY (KIKA), su recuerdo estará siempre en mi corazón.*

## **Agradecimientos**

Agradezco de manera muy especial a mis tutores Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana y al Dr. Humberto González Márquez por el invaluable respaldo que por años me han brindado, así como por su persistencia y profesionalismo. Gracias por tenerme paciencia y por creer en mí, y sobre todo por brindarme su amistad y confianza que fue fundamental para la culminación de este trabajo.

Dr. Salvador Romo García por sus comentarios, sugerencias y por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

Dras. Elia Roldán Reyes y María Elena Ibarra Rubio, por la revisión de esta tesis, sus acertadas observaciones y por sus invaluable consejos para mejorar la presentación de este trabajo.

Jorge Lodigiani por la excelente digitalización de los geles.

Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez, Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biológicas, por el gran apoyo que me brindó.

Mil gracias.



Agradezco a:

Dra. Rocío Ortiz por su amistad, entusiasmo, dedicación y empeño que la caracterizan y que ha sido para mí el mejor ejemplo a seguir.

Dr. Miguel Betancourt por su gran apoyo, y sobre todo, por haberme permitido colaborar en su grupo.

Dra. Yvonne Ducolomb por su amistad incondicional y su gran ayuda a lo largo de la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología celular Cris, Eduardo, Mundo, Leo y Edith. Gracias por su apoyo incondicional.

A TODAS MIS AMIGAS porque con su amistad, los obstáculos fueron más fáciles de superar, lo cual me permitió lograr esta meta.

MIL GRACIAS AMIGUITAS !!!

## Resumen

La capacitación es el proceso mediante el que los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de fertilizar al ovocito, ocurre en el tracto reproductor femenino, y se caracteriza por cambios en la composición y distribución de los componentes de la superficie del espermatozoide. Entre estos se pierde el colesterol y se redistribuyen las glicoproteínas de membrana plasmática. El objetivo de este estudio fue identificar las glicoproteínas que se expresan en espermatozoides de cerdo capacitados. Se analizaron muestras de espermatozoides normozoospermicos de cerdo capacitados y no capacitados. Se aislaron glicoproteínas de espermatozoides por cromatografía de afinidad, utilizando las lectinas Con-A y WGA como ligandos fijados a una columna de sefarosa. La fracción retenida por la columna de afinidad se analizó por PAGE-SDS y electroforesis 2D y se secuenciaron los extremos N-terminal por degradación de Edman. La cantidad de proteínas extraídas de espermatozoides capacitados, comparada con la de espermatozoides no capacitados fue menor. En el análisis electroforético se encontró que, después de la capacitación, disminuye la proporción de las proteínas con masa molecular menor a 32 kDa. Estos resultados confirman que algunas proteínas fueron liberadas de la superficie del espermatozoide al realizarse la capacitación *in vitro*. Por medio de cromatografía de afinidad se encontró que la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo presenta un gran número de proteínas unidas a residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico. Las proteínas retenidas por la lectina Con-A de espermatozoides no capacitados tienen masa molecular de entre 14

y 112 kDa. Mediante electroforesis bidimensional de proteínas de espermatozoides no capacitados, se observó que la familia de isoformas de 24 kDa desaparece al igual que las proteínas básicas menores de 20 kDa. Las proteínas totales de espermatozoides capacitados mostraron masas moleculares entre 14 y 102 kDa. Se encontró una banda mayoritaria de 68 kDa y dos de 52 y 47 kDa que corresponden a arilsulfatasa (AS-A), hialuronidasa y lactadherina, respectivamente. El patrón de proteínas retenidas por Con-A (RP) mostró bandas de 14 a 98 kDa. La secuencia de la banda de 62 kDa correspondió a AS-A comparándola por BLAST en el banco de genes. La fracción RP por WGA mostró bandas de 14 a 100 kDa. La banda de 65 kDa también correspondió a AS-A. Este estudio demostró que AS-A tiene residuos de manosa y N-acetilglucosamina y/o ácido siálico como parte de su glicosilación.

**Palabras clave:** Arilsulfatasa-A, capacitación espermática, Con-A, espermatozoides de cerdo, WGA

## Abstract

Capacitation is a sperm process necessary for fertilization. It occurs in female reproductive tract and it is characterized by membrane modifications including loss of cholesterol and glycoprotein redistribution. The aim of this study was to determine which of the mannose or N-acetylglucosamine and/or sialic acid glycoproteins were maintained in the membrane of capacitated boar sperm. Normospermic boar sperm, capacitated or not, were analyzed. Total proteins were injected in affinity columns with immobilized Con-A or WGA lectin. Retained fraction was analyzed by SDS-PAGE and 2-D electrophoresis. The N-terminal sequence of proteins was determined by Edman's degradation. Total protein extracted from capacitated sperm was a small amount of that extracted from non-capacitated sperm. SDS-PAGE showed that proteins smaller than 32 kDa were lost in capacitated sperm. Affinity chromatography showed that there are many glycoproteins with mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues. Proteins from non-capacitated sperm retained by the lectin Con-A have a Mr from 14 to 112 kDa. 2-D electrophoresis showed that a 24kDa protein family and the basic proteins smaller than 20kDa disappeared from non-capacitated sperm. Total capacitated sperm proteins electrophoresis showed molecular masses between 14 kDa and 102 kDa. A major band of 68 kDa, and 2 minor bands of 52 kDa and 47 kDa were observed. They were Arylsulfatase-A (AS-A), hyaluronidase and lactadherin, respectively. Con-A-retained proteins (RP) pattern showed bands from 14 to 98 kDa. After sequencing and BLAST analysis, the 62 kDa band corresponded to AS-A. The WGA RP fraction showed bands from 14 to 100 kDa. The 65 kDa band corresponded

to AS-A. This study showed that AS-A has mannose and N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues as part of its glycosilation.

**Keywords:** Arylsulfatase-A, boar sperm, Con-A, sperm capacitation, WGA.

# ÍNDICE

Dedicatoria.....	v
Agradecimientos .....	vii
Resumen .....	ix
Abstract.....	xi
ÍNDICE.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
Espermatogénesis .....	1
Estructura del espermatozoide.....	5
Membrana Plasmática.....	8
Glicolema .....	11
Maduración del espermatozoide .....	12
Capacitación Espermática.....	15
ANTECEDENTES.....	22
Lectinas.....	23
Estudios con lectinas en diversas especies de mamíferos .....	25
Estudios sobre glicoproteínas relacionadas con la interacción entre gametos.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	35
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS PARTICULARES .....	36

MATERIAL Y MÉTODO.....	37
Obtención de la muestra .....	37
Evaluación espermática .....	37
Preparación de la muestra .....	38
Extracción de proteínas.....	40
Cromatografía de afinidad .....	41
Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS (PAGE-SDS).....	41
Preparación de geles .....	42
Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry .....	43
Electroforesis Bidimensional (2-D) en gel poliacrilamida.....	44
Tinción de plata.....	45
Secuenciación.....	45
Análisis de resultados .....	46
RESULTADOS. ....	47
Extracción de proteínas de espermatozoides capacitados y no capacitados de cerdo.....	47
Aislamiento de glicoproteínas de espermatozoides por cromatografía de afinidad, utilizando las lectinas Con-A y WGA como ligandos fijados a una columna de sefarosa. ....	48
Determinación de la masa molecular relativa y el punto isoelectrico de glicoproteínas del extracto mediante electroforesis. ....	50
<i>Espermatozoides no capacitados</i> .....	50
Espermatozoides Capacitados. ....	56

Análisis de la secuencia de aminoácidos.....	66
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	83
PERSPECTIVAS.....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86



# INTRODUCCIÓN

## *Espermatogénesis*

La espermatogénesis es un proceso complejo mediante el cual las espermatogonias sufren una serie de divisiones y diferenciación celular dando lugar a espermatozoides [52]. La espermatogénesis está regulada por diferentes hormonas, entre las más importantes se encuentran la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la Hormona Leutinizante (LH) y la testosterona [159]. Durante la formación de la célula espermática en el testículo, la membrana plasmática y otras estructuras específicas son preparadas para que reaccionen adecuadamente durante el paso por el tracto reproductor femenino y durante la interacción con el ovocito [31; 83; 150]. En los mamíferos, la espermatogénesis comienza en la pubertad, con la formación de células espermáticas en los testículos, las cuales se encuentran en los túbulos seminíferos [43].

La espermatogénesis puede dividirse en tres etapas:

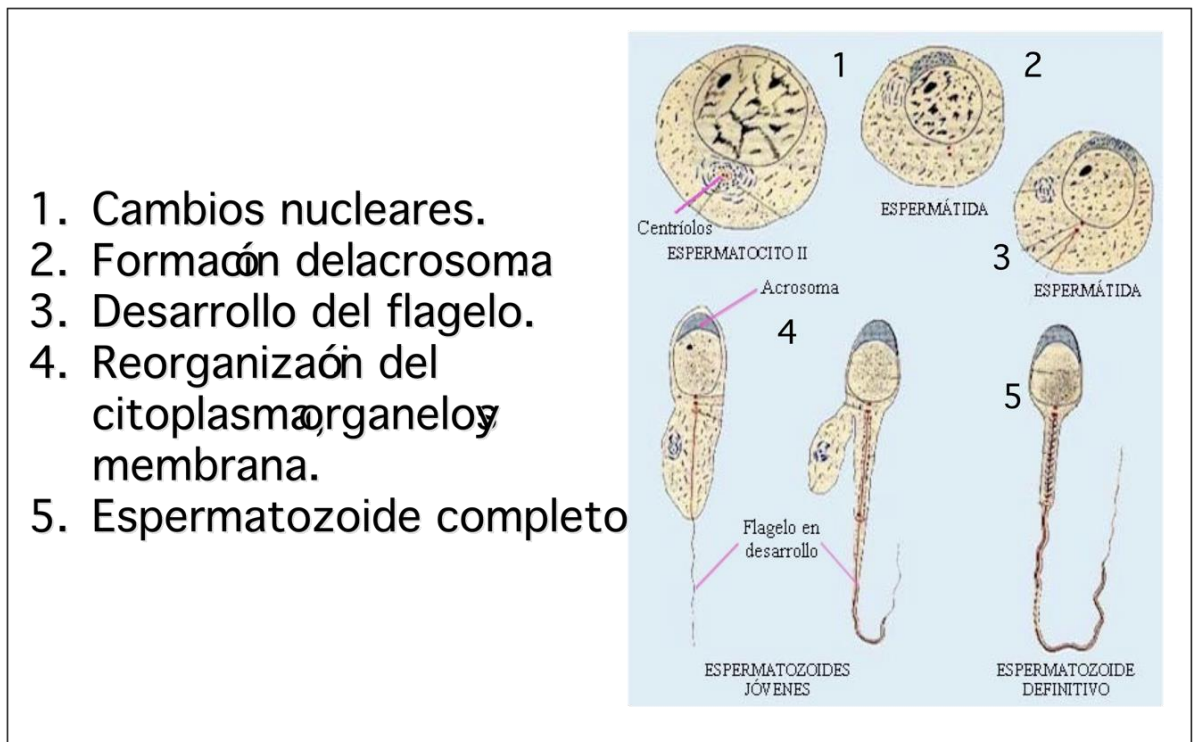
- I. Proliferación de las espermatogonias por mitosis.
- II. Multiplicación de los espermatocitos por meiosis.
- III. Diferenciación terminal de las espermátidas o espermiogénesis.

La primera etapa de la espermatogénesis está relacionada con la multiplicación por mitosis de las células de la línea germinal llamadas espermatogonias. Estas células tienen un papel fundamental, ya que a partir de ellas se inicia la producción de espermatozoides. Las espermatogonias poseen la capacidad de autorenovarse, es decir que sólo algunas de las espermatogonias hijas que se producen son capaces de

evolucionar y dar origen a los espermatozoides y otra parte de ellas permanecen como una población de células troncales (stem cells). Éstas son capaces de repetir ciclos de multiplicación para su renovación y para garantizar la producción de espermatozoides durante la vida adulta del organismo.

Las espermatogonias tipo A son las primeras en aparecer, existen varias generaciones de espermatogonias tipo A con diferente morfología. Este tipo celular da origen a otro tipo celular que presenta un núcleo aplanado con depósitos finos de cromatina (espermatogonias intermedias); éste, a su vez, da lugar a las espermatogonias tipo B, que dan origen a los espermatoцитos primarios, los cuales se multiplican por meiosis. Como producto de esta división se forman los espermatoцитos secundarios, que tienen una vida media muy corta porque casi inmediatamente después de su formación inicia la segunda división meiótica y dan origen a las espermatídas (etapa II).

En la tercera etapa, las espermatídas aparecen en los túbulos seminales durante la pubertad, sufren varios cambios morfológicos y bioquímicos hasta convertirse en espermatozoides, a este proceso de diferenciación se le conoce como espermiogénesis, el cual se divide en fase de Golgi, fase de capuchón, fase acrosomal y fase de maduración tomando como base la evolución de los organelos intracelulares para formar las estructuras características del espermatozoide: núcleo, acrosoma y flagelo como se observa en la Figura 1 [137].



**Figura 1.** Esquema de la tercera etapa de la espermatogénesis. Etapa de diferenciación terminal de las espermatidas. Durante esta etapa ocurre reorganización de organelos celulares para la formación del espermatozoide.

El flagelo es la primera estructura que se desarrolla durante la espermatogénesis, lo cual coincide con el reclutamiento de las mitocondrias del citoplasma, que son acomodadas en forma de hélice, dando origen a la pieza media. Simultáneamente se forma el acrosoma (una larga vesícula secretora en la cabeza del espermatozoide), el aparato de Golgi perinuclear produce pequeñas vacuolas

condensadas, que contienen un material denso (gránulos proacrosomales), las cuales dan origen al acrosoma [137].

La membrana plasmática se acerca al núcleo debido a la redistribución del citoplasma y el acrosoma se ubica entre ambas estructuras. El ADN del núcleo comienza a condensarse por cambios en las histonas y en otras proteínas específicas asociadas al ADN. Simultáneamente, la célula se alarga y el citoplasma se dirige hacia el flagelo. El acrosoma deja de crecer y el aparato de Golgi migra hacia el flagelo de la espermatίδα. El volumen de la espermatίδα es reducido aproximadamente un 25% del volumen original, por la pérdida de agua, pérdida de citoplasma y formación del cuerpo residual, posteriormente se da la liberación del espermatozoide. Los cuerpos residuales contienen paquetes de ARN y organelos como aparatos de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas y peroxisomas [137]. Durante la diferenciación de las espermatίδas, la membrana plasmática presenta gran elasticidad y su extensión aumenta en forma considerable debido a que recubre al flagelo en toda su longitud permitiendo la formación de regiones o dominios en la membrana plasmática con propiedades específicas [137].

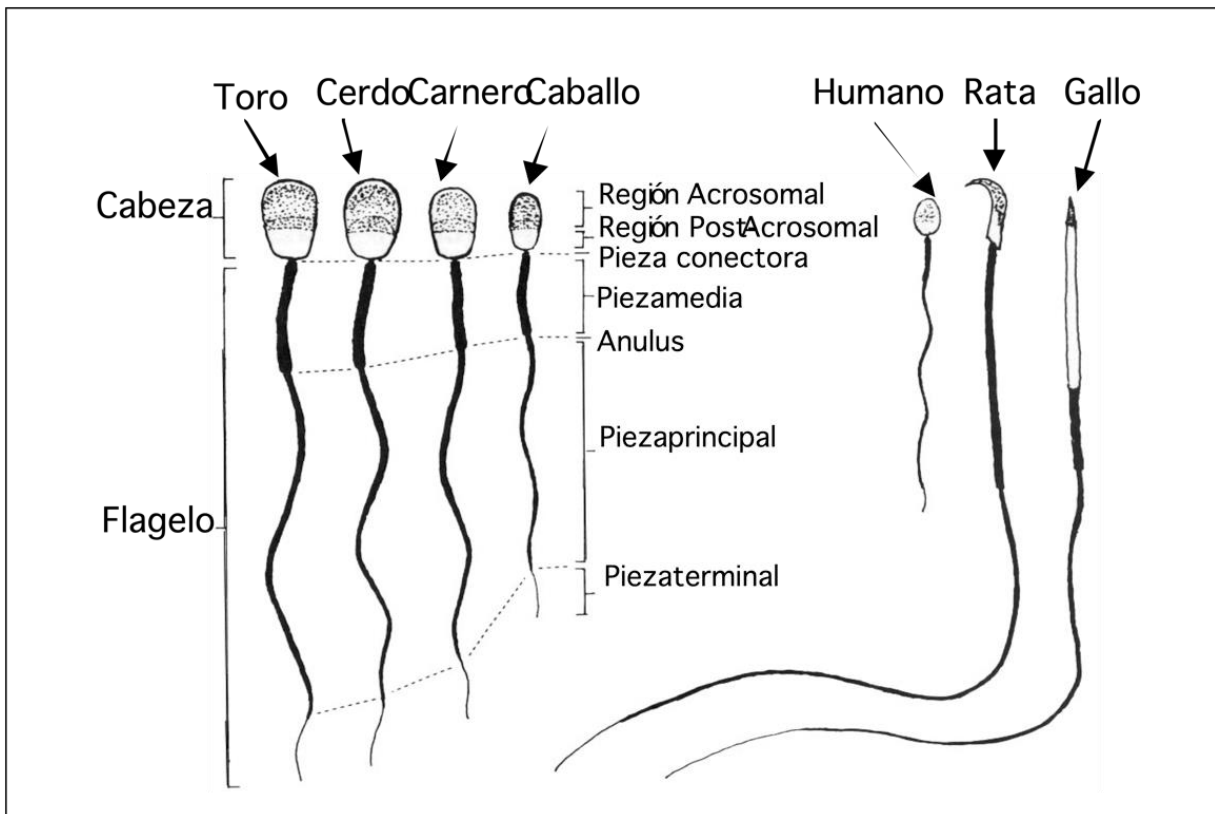
Debido a la pérdida de organelos celulares y a la incapacidad de llevar a cabo la transcripción de ADN, los espermatozoides no pueden llevar a cabo expresión de proteínas ni transporte vesicular. Es por ello que, proteínas; fosfolípidos, colesterol y otros componentes de la membrana plasmática no pueden ser nuevamente sintetizados [43; 82].

Por otro lado, se ha demostrado que existen genes específicos de testículo y muchos de ellos se expresan durante la espermatogénesis. Se han clonado

aproximadamente 40 genes, la mayoría de ellos se expresan en los espermatocitos primarios en la profase de la primera división meiótica. Se han identificado 11 genes que codifican proteínas específicas del espermatozoide. Esto sugiere que la formación de espermatozoides aptos para la fertilización depende de los mecanismos que regulan la expresión génica durante la primera división meiótica y las primeras fases de maduración de la espermátida [137].

### ***Estructura del espermatozoide***

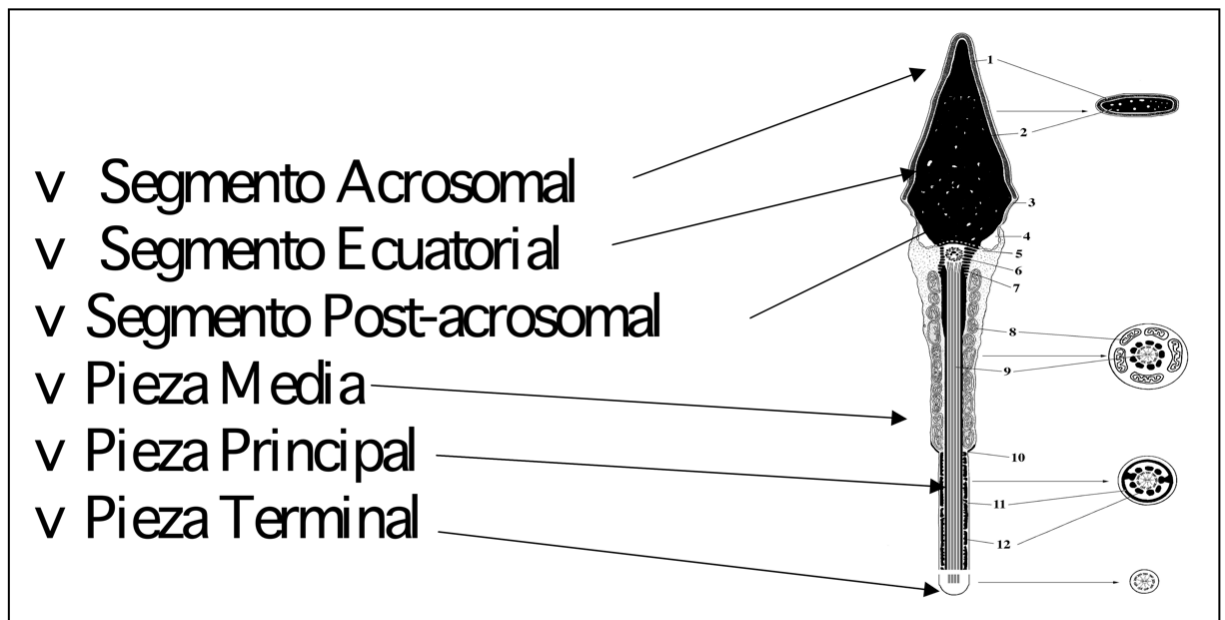
Los espermatozoides de mamíferos son células alargadas de aproximadamente 65  $\mu\text{m}$  de largo. Están compuestos por una cabeza aplanada (núcleo haploide) y un flagelo que contiene el aparato necesario para la movilidad celular, ambas estructuras, están unidas por una pieza conectora. El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática. En la mayoría de las especies de animales domésticos los espermatozoides tienen tamaño y forma uniforme (Figura 2) [46].



**Figura 2.** Comparación de espermatozoides de animales domésticos y otros vertebrados. Se observan las principales características estructurales [46].

La cabeza del espermatozoide mide aproximadamente  $5\mu\text{m}$  de largo, se caracteriza por presentar un núcleo de forma plana y oval que contiene a la cromatina altamente condensada. La cabeza está dividida en: segmento acrosomal, segmento ecuatorial y segmento post-acrosomal. El acrosoma es un saco membranoso situado entre la membrana plasmática y la parte anterior del núcleo. Contiene varias enzimas: hialuronidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasa y acrosina. Cada uno de los segmentos o dominios, están separados por una barrera estructural y funcional. El ecuador divide

la porción caudal de la cabeza del segmento acrosomal. El anillo posterior separa la cabeza de la pieza media y el anulus separa la pieza media de la pieza principal [46; 61; 137]. De esta manera, la membrana plasmática proporciona al espermatozoide una superficie altamente regionalizada en su estructura y en sus funciones (Figura 3) [51].



**Figura 3.** Ultraestructura del espermatozoide de humano. La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar organizada en dominios o segmentos, los cuales difieren notablemente en su composición y función [51].

El flagelo está compuesto por pieza conectora, pieza media, pieza principal y pieza terminal. El cuello forma una placa basal en la superficie posterior del núcleo, mide aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de largo y conecta a la cabeza con el resto del flagelo. El flagelo está constituida por microtúbulos, denominados en su conjunto axonema, está revestida por una membrana celular muy fina y una serie de mitocondrias que rodean el axonema en la porción proximal del flagelo. Esta estructura es la responsable del movimiento flagelar por la energía proporcionada de la fosforilación oxidativa y la participación de una enzima llamada dineína [46].

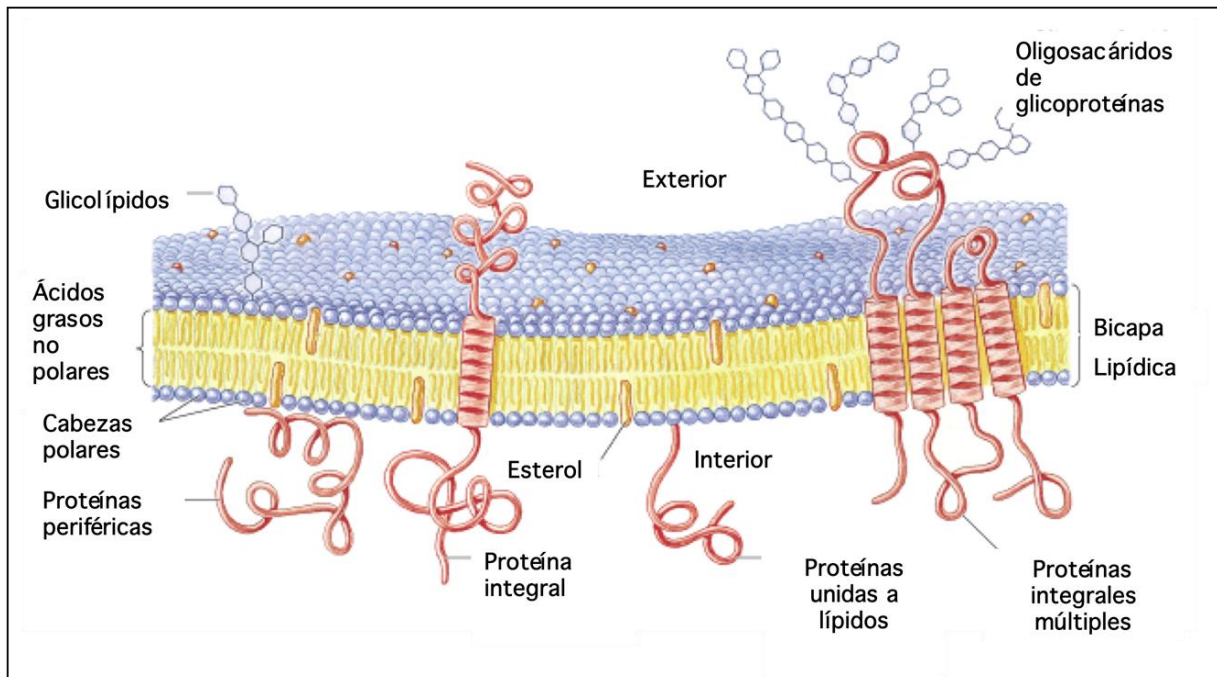
### ***Membrana Plasmática***

La membrana plasmática define a la célula y limita las diferencias entre el citoplasma y el medio extracelular. En todas las células, la membrana plasmática tiene proteínas que actúan como sensores de señales externas. A pesar de las diferentes funciones, todas las membranas biológicas presentan una estructura general en común (Figura 4) [5].

La membrana plasmática del espermatozoide está constituida por agrupaciones de moléculas lipídicas y proteínicas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor. La bicapa lipídica constituye la estructura básica y actúa como una barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles [61]. La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide es variable,



contiene un 70% de fosfolípidos, 25 % lípidos neutros, principalmente colesterol y un 5 % de glicolípidos [43].



**Figura 4.** Estructura de la membrana plasmática de una célula eucariote [92].

Los fosfolípidos de las células espermáticas, generalmente son comparables a los de las células somáticas. Por ejemplo, el espermatozoide humano contiene un 50 % de fosfatidilcolina, 30 % de fosfatidiletanolamina, 12.5 % de esfingomiélinea, 3% de fosfatidilserina, 2.5 % de cardiolipina y cerca del 2 % de fosfatidilinositol [43].

El espermatozoide tiene una composición de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina diferente a la de las células somáticas [43]. Durante la capacitación, los niveles de fosfatidilcolina pueden aumentar debido a la metilación de la fosfatidiletanolamina [43; 121]. En cuanto a la concentración de colesterol, ésta puede variar entre espermatozoides de diferentes especies. El espermatozoide de humano contiene una alta concentración de colesterol (40% del total de lípidos), sin embargo el cerdo contiene mucho menor cantidad, alrededor del 22% del total de lípidos [19; 43].

La mayoría de los glicolípidos en los espermatozoides y en las células espermátogénicas es el sulfatogalactosilglicerolípidio (SGG), el cual se puede encontrar también en cerebro. El SGG está presente tanto en el flagelo como en la cabeza de los espermatozoides. Un anticuerpo monoclonal de SGG reacciona con el segmento ecuatorial y la pieza media del espermatozoide vivo [43]. Las moléculas lipídicas presentan la asimetría más marcada y constante en cuanto a su distribución en la membrana plasmática de las células animales; las principales son los glicolípidos, que se caracterizan por estar únicamente en la mitad exterior de la bicapa, quedando sus grupos de carbohidratos al descubierto en la superficie de la célula [43].

Las moléculas proteínicas están incluidas en la bicapa lipídica y realizan diversas funciones, entre las que se encuentran: el transporte de moléculas específicas hacia el interior o exterior de la célula, actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales. La membrana plasmática se caracteriza por estar subdividida en regiones llamadas dominios, que difieren en composición y función. Cada dominio

de la membrana plasmática tiene una función específica. El segmento acrosomal es el sitio de unión del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) y donde ocurre la reacción acrosomal (RA). El segmento ecuatorial, es el sitio de fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito y evita que se difundan los componentes de la región acrosomal a la post-acrosomal y viceversa [159].

La membrana plasmática de los espermatozoides eyaculados mantiene un gran dinamismo para interactuar con los líquidos y células epiteliales del tracto genital femenino y consecuentemente experimentar una reorganización molecular en el oviducto hasta que el espermatozoide alcance la capacidad de fertilizar al ovocito [129; 137].

### ***Glicolema***

En la membrana externa del espermatozoide se han identificado más de 300 diferentes proteínas, algunas de ellas están glicosiladas y forman lo que se conoce como glicolema o glicocálix. El glicolema está formado por residuos de carbohidratos unidos a lípidos y proteínas. No todas estas estructuras están fuertemente unidas a la membrana de la superficie del espermatozoide, algunas están intercaladas en la bicapa lipídica, por ejemplo en proteínas transmembranales. Se considera que la mayoría de las interacciones entre el espermatozoide y su ambiente están reguladas por esta estructura [29; 120].

El glicolema del espermatozoide representa la interfase entre el gameto masculino y el ambiente extracelular. Por medio de microscopía electrónica se determinó que es una estructura delgada y heteromorfa que varía entre 20 y 60 nm de

grosor [131]. El glicolema comprende entre 50 y 150 diferentes glicoconjugados. Esto sugiere que tanto su heterogeneidad como su microgeografía son parte de la compleja funcionalidad que presenta el espermatozoide durante su existencia pos-testicular [120].

Las uniones de los carbohidratos con las proteínas pueden ser de tipo N-glicosídico sobre un residuo de asparagina, o bien del tipo O-glicosídico sobre el grupo hidroxilo de una serina o de una treonina. Los glúcidos fijados pueden ser residuos de hexosa, manosa, galactosa, fucosa, hexosamina (D-glucosamina, D-galactosamina) o ácido siálico [29; 141].

### ***Maduración del espermatozoide***

Cuando los espermatozoides son liberados de los túbulos seminíferos, son inmóviles e incapaces de fertilizar al ovocito [96], adquieren estas propiedades al pasar por el epidídimo, donde se producen cambios en su función, composición y organización [96, 159]. Los cambios funcionales ocurren en su proceso metabólico que favorece la actividad flagelar y la capacidad de unión con la ZP. Los cambios en la composición y organización de los componentes de la membrana plasmática ocurren para favorecer su funcionalidad. Esto se ve reflejado por variaciones a nivel de superficie, distribución de partículas intramembranales, fluidez de la membrana, composición lipídica, composición proteínica y anticuerpos unidos a la superficie del espermatozoide [43; 82].

Los cambios principales que se producen en la superficie del espermatozoide durante la maduración epididimaria son: a) incremento en la carga neta superficial, el cual ocurre en la parte terminal del epidídimo, en la mayoría de las especies [88; 99]; b) modificaciones en la cantidad de sacáridos y glicoproteínas en la superficie de los espermatozoides; c) aumento en la cantidad de ácido siálico [24; 113]; y d) disminución en el contenido de lípidos, especialmente de colesterol [8]. Los cambios en la cantidad, composición y distribución de lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante su maduración en el epidídimo, le permiten adquirir su capacidad fusogénica para realizar con éxito la reacción acrosomal y la fusión con el óvulo [96].

Durante la maduración epididimaria, la membrana plasmática del espermatozoide cambia su composición proteínica, principalmente en su contenido glicoproteínico [96; 159]. Estos cambios pueden deberse a la adición de componentes nuevos a la superficie del espermatozoide, modificación de componentes preexistentes o pérdida de elementos de la superficie de la membrana. Los cambios se han identificado mediante pruebas bioquímicas, usando anticuerpos específicos para diferentes componentes de la superficie de la membrana y por medio del uso de lectinas o fluorocromos en la superficie del espermatozoide.

En espermatozoides de rata obtenidos en la parte terminal del epidídimo, se identificaron glicoproteínas de 37 kDa, las cuales no se encontraron en el cuerpo del epidídimo [99; 100]. En otros estudios se identificaron glicoproteínas con peso molecular de 31 a 37 kDa utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida [96; 159]. Hasta la fecha no se conocen en detalle todos los cambios realizados en la superficie. Tulsiani y col. [138] mostraron evidencias de que en la membrana plasmática hay

glicoproteínas que contienen uniones O-glicosídicas y N-glicosídicas, las cuales pueden ser modificadas por enzimas que modifican los glicanos, tales como las glicohidrolasas y glicosiltransferasas presentes en el fluido luminal del epidídimo. Por medio de lectinas se observaron glicoproteínas positivas a PNA (*Arachis hipogea* aglutinina) con subunidades con masa molecular de 135-150 kDa en la superficie de espermatozoides presentes en la región de la cabeza pero no en la región del cuerpo por lo que se sugiere que estas glicoproteínas pueden ser degalactosadas por digestión enzimática por  $\beta$ -D-galactosidasa. También se observaron glicoproteínas con uniones N-glicosídicas con PM de 86 kDa, las cuales son fucosiladas en el epidídimo, se considera que estas moléculas pueden sufrir cambios por la degalactosilación o fucosilación [138].

La función de estos cambios en la superficie celular aún no se ha comprendido en su totalidad, al parecer la adsorción de proteínas está relacionada con la unión del espermatozoide al ovocito. En la mayoría de los mamíferos, los espermatozoides están completamente maduros cuando llegan a la parte terminal del epidídimo [31].

Otros cambios en la membrana plasmática del espermatozoide se originan cuando el espermatozoide entra en contacto con el plasma seminal durante el proceso de eyaculación [56]. Algunos de los cambios que ocurren en la superficie del espermatozoide como resultado de la eyaculación se han detectado por medio del uso de lectinas, las cuales tienen afinidad específica por residuos de azúcares. Los espermatozoides pueden ser cubiertos con proteínas producidas por glándulas accesorias y proteínas presentes en el plasma seminal. Los espermatozoides de

humano unen proteínas de 140 kDa durante la eyaculación [43]. En el conejo se han encontrado proteínas de 20 kDa en el eyaculado pero no en espermatozoides de epidídimo [96]. En el toro se han encontrado proteínas de 25 y 14 kDa unidas a espermatozoides eyaculados [145].

### ***Capacitación Espermática***

Los primeros hallazgos en la capacitación espermática fueron descritos por Austin en 1951 (citado por Yanagimachi) [159]. La capacitación espermática consiste en el desarrollo funcional que sufre el espermatozoide cuando ocurre una serie de modificaciones estructurales y bioquímicas como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor femenino. Este proceso es necesario y provee al espermatozoide las condiciones necesarias para que efectúe la fertilización. Dentro de estas modificaciones se eliminan o alteran moléculas que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide durante su maduración [43; 59].

La capacitación induce cambios a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide que le permite aumentar la afinidad por la ZP [57; 58]. En la superficie del espermatozoide se presentan eliminación, modificación y redistribución de glicoproteínas periféricas e integrales, cambios en la estructura lipídica (fosfolípidos), desestabilización de la membrana plasmática, remoción de agentes descapacitantes, activación de sitios receptores y es hasta entonces que se obtiene la capacidad de realizar la reacción acrosomal. Ésta, consiste en la ruptura y fusión de la membrana

plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por una vesiculación en el segmento anterior del acrosoma. Esto permite la liberación de las enzimas acrosomales hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina [43; 48; 141].

La capacitación es un proceso gradual de desestabilización de las membranas del espermatozoide, ocurriendo asincrónicamente en una población heterogénea de células y que culmina con la reacción acrosomal. La proporción de cada subpoblación dependerá del grado de desestabilización de la membrana espermática [84]. Así, la capacitación es un proceso que se inicia bajo condiciones específicas y no todos los espermatozoides responden a las mismas condiciones de manera sincrónica [59].

El mecanismo de la capacitación espermática es muy complejo, por ello se ha estudiado intensamente bajo condiciones *in vitro*, aunque el modelo debe ajustarse a las condiciones *in vivo*. La capacitación se inicia en la membrana plasmática, donde la membrana recibe varias señales que se internalizan a la célula. La relación colesterol-fosfolípidos de la membrana celular decrece con la capacitación, se considera que las moléculas de albúmina presentes en el tracto reproductor femenino pueden secuestrar el colesterol de los espermatozoides. La eliminación de colesterol genera un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática y consecuentemente permite el ingreso del bicarbonato de sodio a la célula [43], también se enfatiza la importancia del bicarbonato de sodio y del  $\text{Ca}^{2+}$ , en este proceso [127; 128]. Los carbohidratos se pierden del glicocálix del espermatozoide durante la capacitación tanto los unidos a proteínas, como a lípidos. La redistribución de glicolípidos se ha mostrado como la liberación de factores descapacitantes [1; 41; 42], así como de otras moléculas que se unen a la membrana plasmática del espermatozoide [135]. Es



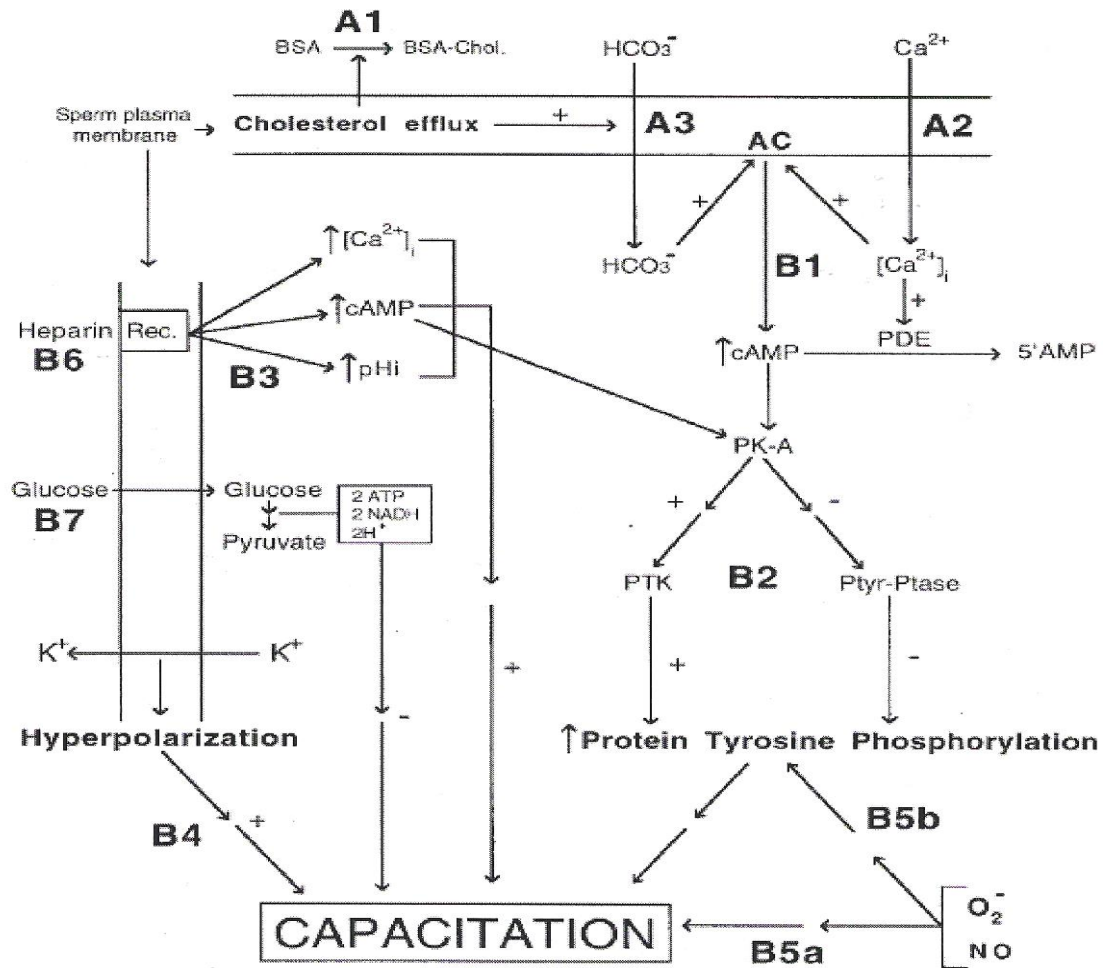
posible que los carbohidratos bloqueen los sitios de reconocimiento para las proteínas de la ZP. Los cambios en los carbohidratos de las glicoproteínas involucran una disminución en las cargas como reflejo de la pérdida de los azúcares terminales [73].

El potencial de membrana del espermatozoide se vuelve más negativo con la salida de iones de  $K^+$ . Este cambio en el potencial de la membrana permite la activación de los canales de calcio, permitiendo la entrada de iones  $Ca^{2+}$  al espermatozoide. El  $Ca^{2+}$  y los iones bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) activan a la adenilato ciclasa lo que incrementa al AMPc el cual activa a la proteína cinasa A, que desencadena una cascada que llega a la fosforilación de las proteínas de la membrana del espermatozoide [146; 147]. Todos estos procesos culminan en la “capacitación espermática” (Fig 5) [148].

Se ha demostrado en algunas especies de mamíferos incluyendo el humano y ratón, que un número considerable de proteínas llega a fosforilarse por acción de la tirosina cinasa durante la capacitación *in vitro* [147]. Sin embargo, las investigaciones que se realizan sobre capacitación *in vitro*, son un potencial para examinar el efecto de diferentes compuestos que median o inhiben la fosforilación de las proteínas durante la capacitación. Uno de los compuestos más importantes en la fosforilación es el bicarbonato y su omisión no sólo inhibe la fosforilación proteínica [76, 148], sino que también disminuye la posibilidad de que el espermatozoide se una con la ZP [57]. La albúmina interviene movilizándolo el colesterol, sin embargo, no es del todo clara su función sobre la fosforilación [32; 101]. Otro componente importante en la capacitación es el calcio, su acción directa sobre el sistema de la tirosina cinasa en la fosforilación

de proteínas ha sido difícil de examinar debido a que varios procesos requieren de calcio, además de que existen diferencias entre especies [32].

Se ha demostrado en diferentes especies de mamíferos incluyendo el humano, que un número considerable de proteínas llega a fosforilarse por acción de la tirosina cinasa durante la capacitación *in vitro* [147]. Sin embargo, las investigaciones que se realizan sobre capacitación *in vitro*, son un potencial para examinar el efecto de diferentes compuestos que median o inhiben la fosforilación de las proteínas durante la capacitación. Uno de los compuestos más importante en la fosforilación es el bicarbonato, y su omisión no sólo inhibe la fosforilación proteínica [148; 76], sino que también disminuye la posibilidad de que el espermatozoide se una con la zona pelúcida [57]. La albúmina interviene movilizándolo el colesterol, sin embargo, no es del todo clara su función sobre la fosforilación [32; 101]. Otro componente importante en la capacitación es el calcio, su acción directa sobre el sistema de la tirosina cinasa en la fosforilación de proteínas ha sido difícil de examinar debido a que varios procesos requieren de calcio, además, existen diferencias entre especies [32].



**Figura 5.** Representación esquemática de las rutas hipotéticas de señalización transmembranal e intracelular que regulan la capacitación en espermatozoides de mamífero [148].

Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden elevarse por entrada de bicarbonato, vía canales iónicos en la membrana plasmática ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  [4], intercambio  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  [63]. Una explicación para la entrada de bicarbonato al espermatozoide es que los niveles de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  se encuentran en equilibrio en los compartimentos intracelulares y extracelular por la difusión del gas a través de la membrana plasmática del espermatozoide [102]. La anhidrasa carbónica que está presente en la cabeza del espermatozoide podría estar involucrada en mantener los niveles altos de bicarbonato intracelular, por conversión del  $\text{CO}_2$  que se difunde [102].

El bicarbonato de sodio es capaz de unirse a adenilato ciclasa (AC) en sitios específicos del espermatozoide y desencadenar un aumento en los niveles de AMPc [149]. Los altos niveles de AMPc activan a las proteínas cinasas dependiente de AMPc (PKA) y la activación de éstas induce las vías de fosforilación de tirosina [76].

Se han identificado diferentes vías de señalización en el espermatozoide:

- a) En espermatozoides de ratón, los inhibidores específicos de PKA inducen la disminución en la fosforilación de la tirosina durante la capacitación.
- b) La estimulación de PKA por activación de análogos de AMPc [148] o por inhibidores de la fosfodiesterasa induce la fosforilación de tirosina [66].
- c) La inhibición de fosfatasas que son específicas para residuos de fosfoserina y fosfotreonina (PP1 y PP2A) incrementan el número de espermatozoides capacitados [44].

Además, se ha demostrado que la fosforilación de tirosina en proteínas espermáticas incrementa la afinidad con la ZP [109], la reacción acrosomal [16] y la hipermovilidad del espermatozoide [91].

## ANTECEDENTES

Las células espermáticas son células altamente especializadas. No tienen la capacidad de sintetizar proteínas después de la espermatogénesis debido a la falta de ribosomas y retículo endoplásmico. Las principales modificaciones postraduccionales y la redistribución de glicoproteínas de la membrana plasmática ocurren antes y/o durante la fertilización.

Varios autores han estudiado la composición del glicolema del espermatozoide, la mayoría de ellos han utilizado lectinas específicas, las cuales se unen a diferentes azúcares para mostrar los residuos de carbohidratos que forman la superficie del espermatozoide [10; 27; 37], además proporcionan información sobre los cambios en las concentraciones de azúcares en la superficie espermática durante la maduración y la capacitación del espermatozoide [43; 96].

Una de las principales complicaciones en el estudio de la capacitación, es el poder discriminar entre los espermatozoides capacitados, cuáles podrán llevar a cabo la reacción acrosomal y cuáles resultan dañados bajo las mismas condiciones [42].

Existen diversos métodos para estudiar los cambios en la superficie de la membrana entre ellos están, el marcaje con hierro coloidal, la actividad de neuroaminidasa [80; 159], el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales, la utilización de fluorocromos unidos a diferentes lectinas. Una vez realizado el marcaje, las células pueden ser analizadas mediante microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo [37; 64; 65; 34].

## ***Lectinas***

Las lectinas son proteínas unidas covalentemente a carbohidratos, se aíslan de una amplia variedad de plantas y de algunos animales. Se caracterizan como ligandos de azúcares por que presentan dos o más valencias para unirse o aglutinarse a ligandos específicos de carbohidratos presentes en la superficie celular [70]. Las lectinas se consideran muy valiosas en el campo de la Biología, Biomedicina y la Genética. Su utilidad se basa en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares. Las interacciones de las lectinas con células pueden ser inhibidas específicamente por azúcares, esto ha permitido utilizarlas como marcadores en técnicas histoquímicas y en microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática [27].

Dentro de los estudios de membrana se ha reportado en la literatura el uso de lectinas para estudiar la localización de los sitios de unión a lectinas, cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares durante procesos fisiológicos, distribución subcelular de moléculas terminales glicoproteínicas e identificar alteraciones en la expresión de moléculas presentes en la superficie celular [70]. Para estos estudios generalmente se utilizan lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes como Isocianato de fluoroceína (FITC), o ultraestructurales, peroxidasa, biotina y oro coloidal, entre otros [2; 35; 45].

Las lectinas más utilizadas se muestran en la Tabla 1. El uso de lectinas unidas a colorantes fluorescentes ha permitido mostrar una amplia variedad de azúcares unidos tanto en la parte terminal como en el centro del complejo de los polisacáridos.

Origen	Abreviación	Especificidad
<i>Ricinus communis</i>	RCA	$\alpha$ -galactosa (-Gal)
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSL BS-1-A	$\alpha$ -D-N-Acetilgalactosamina ( $\alpha$ -D-NAcGal)
<i>Lens culinaris</i>	LCA	$\alpha$ -Manosa ( $\alpha$ -Man)
<i>Datura stramonium</i>	DBA	N-Acetilgalactosamina (NAcGal)
<i>Arachis hypogae</i>	PNA	$\alpha$ -D-galactosa (-D-Gal)
<i>Pisum sativum</i>	PSA	$\alpha$ -Manosa ( $\alpha$ -Man)
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	N-Acetilglucosamina y/o ácido siálico (NAcGlc)
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	$\alpha$ -D-Manosa (D-Man)
<i>Maclura pomifera</i>	MPA	$\alpha$ -D-galactosa (-D-Gal)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA	$\alpha$ -galactosa (-Gal)
<i>Ulex europaeus</i>	UEA	L-Fucosa (L-Fuc)
<i>Lotus tetragonolobus</i>	FBP	$\alpha$ -L-Fucosa ( $\alpha$ -L-Fuc)
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	N-Acetilgalactosamina (NAcGlc)
<i>Vicia faba</i>	VFA	$\alpha$ -Manosa ( $\alpha$ -Man)
<i>Limulus polyphemus</i>	LPH	N-Acetilgalactosamina (NAcGal)

Tabla 1: Principales lectinas de uso común para el estudio de la superficie de la membrana celular [15; 50].



## ***Estudios con lectinas en diversas especies de mamíferos***

Estudios en espermatozoides de diferentes especies indican que la superficie celular contiene una amplia variedad de carbohidratos disponibles a lectinas, además se observó que la distribución no es uniforme y está depende de la especificidad de la lectina, así como de la especie que se esté analizando [70].

En varias especies de mamíferos (hámster, cobayo, rata, conejo, toro, cerdo y caballo), por medio de lectinas marcadas se localizaron específicamente los carbohidratos presentes en la membrana del espermatozoide [70; 77; 3; 2]. En la mayoría de las especies examinadas se observa una fijación de las lectinas en membranas específicas. Se mostró un patrón de tinción con MPA, BPA, GSL, Con-A, y WGA, lo que indica la presencia de residuos de galactosa, glucosa, manosa,  $\alpha$ -D-galactosa y N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, principalmente la región de la cabeza mostrando mayor concentración en la región del acrosoma, en la región post-acrosomal no se mostró tinción [2;77].

En ratón se localizó la distribución de los sitios de unión de diferentes lectinas relacionadas principalmente con la región de la cabeza del espermatozoide [77]. La región acrosomal y post-acrosomal contiene azúcares específicos para BS-I-A, DBA, LPA, UEA y Con-A, pero la región flagelar presenta un patrón de tinción débil excepto para MPA y FBI. Algunas lectinas (PNA, RCA y WGA), muestran sitios de unión exclusivamente en el acrosoma. La presencia de estas lectinas en la región acrosomal es importante porque, galactosiltransferasa, que es un receptor para ZP, se encuentra presente en esta región y es reconocible por las tres lectinas [151].

Las lectinas más comúnmente utilizadas para el estudio de superficie de membrana son PNA, WGA y Con-A entre otras. La lectina WGA se puede utilizar como un marcador para la membrana plasmática mientras que la lectina PNA se utiliza como un marcador para la membrana acrosomal externa. Sin embargo, PNA, Con-A o PSA pueden también detectar carbohidratos específicos de la parte interna del acrosoma. Estudios de la membrana del espermatozoide mediante citometría de flujo, microscopía electrónica y microscopía de fluorescencia han demostrado que la fijación de las lectinas sobre las membranas plasmática y acrosomal depende del grado de avance en el tiempo de la capacitación y la RA [37; 34].

La lectina Con-A se utiliza para determinar la integridad del acrosoma. En espermatozoides de diversos mamíferos, se han realizado estudios ultraestructurales, se observaron residuos de manosa localizados preferencialmente en la membrana interna del acrosoma [116]. En humano Con-A se une a la región anterior de la cabeza del espermatozoide capacitado; al inducir la RA, se observó que la lectina se une a la región ecuatorial y a la membrana acrosomal interna (Fierro, 1996 ;Vázquez, 1996 ). La aparición de estos receptores en la superficie del espermatozoide se incrementa durante la capacitación, lo que sugiere que la expresión de los residuos de manosa se relaciona con el estado acrosomal del espermatozoide y su potencial fertilizante (Cheng, 1995 ;Mori, 1989 ).

En humano, estudios con citometría de flujo y microscopía electrónica, demostraron que la fijación de las lectinas sobre las membranas plasmática y acrosomal depende del grado de avance en el tiempo de la capacitación y la RA. Se mostró que los residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico se localizan

principalmente sobre toda la membrana plasmática del espermatozoide, la galactosa se encontró a nivel de la membrana externa del acrosoma; los residuos de manosa y de fucosa se localizaron principalmente sobre la membrana interna del acrosoma ([37]).

En cerdo se han realizado algunos estudios con las lectinas Con-A, WGA y PNA para evaluar la integridad del acrosoma. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de unión a las lectinas después de la RA (Vázquez, 1996 ). Existe pocos estudios en donde se evalúan cuantitativamente las poblaciones de espermatozoides en los procesos de capacitación y RA *in vitro*.

En cerdo, por medio de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, se demostró la presencia de residuos de manosa, ácido siálico, N acetilglucosamina y fucosa en la membrana del espermatozoide. Al mismo tiempo se observó que la distribución de estas moléculas cambia durante la capacitación y la RA. Se observó que los residuos de fucosa y N-acetilglucosamina y/o ácido siálico disminuyen considerablemente durante la capacitación y la RA, mientras que los receptores a manosa se incrementan después de la capacitación y disminuyen ligeramente con la RA. Se considera que los cambios en la expresión de estos receptores podrían ser utilizados como indicadores del proceso de capacitación y RA [65].

Por otro lado, existe controversia con respecto a la lectina UEA, que es específica para residuos de fucosa, UEA se une sólo a la región post-acrosomal del espermatozoide. En espermatozoides de humanos recién eyaculados no presentan unión de la lectina UEA (Ahuja, 1985 ;[77] ). Otros autores observaron que después del lavado de espermatozoides, se aprecian residuos de fucosa en la membrana

plasmática de la región post-acrosomal, en el cuello y en la pieza media [10]. Posteriormente se detectó la aparición de residuos de fucosa en la membrana interna del acrosoma y en las vesículas acrosomales solamente dos horas después de haber inducido la RA [35].

Se logró demostrar la presencia de residuos de fucosa en espermatozoides de cerdo y detectar sus modificaciones durante la capacitación y la RA. Al parecer, los residuos de fucosa son importantes para el reconocimiento entre los gametos [65]. Hasta la fecha no se conoce con exactitud la participación de este carbohidrato durante la fertilización, pero se requiere de su presencia para que el espermatozoide se una al ovocito [118].

A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre la capacitación y la RA, estos fenómenos son tan complejos que todavía quedan muchas interrogantes por contestar. En humanos algunos investigadores han empezado a correlacionar los resultados de la evaluación espermática con la aparición o desaparición del marcaje con lectinas. Por ejemplo, los espermatozoides que no fijan PNA por lo general presentan alto porcentaje de formas anormales al ser estudiados en microscopía electrónica [111], además se encontró una disminución en la expresión de Con-A en pacientes que presentan problemas de fertilidad [130; 160].

En animales se ha mostrado que la alteración en los patrones de unión de lectinas está relacionada con problemas de fertilidad. En cerdo se observó diferencia en la distribución de los receptores. Se mostró una menor expresión de N-acetilglucosamina y /o ácido siálico en la superficie de espermatozoide de cerdos subfértiles. Con respecto a los residuos de manosa no se modificaron durante la

capacitación y la RA, por lo que se considera que estas moléculas podrían estar relacionadas con la capacidad fertilizante del espermatozoide [64]. Nuestros resultados indican que disminuye la población de espermatozoides que realizó la RA y concuerda con los datos obtenidos con las mismas muestras en las que se evaluó la RA mediante otra metodología (Herrera, 2002 ). Por lo tanto consideramos que la expresión diferencial de estos receptores podría ser uno de los indicadores de espermatozoides de cerdos subfértiles.

Se reportó en espermatozoides humanos que la localización y la concentración de receptores a WGA están directamente asociados con la fertilidad masculina ya que los residuos de WGA se encontraron disminuidos en muestras de semen con alteraciones morfológicas [45]. Así mismo, se encontró que bajas concentraciones de WGA impiden que los espermatozoides activen al ovocito y reducen la fertilización. Estas observaciones sugieren que los sitios de unión a WGA en la membrana plasmática podrían ser parte de un complejo receptor-activación del espermatozoide [36].

En la mayoría de las especies de mamíferos se han estudiado los cambios en la unión de diversas lectinas durante la capacitación y la RA, sin embargo, algunos de los resultados son contradictorios. La mayoría de ellos demuestran que durante la capacitación ocurre una modificación de los carbohidratos presentes en la membrana plasmática.

Estudios empleando carbohidratos específicos como exoglicosidasas e inhibidores de síntesis de glicoproteínas sugieren que hay una gran variedad de oligosacáridos sintetizados por la vía de unión a lípidos (N-ligando) que están

expresados en la superficie del espermatozoide y sirven como carbohidratos involucrados en la fertilización de mamíferos [3]. La mayoría de los estudios se han enfocado en la importancia de los cambios en la distribución de carbohidratos de los dominios de la membrana durante la maduración, la capacitación y la reacción acrosomal. Sin embargo durante la fertilización, los carbohidratos juegan un papel importante. La unión inicial entre los gametos implica el reconocimiento de proteínas glicosiladas presentes tanto en la ZP como en la superficie del espermatozoide [16; 12; 133; 152].

### ***Estudios sobre glicoproteínas relacionadas con la interacción entre gametos***

Una de las etapas decisivas en la fertilización es el reconocimiento y la interacción entre moléculas complementarias presentes en el espermatozoide y la ZP ([159; 152; 17]. Las moléculas de la membrana plasmática no están estáticas en los dominios, éstas pueden ser redistribuidas en dominios adyacentes o sufrir modificaciones bioquímicas. Durante la maduración, la capacitación y la RA, varias moléculas del acrosoma y de la membrana plasmática son modificadas bioquímicamente o son resituadas en otros dominios; estos cambios secuenciales son necesarios para la fertilización [115]. Los espermatozoides capacitados pueden reconocer y unirse a los residuos de glicanos bioactivos en la capa extracelular del ovocito, es decir a la ZP. En diversas especies la unión del espermatozoide a la ZP se realiza en dos etapas: la adhesión y la unión. La adhesión está definida como una

asociación no específica y relativamente débil, entre la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y la ZP. La unión es la interacción relativamente fuerte entre el acrosoma intacto de espermatozoides capacitados y la ZP, dicha interacción es especie-específica [159; 156].

La adhesión y la unión son etapas reguladas por proteínas unidas a glicanos (mono u oligosacáridos). Estas glicoproteínas cuando pertenecen a la membrana de espermatozoides reciben el nombre de receptores, y cuando pertenecen a la ZP, se les denomina ligandos. El reconocimiento entre el ligando y el receptor inicia una cascada de señales de transducción provocando la exocitosis del contenido acrosomal, es decir la RA; esta etapa es un prerequisite para que el espermatozoide penetre a la ZP y fertilice al óvulo [17; 159].

La ZP es una capa de glicoproteínas que rodean al ovocito de los mamíferos. La ZP está formada por tres familias de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 que difieren en sus propiedades funcionales e inmunológicas [90; 106]. La ZP está involucrada en varios eventos incluyendo: la especificidad de especie, activación del espermatozoide (inducción de la RA), bloqueo a la polispermia y protección del embrión durante su crecimiento. Estudios en ratón sugieren que la función de estas proteínas se encuentra relacionada con el reconocimiento del espermatozoide por la ZP [151]. Estudios tanto a nivel molecular como bioquímico, han demostrado que la ZP3 es la responsable de la unión primaria del espermatozoide a la ZP e inducir la RA (Lasserre, 2003 ;Rankin, 2000 ), mientras que la ZP2 podría participar en la unión secundaria a la ZP. En cerdo, los oligosacáridos con enlaces O-, y N-glicosídicos de

la ZP3 son de importancia para iniciar la unión del espermatozoide (Wassarman, 2001; Yurewicz, 1998).

En diferentes especies de mamíferos la estructura de la ZP consta de tres familias de glicoproteínas, a excepción del cerdo que contiene cuatro. Sin embargo la membrana plasmática que cubre al espermatozoide es una estructura mucho más compleja, presenta varias proteínas o glicoproteínas que existen como receptores moleculares en el espermatozoide. Hasta este momento se tiene poca información acerca de la identidad molecular y caracterización bioquímica de las proteínas receptoras que participan en la unión primaria y secundaria a la ZP. Se han reportado diversas proteínas de superficie del espermatozoide que reconocen a la ZP (Wassarman, 1999; Dell, 1999), varias de ellas tienen propiedades de lectina como las espermadhesinas, zonadhesina, sp56 . Algunas de las proteínas de unión a ZP en la superficie del espermatozoide son glicoenzimas, tales como la  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (GalTasa) y la  $\alpha$ -D-manosidasa (Wassarman, 2001; Wassarman, 2002; Nixon, 2001; Nieto, 1997; Cornwall, 1991). Estas moléculas se unen a su sustrato, azúcares de la ZP, por lo que son consideradas como la base de la unión entre el espermatozoide y la ZP. En humano se ha propuesto que varias proteínas participan en este proceso, como el antígeno FA-1, el receptor ZRK, P34H y una lectina unida a manosa (Lasserre, 2003), en cobayos la proteína PH-20 (Primakoff, 2002; Primakoff, 1988), en ratón un receptor a tirosina cinasa (p95) (Leyton, 1989), y en conejo la RSA (Sp17) (O'Rand, 1988).



Existe controversia con respecto a la identidad de las proteínas espermáticas de cerdo que participan como moléculas de unión primaria. Entre las más estudiadas en este modelo, se encuentra la proteína de adhesión a zona (APz), la proacrosina/acrosina y la zonadhesina; aunque todas estas proteínas muestran afinidad por la ZP de la misma especie, presentan propiedades diferentes y no se conoce si existe relación entre ellas (Peterson, 1989; Hardy, 1994). Varias de estas moléculas han sido descritas (Tulsiani, 1997) y son mostradas en la Tabla 2.

Carmona y col. [22] mostraron, en espermatozoides de cerdo, una proteína de superficie denominada P68, con capacidad de unirse a la ZP. Se identificó que esta proteína es homóloga a la arilsulfatasa-A (AS-A) de humano [124, 125].

	Receptores propuestos	Ligandos
Ratón	$\beta$ -1,4-Galactosiltransferasa	N-Acetilglucosamina
	Fucosiltransferasa	No se conoce
	Proteína espermática 95kDa	No se conoce
	$\alpha$ -D-Manosidasa	Glicanos Manosilados
	Proteína unida a Galactosa	Residuos $\beta$ -Galactosilados
Cerdo	Espermadesina	No se conoce
	Zonadesina	No se conoce
	Proteína de adhesión (APz)	No se conoce
	Proteína unida a Manosa	Residuos $\alpha$ -Manosilados
	Proteína unida a Fucosa	Residuos $\alpha$ -Fucosilados
Cobayo	PH20	No se conoce

Tabla 2: Proteínas de superficie de espermatozoides de mamíferos y sus residuos de carbohidratos complementarios involucradas en su interacción con el ovocito [139].

## **JUSTIFICACIÓN**

La capacitación y la reacción acrosomal son etapas muy importantes del proceso de la fertilización. Se sabe que durante estos procesos ocurren modificaciones en la distribución de los carbohidratos en la membrana de los espermatozoides. Se han aislado algunas proteínas que intervienen en dichos procesos, sin embargo, lo que se conoce de los cambios en la expresión de los complejos glicoproteínicos es muy poco. En este estudio se pretende determinar cuáles son las proteínas unidas a manosa, a N-acetilglucosamina y a ácido siálico, que sufren cambios importantes en cuanto a su expresión en la membrana celular durante la capacitación de espermatozoides de cerdo.

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que durante la capacitación suceden cambios a nivel de membrana. Se ha encontrado una redistribución de los carbohidratos manosa y N- acetilglucosamina y/o ácido siálico en el transcurso de dicho proceso, se considera que las proteínas asociadas a dichos carbohidratos también se modifican. Por lo anterior, se espera encontrar una disminución en las glicoproteínas membranales presentes en espermatozoides capacitados y no capacitados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las glicoproteínas que se expresan en espermatozoides de cerdo capacitados.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Extracción de proteínas de espermatozoides capacitados y no capacitados.

Aislamiento de glicoproteínas de espermatozoides por cromatografía de afinidad, utilizando las lectinas Con-A y WGA como ligandos fijados a una columna de sefarosa.

Determinación de la masa molecular relativa y el punto isoelectrico de glicoproteínas del extracto mediante Electroforesis Bidimensional.

Secuenciación del extremo amino terminal de las proteínas que presenten expresión diferencial durante la capacitación.

Comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos para identificar las proteínas aisladas.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### ***Obtención de la muestra***

La muestra de semen se obtuvo de la fracción rica del eyaculado por medio de la técnica de la mano enguantada y filtrada a través de una gasa para separar la fracción gelatinosa. Se emplearon muestras de semen recién eyaculado de cerdos clínicamente sanos y fértiles [46]. Se transportaron al laboratorio a una temperatura de 37°C a 39 °C en un tiempo no mayor de 2 horas.

Las muestras fueron clasificadas como normozoospermicas de acuerdo a los criterios descritos por Garner, 1993 [46]. Se utilizaron eyaculados que mostraron más del 85 % de movilidad progresiva, 90 % de viabilidad y menos del 10 % de anomalías espermáticas. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). El agua utilizada en la preparación de las soluciones fue calidad Milli-Q (Millipore).

### ***Evaluación espermática***

En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras por medio de la evaluación espermática básica.

La movilidad se determinó por observación directa al microscopio óptico a 200X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles.

Viabilidad y anomalías morfológicas se determinaron por medio de la técnica de Eosina/Nigrosina de acuerdo a los criterios descritos [39; 114]. La muestra

se diluyó con el colorante a una proporción de 3:1, se preparó un frotis y se dejó secar a 37 °C. Se observó al microscopio óptico. Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideraron como espermatozoides vivos aquellos que no presentaron tinción y como espermatozoides muertos los teñidos en color rojo. Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas. Se analizaron 100 células al microscopio.

### ***Preparación de la muestra***

Los espermatozoides fueron analizados bajo dos condiciones: espermatozoides sin capacitar y espermatozoides capacitados. Se utilizó una mezcla de 3 eyaculados en cada condición.

1) Espermatozoides sin capacitar o frescos: la muestra de semen fue lavada dos veces para eliminar el plasma seminal, usando solución salina de fosfatos (PBS) a pH 7.4, añadiendo un volumen igual de semen. La muestra se centrifugó a 600g durante 10 minutos a 4 °C [64]. Se retiró el sobrenadante y se conservó el paquete celular.

2) Espermatozoides capacitados: De los espermatozoides lavados se tomaron alícuotas de espermatozoides a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL y se depositaron en botellas de cultivo (Nunc Denmark) con 500 mL de medio TALP-HEPES previamente suplementado con albúmina sérica bovina fracción V (6mg/mL) y Piruvato de Sodio 1 mM, a un pH de 7.4 y se incubaron (Incubadora Lab-Line

Instruments, Inc.), durante cuatro horas a 39 °C, en una atmósfera húmeda, 95 % de aire y con 5 % de CO<sub>2</sub> [65].

La capacitación fue evaluada por medio de la tinción de clorotetraciclina (CTC) (Fraser, 1990 ). La CTC se preparó a una concentración de 750 µM en un amortiguador de Tris 20 mM, NaCl 130 mM, L-cisteína 5 mM, a un pH final de 7.8. La solución fue preparada en fresco y se mantuvo en obscuridad. El paquete de células espermáticas se fijó en 10µL de glutaraldehído al 0.2 % en Tris 0.5 M a un pH de 7.4, una suspensión de 5µL de espermatozoides fijados se mezcló con 5 µL de CTC en un portaobjetos y se dejó reposar por un minuto. Finalmente se añadió una gota de 1.4-diaza-biciclo(2.2.2) octano (DABCO) al 0.22 M en glicerol al 90 %, para conservar la fluorescencia. Se analizaron las laminillas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss) a un aumento de 400 X bajo luz ultravioleta a 495-nm para excitar la CTC y determinar el estado funcional de los espermatozoides. Se analizaron 200 células y se clasificaron de acuerdo con los siguientes patrones de tinción: Espermatozoides no capacitados con fluorescencia uniforme en la cabeza y el acrosoma intacto; espermatozoides capacitados con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y presencia de acrosoma intacto; espermatozoide con reacción acrosomal sin fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial.

## ***Extracción de proteínas***

La extracción de proteínas fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Runnebaum y col. Al paquete celular, se le agregaron 4 volúmenes iguales (4mL) de Colato de Sodio al 1% en PBS/1mM PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo) y benzamida 1mM a un pH de 7.2, por medio de agitación suave. Se mantuvo en refrigeración durante 24 horas. Transcurrido este tiempo el extracto celular fue centrifugado a 5,000 g por 10 minutos, se colectó el sobrenadante y fue centrifugado a 50,000 g durante 30 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas totales y se conservó a -20 °C [116]. Posteriormente el extracto proteínico se depositó en una membrana de diálisis previamente tratada. Se dializó en el amortiguador de unión (Tris-HCl a 20 mM, NaCl al 0.5M), conteniendo PMSF 1mM, Benzamida 1mM y una mezcla de inhibidores de proteasas a un pH de 7.4 durante 24 horas en refrigeración, con el fin de eliminar los restos del detergente y ajustar la muestra a la concentración del amortiguador de unión. Se determinó la concentración de proteínas por medio del método de Lowry [81].

En la segunda condición, después de la capacitación los espermatozoides fueron lavados dos veces con PBS para eliminar los restos del medio de capacitación. Las muestras fueron centrifugadas a 600g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular fue procesado como se mencionó anteriormente.



## ***Cromatografía de afinidad***

El extracto proteínico fue añadido a una columna de sefarosa conjugada a *Concanavalia ensiformis* aglutinina (Con-A), (HiTrap-Con-A 5 mL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza) o a una columna de sefarosa (HiTrap NHS-activated HP 1 mL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza), unida a *Triticum vulgare* aglutinina (WGA). Se inyectaron los mililitros necesarios de proteína para obtener una concentración de 7 a 10 mg/mL, se dejó correr a un flujo de 0.5 mililitros por minuto. Las proteínas permanecieron ahí por 20 minutos para maximizar la unión al ligando. La columna se lavó con 10 volúmenes de amortiguador de unión. Las proteínas retenidas fueron eluidas con amortiguador de unión adicionado con el azúcar correspondiente, para el caso de Con-A se eluyó con metil- $\alpha$ -D-glucopiranososa al 0.5M y en el caso WGA se adicionó N-acetilglucosamina al 0.5M. Se colectaron dos fracciones: Proteína no Retenida (PNR) que corresponde a la proteína que no se une al ligando y Proteínas Retenida (PR) que es la proteína retenida en la columna. Se colectaron fracciones de 2 mL y se determinó la absorbancia a cada una de las fracciones a 280 nm con luz UV y se cuantificó la concentración de las mismas por el método de Lowry (Lowry, 1951 ).

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS (PAGE-SDS)**

El análisis electroforético fue realizado de acuerdo al método reportado por Laemmli [71]. Se preparó el gel de separación al 13 % y el gel de compactación al 4% en condiciones reducidas. Para cada fracción (PR y PNR), se precipitaron 50  $\mu$ g de

proteína con 4 volúmenes de acetona fría, se incubó por 10 minutos en hielo. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El botón se disolvió en 20  $\mu$ l de amortiguador de muestra (10% SDS, 50% glicerol/azul de bromofenol 5% 2- $\beta$ -mercaptoetanol, y Tris-HCl 0.5M pH 6.8) y se calentó a 100 °C por 3 minutos. Las fracciones se colocaron en cada carril y el gel se resolvió en una cámara Mini-Protean II Cell (Bio-Rad). A 200 V durante 45 minutos en un amortiguador de corrimiento preparado con Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS al 1 %. Los geles monodimensionales se fijaron en una solución de ácido acético al 10% v/v, etanol al 40% v/v y agua desionizada durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie al 0.025 % durante 2 h. Se decoloraron con ácido acético al 10% v/v hasta que el fondo de los geles se mostró totalmente claro [71].

Los geles teñidos fueron digitalizados y analizados por densitometría con el software Labworks 4.0 de upv (Imaging Systems. Inc EUA). Se realizaron tres geles, cada uno de un experimento diferente. Las masas relativas  $M_r$  fueron determinadas con un estándar (SDS-PAGE), de baja masa molecular (BioRad 161-0304).

### ***Preparación de geles***

#### Gel de Separación

Se preparó un gel de separación al 13 % de la siguiente manera: se mezclaron 5 mL de acrilamida al 30% (Acrilamida/Bis acrilamida Bio-Rad), 2.34 mL de agua

desionizada, 2.5 mL de amortiguador Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, se desgasificó con una bomba de vacío durante 15 minutos. Inmediatamente después se agregaron 100 µL de SDS, 50 µL de APS (Persulfato de amonio Bio-Rad) al 10% y 5 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina, Bio-Rad) al 0.01%. Se llenó la cámara electroforética Miniprotean II previamente armada con separadores de 0.75 mm, se añadieron unas gotas de isobutanol y se dejó polimerizar al menos una hora [71].

#### Gel de Compactación

Se preparó un gel de compactación al 4%, con 1.33 mL de Acrilamida al 30%, 6.1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, se desgasificó con una bomba de vacío durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 100 µL de SDS, 50 µL de APS al 10% y 10 µL de TEMED y se dejó polimerizar.

#### ***Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry***

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. [81]. Se tomaron 25 µL de la muestra y se llevaron a un volumen final de 100 µL con agua destilada, se añadieron 100 µL de solución ABC (solución A : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% en NaOH al 0.5M, Solución B: tartrato de Na y K al 2%, Solución C : CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O al 1%). Se mezclaron 5 mL de sol. A, 0.15 de B y 0.15 de C), se mezcló la solución con la ayuda de un vórtex y se dejó reposar por 15 minutos. Se agregaron 300 µL de reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu diluído 1:10 con agua destilada, se dejó reposar la muestra por 45 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 600 computarizado. Se preparó una curva estándar

de albúmina bovina para interpolarla con la absorbancia obtenida y se determinó la concentración de proteínas.

### ***Electroforesis Bidimensional (2-D) en gel poliacrilamida***

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Obermaier, 1998 [98]. La primera dimensión se realizó en una cámara Protean IEF (isoelectroenfoque) de Bio-Rad, según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH inmovilizado. Antes del isoelectroenfoque, las bandeletas se rehidrataron con la muestra y el amortiguador de rehidratación (Urea 9 M, 0.5 % w/v CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% v/v de anfolitas y 0.001 % w/v azul de bromofenol). Se usaron de 30-50 µg de proteína para la tinción con plata. La bandaletas focalizadas se equilibraron con amortiguador de equilibrio I (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, DTT 130 mM y Tris HCl 0.375 M a pH 8.8 ), amortiguador de equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, Iodoacetamida 135 mM y Tris HCl 0.375 M a pH 8.8), durante 10 minutos cada uno.

Se realizó una electroforesis PAGE-SDS [71]. La banda se colocó sobre un gel de acrilamida al 13% para separar las proteínas durante tres fases de isoelectroenfoque según el manual, que van de 200 a 20,000 V. Se revelaron mediante tinción de plata.

## ***Tinción de plata***

Los geles se enjuagaron tres veces durante 20 min con agua ultra-pura. Se incubaron 30 minutos en solución DTT al 0.0005% (w/v). Se tiñeron durante 40 minutos con una solución de Nitrato de Plata al 0.2% (w/v), posteriormente se enjuagaron durante 5 minutos con agua ultrapura. Los geles fueron revelados en una solución de Carbonato de Sodio al 3.5% (w/v) y formaldehído al 0.05% (v/v) durante 10 minutos. La reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 3% (v/v). Los geles revelados se enjuagaron con agua ultra-pura y se secaron, posteriormente se digitalizaron y fueron analizados. Se determinó el punto Isoeléctrico (pI) de cada blot por la comparación de los estándares de segunda dimensión de Bio-Rad [85].

## **Secuenciación**

La secuencia N-terminal de cada una de las proteínas obtenidas en la fracción retenida fue determinada por degradación automática de Edman por el método de Towbin [136], en un secuenciador de proteínas de fase gaseosa (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine CA), equipado con un sistema HPLC en Beckman Gold system.

Después de la electroforesis SDS-PAGE las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Polyscreen, Perkin Elmer, Boston MA) en un sistema semi seco de grafito (CLP Continental Lab Products, USA). El gel fue equilibrado con buffer de Towbin a una concentración de 0.5 X [136] y SDS al 0.1% durante 10 minutos. La transferencia fue realizada a 50 mA durante 90 minutos. Después de la transferencia la membrana fue teñida con azul de coomasie al 0.1% en metanol al 40 % por 5 minutos y desteñida con metanol al 50 %. La secuencia fue determinada en el

laboratorio de proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM. La identificación de las proteínas fue obtenida de la secuencia amino terminal usando el servidor BLAST network de la NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Las bandas proteínicas fueron sujetas al menos a diez ciclos de la degradación de Edman, usando un secuenciador automatizado proteína-gas. Se identificaron los 10 primeros residuos de aminoácidos y fueron analizados utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), con el servidor Blast Network [6], usando la base de datos de la secuencia del péptido no redundante.

### Análisis de resultados

Se aislaron las glicoproteínas unidas a residuos de manosa y N acetilglucosamina y/o ácido siálico por cromatografía de afinidad.

Se determinó la masa molecular relativa y el punto isoeléctrico de las diferentes proteínas unidas a residuos de manosa y N acetilglucosamina y/o ácido siálico por medio de electroforesis (monodimensional y bidimensional), utilizando estándares comerciales.

Una vez identificados estos parámetros se secuenció el extremo amino terminal de las proteínas retenidas por la cromatografía de afinidad.

## RESULTADOS.

### ***Extracción de proteínas de espermatozoides capacitados y no capacitados de cerdo.***

Se analizaron tres muestras de espermatozoides recién eyaculados (no capacitados) de 100mL c/u, de cerdos clínicamente sanos. Después de lavar los espermatozoides, se extrajeron las proteínas, el extracto se dializó, obteniéndose un volumen de aproximadamente 120 mL. El promedio de la concentración de proteínas fue de  $3.28 \pm 0.56$  mg. En la Tabla 3 se describen los resultados de cada una de las muestras procesadas.

Concentración de Espermatozoides/ mL	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)
150X10 <sup>6</sup> células	3.92	35	137
232X10 <sup>6</sup> células	2.86	50	143
292X10 <sup>6</sup> células	3.08	40	123

Tabla 3. Características de las muestras de espermatozoides recién eyaculados (no capacitados).

Se analizaron tres muestras de espermatozoides capacitados, a una concentración de  $5 \times 10^6$  células por mL. Se obtuvieron en promedio,  $1.8 \pm 0.56$  mg de proteínas.

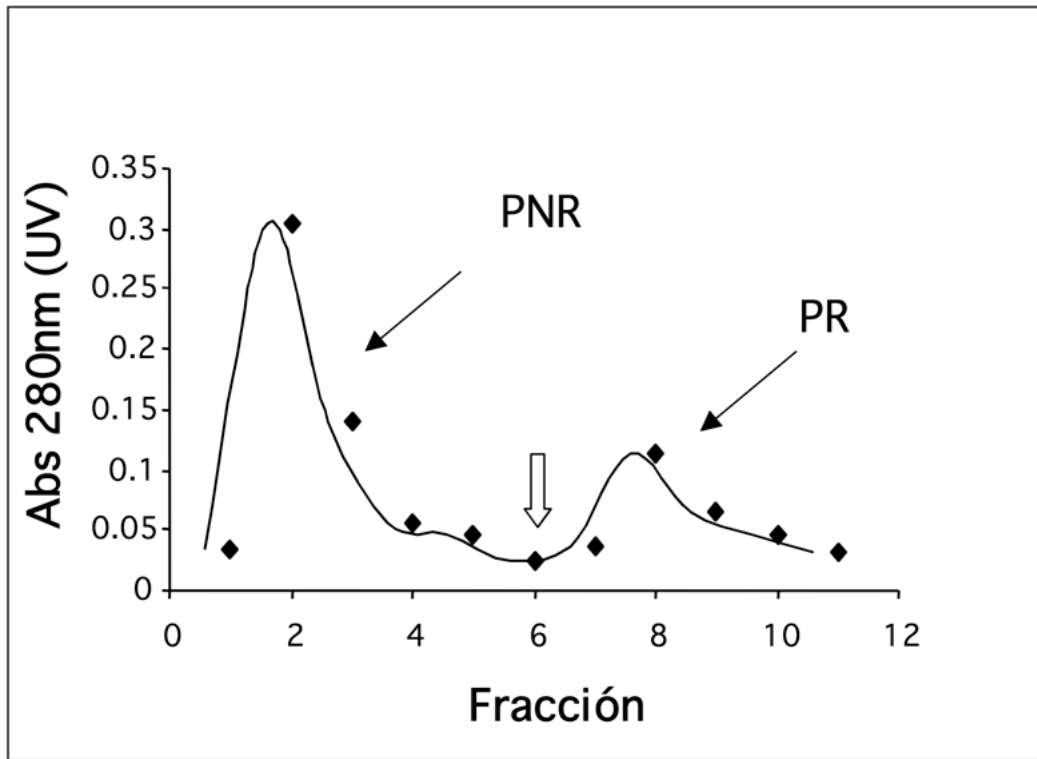
Se realizó el cálculo de proteína extraída por célula, obteniendo los siguientes valores:  $6.6 \times 10^{-9}$  mg en espermatozoides no capacitados y  $2.4 \times 10^{-9}$  mg en espermatozoides capacitados, es decir, 2.75 veces menos proteína en espermatozoides capacitados.

***Aislamiento de glicoproteínas de espermatozoides por cromatografía de afinidad, utilizando las lectinas Con-A y WGA como ligandos fijados a una columna de sefarosa.***

El extracto proteínico se pasó por la columna de afinidad de sefarosa unida a las lectinas Con-A o WGA. Se colectaron entre 10 y 15 fracciones de 2 mL por ensayo. Se colectaron las proteínas que no se unen al ligando (PNR), y las Proteínas Retenidas en la columna (PR), se determinó la presencia de proteína en cada fracción por espectrofotometría a 280 nm y se graficó el cromatograma (Figura 6).

En el cromatograma se observaron dos picos. El mayor corresponde a las PNR, después de que la absorbancia desciende hasta el valor inicial, se realizó el cambio del amortiguador de unión por el de elusión y las PR presentaron un pico menos elevado. Los resultados de los cromatogramas fueron similares en todas las condiciones estudiadas. Se tomaron las fracciones con concentración máxima de proteína que forman ambos picos y se cuantificaron por el método de Lowry.





**Figura 6.** Cromatograma de afinidad utilizando las lectinas Con-A o WGA inmovilizadas. Las PNR fueron liberadas por lavados sucesivos con amortiguador de unión. Al cambio de amortiguador (representado por la  $\Downarrow$ ), las PR fueron eluidas con sus respectivos ligandos; para Con-A se añadió metil- $\alpha$ -D-gluco-piranososa, para WGA se añadió N-acetilglucosamina, y corresponden al pico de menor tamaño. Los cromatogramas para ambas lectinas fueron similares. PNR proteínas no retenidas; PR proteínas retenidas por la columna; Abs absorbancia a 280 nm con luz ultravioleta (UV).

## ***Determinación de la masa molecular relativa y el punto isoeléctrico de glicoproteínas del extracto mediante electroforesis.***

*Espermatozoides no capacitados.*

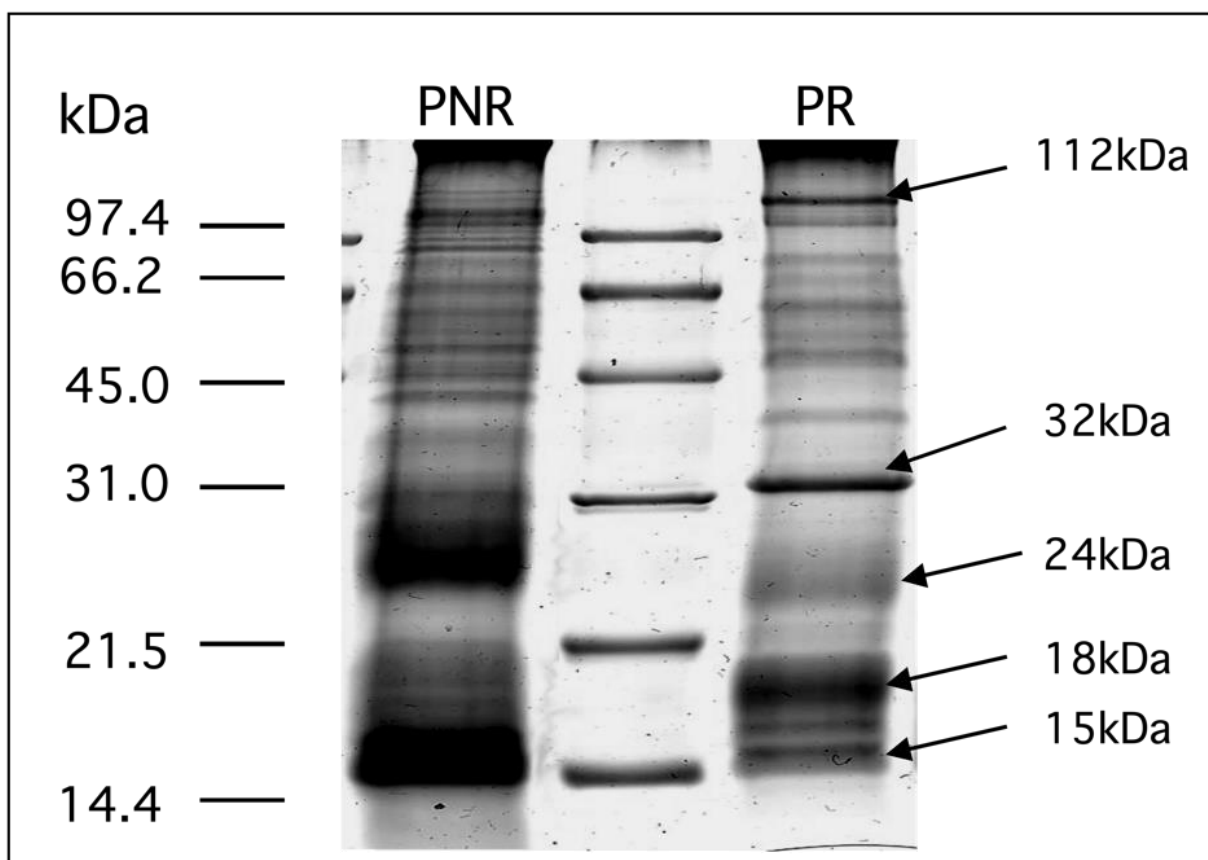
### **Proteínas retenidas por la lectina Con-A**

El patrón electroforético de proteínas de espermatozoides no capacitados se muestra en la Figura 7. Se determinó el número de bandas proteínicas y la masa molecular relativa ( $M_r$ ). El primer carril corresponde a la fracción de PNR. Se observó un gran número de bandas proteínicas con  $M_r$  entre 14 y 120 kDa. Se presentan dos bandas principales de 14 y 26 kDa. En el tercer carril, la fracción de PR, presenta un menor número de bandas proteínicas (de 15 a 112 kDa) de las cuales, cinco son bandas principales de 15, 18, 24, 32 y 112 kDa. Las bandas entre 45 y 66 kDa, están presentes en la fracción de PNR aunque se observan en menor concentración. Estas proteínas contienen residuos de manosa.

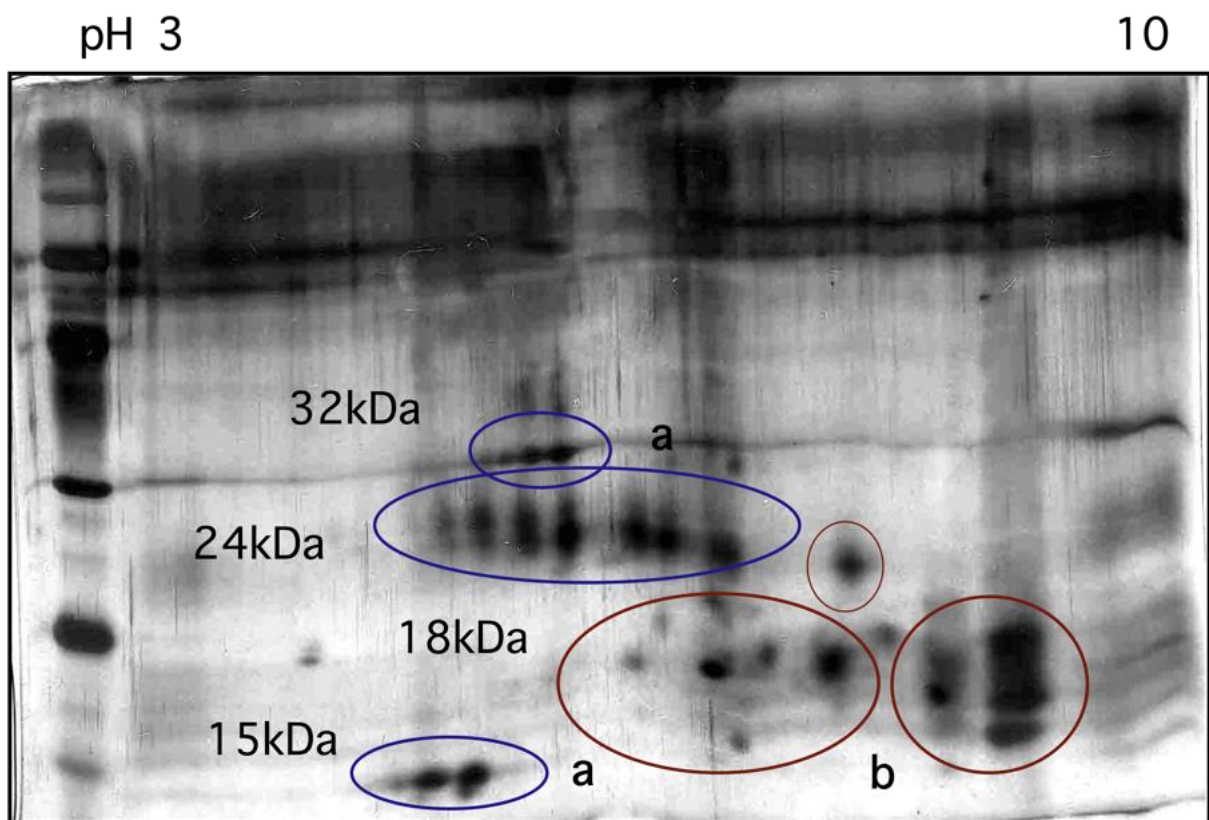
Para la caracterización de las proteínas se realizó una electroforesis bidimensional (IEF). Se determinaron los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas comparándolas con los pI de un estándar de peso molecular comercial.

El análisis bidimensional muestra que la fracción de PNR tiene una gran cantidad de proteínas con diferente pI, se observan proteínas tanto ácidas (pI 4), como básicas (pI de 9). En la fracción PR las bandas principales presentes en la primera dimensión parecen estar constituídas por familias de isoformas, es decir una familia de proteínas con la misma secuencia de aminoácidos pero diferente pI pues presentan

un patrón característico de incremento gradual de pI. Esto puede ser debido a cambios pos-traduccionales de la proteína. Las proteínas de 15, 24 y 32 kDa presentan isoformas cuyo pI va desde 4 hasta 6.8 (Figura 8, a). Los puntos proteínicos cercanos a 18 kDa parecen corresponder a proteínas individuales con  $M_r$  y pI muy cercanos. Se observan 7 proteínas con pI de 5.4 a 7.6 (Figura 8, b).



**Figura 7.** Masa molecular ( $M_r$ ) de las proteínas no retenidas (PNR) y proteínas retenidas (PR) de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina Con-A. Carril 1: PNR, carril 2: Estándares de bajo peso molecular (Bio-Rad), carril 3: PR. Las flechas indican las  $M_r$  de las proteínas unidas a residuos de manosa que manifiestan mayor proporción proteínica en espermatozoides no capacitados de cerdo.

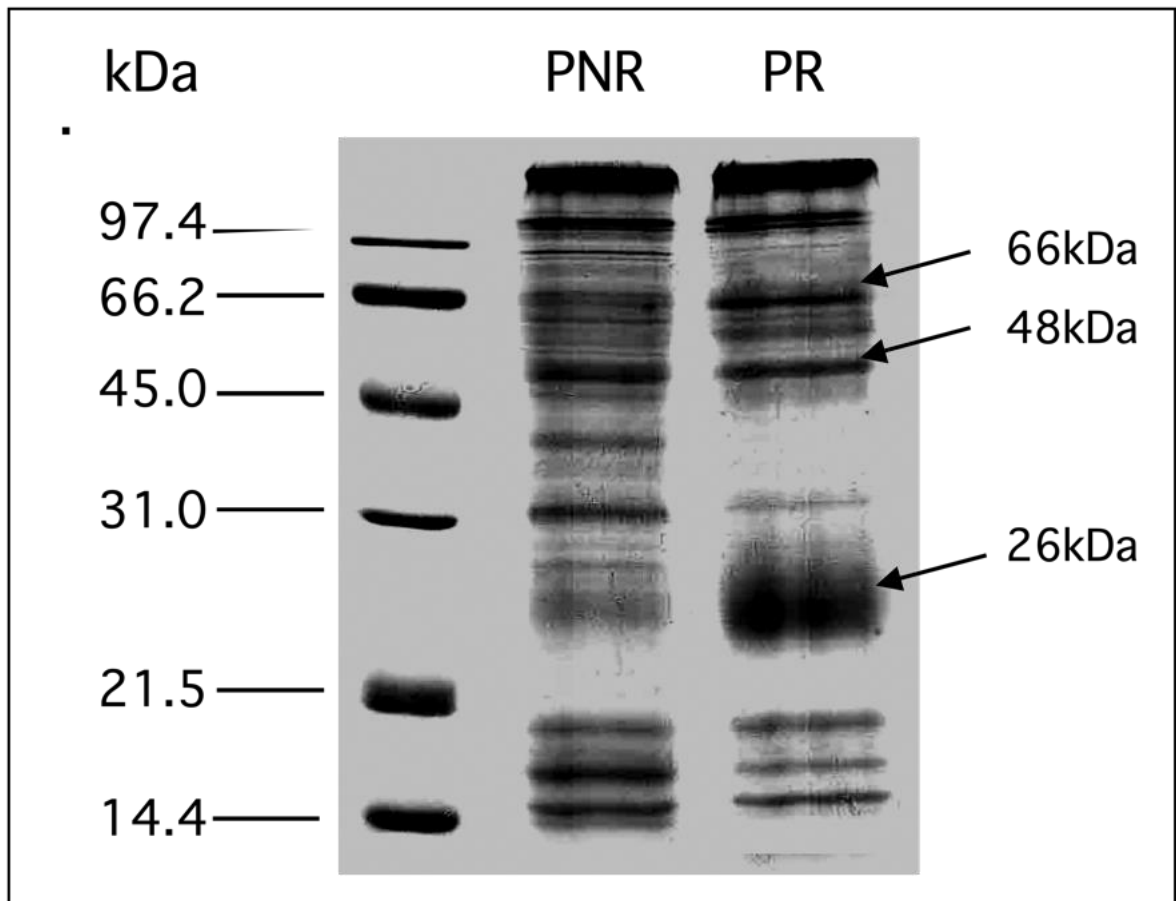


**Figura 8.** Electroforesis bidimensional de las PR de espermatozoides no capacitados de cerdo, obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina Con-A. Para el IEF se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH. Después de la migración de la proteína, el gel fue teñido con plata. La letra **a** indica una familia de proteínas con la misma secuencia de aminoácidos pero diferente pI, la letra **b** corresponde a proteínas individuales con  $M_r$  y pI cercanos con un rango de pI entre 5.4 y 7.6. Se determinaron los pI de las proteínas comparándolas con los pI de un estándar comercial.

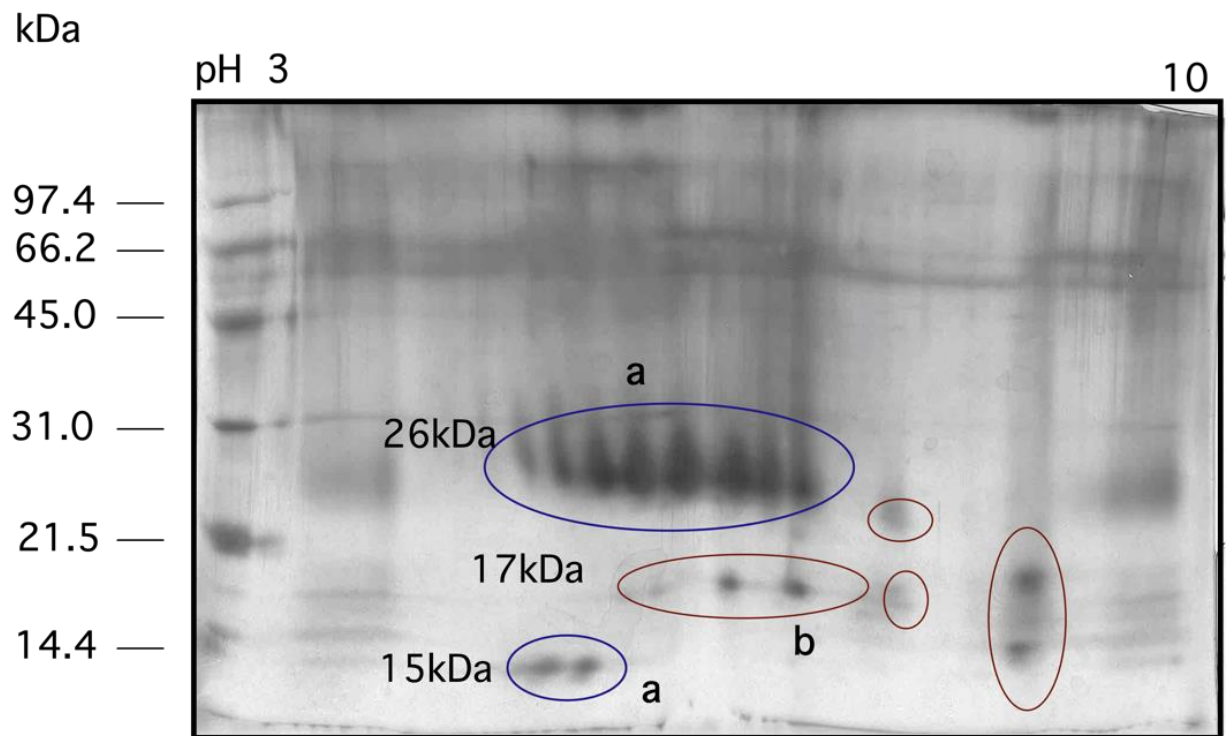
## **Proteínas retenidas por la lectina WGA**

El patrón electroforético de proteínas de espermatozoides no capacitados se muestra en la Figura 9. El carril 2 corresponde a la fracción de PNR, se observan bandas minoritarias con  $M_r$  entre 45 y 112 kDa. En la fracción de PR, esta lectina retiene un mayor número de proteínas que presentan residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico. Hay 8 bandas mayoritarias con  $M_r$  entre 15 y 112 kDa. Las bandas proteínicas con mayor concentración son las de 15, 26, 48 y 66 kDa.

Al realizar la electroforesis bidimensional, se encontró que la banda mayoritaria de 26 kDa corresponde a una familia de 8 isoformas con  $pI$  entre 4.6 a 6.5, esta familia de proteínas es similar a las proteínas de 24 kDa encontradas en la fracción de PR por la lectina Con-A (Figura 10, a). Las proteínas menores a 20 kDa corresponden a proteínas o grupos de proteínas individuales con  $M_r$  y  $pI$  muy cercanos entre ellas. Los puntos proteínicos de la banda de 15 kDa contiene proteínas ácidas ( $pI$  4.3-6.0) (Figura 10, b).



**Figura 9.**  $M_r$  de las proteínas no retenidas (PNR) y proteínas retenidas (PR) de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina WGA. Carril 1: Estándares de bajo peso molecular (Bio-Rad), carril 2: PNR, carril 3: PR. Las flechas indican las  $M_r$  de las proteínas unidas a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, que manifiestan mayor proporción proteínica en espermatozoides no capacitados de cerdo. Las proteínas menores a 20 kDa disminuyen su proporción.



**Figura 10.** Electroforesis bidimensional de las proteínas retenidas (PR) de espermatozoides no capacitados de cerdo, obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina WGA. Para el IEF se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH. La letra **a** indica una familia de proteínas con la misma secuencia de aminoácidos pero diferente pI, la letra **b** corresponde a proteínas individuales con  $M_r$  y pI cercanos. Se determinaron los pI de las proteínas comparándolos con los pI de un estándar comercial.

## Espermatozoides Capacitados.

### Evaluación de la capacitación *in vitro*.

La capacitación *in vitro* se comprobó por medio de la tinción de clorotetraciclina (CTC). Con esta técnica se determina el estado funcional de la membrana plasmática, lo que permite evaluar espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal. La Tabla 4 muestra el porcentaje de espermatozoides analizados con CTC. Al inducir la capacitación *in vitro*, se encontró que el  $83 \pm 1.4$  % de espermatozoides se capacitaron. Estos resultados indican que las condiciones utilizadas para la capacitación fueron las adecuadas, ya que se obtuvo un alto porcentaje de espermatozoides capacitados.

Tiempo	No capacitados	Capacitados	Reaccionados
0 horas	$85.0 \pm 14$	$13 \pm 1.6$	$2.0 \pm 0.6$
4 horas	$14.0 \pm 3.4$	$83 \pm 1.4$	$3.5 \pm 1.0$

(%)  $\pm$  DE

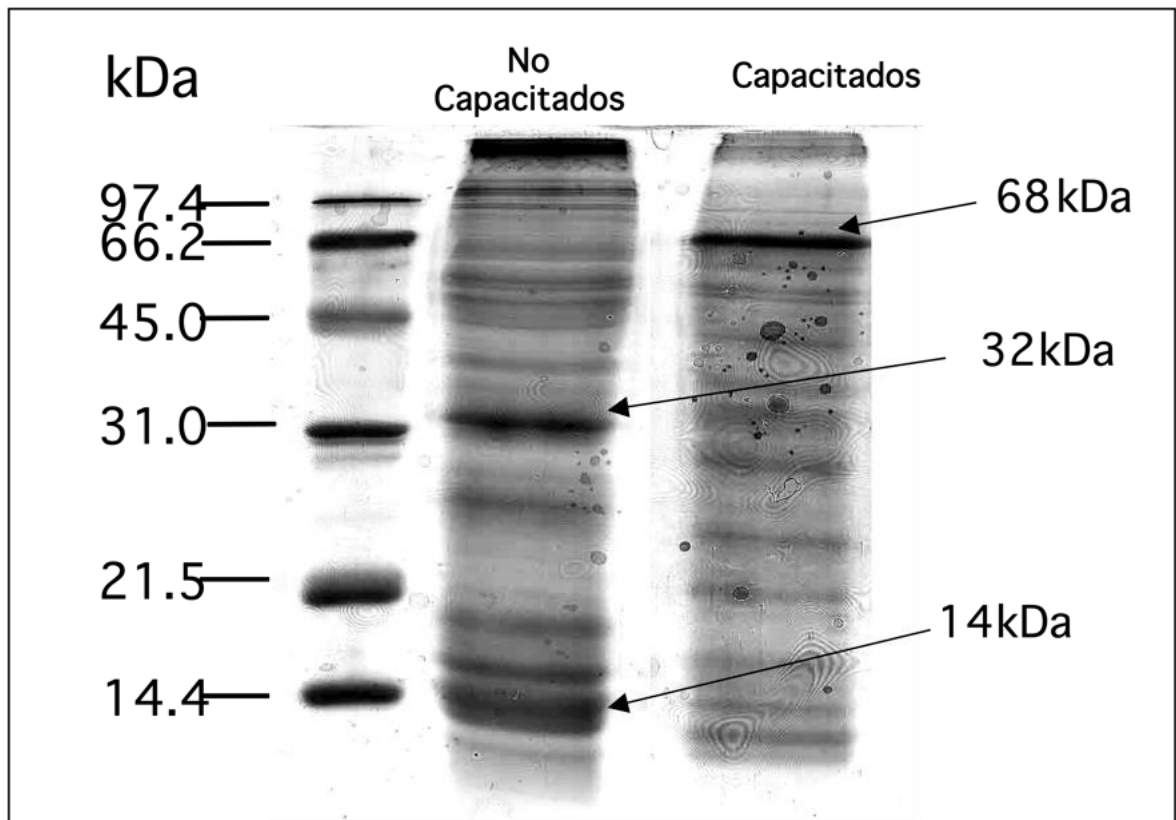
Tabla 4. Porcentaje de espermatozoides analizados con CTC.



## **Análisis electroforético de proteínas totales de espermatozoides capacitados.**

Se realizó una PAGE-SDS para identificar el patrón electroforético del extracto total de proteínas espermáticas presentes en espermatozoides capacitados y no capacitados (Figura 11). La electroforesis de espermatozoides no capacitados muestra un gran número de bandas proteínicas con  $M_r$  entre 13 y 120 kDa, de las cuales se observan en mayor proporción 2 bandas de 14 y 32 kDa (Figura 11, carril 2).

La electroforesis de espermatozoides capacitados presenta un menor número de bandas proteínicas. Se identificaron cinco bandas que no están presentes en espermatozoides no capacitados con  $M_r$  de 18 a 68 kDa. Las proteínas de bajo peso molecular disminuyen durante la capacitación, en contraste se incrementa la expresión de la banda proteínica de 68 kDa. Se observan dos bandas minoritarias de 52 y 47 kDa (Figura 11, carril 3).

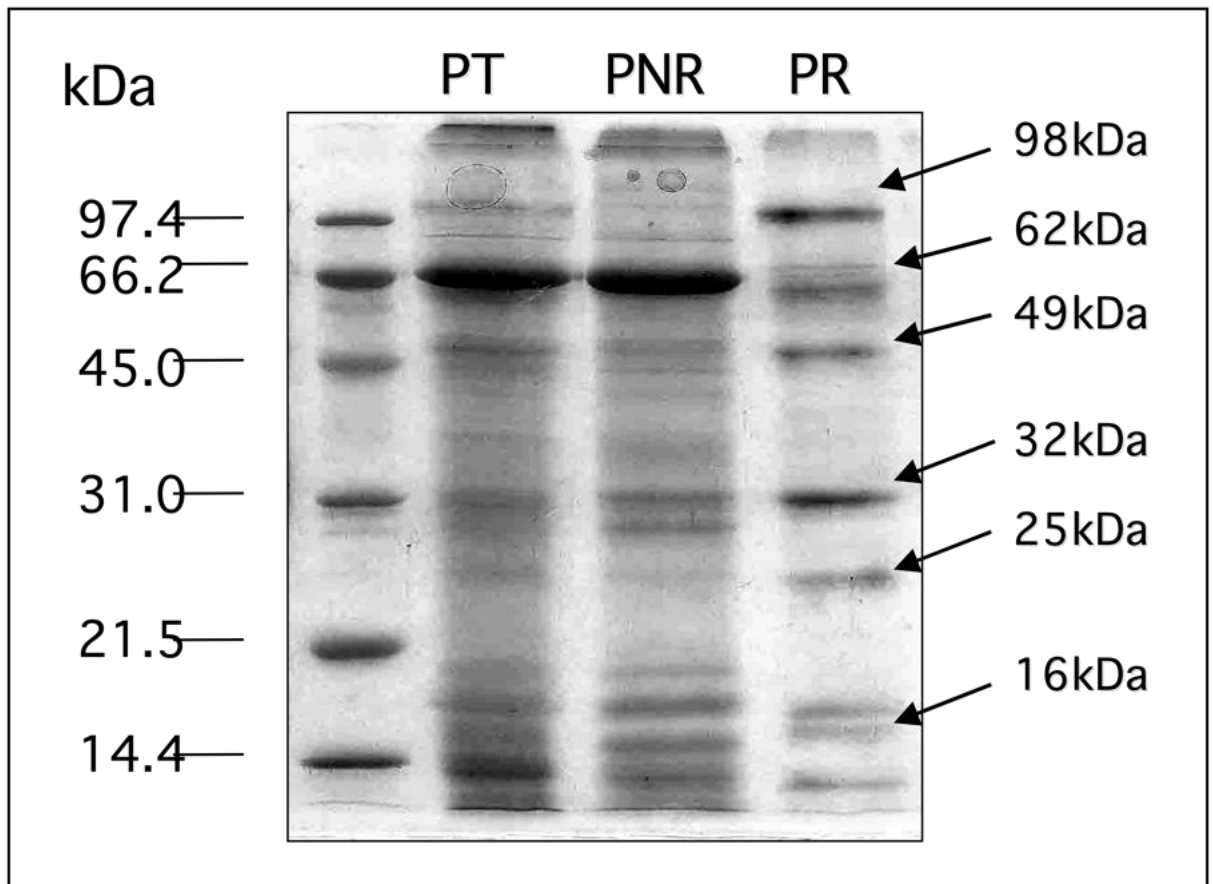


**Figura 11.** Electroforesis del extracto total proteínico de espermatozoides capacitados y no capacitados de cerdo. Carril 1: Estándares de bajo peso molecular. La electroforesis de espermatozoides no capacitados (carril 2), muestra un mayor número de proteínas comparándolas con las de espermatozoides capacitados (carril 3); las proteínas menores a 20 kDa disminuyen durante la capacitación. Las flechas indican las  $M_r$  de las bandas con mayor proporción proteínica.

El extracto total proteínico se pasó por una columna de sefarosa unida a la lectina Con-A o WGA. Se colectaron las fracciones de PNR y PR, cuya concentración fue menor que la obtenida con espermatozoides no capacitados.

## **Proteínas retenidas por la lectina Con-A**

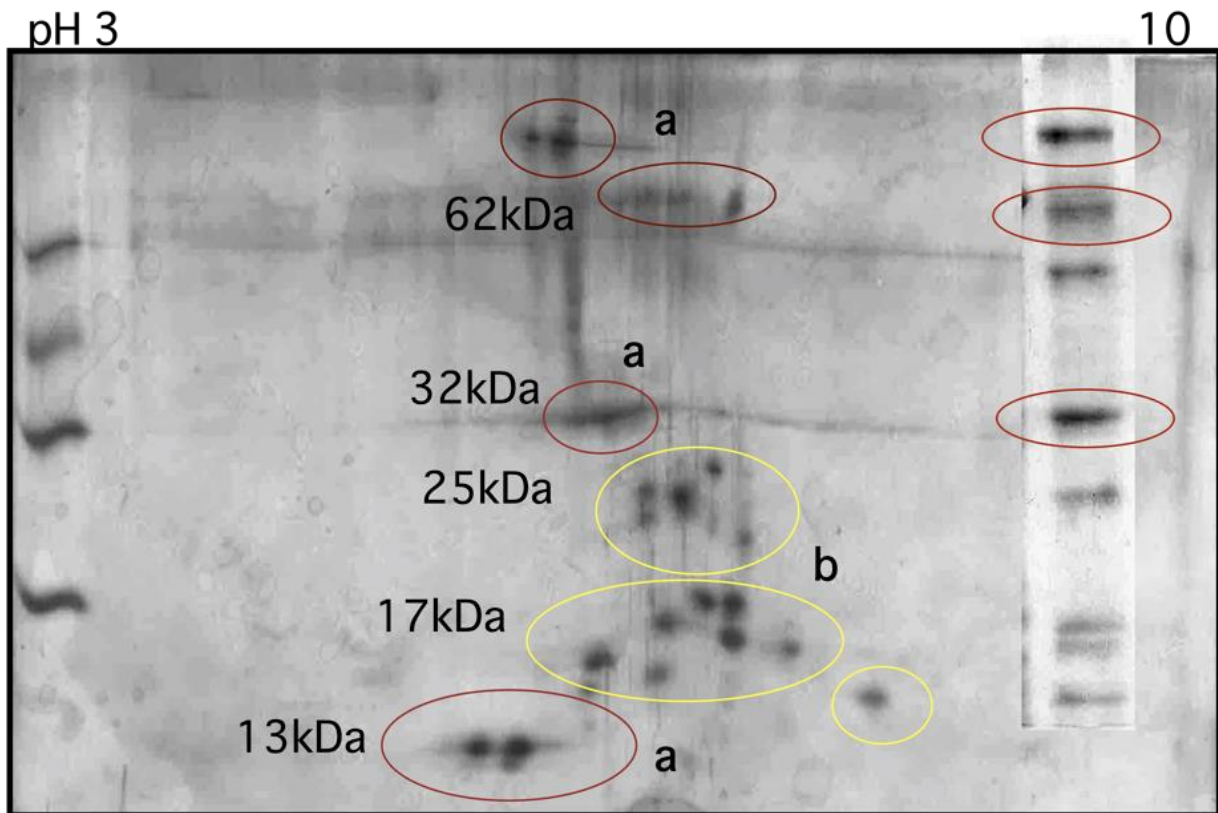
La Figura 12 muestra el patrón electroforético de las proteínas unidas a la lectina Con-A. La fracción de PNR (tercer carril) de espermatozoides capacitados presenta un patrón electroforético semejante al del extracto proteínico total (carril 2). Este, presenta varias proteínas con  $M_r$  entre 14 y 107 kDa. El patrón electroforético de la fracción de PR muestra proteínas con masas moleculares entre 13 y 98 kDa. Las bandas de 31, 62 y 98 kDa manifiestan mayor proporción. Se identificaron 2 bandas, una de 16 y otra de 25 kDa, ausentes en la fracción NR, por lo que se considera que presentan residuos de manosa.



**Figura 12.** Electroforesis de espermatozoides capacitados que muestra la masa molecular ( $M_r$ ) de las proteínas no retenidas (PNR) y proteínas retenidas (PR) de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina Con-A. Carril 1: Estándares de bajo peso molecular (Bio-Rad), carril 2: Proteínas totales de espermatozoides capacitados (PT), carril 3: PNR, carril 4: PR. Se observa un menor número de proteínas con residuos de manosa. Las flechas indican las  $M_r$  de las proteínas retenidas por la lectina.

La electroforesis Bidimensional muestra que las bandas de 13, 32, 62 y 98 kDa corresponden a una familia de 2 isoformas, de pI entre 4 y 6.5. La banda de 25 kDa

presenta un grupo de 6 proteínas con pI cercanos entre ellas (Figura 13, a, b). Al comparar esta banda con la expresada en espermatozoides no capacitados, observamos que la familia de 7 proteínas se pierde durante la capacitación y se expresa un grupo de proteínas con  $M_r$  (s) cercanas y pI que tienden a ser básicos. Las bandas proteínicas con  $M_r$  (s) menores a 20 kDa presentan un mayor número de proteínas, se observan ocho proteínas que abarcan pI desde 5 hasta 7.5 (Figura 13, b). Con base en estos resultados, se puede afirmar que los espermatozoides no capacitados presenta un mayor número de proteínas con residuos de manosa, en relación a las encontradas en los espermatozoides capacitados.

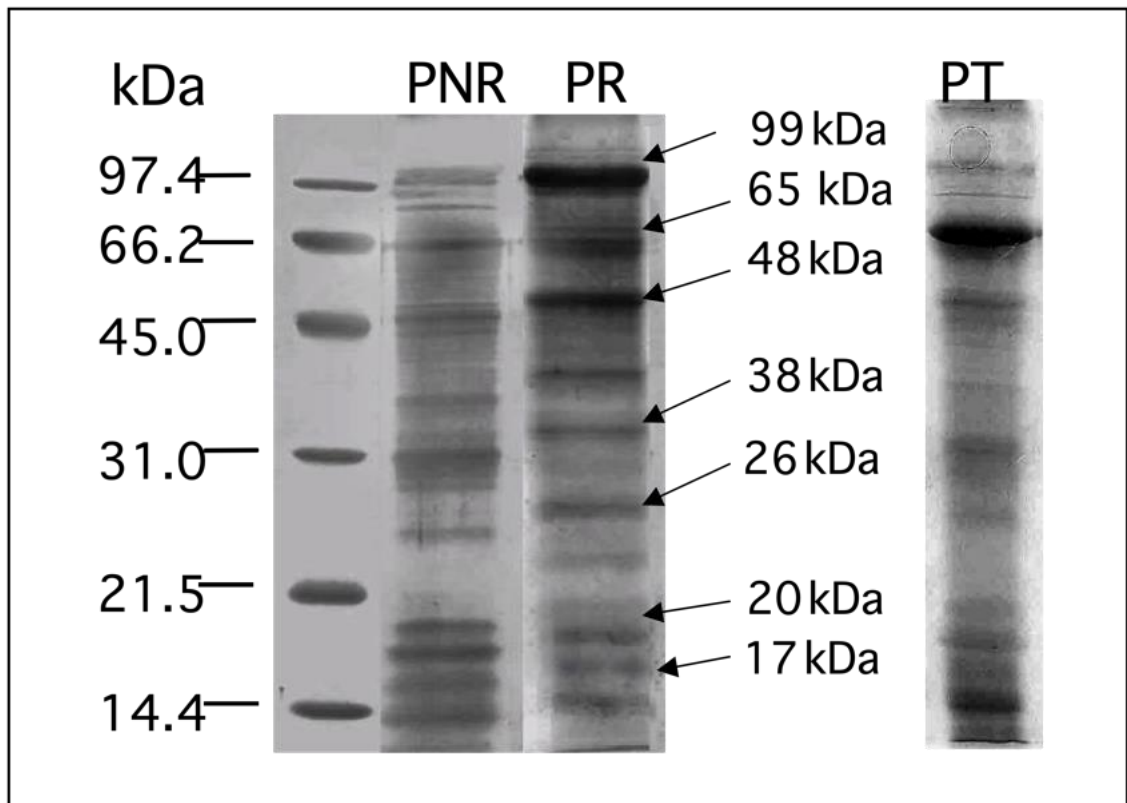


**Figura 13.** Electroforesis bidimensional de la fracción de las PR de espermatozoides capacitados, obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina Con-A. Para el IEF se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH. Durante la capacitación disminuye el número de proteínas, en relación con las proteínas presentes en espermatozoides no capacitados. La letra **a** indica una familia de proteínas con la misma secuencia de aminoácidos pero diferente pI, los círculos en blanco y la letra **b** corresponde a proteínas individuales con  $M_r$  y pI cercanos. Se determinaron los pI de las proteínas comparándolos con los pI de un estándar comercial

## **Proteínas retenidas por la lectina WGA**

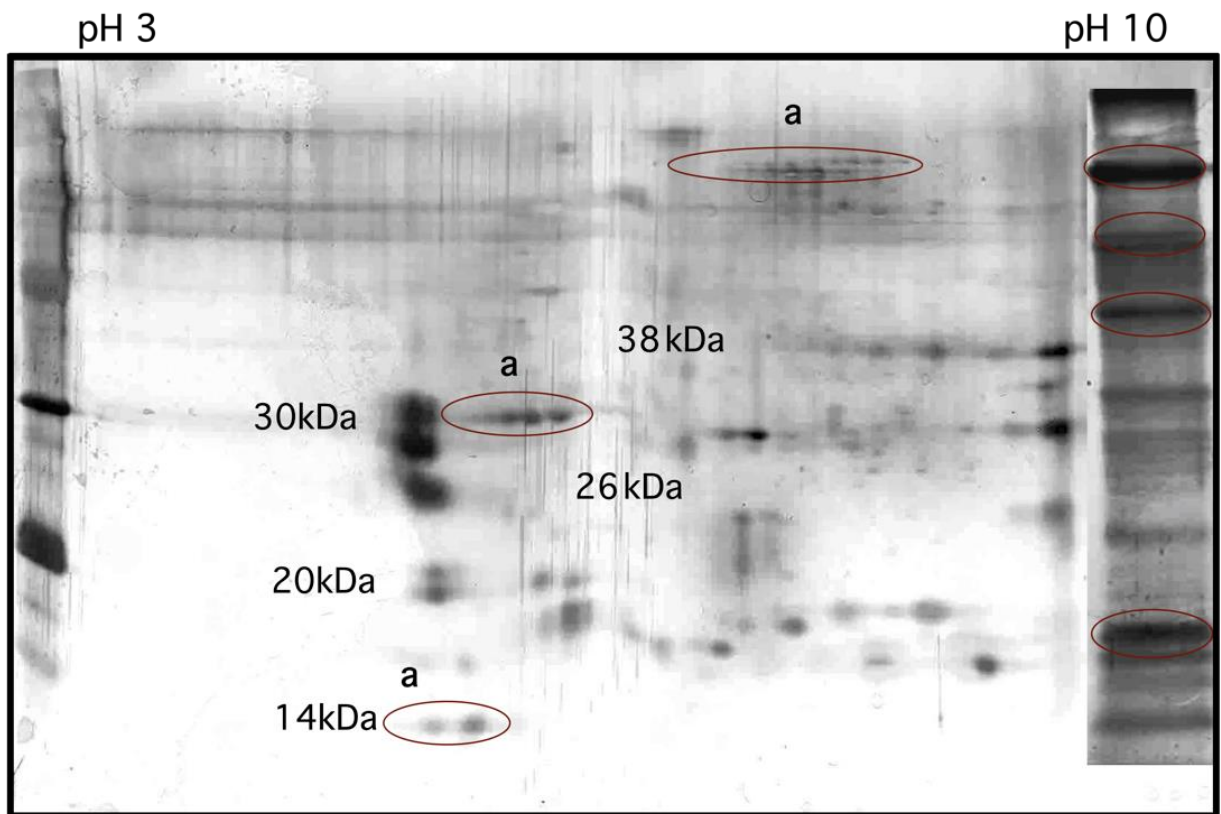
Con respecto a las proteínas unidas a la lectina WGA, se observó que la fracción de PNR presenta un patrón electroforético similar al del extracto total de proteínas de espermatozoides no capacitados (Figura 14, carril 2). En la fracción de PR (carril 3), se observan bandas mayoritarias con  $M_r$  (s) entre 14 y 99 kDa. Las bandas proteínicas de 99, 65, 48, kDa presentan mayor proporción, sin embargo la proteína de 65 kDa presenta similitud con la banda proteínica observada en la fracción de proteínas retenidas por Con-A, aunque la  $M_r$  difiere un poco, se considera que esta misma proteína corresponde a la encontrada en el extracto de proteínas totales de espermatozoides capacitados. Por lo tanto, es posible afirmar que la proteína de 68 kDa presenta residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, y de manosa.

El análisis bidimensional de la fracción de PR por WGA se muestra en la Figura 15. Se observa un patrón electroforético diferente al mostrado en espermatozoides no capacitados. La banda proteínica de 99 kDa presenta una familia de ocho isoformas con un rango de pI de 6 a 7 (Figura 15, a), sin embargo las proteínas de 65, 38 kDa y las proteínas con masa molecular baja están constituidas por puntos proteínicos individuales con  $M_r$  (s) y pI cercanos; estas proteínas presentan un rango de pI entre 4 y 9, la mayoría de ellas presentan pI (s) básicos.



**Figura 14.** Electroforesis de espermatozoides capacitados que muestra las  $M_r$  de las proteínas presentes en la fracción de proteínas no retenidas (PNR) y proteínas retenidas (PR) por la lectina WGA. Carril 1: Estándares de bajo peso molecular (Bio-Rad), carril 2: PNR, carril 3: PR, carril 4: Proteínas totales de espermatozoides capacitados (PT). Las flechas indican las  $M_r$  de las proteínas con residuos de N- acetilglucosamina y/o ácido siálico.





**Figura 15.** Electroforesis bidimensional de las proteínas retenidas (PR) de espermatozoides capacitados de cerdo, obtenidas por cromatografía de afinidad con la lectina WGA. Para el IEF se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH. La letra **a** indica una familia de proteínas con la misma secuencia de aminoácidos pero diferente pI. Se observa un mayor número de proteínas individuales con  $M_r$  y pI cercanos, con un intervalo de pI entre 4 y 9. Se determinaron los pI de las proteínas comparándolos con los pI de un estándar comercial.

### ***Análisis de la secuencia de aminoácidos.***

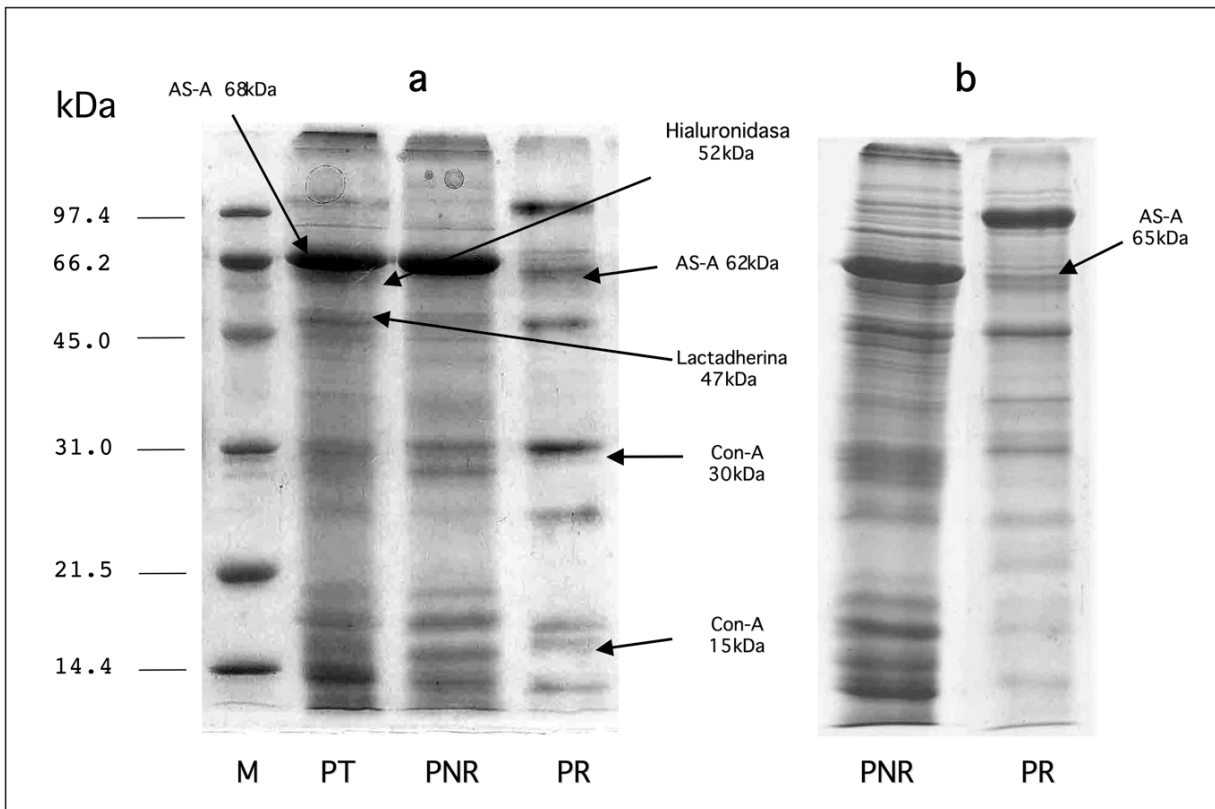
Se analizó la fracción de PR por Con-A en la cromatografía de afinidad. Se identificaron tres bandas mayoritarias: la banda de 62 kDa corresponde a AS-A (Figuras 16 y 17), las proteínas de 32 y 15 kDa corresponden a las cadenas a y b de la Concanavalina A (CAA25787.1) (Figura 16) y las demás, incluyendo la de 98 kDa no se pudieron secuenciar debido a que están bloqueadas.

De la fracción de PR por la lectina WGA sólo la banda mayoritaria de 65 kDa se pudo secuenciar y corresponde a la proteína AS-A (NP999098), las demás están bloqueadas (Figuras 16 y 17).

En ambos casos se identificaron diez residuos de aminoácidos que al compararlos con la base de datos dio el 100 % de identidad con los aminoácidos del 19 al 28 de la proteína AS-A, constituida por un total de 507 aminoácidos. Esta proteína presenta un péptido señal de 18 aminoácidos.

Debido a que se presentaron problemas para secuenciar las demás proteínas, se secuenciaron las del extracto total de espermatozoides capacitados. De éste, se identificaron las bandas proteínicas principales. Se encontró una banda de 68 kDa y dos bandas minoritarias de 52 kDa y 47 kDa, así como otras de bajo peso molecular. Los extremos amino-terminal de estas últimas, resultaron bloqueados y no se lograron secuenciar. La banda de 68 corresponde a la proteína AS-A (NP999098) de la que se identificaron 11 residuos de aminoácidos (Figuras 16 y 17). De la proteína de 52 kDa se identificaron 10 residuos y se trata de la hialuronidasa (CAC83973), y se sabe que tiene un péptido señal de 37 aminoácidos y continúa con el fragmento de secuencia

identificada (del 37 al 46) (Tabla 5). La proteína de 47 kDa corresponde a los aminoácidos del 3 al 12 de la lactadherina de cerdo (CAA72379), y se sabe que se localiza en la región acrosomal del espermatozoide (Tabla 5). En todos los casos se encontró que la secuencia de aminoácidos N-terminal muestra un 100 % de identidad con las proteínas reportadas.



**Figura 16.** Patrón PAGE-SDS de proteínas de espermatozoides capacitados de cerdo, extraídas por cromatografía de afinidad, a. Con-A, b. WGA. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y desteñidos. M, Marcadores estándar de bajo peso molecular (Bio-Rad); PT: proteínas totales de espermatozoides capacitados; PNR, proteínas No-retenidas; PR, proteínas retenidas. AS-A, Arilsulfatasa, Con-A, Concanavalina –A, WGA, *Triticum vulgaris* agglutinina.

a) PT de espermatozoides capacitados	<b>SPPNIVLIFAD</b>
b) PR CON-A	<b>SPPNIVLIFA</b>
c) PR WGA	<b>SPPNIVLIFA</b>
d) AS-A	MVALWALTLALASGLAATS <b>SPPNIVLIFAD</b> DDLGYGDLGSYGHPSSTTPNLDQLA AGGLRFDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGLYPGVLEPSSRGGLPLEEVT LAEVLAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFLLPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNL TCFPPSTPCDGSCDQGLVPVPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYVAFARLMDADA QRQGRPFFLYYASHHHTYPQFSGQSFSGHSGRGPFGDSLMEFDAVAVGALMTAV GDLGLLGETLVI FTADNGPETMRMSHGCSGLLRCCGKGTTFEGGVREPALAFW PGHIAPGVTHELASSDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGVDLSPLLLGTGKSPRR TLFFYPAYPDEVRGVFAVRSGKYKAHFFTQGSIHSDTTADPACHASSPLTAHE PPLLFDLSEDPGENYNLLGGVAEVAPEVLQVLKQLQLLKAQFDAAVTFSPSQI ARGEDPALQICCPSCTPRPSCHCPELQP

**Figura 17.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de arilsulfatasa A con la secuencia obtenida de la proteína de 62-65 kDa: a) proteína total de espermatozoides capacitados, b) proteína retenida por Con-A, c) proteína retenida por WGA. La secuencia de la proteína N-terminal fue realizada por PAGE-SDS 1D posteriormente fue transferida a una membrana de PVDF. El análisis fue realizado en NCBI con el servidor network BLAST usando la base de datos de la secuencia de péptidos no redundantes.

kDa	secuencia de aminoácidos N-terminal	Proteína
47	GDFCDSSLCL	Lactadherina
52	DFRASPIIPN	Hialuronidasa
68	SPPNIVLIFAD	ArilsulfatasaA

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos del extracto total de proteínas de espermatozoides capacitados.

## DISCUSIÓN

La fertilización es una serie de eventos que involucran una secuencia altamente coordinada entre moléculas localizadas en la superficie de ambos gametos, así como las sustancias presentes en el medio ambiente natural de los mismos; en mamíferos, los espermatozoides presentan cambios funcionales durante los primeros eventos de la fertilización, se ha demostrado que la membrana plasmática juega un papel muy importante en este proceso [133]. La superficie de la membrana plasmática está cubierta por varias glicoproteínas, algunas de ellas están relacionadas con la maduración espermática en el epidídimo y la capacitación en el tracto reproductor femenino [53; 138].

Las glicoproteínas secretadas por las células epiteliales del epidídimo se unen a la cabeza y a la región acrosomal del espermatozoide durante su paso por este conducto [68]. Los espermatozoides eyaculados están cubiertos por glicoproteínas producidas por las glándulas accesorias, algunas de estas glicoproteínas actúan como factores descapacitantes [119] y durante la capacitación son degradadas o removidas como resultado de la acción de proteasas, hidrolasas y glicosidasas [138; 69].

El proceso de la capacitación es muy complejo, por ello se ha estudiado intensamente bajo condiciones *in vitro*, sin embargo todavía quedan muchas interrogantes por contestar. En el presente trabajo se realizó la extracción y cuantificación de proteínas de espermatozoides de cerdo sin capacitar y capacitados. Los resultados muestran una disminución en la concentración de proteínas de espermatozoides capacitados, comparada con la encontrada en espermatozoides no

capacitados. Dicha disminución puede deberse a la pérdida de proteínas secretadas durante la maduración del espermatozoide que son los factores descapacitantes, los cuales evitan que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal durante su estancia en el tracto reproductor masculino. Estos factores son removidos o inactivados para permitir que los espermatozoides puedan llevar a cabo la reacción acrosomal y fertilizar al ovocito [159].

En este estudio al realizar el análisis electroforético, se encontró que después de la capacitación se reduce el número de proteínas observadas en espermatozoides no capacitados, disminuye principalmente la proporción de las proteínas con masa molecular menor a 20 kDa así como la de 32 kDa. Estos resultados nos sugieren que algunas proteínas fueron liberadas de la superficie del espermatozoide al realizarse la capacitación *in vitro* en condiciones adecuadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kaul y col. [67], en un estudio con espermatozoides de cabra; encontraron que los espermatozoides no capacitados presentan proteínas con masas moleculares relativamente bajas, identificaron 5 bandas proteínicas de 15, 72, 81 y 128 kDa, en espermatozoides no capacitados y solo tres bandas de 23, 27 y 72 kDa en capacitados. En diferentes especies de mamíferos (oveja, conejo, perro y cerdo), la capacitación del espermatozoide es inducida por la remoción de glicoproteínas de la superficie de la membrana plasmática [47], por lo que la pérdida de algunas glicoproteínas es necesaria para que inicie la capacitación.

Al comparar el patrón electroforético observamos que algunas de las proteínas presentes en espermatozoides capacitados difieren en la  $M_r$  de las proteínas de



espermatozoides no capacitados, estas diferencias podrían estar relacionadas con cambios conformacionales que ocurren durante el proceso de capacitación.

En los últimos años, se han identificado varias proteínas asociadas con la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo, sin embargo los factores y los mecanismos involucrados en el reconocimiento de los gametos no se han elucidado completamente. El reconocimiento y la unión de gametos son eventos especie específicos y están controlados por oligosacáridos de la ZP y su correspondiente carbohidrato en el espermatozoide [138].

Las cadenas glicosídicas de las proteínas de membrana, modulan la unión célula a célula, incluyendo el reconocimiento y la unión del espermatozoide al ovocito, la adhesión oviductal del espermatozoide y la implantación del embrión [151; 156; 138]. Diversos estudios han identificado múltiples receptores en el espermatozoide y sus respectivos ligandos en la ZP homóloga. Los residuos de azúcares terminales reconocidos por el espermatozoide en la ZP pueden ser del tipo: manosilicos, siálicos, glucosamilicos, fucosilicos y  $\alpha$ ,  $\beta$ -galactosilicos. Estos glicanos están implicados en el proceso de la fertilización [25; 72; 86]. Se ha demostrado que las interacciones de algunas proteínas que actúan como lectinas son importantes en el proceso de fertilización [131.]

Se han realizado diversos trabajos usando lectinas para identificar la distribución y los cambios que ocurren en los glicoconjugados durante la diferenciación celular y maduración del espermatozoide, la mayoría de estos glicanos corresponden a glicoproteínas o glicolípidos [115]. Durante la diferenciación no ocurren cambios

significantes en la distribución de las lectinas, sin embargo durante la etapa de maduración disminuye o se pierde la afinidad a diferentes lectinas (WGA, Con-A, PNA, SBA), esto podría deberse a los cambios conformacionales o a la redistribución de glicoproteínas, más que a la pérdida en el contenido de glicanos [21].

En el presente trabajo por medio de la cromatografía de afinidad se encontró que la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo presenta un gran número de proteínas unidas a residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico. Estos resultados coinciden con los resultados mostrados en trabajos previos, donde por medio de la afinidad a lectinas mostramos la presencia de residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, entre otros, distribuidos en la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo, además observamos que estos carbohidratos se modifican durante la capacitación [34; 64; 65]. Kawakami y col. [68], utilizando diferentes lectinas, identificaron cambios en la localización de glicoproteínas como resultado de la capacitación de espermatozoides de perro; ellos encontraron patrones de tinción en la cabeza del espermatozoide como resultado de la incubación bajo condiciones capacitantes.

Los resultados del análisis electroforético de las proteínas retenidas por la lectina Con-A en espermatozoides no capacitados, demuestra, que la lectina retiene proteínas de masa molecular entre 14 y 112 kDa. Al comparar estos resultados con los observados en espermatozoides capacitados, se pudo identificar que el número de proteínas con residuos de manosa disminuye durante la capacitación. Al realizar la electroforesis bidimensional en espermatozoides no capacitados, observamos que la familia de isoformas de 24 kDa desaparece al igual que las proteínas básicas menores

de 20 kDa. Estos resultados nos demuestran que durante la capacitación de espermatozoides de cerdo, las proteínas con residuos de manosa se modifican y algunas de ellas son removidas durante este proceso. Estos resultados coinciden con trabajos previos. Utilizando esta lectina se determinó que el patrón de distribución de los residuos de manosa se modifican durante la capacitación y la reacción acrosomal [34; 64]. Varios autores han demostrado la participación de los sitios de unión de Con-A con la unión del espermatozoide a la ZP en humanos. La expresión de estos receptores en la superficie del espermatozoide se incrementa durante la capacitación por lo tanto la expresión de residuos de manosa se relaciona con el estado acrosomal del espermatozoide y su potencial fertilizante [25]. Así mismo, se demostró que la alteración en el patrón de distribución de este carbohidrato durante la capacitación está relacionada con problemas de infertilidad [64].

Recientemente se ha relacionado la interacción carbohidrato-proteína con la formación del reservorio del espermatozoide en el oviducto (Tienthai, 2004 ). Los sitios de unión L-Fucosa se pierden durante la capacitación y los de unión D-manosa interactúan con el oviducto [112]. En cerdo la formación de dicho reservorio, contiene residuos de manosa [49]. Las proteínas del plasma seminal de cerdo probablemente son las responsables de formar este reservorio y tal vez participen en la modulación o la regulación de la capacitación de espermatozoides [62]. Por otro lado, Amari y col. [9] describieron la importancia de la unión del espermatozoide a los residuos terminales  $\alpha$ -D-manosílicos de la cadena de oligosacáridos N-ligando de las glicoproteínas de la ZP de bovino. Estos hallazgos demuestran que los

espermatozoides requieren la presencia de residuos de manosa al término de la capacitación. Hasta el momento no se conoce la importancia funcional de este carbohidrato, todo parece indicar que el espermatozoide requiere de residuos de manosa en la superficie celular, para que el espermatozoide adquiera su capacidad fertilizante, es decir, realizar la RA, reconocer y unirse a la ZP del ovocito. En este estudio nosotros encontramos ocho proteínas con residuos de manosa, consideramos que estas glicoproteínas podrían ser de importancia en el reconocimiento de gametos o ser necesarias para que el espermatozoide de cerdo adquiera su poder fertilizante.

Los resultados de las proteínas retenidas por WGA muestran que hay una disminución en el número de proteínas con residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico comparadas con las proteínas presentes en espermatozoides no capacitados. Se identificaron 9 bandas mayoritarias con masas moleculares entre 14 y 99 kDa, es posible observar que las proteínas de 65 y 48 kDa no sufren cambios durante la capacitación, sin embargo la proteína de 26 kDa se modifica después de la capacitación. Ésta disminuye drásticamente su proporción, al parecer se pierde gran cantidad de esta proteína. Los datos del análisis bidimensional corroboran estos resultados, ya que en espermatozoides no capacitados, esta banda comprende a un grupo de isoformas con un rango de pI entre 4.5 a 6. Después de la capacitación este grupo de proteínas desaparece mostrando un patrón electroforético completamente diferente y las proteínas menores a 20 kDa se incrementan.

La fracción de PR por ambas lectinas tanto WGA como Con-A, en espermatozoides sin capacitar presentan una mayor concentración de proteínas con Mr menores a 20 kDa y éstas corresponden a proteínas con Mr y pI cercanos. Sin

embargo después de la capacitación se observa disminución en el número de proteínas, principalmente se pierden proteínas con pI(s) básicos. Se ha propuesto que una familia de polipéptidos de 12 a 16 kDa llamadas espermadhesinas son las responsables de la interacción primaria con la ZP. Estas proteínas están asociadas periféricamente a la superficie del espermatozoide y constituyen el mayor componente del plasma seminal. Se han identificado diversas espermadhesinas entre las que se encuentran AWN, AQN-1, AQN-2, PSP-1, PSP-2), así como sus isoformas glicosiladas [134]. Después de la eyaculación, cubren la tercera parte del acrosoma y la mayoría de ellas son liberadas durante la capacitación *in vitro* [30]. Se considera que las espermadhesinas que se mantienen en la superficie de los espermatozoides capacitados son en buena parte, las responsables de actuar como proteínas de unión a la ZP [135]. Consideramos que las proteínas de baja masa molecular con residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico remanentes en espermatozoides capacitados, podrían estar relacionadas con la familia de espermadhesinas y estar involucradas en el reconocimiento de gametos [143].

Diversos estudios han demostrado que la membrana plasmática del espermatozoide de diferentes mamíferos, presenta microdominios lipídicos denominados rafts [26; 122]. Gestel y col. [143] mostraron la presencia de microdominios lipídicos durante la capacitación *in vitro*, identificaron proteínas específicas de microdominios lipídicos (Caveolina-1 y Flotillina-1) en células espermáticas, y observaron que la capacitación induce cambios en la distribución de estas proteínas en la membrana. Por medio de electroforesis bidimensional identificaron varias proteínas presentes en fracciones de membranas resistentes a

detergentes que están relacionadas con los microdominios lipídicos, encontraron proteínas involucradas con la unión primaria a la ZP como espermadhesinas AQ-3,  $\beta$ -fertilina y preproacrosina [143].

Se sabe que la capacitación espermática está relacionada con la fosforilación de proteínas. En espermatozoides de ratón se ha demostrado, que el flujo de colesterol de la membrana plasmática durante la capacitación es necesaria y suficiente para estimular la fosforilación de tirosina en varias proteínas del espermatozoide [149]. Se han identificado fosfoproteínas en el espermatozoide, pero su regulación con respecto a la capacitación no es clara. En bovino la fosforilación de proteínas está relacionada con la movilidad y con varias señales de transducción durante la capacitación. Tardif y col. [128], identificaron en espermatozoides de cerdo una proteína con masa molecular de 32 kDa, llamada P32; esta proteína tiene actividad de cinasa y se distribuye en el acrosoma. Durante la capacitación *in vitro* se incrementa la concentración de P32 y al ser fosforilada ésta se mantiene constante antes de que termine la capacitación. Nuestros resultados de la fracción retenida con WGA, muestran proteínas con Mr entre 30 y 40 kDa, consideramos que estas proteínas podrían estar relacionadas con P32, ya que otros autores han relacionado a P32 con proteínas con masa molecular cercana. Flesch [37], identificó una proteína de 34 kDa en la superficie de espermatozoides de cerdo que está relacionada con la capacitación. Kalab y col. [66], reportaron en cerdo, varias proteínas espermáticas (P34, P38, P40 y P44), las cuales fueron fosforiladas y reguladas por AMPc. Recientemente se encontró que la capacitación requiere de la fosforilación de proteínas, se mostró correlación

positiva de P32 entre los niveles de fosforilación de tirosina y el porcentaje de espermatozoides capacitados [9]. En ratón, los espermatozoides no capacitados se unen a la ZP pero no se induce la reacción acrosomal, mientras que cuando son capacitados los espermatozoides se pueden unir a la ZP y realizar la reacción acrosomal [147]. Uno de los cambios necesarios que ocurre durante la capacitación es la distribución adecuada de los componentes de la membrana plasmática para permitir la interacción y la activación de señales que modulan la función del espermatozoide durante la interacción de [11].

Al realizarse el análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas retenidas por Con-A y por WGA se encontró que una de las proteínas obtenidas corresponde a AS-A. Estos resultados se confirmaron al secuenciar las principales bandas del extracto total de proteínas de espermatozoides capacitados, ya que también se encontró la presencia de AS-A. Estudios en espermatozoides de ratón, mostraron que la proteína AS-A se localiza en la membrana plasmática y/o en la fracción soluble acrosomal [126]. Mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía electrónica se confirmó que AS-A está presente en la superficie de la membrana de la cabeza del espermatozoide y en la región post-acrosomal, además existen evidencias de que está presente en el acrosoma de varias especies de mamíferos [94; 126]. (En otro estudio, se produjeron anticuerpos contra AS-A para demostrar la importancia de esta enzima en la unión del espermatozoide al ovocito y se encontró que esta molécula reduce la unión de manera dosis dependiente, inhibiendo la unión en un 70% en cerdo y ratón [22]. Nuestros resultados confirman que AS-A está presente en espermatozoides capacitados de cerdo y hasta donde

sabemos, no se había reportado la presencia de residuos de manosa y N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en dicha proteína.

Con respecto a las otras proteínas secuenciadas del extracto total de espermatozoides capacitados, se encontró que corresponden a las proteínas hialuronidasa y lactadherina. La hialuronidasa es una molécula de adhesión reportada en espermatozoides de cerdo [28]. La lactadherina se encontró en toda la región acrosomal de espermatozoides de cerdo [33, 105]. Otros autores aislaron lactadherina de cerdo y de leche de bovino por cromatografía de afinidad utilizando como ligando a la ZP de cerdo [162].

A pesar de que en años recientes se han identificado varias proteínas asociadas a la membrana plasmática de espermatozoides, existe controversia con respecto a la identidad de las proteínas espermáticas que participan como moléculas de unión a la ZP, de manera particular a su componente ZP3. Se han identificado, y en algunos casos caracterizado, a las proteínas espermáticas de mamíferos especialmente en ratón se reportaron: el receptor a tirosina cinasa (p95);  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (GalTasa) y sp56 [18, 79; 86].

El receptor p95 se encuentra en la superficie de la cabeza de espermatozoides de ratón y humano que tienen el acrosoma intacto [20; 79]. Este receptor se autofosforila en respuesta a la interacción directa con la ZP3 [78], aunque también existen reportes que muestran que p95 podría fosforilarse gradualmente durante la capacitación [148] ), y que está regulado por una vía de señalización AMP cíclico/proteína cinasa A [149].



La  $\beta$ -1,4-Galactosiltransferasa es una enzima que está orientada externamente sobre la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides. Es considerada como una de las proteínas necesarias para la unión de estos con la ZP [123]. Ésta participa en la síntesis de carbohidratos complejos y reacciona con residuos de N-acetilglucosamina o de N-acetilgalactosamina de la ZP murina por su capacidad de funcionar como lectina más que como enzima [14]. En espermatozoides recién eyaculados, los sitios de unión a dicha enzima están enmascarados por “factores descapacitantes” derivados de glucósidos epididimarios, que son removidos durante la capacitación [16].

En cerdo se ha identificado una gran cantidad de proteínas asociadas a la membrana plasmática de espermatozoides, se han identificado proteínas espermáticas que interactúan con la ZP de manera especie-específica. Entre las proteínas más estudiadas y propuestas como responsables de la unión entre gametos se encuentran las espermadhesinas, la zonadhesina, la Apz, entre otras. La zonadhesina es una proteína transmembranal que presenta alta afinidad especie-específica de unión a zona, está compuesta por dos cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente, una de Mr 105 (p105) y otra de Mr 45 (p45) [55]; se localiza en la parte anterior de la cabeza de espermatozoides de cerdo, tanto del epidídimo como eyaculados y capacitados [75].

La APz es una proteína integral de membrana plasmática de espermatozoides capacitados y no capacitados, presenta una Mr de 55 kDa. No muestra actividad enzimática, es un componente minoritario de la membrana de espermatozoides,

representa menos del 1% de proteína total de membrana y muestra una alta afinidad por polisacáridos sulfatados [103]. Mediante el uso de anticuerpos, se mostró que está presente en espermatozoides epididimarios y se incrementa después de la eyaculación en asociación con la capacitación. Esta proteína es capaz de bloquear parcialmente la unión entre gametos [104].

La Sp47 es una proteína que tiene una Mr de 47 kDa, está asociada a la periferia de la cabeza del espermatozoide. Por inmunofluorescencia indirecta se observó que se localiza sobre la región acrosomal de espermatozoides testiculares, epididimarios y capacitados [33].

Como se puede ver la capacitación es una etapa muy importante para el proceso de fertilización. La expresión y modificación de los carbohidratos y proteínas de la membrana plasmática en el espermatozoide son necesarios para el reconocimiento del espermatozoide a la ZP. Existe una gran variedad de moléculas espermáticas que se consideran como responsables de la unión entre gametos. Consideramos que es necesario continuar investigando los procesos bioquímicos y moleculares para integrar y comprender la secuencia de eventos durante la interacción de los gametos.

## CONCLUSIONES

La cantidad de proteínas obtenidas después de la capacitación disminuye considerablemente con respecto a la cantidad obtenida en espermatozoides no capacitados.

Se lograron aislar proteínas espermáticas con residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico por medio de cromatografía de afinidad con Con-A y WGA respectivamente, lo cual indica que estos carbohidratos abundan en la membrana plasmática de espermatozoides capacitados en forma de glicoproteínas.

Los resultados del presente trabajo demuestran que los espermatozoides capacitados de cerdo contienen una amplia variedad de proteínas con residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico.

Se confirmó la presencia de lactadherina y hialuronidasa en espermatozoides capacitados de cerdo, reportadas como proteínas que participan en el proceso de fertilización, principalmente en la RA y en el reconocimiento del espermatozoide con la ZP.

Se confirmó la presencia de la proteína arilsulfatasa en espermatozoides de cerdo y se encontró como dato novedoso que esta proteína continúa presente en espermatozoides capacitados y que tiene residuos de manosa y de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico como parte de su glicosilación.

## PERSPECTIVAS

Hasta la fecha, varias glicoproteínas espermáticas se postulan como responsables de la unión entre gametos de cerdo. Por lo tanto, es necesario clarificar qué moléculas podrían actuar como sistema ligando-receptor en el modelo porcino.

Es por esto que proponemos las siguientes líneas de investigación:

Ya que varias de las glicoproteínas que contienen residuos de manosa y N-acetilglucosamina y/o ácido siálico presentes en espermatozoides capacitados de cerdo y aisladas en este trabajo no pudieron secuenciarse por degradación de Edman, debería intentarse su identificación por un método proteómico. El método que proponemos es el Análisis Multidimensional de proteínas (MudPit). Este consiste en la hidrólisis de las glicoproteínas aisladas por cromatografía de afinidad, seguida de la separación de los péptidos por cromatografía bidimensional y por último el análisis de los péptidos por espectrometría de masas bidimensional. Esta técnica permite el análisis e identificación de mezclas de proteínas, ya que los resultados son comparados con las bases de datos y se pueden identificar la mayoría de las proteínas presentes en una mezcla con sólo un experimento.

- Determinar si una o varias de estas proteínas, importantes en la capacitación, podrían servir como marcadores de espermatozoides que puedan realizar la capacitación y por lo tanto sean buenos candidatos para fertilizar. Esto tendría una aplicación directa en el área de producción animal pues permitiría detectar

qué animales podrían servir como sementales y cuáles tienen espermatozoides con deficiencias en su capacidad fertilizante.

- Determinar cómo es la glicosilación precisa de las proteínas retenidas por cromatografía de afinidad con la lectina WGA por medio de técnicas de secuencia de carbohidratos.
- Determinar la cinética de desplazamiento de la Arilsulfatasa-A en la membrana plasmática de espermatozoides antes, durante y después de la capacitación, mediante el uso de anticuerpos específicos y a nivel de microscopía óptica y electrónica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adeoya-Osiguwa SA, Dudley RK, et al. (1998): FPP modulates mammalian sperm function via TCP-11 and the adenylyl cyclase/cAMP pathway. *Mol Reprod Dev* 51:468-76.
2. Ahluwalia B, Farshori P, et al. (1990): Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 22:53-62.
3. Ahuja KK (1985): Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am J Anat* 174:207-223.
4. Ain R, Uma Devi K, et al. (1999): Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Mol Hum Reprod* 5:618-26.
5. Alberts B, Bray D, et al. (1994): *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición, ed. Robetson M. Barcelona.
6. Altschul SF, Madden TL, et al. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
7. Amari S, Yonezawa N, et al. (2001): Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 59:221-6.
8. Avelzano MI, Rotstein NP, Vermouth NT (1992): Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmemylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J* 283 ( Pt 1):235-41.
9. Bailey JL, Tardif S, et al. (2005): Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology* 63:599-614.

10. Bains HK, Sehgal S, Bawa SR (1992): Human sperm surface mapping with lectins. *Acta Anat* 145:207-211.
11. Baker SS, Thomas M, Thaler CD (2004): Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J Androl* 25:744-51.
12. Ban DD, Przelecka A (1981): Surface coat of plasma membrane of L-1210 lymphoid leukemia cells. A cytochemical study. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 19:3-10.
13. Bearer EL, Friend DS (1990): Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microsc Tech* 16:281-97.
14. Benau DA, McGuire EJ, Storey BT (1990): Further characterization of the mouse sperm surface zona-binding site with galactosyltransferase activity. *Mol Reprod Dev* 25:393-9.
15. Benhamou N (1989): Preparation and application of lectin-gold complexes. In *Colloidal Gold : Principles, Methods and Applications*, Hayat MA, (Ed) San Diego: Academic Press, Inc, pp 95-143.
16. Benoff S (1997): Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* 3:599-637.
17. Benoff S (1998): Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci* 3:D1220-40.
18. Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD (1995): Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 269:86-9.
19. Brooks DE, Tate ME, et al. (1981): Phosphoglycopeptide, a major constituent of the spermatophoric plasma of the octopus (*Octopus dofleini martini*). *J Reprod Fertil* 63:515-21.
20. Burks DJ, Carballada R, et al. (1995): Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269:83-6.
21. Calvo A, Pastor LM, et al. (2000): Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J Reprod Fertil* 120:325-35.

22. Carmona E, Weerachayanukul W, et al. (2002): Arylsulfatase A Is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zone pellucida binding. *Dev Biol* 247:182-196.
23. Cheng JS, Doncel GF, et al. (1995): Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zone pellucida binding. *Journal of Andrology* 16:55-63.
24. Cooper GW, Bedford JM (1971): Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J Reprod Fertil* 25:431-6.
25. Cornwall GA, Tulsiani DRP, Orgebin-Crist N (1991): Inhibition of the mouse sperm surface D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod* 44:913-921.
26. Cross N (2004): Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 71:1367-73.
27. Damjanov I (1987): Biology of disease : lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigation* 57:5-20.
28. Day AE, Quilter CR, et al. (2002): Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping. *Anim Genet* 33:211-214.
29. Dell A, Morris HR, et al. (1999): The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1473:196-205.
30. Dostálová Z, Llanos MN, et al. (1994): Quantitation of boar spermadhesins in accesory sex gland fluids and on the surface epididymal, eyaculatedand capacitated spermatozoa. *Biochem Biophys Acta* 1200:48-54.
31. Eddy EM, O'Brien DA (1994): *The Physiology of reproduction*. 2 ed. The Physiology of reproduction, ed. Knobil E, Neill JD. Vol. 1. New York: Raven Press. 29-77.
32. Emiliozzi C, Fenichel P (1997): Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* 56:674-9.



33. Ensslin M, Vogel T, et al. (1998): Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol Reprod* 58:1057-64.
34. Fierro R, Bene MC, et al. (1998): Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry. *Ital J Anat Embryol* 103:75-84.
35. Fierro R, Foliguet B, et al. (1996): Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl* 36:187-196.
36. Flannery B, Epel D (1998): Effects of wheat germ agglutinin on tunicate egg activation and fertilization: is there a plasma membrane sperm receptor system on *Ascidia ceratodes* eggs? *Dev Growth Differ* 40:297-306.
37. Flesch FM, Colenbrander B, et al. (1999): Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 262:787-92.
38. Flesch MF, Voorhot WF, et al. (1998): Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* 59:1530-1539.
39. Flowers WL (1997): Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl* 52:67-78.
40. Fraser L, Herold E (1990): Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
41. Fraser LR (1998): Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol Reprod Dev* 51:193-202.
42. Fraser LR (1998): Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 13 Suppl 1:9-19.
43. Frits M, Flesch FM, Gadella BM (2000): Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197-235.

44. Furuya S, Endo Y, et al. (1993): Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. *Fertil Steril* 59:1285-90.
45. Gabriel LK, Franken DR, et al. (1994): Wheat germ agglutinin receptors on human sperm membranes and sperm morphology. *Andrologia* 1994:5-8.
46. Garner DL, Hafez E, S .E. (1993): Spermatozoa and seminal plasma. In *Reproduction in Farm Animals*, Hafez ESE, (Ed) Philadelphia: Lea & Febiger, pp 165-187.
47. Geussova G, Peknicova J, et al. (1997): Monoclonal antibodies to canine intra-acrosomal sperm proteins recognizing acrosomal status during capacitation and acrosome reaction. *Andrologia* 29:261-8.
48. Gordon I (1994): Laboratory production of cattle embryos. In *Biotechnology in agriculture* Cambridge: Univ. Press Cambridge, pp 143-169.
49. Green CE, Bredl J, et al. (2001): Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction* 122:305-15.
50. Griffiths G (1993): *Fine structure immunocytochemistry*. Berlin: Springer-Verlag. 307-320.
51. Grignon G (1996): *Histologie*. Paris: Ellipses. 366.
52. Hafez ESE (1993): *Reproduction in farm animals*. 6a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 573.
53. Harayama H, Miyake M, et al. (1998): Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 10:445-50.
54. Hardy DM, Garbers DL (1994): Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *J Biol Chem* 269:19000-19004.
55. Hardy DM, Garbers DL (1995): A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270:26025-8.

56. Harkema W, Colenbrander B, et al. (2004): Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. *Theriogenology* 61:215-26.
57. Harkema W, Harrison RA, et al. (1998): Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* 58:421-30.
58. Harkema W, Visser I, et al. (2004): Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins in vitro in relation to fertilization rates in vivo. *Theriogenology* 61:227-38.
59. Harrison RA (1996): Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:581-94.
60. Herrera JA, Fierro R, et al. (2002): Acrosome reaction in fertile and subfertile boar sperm. *Archives of Andrology* 48:161-167.
61. Holt WV (1995): The sperm plasma membrane. In *Colloque INSERM/John Libbey, Fenichel P, Parinaud J, (Eds). EUROTEXT LTD, pp 1-16.*
62. Jelinkova P, Liberda J, et al. (2004): Mannan-binding proteins from boar seminal plasma. *J Reprod Immunol* 62:167-82.
63. Jensen LJ, Schmitt BM, et al. (1999): Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol Reprod* 60:573-9.
64. Jiménez I, González-Márquez H, et al. (2002): Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boar by flow cytometry. *Arch Androl* 48:159-166.
65. Jiménez I, González-Márquez H, et al. (2003): Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59:1171-1180.
66. Kalab P, Peknicova J, et al. (1998): Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 51:304-14.

67. Kaul G, Kumar M, et al. (2000): Surface protein changes in goat spermatozoa during capacitation. *Indian J Exp Biol* 38:18-25.
68. Kawakami E, Arai T, et al. (2000): Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J Vet Med Sci* 62:65-8.
69. Kawakami E, Hirano T, et al. (2004): Protease-induced hyperactivation of canine spermatozoa associated with disappearance of lectin-binding glycoproteins on their surface. *J Vet Med Sci* 66:1027-31.
70. Koehler JK (1981): Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Arch Androl* 6:197-217.
71. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
72. Lambert H (1984): Role of sperm-surface glycoproteins in gamete recognition in two mouse species. *J Reprod Fertil* 70:281-284.
73. Lassalle B, Testart J (1994): Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J Reprod Fertil* 101:703-11.
74. Lasserre A, Gonzalez-Echeverria F, et al. (2003): Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertil Steril* 79 Suppl 3:1606-15.
75. Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG (2001): Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 65:1691-700.
76. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996): Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55:684-92.
77. Lee SH, Ahuja K (1987): An investigation using lectins of glycocomponents of mouse spermatozoa during capacitation and sperm-zona binding. *J Reprod Fertil* 80:65-74.
78. Leyton L, LeGuen P, et al. (1992): Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11692-5.

79. Leyton L, Saling P (1989): Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 108:2163-2168.
80. Lopez ML, de Souza W, Bustos-Obregon E (1987): Cytochemical analysis of the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during the epididymal transit. *Gamete Res* 18:319-32.
81. Lowry OH, Rosebrough NJ, et al. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
82. Marina F, Marina S (2003): Comments on oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 6:401-2.
83. Marina P, Annamaria L, et al. (2002): Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 63:192-201.
84. Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA (1996): Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 8:1165-78.
85. Merrill CR (1990): Gel-Staining Techniques. In *Guide to Protein Purification*, Deutscher MP, (Ed) San Diego California: Academic Press, INC, pp 477-488.
86. Miller D, Brough S, al-Harbi O (1992): Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 7:637-45.
87. Miller DJ, Burkin HR (2001): Gamete adhesion molecules. *Reprod Suppl* 58:147-58.
88. Moore HD (2001): Molecular biology of fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 57:105-10.
89. Mori K, Daitoh T, et al. (1989): Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 161:207-211.
90. Nakano M, Yonezawa N (2001): Localization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells tissues Organs* 168:65-75.

91. Nassar A, Mahony M, et al. (1999): Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 71:919-23.
92. Nelson L, Cox M (2001): *Lehninger Principios de Bioquímica*. tercera edicion ed. Barcelona: Ed Omega. 398-430.
93. Nieto A, Gutierrez Sagal R, Perez Martinez M (1997): Isolation and characterization of a rabbit epididymal secretory glycoprotein that associates to the spermatozoon surface. *Mol Reprod Dev* 46:337-43.
94. Nikolajczyk BS, O'Rand MG (1992): Characterization of rabbit testis beta-galactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction. *Biol Reprod* 46:366-378.
95. Nixon B, Lu Q, et al. (2001): Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:46-57.
96. Nolan JP, Hammerstedt RH (1997): Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *Faseb J* 11:670-82.
97. O'Rand M, Widgren EE, Fisher SJ (1988): *Characterization of the rabbit sperm membrane autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein*. *Dev Biol* 129:231-240.
98. Obermaier C (1998): third siena 2D electrophoresis meeting. Proteome SCIENCES PLC.
99. Olson GE, Danzo BJ (1981): Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol Reprod* 24:431-43.
100. Olson GE, Hamilton DW (1978): Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 19:26-35.
101. Osheroff JE, Visconti PE, et al. (1999): Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 5:1017-26.

102. Parkkila S, Kaunisto K, et al. (1991): A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* 95:477-82.
103. Peterson RN, Campbell P, et al. (1991): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 28:260-71.
104. Peterson RN, Hunt WP (1989): *Identification, isolation and properties of a plasma membrane protein involved in the adhesion of boar sperm to the porcine zona pellucida*. *Gamete Res* 23:103–118.
105. Petrunkina AM, Lakamp A, et al. (2003): Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction* 125:377-387.
106. Prasad SV, Dunbar BS (2000): Human sperm-oocyte recognition and infertility. *Semin Reprod Med* 18:141-9.
107. Primakoff P, Cowan A, et al. (1988): Purification of the guinea pig sperm PH-20 antigen and detection of a site-specific endoproteolytic activity in sperm preparations that cleaves PH-20 into two disulfide-linked fragments. *Biol Reprod* 38:921-34.
108. Primakoff P, Myles DG (2002): Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296:2183-5.
109. Pukazhenthi BS, Long JA, et al. (1998): Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species. *J Androl* 19:675-85.
110. Rankin T, Dean J (2000): The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5:114-21.
111. Ravid A, Sagiv M, et al. (1990): Separation of sub-populations of sperm with higher fertility potential from normal and pathological semen by peanut agglutinin. *Andrologia* 22:225-30.
112. Revah I, Gadella BM, et al. (2000): Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol Reprod* 62:1010-5.

113. Reyes-Moreno C, Gagnon A, et al. (2000): Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl* 21:876-86.
114. Rillo M, Martínez E, et al. (1996): Boar semen evaluation in practice. *Reprod Domest Anim* 31:519-526.
115. Rosati F, Capone A, et al. (2000): Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. *Int J Dev Biol* 44:609-18.
116. Runnebaum IB, Schill WB, Topfer-Petersen E (1995): ConA-binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia* 27:81-90.
117. Saling PM (1989): Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol* 11:339-88.
118. Sartini BL, Berger T (2003): Changes in oocyte plasma membrane binding sites on boar spermatozoa with capacitation and acrosome reactions. *Reproduction* 125:865-70.
119. Sato I, Hamabe T, et al. (1995): A new method for the determination of the ABO blood type of semen by immunoblotting using anti-ABH antibodies following immunoprecipitation. *J Immunol Methods* 188:229-37.
120. Schröter S, Osterhoff C, et al. (1999): The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update* 5:302-313.
121. Selivonchick DP, Schmid PC, et al. (1980): Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 618:242-54.
122. Shadan S, James PS, et al. (2004): Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71:253-65.
123. Shur BD (1991): Cell surface beta 1,4 galactosyltransferase: twenty years later. *Glycobiology* 1:563-75.



124. Tanphaichitr N, Moase C, et al. (1998): Isolation of antiSLIP1-reactive boar sperm P68/62 and its binding to mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 49:203-216.
125. Tanphaichitr N, White D, et al. (1999): Role of male germ-cell specific sulfogalactosylglycerolipid (SGG) and its binding protein, SLIP1 in mammalian sperm-egg interaction. In *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*, Gagnon C, (Ed) Vienna, IL: Cache Press, pp 227-235.
126. Tantibhedhyangkul J, Weerachatanukul W, et al. (2002): Role of sperm surface Arylsulfatase a in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol Reprod* 67:212-219.
127. Tardif S, Dube C, Bailey J (2003): Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68:207-213.
128. Tardif S, Dube C, et al. (2001): Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 65:784-92.
129. Tauber R, Park CS, Reutter W (1983): Intramolecular heterogeneity of degradation in plasma membrane glycoproteins: evidence for a general characteristic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4026-9.
130. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A (1991): Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 56:113-8.
131. Ticha M, Kraus M, et al. (1998): Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. *Folia Biol (Praha)* 44:15-21.
132. Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2004): Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 80:131-46.

133. Topfer-Petersen E (1999): Molecules on the sperm's route to fertilization. *J Exp Zool* 285:259-66.
134. Topfer-Petersen E, Dostalova Z, Calvete JJ (1997): The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Adv Exp Med Biol* 424:301-10.
135. Topfer-Petersen E, Romero A, et al. (1998): Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30:217-24.
136. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4.
137. Trejo R, Betancourt M, Casas E (2005): Los gametos: células reproductoras de los mamíferos. México: Manual Moderno. 1-46.
138. Tulsiani DR (2003): Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc Res Tech* 61:18-27.
139. Tulsiani DR, Abou-Haila A (2001): Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* 9:51-69.
140. Tulsiani DR, Chayko CA, et al. (1996): Temporal surge of glycosyltransferase activities in the genital tract of the hamster during the estrous cycle. *Biol Reprod* 54:1032-7.
141. Tulsiani DR, Komiya YH, Araki Y (1997): Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* 57:487-494.
142. Tulsiani DRP, Abou-Halia A, et al. (1998): The Biological and Funcional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzimes in Mamalian Fertilization. *Experimental Cell Research* 240:151-164.
143. van Gestel RA, Brewis IA, et al. (2005): Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 11:583-90.

144. Vázquez JM, Martínez E, et al. (1996): Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochem* 98:93-100.
145. Vierula M, Rajaniemi H (1981): Changes in surface protein structure of bull spermatozoa during epididymal maturation. *Int J Androl* 4:314-20.
146. Visconti PE, Bailey JL, et al. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-37.
147. Visconti PE, Kopf GS (1998): Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
148. Visconti PE, Moore GD, et al. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121:1139-50.
149. Visconti PE, Stewart-Savage J, et al. (1999): Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61:76-84.
150. Vos JP, Lopes-Cardozo M, Gadella BM (1994): Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. *Biochim Biophys Acta* 1211:125-49.
151. Wassarman P, Chen J, et al. (1999): Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 285:251-8.
152. Wassarman P, Litscher E (2001): Multiple functions of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3, the sperm receptor. *Ital J Anat Embryol* 106:21-32.
153. Wassarman PM (1992): Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 46:186-91.
154. Wassarman PM (1999): Fertilization in animals. *Dev Genet* 25:83-6.
155. Wassarman PM (1999): Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96:175-83.
156. Wassarman PM (2002): Channels of communication in the ovary. *Nat Cell Biol* 4 Suppl:7-9.

157. Wassarman PM (2002): Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med* 69:148-55.
158. Wassarman PM, Litscher ES (2001): Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:36-45.
159. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD, (Eds). New York: Raven Press, pp 189-317.
160. Youssef HM, Doncel GF, et al. (1996): Mannose-binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. *Fertil Steril* 66:640-5.
161. Yurewicz EC, Sacco AG, et al. (1998): Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 273:7488-94.
162. Zayas-Perez H, Tello-Solis S, et al. (2005): Circular dichroism of pig and bovine lactadherins and their affinity for the pig zona pellucida. *Protein Pept Lett* 12:299-303.

Carbohydrate affinity chromatography indicates that Arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues.

Jiménez Irma<sup>1-2</sup>, Fierro Reyna<sup>2</sup>, González-Márquez Humberto<sup>2</sup>, Mendoza-Hernández Guillermo<sup>3</sup>, Romo Salvador<sup>4</sup>, Betancourt Miguel<sup>2</sup>.

1. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
2. Laboratorio de Biología Celular. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. México.
3. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM. México.
4. Laboratorio de Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

## **Abstract**

Carbohydrate residues on membrane proteins from sperm are important in gamete interaction. In recent years, Arylsulfatase A (AS-A) has been acquiring an important role from the various putative gamete interaction responsables in sperm. The aim of this study was to determine if the capacitated boar sperm Arylsulfatase-A (AS-A), contains D-mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues by its purification using affinity chromatography with *Concanavalia ensiformis* Agglutinin (Con-A) or Wheat Germ Agglutinin (WGA) as ligands. Sperm samples were capacitated

in TALP-HEPES medium. Protein extract was added to the affinity columns. Sequencing of retained proteins was done after SDS-PAGE. Total capacitated sperm proteins electrophoresis showed molecular masses between 14 kDa and 102 kDa. A major band of 68 kDa, and 2 minor bands of 52 kDa and 47 kDa were observed. They were AS-A, hyaluronidase and lactadherin, respectively. The Con-A-retained proteins (RP) pattern showed bands from 14 to 98 kDa. After sequencing and BLAST analysis, the 62 kDa band corresponded to Arylsulfatase-A. The WGA RP fraction showed bands from 14 to 100 kDa. The 65 kDa band corresponded to AS-A. This study showed that AS-A has mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues as part of its glycosilation.

**Keywords:** Arylsulfatase-A, boar sperm, Con-A, sperm capacitation, WGA.

### **Corresponding author**

Reyna Fierro. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. Ciencias de la Salud. Apdo. Postal 55-535. C.P. 09340 México D. F. MEXICO.

e-mail: [reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

### **Acknowledgments**

The authors thank Jorge Lodigiani for his help in image digitalization. We thank Dr. Hector Serrano for critical reading and suggestion in the preparation of this

manuscript. This study was partially supported by CONACYT (México) grant 5-37923-B. Jiménez I. was supported by CONACYT scholarship grant 164763.

## **Introduction**

The first stage in gamete interaction is the union of the sperm to the zona pellucida (ZP), which allows the sperm to penetrate it and to fuse with the oocyte plasma membrane [151];[159]). Protein-carbohydrate interaction is one of the main mechanisms of sperm-ZP binding [151];Topfer-Petersen, 1997 ). ZP from all mammals, consist of three heavily glycosylated polypeptides ([106], termed ZP1, ZP2 and ZP3. In mouse, O-linked oligosaccharides to ZP3 are important for initial sperm binding and represent the primary sperm receptor on ZP [154]. Other studies demonstrated that in boar, both N- and O-linked oligosaccharides mediate sperm-ZP binding [154; 161].

Besides the profuse information of sperm receptor on ZP, there is scarce information about the molecular identity and biochemical characterization of the sperm proteins that participate in the primary and secondary binding to the ZP. A number of sperm surface proteins have been reported to recognize ZP [29], with several of them having lectin properties, including spermadhesins, zonadhesin, and sp56. In addition, a number of ZP-binding proteins on the sperm surface are glycoenzymes, such as galactose binding protein,  $\beta$ -1,4-galactosyl transferase, fucosyltransferase and  $\alpha$ -D-mannosidase [25; 95]. These enzymes are believed to bind to their ligands, ZP sugar residues with no alteration of their enzyme activity. This interaction has been

considered as the basis of the interaction between sperm Zona receptor and the ZP sperm receptor.

By using lectin staining and electron microscopy [35] demonstrated the presence of mannose and N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues on the sperm membrane. The distribution of these molecules changes during capacitation and acrosome reaction [64, 65]. Other authors reported the participation of mannose in binding of sperm to human ZP [23; 89]. Detection of these receptors is increased during capacitation, suggesting that their presence is related to the sperm acrosomal stage and correlate to the sperm fertilizing potential [34].

Carmona et al. [22], described a boar sperm surface protein, P68, with binding ability to ZP. Three P68 tryptic peptides sequences reveled high identity (81-100%) to human Arylsulfatase A (AS-A) [124, 125]. These results identified the sperm surface P68 as AS-A and suggest a new location, the cell surface, for AS-A, previously recognized as a lysosomal/acrosomal enzyme [44]. The presence of AS-A was ultimately demonstrated by electron microscopic immunogold labeling on the sperm head surface, on top of the plasma membrane. All these findings indicate that boar sperm AS-A was an active peripheral plasma membrane enzyme [22].

The aim of present study was the purification of AS-A by affinity chromatography with *Concanavalia ensiformis* Agglutinin (Con-A) or Wheat Germ Agglutinin (WGA) as ligands to determine if AS-A from the surface of capacitated boar sperm contains D-mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues.



## **Materials and methods**

### Collection and semen evaluation

Semen samples were obtained from the sperm-rich ejaculated fractions using the gloved-hand method, removing the gelatinous fraction. Semen samples were obtained from 3 healthy fertile boars. Samples were classified as normozoospermics according to criteria described [46]. Only ejaculates showing 85% progressive motility, more than 90% viability and less than 10% sperm abnormalities were used. Sperm viability was evaluated by eosine-nigrosin staining.

All reagents were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, M.O. USA) unless otherwise indicated. Milli Quality (Millipore) water was used to prepare all solutions.

### Capacitation

Semen was washed twice to remove the semen plasma, using phosphate-buffered saline solution (PBS) pH 7.4 added to an equal volume of semen. Samples were centrifuged at 600 g for 10 minutes; the pellet was resuspended in TALP-HEPES medium [65]. Washed sperm were incubated at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL and placed in a culture flask (Nunc Denmark) with 500 mL of capacitation medium TALP-HEPES supplemented with bovine serum albumin fraction V (6 mg/mL) and 7 mM sodium pyruvate, pH 7.4 for 4 h at 39°C in a humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere [65]. Capacitation was assessed by chlortetracycline staining under 495-nm UV epifluorescence microscope (Carl Zeiss) at 400X magnification as described by Fraser and Herold [40].

### Protein extraction

Sperm membrane proteins were extracted according to the technique described by Runnebaum et al. [116]. After capacitation, sperm were washed twice with PBS. Samples were centrifuged at 600 Xg for 10 min, the pellet was resuspended in sodium cholate 1%, containing PMSF 1mM and benzamidine 1mM pH 7.2 and refrigerated during 24 h. Cell extract was centrifuged at 5,000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was collected and centrifuged at 50,000 Xg for 30 min at 4°C [116]. Protein extract was dialyzed in binding buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5mM) containing PMSF 1mM, Benzamidine 1mM and a protease inhibitor cocktail, pH 7.4. Protein concentration was determined by Lowry assay [81].

### Affinity chromatography

Protein extract was added to a sepharose column conjugated to Con-A (5 mL HiTrap-Con-A, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) or to a sepharose column (1 mL HiTrap NHS-activated HP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), linked to WGA. Seven to 10 mg/mL of total protein were injected to the column at a flow rate of 0.5 mL per min. The column was washed with 10 column volumes of binding buffer. The retained proteins were eluted with binding buffer added with 0.5M methyl  $\alpha$ -D-gluco-pyranoside or 0.5M N-acetylglucosamine, respectively. Fractions of 2 mL were collected. Protein concentration was determined by Lowry assay [81].

### Polyacrilamide gel electrophoresis

Electrophoretic protein analysis was performed according to Laemmli [70] in 13% T, 4% C polyacrylamide gels. From each fraction, 50  $\mu$ g of protein were precipitated with cold acetone, solubilized in  $\beta$ -mercaptoethanol-containing buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, and 0.01% (w/v) bromophenol blue) and electrophoresed at 200 volts for 45 min in a Mini-Protean electrophoresis chamber (Bio-Rad, Hercules, CA). Coomassie blue stained gels were scanned and analyzed by using the Labworks 4.0 software (Imaging Systems, Inc USA). Molecular masses were determined with SDS-PAGE low range standards (BioRad, Hercules, CA).

### N-Terminal sequencing

Following SDS-PAGE, protein was electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (Polyscreen, Perkin Elmer, Boston MA) by the Towbin method [136] and stained with Coomassie blue R-250. Protein band was excised and subjected to limited Edman degradation sequencing in a gas-phase automated protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine CA) equipped with an on-line Beckman Gold HPLC system. In all cases the principal bands were sequenced and the N-terminal of some proteins were blocked. Aminoacid sequences were compared to those of the NCBI Protein database by using the BLAST algorithm for exact matches in pig [6].

## **Results**

### Analysis of boar sperm capacitation

Ejaculates from three clinically healthy boars were analyzed. The capacitation patterns were low in fresh samples ( $13 \pm 1.6$ ). After in vitro capacitation treatment, the percentage of sperm with capacitation pattern of fluorescence, increases to  $83 \pm 1.4$ .

#### Protein extraction and affinity chromatography

Membrane proteins from capacitated sperm were extracted. An average of  $1.8 \pm 0.56$  mg of protein/sample was obtained. Protein extract was loaded on sepharose affinity column attached to Con-A or WGA. Ten to 15 fractions of 2 ml were collected per assay. Both, the non-retained proteins (NRP) corresponding to the proteins that do not bind to the ligand, and the retained proteins (RP) in the column were collected. Two peaks were observed in the chromatogram, the higher corresponding to the NRP. After changing binding buffer for elution buffer, RP's were eluted and a less prominent peak was observed (Figure 1). Chromatograms for both lectin assays were similar.

#### Protein profiles and N-terminal analysis

Electrophoretic pattern for capacitated sperm shows proteins with molecular masses between 14 kDa and 102 kDa. A major band of 68 kDa and 2 minor bands of 52 kDa and 47 kDa were observed. The protein bands were subject to at least 10 cycles of Edman degradation using an automated gas-protein sequencer as described in Methods section. The first 10 amino acid residues were uniquely identified and homology search was performed using the non-redundant boar peptide sequence database facility of NCBI. It was found that 47 kDa protein corresponds to boar

lactadherin (CAA72379), 52 kDa to hyaluronidase (CAC83973) and 68 kDa to AS-A (NP999098) (Table 1).

The NRP fraction (Fig 2a), showed an electrophoretic pattern similar to the total protein extract of capacitated sperm, showing bands from 14 to 107 kDa. The RP pattern for Con-A showed bands from 14 to 98 kDa (Fig 2a). After sequencing and BLAST analysis, it was found that 62 kDa band corresponds to AS-A (NP999098). Proteins of 30 and 15 kDa were chains of Con-A (CAA25787.1). The N-terminal of the other bands, including the 98 kDa protein, were blocked. Electrophoretic pattern of NRP retained by WGA lectin from capacitated sperm is showed in figure 2b. The RP fraction showed bands from 14 to 100 kDa. The 65 kDa band corresponds to AS-A (NP999098), all other N-terminal protein sequence were blocked.

As showed in Figure 3, a search of the sequence on automated protein database revealed a high degree of identity to the corresponding sequence of AS-A from boar sperm.

## **Discussion**

In recent years a large number of proteins associated with the plasma membrane of boar sperm have been identified. However, their role and mechanisms involved in gamete interaction are not well understood. Gamete recognition and binding are species-specific and are controlled by oligosaccharides of the ZP and corresponding carbohydrates on sperm proteins (Michelmann, 2001 ).

The glycosidic chains of membrane proteins modulate the cell-to-cell binding, including the sperm-oocyte recognition and binding, the sperm oviductal cell adhesion and embryo implantation [154]. Several studies allowed the identification of receptors in the sperm cell and its ligands in the homologous ZP. The residues from terminal sugars recognized by the sperm in the ZP may be manosil, sialil, glucosamil, fucosil and  $\alpha$ ,  $\beta$ -galactosil. These glycans are implicated in the process of fertilization [151; 29].

In this study, a band of 52 kDa was found that corresponds to the protein hyaluronidase, which is an adhesion protein reported in boar sperm [28]. A 48 kDa band was also found in capacitated sperm, and by the limited sequence obtained, could be lactadherin. Our results agree with those by Petrunkina et al. [105], who reported the presence of lactadherin in the acrosomal region of boar sperm, and with those by Zayas et al. [162], who isolated porcine and bovine milk lactadherins by affinity chromatography using ZP as ligand.

The 68, 62 and 65 kDa proteins found in both, the total protein extract of capacitated sperm and in the RP fractions by affinity columns of Con-A and WGA respectively, were sequenced and correspond to AS-A. It has been reported that this protein is found on the surface of mouse and boar sperm, and is involved in the binding to the ZP [22; 126]. Our results confirm that AS-A is present in the boar capacitated sperm and exposes mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid. These results agree with previous reports describing the presence of these glycosidic residues in boar sperm capacitated membrane [64, 65].

Indirect immunofluorescence and electron microscopy studies showed that AS-A is located on the membrane of the sperm head and on the post-acrosomal region and can also be detected in the acrosome of several mammalian species [94; 126]. Antibodies raised against AS-A demonstrated the importance of this enzyme in the binding of the sperm to the oocyte since they effectively reduces the number of bound sperm in a dose-dependent manner in boars and mice [22].

In this study AS-A was isolated from boar capacitated sperm by affinity chromatography using separately Con-A and WGA, indicating that there are mannose, N-acetylglucosamine and/or sialic acid residues in its glycosilation. AS-A is a membrane protein of capacitated sperm. Further investigation is needed to fully characterize the glycosidic residues bore by AS-A and to determine its function.

## References

1. Altschul SF, Madden TL, et al. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
2. Carmona E, Weerachayanukul W, et al. (2002): Arylsulfatase A is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zone pellucida binding. *Dev Biol* 247:182-196.

3. Cheng JS, Doncel GF, et al. (1995): Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zone pellucida binding. *Journal of Andrology* 16:55-63.
4. Cornwall GA, Tulsiani DRP, Orgebin-Crist N (1991): Inhibition of the mouse sperm surface D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod* 44:913-921.
5. Day AE, Quilter CR, et al. (2002): Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping. *Anim Genet* 33:211-214.
6. Dell A, Morris HR, et al. (1999): The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1473:196-205.
7. Fierro R, Bene MC, et al. (1998): Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry. *Ital J Anat Embryol* 103:75-84.
8. Fierro R, Foliguet B, et al. (1996): Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl* 36:187-196.
9. Fraser L, Herold E (1990): Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
10. Fujii T, Kobayashi T, et al. (1992): Proteolytic processing of human lysosomal arylsulphatase A. *Biochim Biophys Acta* 1122:93-98.



11. Gao Z, Garbers DL (1998): Species diversity in the structure of zonadhesin, asperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion moleculelike domains. *J Biol Chem* 273:3415-3421.
12. Garner DL, Hafez ESE (1993): Spermatozoa and seminal plasma. In *Reproduction in Farm Animals*, Hafez ESE, (Ed) Philadelphia: Lea & Febiger, pp 165-187.
13. Jiménez I, González-Márquez H, et al. (2002): Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boar by flow cytometry. *Arch Androl* 48:159-166.
14. Jiménez I, González-Márquez H, et al. (2003): Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59:1171-1180.
15. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, et al. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
17. Michelmann H, Topfer-Petersen E, et al. (2001): Use of microbeads for the detection of binding sites on the human zona pellucida: a scanning electron microscopy (SEM) assay. *Andrologia* 33:266-271.
18. Mori K, Daitoh T, et al. (1989): Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 161:207-211.

19. Nakano M, Yonezawa N (2001): Localization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells tissues Organs* 168:65-75.
20. Nikolajczyk BS, O'Rand MG (1992): Characterization of rabbit testis betagalactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction. *Biol Reprod* 46:366-378.
21. Nixon B, Lu Q, et al. (2001): Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:46-57.
22. Petrunkina AM, Lakamp A, et al. (2003): Fate of lactadherin P47 during posttesticular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction* 125:377-387.
23. Prasad SV, Skinner SM, et al. (2000): Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 166:148-164.
24. Runnebaum IB, Schill WB, Topfer-Petersen E (1995): ConA-binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia* 27:81-90.
25. Tanphaichitr N, Moase C, et al. (1998): Isolation of antiSLIP1-reactive boar sperm P68/62 and its binding to mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 49:203-216.
26. Tanphaichitr N, White D, et al. (1999): Role of male germ-cell specific sulfogalactosylglycerolipid (SGG) and its binding protein, SLIP1 in mammalian sperm-egg interaction. In *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*, Gagnon C, (Ed) Vienna, IL: Cache Press, pp 227-235.

27. Tantibhedhyankul J, Weerachayanukul W, et al. (2002): Role of sperm surface Arylsulfatase a in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol Reprod* 67:212-219.
28. Topfer-Petersen E, Dostalova Z, Calvete JJ (1997): The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Adv Exp Med Biol* 424:301-310.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4354.
30. Wassarman P, Litscher E (2001): Multiple functions of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3, the sperm receptor. *Ital J Anat Embryol* 106:21-32.
31. Wassarman PM (1999): Fertilization in animals. *Dev Genet* 25:83-86.
32. Wassarman PM (1999): Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96:175-183.
33. Wassarman PM, Litscher ES (2001): Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:36-45.
34. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD, (Eds). New York: Raven Press, pp 189-317.
35. Yurewicz EC, Sacco AG, et al. (1998): Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 273:7488-7494.

36. Zayas-Perez H, Tello-Solis S, et al. (2005): Circular dichroism of pig and bovine lactadherins and their affinity for the pig zona pellucida. *Protein Pept Lett* 12:299-303.

Table 1. Proteins identified in capacitated boar sperm.

kDa	N-terminal amino acid sequence	Protein
47	GDFCDSSLCL	Lactadherin
52	DFRASPIIPN	Hyaluronidase
68	SPPNIVLIFAD	ArylsulfataseA

Proteins were sequenced and a computational database analysis was performed at NCBI with BLAST network service using the non-redundant peptide sequence database. Results revealed a high degree of similarity (100% identity).

Figure legends:

Figure 1. Affinity chromatography using immobilized lectin Con-A. Proteins were eluted adding methyl  $\alpha$ -D-gluco-pyranoside to the buffer at  $\downarrow$ . Both lectins chromatograms were similar. NRP non-retained proteins. RP retained proteins.

Figure 2. SDS-PAGE pattern of the affinity chromatography of proteins extracted from boar capacitated sperm. a. Con-A, b. WGA. Gels were stained with Coomassie blue R-250 and destained. MW, Low molecular weight standards (BioRad); TP: total proteins; NRP, non-retained proteins; RP, retained proteins; AS-A, Arylsulphatase; Con-A, Concanavalin-A; WGA, Wheat Germ Agglutinin.

Figure 3. Comparison of Arylsulfatase-A (AS-A) amino acid sequence with sequences obtained from boar capacitated sperm proteins. a) Total proteins (TP) extract of capacitated sperm, band of 68 kDa; b) Con-A retained proteins (RP) fraction, band of 62 kDa; c) WGA retained proteins fraction, band of 65 kDa; d) Arylsulfatase-A (AS-A) sequence. N-terminal protein sequence was performed from 1D SDS-PAGE electroblotted on to a PVDF membrane. Computational database analysis was performed at NCBI with the BLAST network service using the non-redundant peptide sequence database.

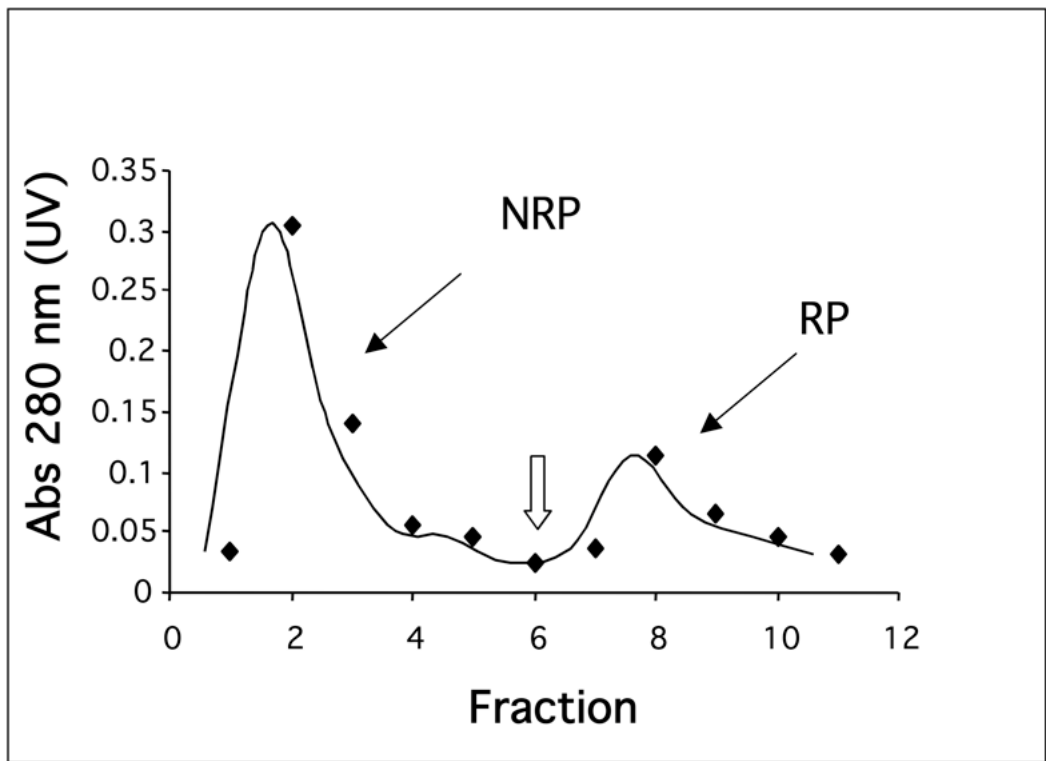


Figure 1.

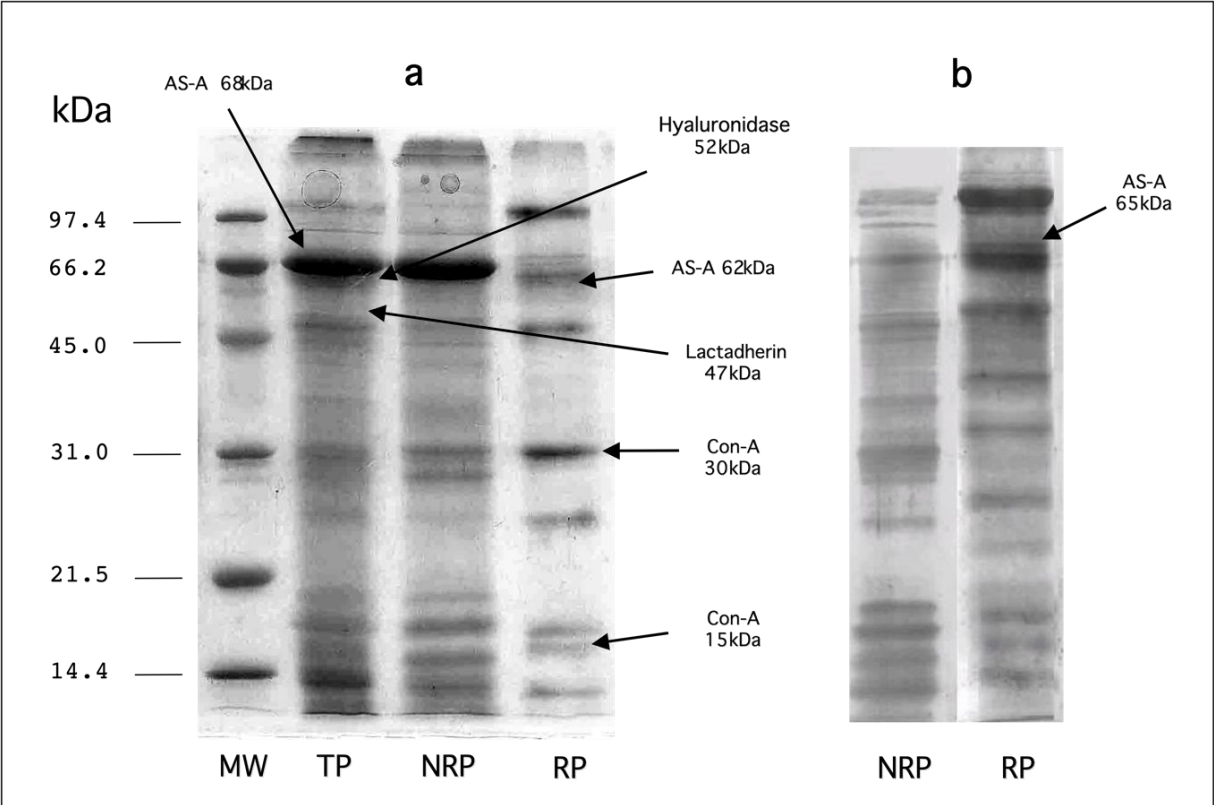


Figure 2.



<b>a) TP Capacitated Sperm</b>	<b>SPPNIVLIFAD</b>
<b>b) RP CON-A</b>	<b>SPPNIVLIFA</b>
<b>c) RP WGA</b>	<b>SPPNIVLIFA</b>
<b>d) AS-A</b>	MVALWALTALASGLAATS <b>SPPNIVLIFAD</b> DLGYGDLGSYGHPSSTTPNLDQLA AGGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGLYPGVLEPSSRGGLPLEEVT LAEVLAARGYLTGMAGKWHLGVGPEGAFLLPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNL TCFPPSTPCDGSCDQGLVPVPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYVAFARDLMADA QRQGRPFFLYYASHHHTYPQFSGQSFSGHSGRGPFGDSLMELDAAVGALMTAV GDLGLLGETLVIIFTADNGPETMRMSHGGCSGLLRGCGKGTTFEGGVREPALAFW PGHIAPGVTHELASSDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGVDLSPLLLGTGKSPRR TLFFYPAYPDEVVRGVFAVRSGKYKAHFFTQGSIHSDTTADPACHASSPLTAHE PLLFDLSEDPGENYNLLGGVAEVAPEVLQVLKQLQLLKAQFDAAVTFSPSQI ARGEDPALQICCPSCCTPRPSCCHCPELQP

Figure 3.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00026

IDENTIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO EXPRESADAS DURANTE LA CAPACITACION.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 24 del mes de febrero del año 2006 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ  
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA  
DRA. ELIA ROLDAN REYES  
DR. SALVADOR ROMO GARCIA  
DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

IRMA JIMENEZ MORALES  
FIRMA DE LA ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DE: IRMA JIMENEZ MORALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

SECRETARIO ACADÉMICO EN FUNCIONES DE DIRECTOR DE LA DIVISION DE C.B.S.

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DRA. ELIA ROLDAN REYES

VOCAL

DR. SALVADOR ROMO GARCIA

SECRETARIA

DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO