

# CAPÍTULO 7

## Interacciones espermatozoide-cúmulo

Rocío Núñez Calonge y Pedro Caballero Peregrín

### Introducción 2

<i>Regulación e la función de las células del cúmulo</i>	X
<i>Medioambiente folicular</i>	X
<i>Estimulación de la proliferación de las células del cúmulo (CCs)</i>	X
<i>Regulación del metabolismo de las CCs</i>	X
<i>Expansión de las células del cúmulo</i>	X

### Cambios en la superficie del espermatozoide X

### Mecanismos moleculares de quimotaxis espermatozoide-células del cúmulo X

<i>Modelo para el mecanismo molecular de la quimiotaxis</i>	X
<i>Conducta quimiotáctica de los espermatozoides</i>	X
<i>Oscilaciones de calcio en los espermatozoides durante la quimiotaxis</i>	X
<i>Penetración espermática a través de las células del cúmulo</i>	X
<i>Aspectos moleculares en el espermatozoide</i>	X
<i>Reacción acrosómica y penetración en el cúmulo</i>	XX

### Papel de las células del cúmulo en los fallos de fecundación XX

### Bibliografía XX

### RESUMEN

*El tracto femenino juega un papel primordial para asegurar el éxito de la fecundación del ovocito por el espermatozoide y el posterior desarrollo embrionario normal. El proceso de capacitación espermática necesita una coordinación activa y específica entre el tracto femenino, ovulación y espermatozoide. Durante la ascensión espermática hacia el lugar de la fecundación tiene lugar la capacitación de una forma absolutamente controlada. Antes de la ovulación, la mayoría de los espermatozoides alcanzan el oviducto, y pueden almacenarse en el istmo durante varios días. La capacitación se completa cuando termina la ovulación. Es en-*

tonces cuando los gametos masculinos son guiados hasta el ovocito en una interacción fundamental entre los primeros, y las células del cúmulo. Las hormonas esteroideas y en concreto, la progesterona liberada por las células del cúmulo, son potentes estimulantes de los espermatozoides, de forma que atraen a los mismos ayudándolos a penetrar las cubiertas ovocitarias. La progesterona induce el influjo de calcio en los espermatozoides y provoca una serie de respuestas esenciales para la fecundación tales como la hiperactivación, reacción acrosómica y quimiotaxis hacia el ovocito. Aunque existen determinados aspectos conocidos en la fecundación de mamíferos

referentes a la penetración de los espermatozoides en el cúmulo y zona pelúcida antes de la unión con el ovocito, existen otros mecanismos moleculares que todavía no han sido del todo conocidos. Se ha sugerido que, entre otros, las enzimas proteolíticas e hialuronato espermáticos participan en los fenómenos de penetración a través de las células del cúmulo.

Así mismo, se han empleado los conocimientos existentes en esta relación espermatozoide-cúmulo para poder aplicarla de una forma práctica en la selección espermática en técnicas de reproducción asistida y, en concreto, en la búsqueda del espermatozoide idóneo para microinyección espermática.

## Introducción

El proceso de fecundación en mamíferos, implica un conjunto de eventos moleculares y celulares ordenados de forma precisa, incluyendo la penetración espermática a través de las células del cúmulo (CC), la adhesión y unión a la zona pelúcida (ZP), la penetración a través de la ZP, la exocitosis acrosomal y la fusión entre el espermatozoide y el ovocito (1-4).

Los espermatozoides de mamífero tienen que viajar una larga distancia a través del tracto reproductivo femenino hasta el oviducto, en el cual tiene lugar la fecundación. Para realizar este viaje hacia el ovocito, los espermatozoides tienen que sobrepasar varios obstáculos tales como la unión útero-tubárica (UT), el istmo y finalmente la ampolla tubárica, donde penetrarán en la matriz extracelular del ovocito. Después de pasar a través de la unión UT, los espermatozoides se unen a la superficie mucosa del istmo y permanecen allí hasta el momento de la ovulación. Durante el almacenamiento en el istmo, el epitelio ístmico crea un microambiente que retrasa la capacitación y estabiliza el espermatozoide por un periodo de, como mínimo, 24 horas en humanos (5). Después de dejar el reservorio de almacenamiento, los espermatozoides se mueven hacia la ampolla y se localizan en el complejo cúmulo-ovocito (COC). La quimiotaxis de los espermatozoides está implicada en la localización del COC. En concreto, se ha comprobado que los espermatozoides humanos son sensibles a sustancias quimioatrayentes del líquido folicular y del COC. (6).

La capacitación del espermatozoide con un acrosoma intacto es necesaria para que penetre entre las células del cúmulo. La penetración espermática en las células del cúmulo es importante para la fecundación, ya que ésta se reduce grandemente si se retiran *in vitro* las células del cúmulo (1). Así, existe la posibilidad de que las células del cúmulo puedan funcionar estimulando la movilidad espermática y promoviendo la reacción acrosómica, e incluso, inmovilizando los espermatozoides mediante la red fibrosa de la matriz del cúmulo, controlar su acceso a la ZP (4). No obstante, el papel de la matriz celular del cúmulo todavía no está claro. Ya que las células del cúmulo están embebidas en abundante hialuronato de la matriz extracelular, se cree que la hialuronidasa espermática, identificada hace aproxima-

damente 60 años, cataliza la degradación del hialuronato para facilitar al espermatozoide con el acrosoma intacto penetrar en la matriz del cúmulo y alcanzar la ZP. Esta revisión está enfocada en la interacción entre las células del cúmulo y el espermatozoide. A pesar de la importancia de la penetración espermática en las células del cúmulo en el mecanismo de la fecundación, el proceso molecular sigue siendo controvertido. Además, el concepto general, que se ha mantenido durante mucho tiempo, se desprende sobre todo de los experimentos realizados utilizando genes-knockout de ratón. Previa a la descripción molecular de los acontecimientos producidos en la penetración del espermatozoide en el cúmulo, se describirán los siguientes aspectos relacionados con la capacidad de fecundación tanto del ovocito como del espermatozoide: regulación de la función de las células del cúmulo, organización de la superficie del espermatozoide previa a su penetración en las células del cúmulo y mecanismos de quimiotaxis del espermatozoide para alcanzar el ovocito. Posteriormente se detalla la interacción espermatozoide-CC y las alteraciones de la misma que pueden ocasionar fallos de fecundación.

### **Regulación de la función de las células del cúmulo**

#### *Medioambiente folicular*

Los ovocitos de mamífero crecen y se desarrollan en una íntima y mutua dependencia con las células somáticas adyacentes. El crecimiento del volumen ovocitario tiene lugar en los folículos preantrales donde el ovocito está estrechamente asociado con células relativamente indiferenciadas de la granulosa. Después de la formación del antro, el cual corresponde aproximadamente al fin de la fase de crecimiento ovocitario, las células de la granulosa se diferencian en dos líneas anatómica y funcionalmente distintas: la mural (MGCs) que recubre la pared del folículo y tiene principalmente un papel estereoidogénico y las células del cúmulo (CC), que forman una íntima asociación con el ovocito. Las CCs poseen proyecciones citoplasmáticas altamente especializadas que penetran a través de la zona pelúcida y forman uniones gap con el ovocito, en una estructura denominada complejo cúmulo ovocito (7).

Las CCs nutren al ovocito en las fases finales de su desarrollo. No obstante, solo

existe un conocimiento limitado de la naturaleza y diversidad de los componentes que se transfieren entre las CCs y el ovocito vía uniones gap durante el desarrollo en el folículo antral (8).

La calidad ovocitaria es un factor limitante en la fertilidad femenina, aunque no se conoce demasiado sobre los mecanismos que la condicionan y regulan. El medioambiente folicular y las señales maternas, a través de las células de la granulosa (GCs) y del cúmulo (CC) son responsables de la nutrición del ovocito en desarrollo y de la adquisición gradual de su competencia funcional. No obstante, la comunicación GCs y CC-ovocito es bidireccional con los potentes factores de crecimiento que secreta el ovocito y que actúan localmente para dirigir la diferenciación y función de las CC. Existen dos (en las líneas que siguen se citan 6) importantes factores secretados por el ovocito que pertenecen a la familia de factor de necrosis tumoral TGFbeta: el ovocito expresa TGFbeta1, TGFbeta2, activina, GDF9 (growth differentiation factor 9), BMP15 (bone morphogenetic protein 15) y BMP6, los cuales activan señales en las CC para regular genes clave y procesos requeridos para la diferenciación y mantenimiento de las CC (9,10).

#### ***Estimulación de la proliferación de CC***

Los ovocitos son potentes estimuladores de la síntesis de ADN para MGC y CC y de su proliferación celular. Esto se ha determinado utilizando una serie de experiencias in vitro, incluyendo la regulación de *Ccnd2*, el transcrito que codifica para la ciclina D2, estimulación de la excreción de timidina como medida de la síntesis de DNA, incremento del contenido total de ADN de cultivos de GC e incremento en el número de células de GCs (11).

#### ***Regulación del metabolismo de las CC***

Los compartimientos celulares del complejo cúmulo-ovocito (COC) tienen diferentes actividades metabólicas y requerimientos (12). En los folículos antrales, el ovocito en crecimiento es totalmente dependiente de la fosforilación oxidativa vía producción de ATP y está incapacitado para oxidar la glucosa (13). Por el contrario, las CCs tienen una capacidad significativa para utilizar la glucosa, vía glicolisis aerobia (14). El metabolismo de la glucosa dentro de las CCs para proporcionar

ácido carboxílico como sustrato para la fosforilación oxidativa dentro del ovocito se conoce desde hace tiempo (15).

Este contraste de requerimientos metabólicos entre los ovocitos y las CCs sugiere que la preferencia metabólica de estos dos tipos celulares puede ser un fenómeno regulado molecularmente. Suguira y col. (16) observaron que varias enzimas glicolíticas eran reguladas en las CCs de los folículos antrales de ratón, comparados con los correspondientes MGCs. Además, demostraron que la ovocitectomía hacía descender los niveles de mRNA de la enzima glicolítica y la actividad glicolítica de las CCs, la cual se restauraba después de tratamiento con complejos ovocitectomizados (OOX) en los ovocitos.

Estos estudios demuestran la íntima relación entre el ovocito y las células del cúmulo, donde el ovocito dirige su aporte de metabolitos de las CCs para su propio desarrollo.

### ***Expansión de las células del cúmulo***

La iniciación de la expansión de las células del cúmulo (mucificación), depende de dos señales: (i) estimulación por gonadotropinas o factor epidérmico de crecimiento (EGF)-like y (ii) señales paracrinas secretadas por el ovocito llamadas factores facilitadores de la expansión del cúmulo (cumulus expansión enabling factor: CEEFs), las cuales actúan en las CCs facilitando la respuesta a las señales de las gonadotropinas /EGF para sintetizar moléculas de la matriz extracelular (ECM). El hialuronato forma la principal estructura del cúmulo y ECM y es sintetizado por la enzima hialuronato sintasa 2 (HAS2). Otros componentes importantes de la matriz del cúmulo incluyen factor de necrosis tumoral alpha inducida proteína 6 (TNFAIP6) y pentraxina 3 (PTX3), así como el proteoglicano versican (17, 18).

La mucificación y expansión del COC en respuesta al pico de LH es absolutamente necesario para la ovulación y la penetración espermática, por lo tanto, para la fecundación. El fallo en la síntesis de alguno de los componentes de la matriz del cúmulo origina esterilidad y el BMP-15 secretado por el ovocito, previene la apoptosis (19, 20).

La alteración del medio ambiente del cúmulo, no solo puede impedir el paso del espermatozoide, sino que compromete los procesos espermáticos que acompañan a la fecundación, tales como capacitación y potenciación de la reacción acrosómica (21).

## Cambios en la superficie del espermatozoide

La superficie espermática tiene un papel activo en la fecundación. La definición de la superficie espermática tanto en su composición como en su organización, comienza durante la espermatogénesis y continúa hasta la unión del espermatozoide con el ovocito. Alguno de estos eventos puede implicar a múltiples moléculas de superficie, y, en algunos casos, una única molécula podría estar relacionada en más de una función de superficie. Un aspecto importante de la superficie espermática es que esta serie de cambios en las funciones ocurre en ausencia de nueva síntesis de proteínas de membrana. Una vez que el espermatozoide deja el testículo, las modificaciones para los cambios moleculares de membrana ocurren mediante otros procesos (22).

Aunque no están aún bien comprendidos, uno de los posibles mecanismos para la regulación de la función espermática en ausencia de nueva síntesis de proteínas puede depender de la organización de las proteínas de membrana localizadas en estos dominios (23). Durante la progresión de los espermatozoides, se producen cambios funcionales tanto en el tracto reproductivo masculino como femenino en proteínas específicas que son capaces de moverse de un dominio a otro, y estas migraciones posiblemente afectan a su actividad.

Una de las principales proteínas implicadas en estos mecanismos es la PH-20, una proteína anclada en la membrana por una glicosil fosfatidilinositol (GPI). La PH-20 es una proteína bifuncional con un papel en la penetración en el cúmulo y unión a los espermatozoides reaccionados a la zona pelúcida. El dominio N-terminal de la molécula, tiene actividad hialuronidasa. Esta actividad facilita al espermatozoide penetrar en la barrera de células que supone el cúmulo (24).

Otra proteína, la fertilina (anteriormente denominada PH-30) es una proteína heterodímera con dos subunidades (alfa y beta) que tienen una región transmembrana. La fertilina actúa en la unión de membranas de espermatozoide y ovocito (23).

Existen diferentes mecanismos por los cuales los cambios en la localización de las proteínas pueden originar cambios en la función de las mismas. Cambiando los patrones de localización, las proteínas también pueden cambiar su densidad de superficie y el nivel de expresión. Por ejemplo, PH-20, moviéndose primero de

un patrón de totalidad de la célula a la zona posterior de la cabeza espermática, puede incrementar su densidad de superficie aproximadamente dos veces. En el momento de la reacción acrosómica, el nivel de expresión de superficie puede incrementarse adicionalmente unas 2,5 veces (24,25).

Cambios en los patrones de localización también sirven para cambiar el medioambiente de la membrana. Un resultado de esta modificación es que la proteína relocalizada se pone en contacto con un conjunto de otras proteínas de membrana que podrían o bien activar o bien inhibir funciones. Los cambios en la localización también significan que la proteína en su nuevo dominio tendrá un medioambiente lipídico alterado porque los lípidos de la membrana plasmática parecen localizarse preferentemente en estos dominios separados. (26).

Otra característica importante en la diferente localización de las proteínas es que es específico de especies. Por ejemplo, PH-20 en la membrana plasmática de espermatozoides con el acrosoma intacto está localizado en toda la cabeza o en la parte anterior de espermatozoides de ratón, mono y humanos (27).

### **Mecanismos moleculares de quimiotaxis espermatozoide-células del cúmulo**

Una de las cuestiones que más ha atraído en el campo de la biología reproductiva concierne al mecanismo por el cual se encuentran los gametos y tiene lugar la fecundación. Durante la pasada década, parece claro que el mecanismo de la quimiotaxis es la guía necesaria para el transporte del espermatozoide hacia el ovocito. (28). La quimiotaxis, el viaje del espermatozoide hacia el óvulo guiado por un gradiente de concentración de atrayentes químicos, ha sido revisada en varias especies de mamíferos por Eisenbach en 2006 (29). La quimiotaxis de los espermatozoides hacia factores del líquido folicular se ha demostrado en humanos, y se han propuesto varios candidatos como atrayentes espermáticos: péptidos N-formilados (30), péptido atrial natriurético (31), progesterona (32) y regulando su activación, células T expresadas y secretadas (RANTES) (33).

La principal fuente atrayente en todos los casos es la progesterona (P), secretada por las células que rodean el ovocito formando una concentración estable a lo largo del cúmulo. Esta hormona induce quimiotaxis del espermatozoide principalmente



a bajas concentraciones, únicamente en aproximadamente un 10% de una subpoblación de células. Además, parece ser que es el único quimioatrayente fisiológico que es secretado por las células del cúmulo. (28). También se sabe que los espermatozoides humanos contienen muchos receptores acoplados a G-proteínas olfativas (34) y el receptor olfatorio humano 17-4 (hOR17-4) parece estar implicado en la quimiotaxis de los espermatozoides (35). El bourgeonal, un aldehído aromático utilizado en perfumería, es un potente ligando del hOR17-4 y actúa como quimioatrayente (35). Sin embargo, estos compuestos no se han identificado todavía en el tracto reproductivo femenino, y los ligandos nativos para estos receptores son todavía desconocidos.

En espermatozoides humanos, la quimiotaxis hacia la progesterona está directamente correlacionada con la capacitación (29), y la heterogeneidad de la quimiotaxis espermática puede ser debida a los bajos niveles de la capacitación, más que a la variada expresión de las moléculas relacionadas con la quimiotaxis. No obstante, si la hipótesis es cierta, debemos considerar la heterogeneidad de la capacitación espermática. Además, los espermatozoides de ratón capacitados *in vitro* también muestran esta respuesta heterogénea en la quimiotaxis (36) y la progesterona parece no atraer a los espermatozoides. Se necesitan más estudios para comprender esta respuesta de los espermatozoides y el papel de la quimiotaxis en la selección de los mismos.

### ***Modelo para el mecanismo molecular de la quimiotaxis***

En los espermatozoides humanos hay algunas evidencias sobre la implicación de la adenilciclase y adenosilmonofosfato cíclico (AC/cAMP/calcio) y guanosil ciclase y guanosilmonofosfato cíclico (GC/cGMP) en respuesta a un atrayente diferente a la progesterona, aunque el mecanismo molecular preciso por el que se lleva a cabo no está aún definido. Teves y col (28) han propuesto un modelo para explicar estos eventos moleculares que pueden tener lugar durante la quimiotaxis de los espermatozoides bajo estimulación con un gradiente de progesterona. El modelo está basado en un diseño experimental que implica la activación de una cascada de señales con gradientes extracelulares de análogos de nucleótidos cíclicos en combinación con inhibidores. Así, la quimiotaxis espermática se alcanza pa-

sando el lugar de unión de la progesterona a su receptor, mientras que los análogos no actúan como posibles quimioatrayentes, pero además cruzan la membrana celular, incrementando las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos, los cuales, a su vez, activan las señales quimioatrayentes.

Bajo este diseño experimental se han identificado las moléculas que son reguladas por sus respectivos nucleótidos cíclicos. Así, después de la unión de la P a su receptor celular de superficie, la vía tmAC-cAMP-PKA se activa primeramente, seguido por la fosforización de la tirosina (en la banda ecuatorial del flagelo) y la movilización de calcio (a través de los canales IP3R y SOC), mientras que la cascada sGC-cGMP-PKG se activa al final, y posiblemente después tenga lugar el influjo de calcio a través de otros canales de calcio de la membrana plasmática. Esta secuencia de eventos podría favorecer la orientación espermática hacia la fuente de progesterona (37). Este modelo, aunque probable, deja aún muchas cuestiones por resolver. Por ejemplo, ¿cuáles son los otros pasos en las señales de transducción de la quimiotaxis? ¿cuáles son las proteínas flagelares que producen la orientación hacia la fuente atrayente? ¿qué otras moléculas y canales de iones están implicados? Las respuestas a estas cuestiones podrían aclarar la comprensión de la quimiotaxis espermática mediada por progesterona.

### ***Conducta quimiotáctica de los espermatozoides***

Hay pocos estudios sobre las trayectorias y movimiento flagelar de los espermatozoides de mamíferos en respuesta a los quimioatrayentes, aunque existen un par de trabajos que investigan estos movimientos durante la quimiotaxis (35,36). En ambos estudios se demuestra que la conducta quimiotáctica está orientada hacia la fuente quimiotáctica y las células a veces muestran un movimiento determinado de batida del flagelo. La frecuencia de este movimiento, sin embargo, es baja: muchos espermatozoides no muestran cambios de movimiento y simplemente se orientan hacia la fuente quimioatrayente.

### ***Oscilaciones de calcio en los espermatozoides durante la quimiotaxis***

Como ya se ha comentado anteriormente, el calcio juega un importante papel en la regulación del movimiento flagelar espermático. En mamíferos, los incrementos

de calcio son inducidos por los atrayentes: bourgeonal y progesterona (28), aunque no se ha demostrado aún la relación entre estos aumentos de calcio y la batida flagelar.

## **Penetración espermática a través de las células del cúmulo**

### *Aspectos moleculares en el espermatozoide*

La hialuronidasa responsable de la degradación del hialuronato está ampliamente distribuida en mamíferos, insectos y bacterias (38). Existen como mínimo dos isoformas de hialuronidasa en el espermatozoide epididimario de ratón. Una glicosilfosfatidilinositol (GPI)-una proteína de membrana, la PH-20, la cual fue originalmente identificada como una proteína unida a la ZP en el espermatozoide del hámster de guinea (39), es estructuralmente similar a la hialuronidasa, exhibiendo, además su actividad (40).

Las hialuronidasas en mamíferos (hiasas), son una familia de 6 enzimas que catalizan la ruptura del ácido hialurónico (HA) en el complejo cúmulo-ovocito (41), y también están implicadas en la unión a la zona pelúcida. Esta familia de proteínas multifuncionales juegan un papel muy importante en la penetración del espermatozoide en las CC y en la inducción de la reacción acrosómica (40).

Desde hace tiempo se pensó que la PH-20 era la única hialuronidasa implicada en la penetración espermática a través de las células del cúmulo, por no haberse caracterizado bien otras proteínas. Sin embargo, en el ratón y en la especie humana, existen como mínimo seis genes like-hialuronidase, agrupados en dos tripletes estrechamente agrupados o en dos cromosomas (41): HYAL1, HYAL2 y HYAL3 en el cromosoma humano (3p21), Hya/1, Hya /2 y Hya /3 en el cromosoma de ratón (9F1-F2), HYAL4, PH-20/SPAM1 y HYALP1 en el cromosoma humano (7q31) y Hya /4, ph-20, Hya y/p1 y Hya /5 en el cromosoma de ratón (6a2).

Hya /1, Hya /2 y Hya /3 se expresan de forma ubicua en todos los tejidos, mientras que la expresión de Hya /p1 y Hya /5 es exclusiva de los testículos. PH-20 y Hya/4 se expresan específicamente en los testículos y en el epidídimo (41) y en la placenta y el músculo esquelético respectivamente.

Cinco de las seis hiasas existentes (3 neutras activas y 2 ácidas activas), de las 6

hijas caracterizadas, se expresan en los testículos. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que solo 3 neutras activas, (sperm adhesión molecule 1: SPAM1), se consideran hijas espermáticas (42). Estas hijas (HYALP1, SPAM1, HYAL5), llamadas hijas reproductivas, están codificadas por los genes mencionados anteriormente, y se expresan en el epidídimo (43), donde SPAM1 se adquiere en la superficie del espermatozoide durante la maduración espermática (44).

Aunque PH-20 y Hya/5 están ancladas en la membrana acrosomal o plasmática de los espermatozoides epididimarios de ratón, estas dos hialuronidasas difieren una de la otra en su localización subcelular (41). PH-20 está presente totalmente en la membrana plasmática de los espermatozoides con el acrosoma intacto, y la localización permanece inalterable tras la reacción acrosómica. Por otra parte, Hya/5 está localizada tanto en la membrana plasmática (aproximadamente el 60% del total), como en la membrana acrosomal (aproximadamente el 40%). La mayoría de la Hya/5 se libera de la membrana plasmática durante la reacción acrosómica. Así, la Hya/5 podría funcionar en la penetración espermática a través de las células del cúmulo y en la hidrólisis del hialuronato cerca o en la superficie de la ZP para facilitar a la región proximal del flagelo espermático moverse libremente. Se ha sugerido también que la PH-20 podría compensar en parte el papel funcional de la Hya/5. Después de la reacción acrosómica, PH-20 está presente en la membrana acrosomal interna y en la membrana plasmática que rodea el segmento ecuatorial, indicando que podría migrar desde la membrana plasmática de la parte posterior de la cabeza espermática a la membrana acrosomal interna después de la exocitosis acrosomal (45).

Se ha publicado que PH-20 del ratón y de otras especies animales tiene dos funciones duales: hidrólisis del hialuronato y propiedades de unión a la ZP (40). Particularmente, se piensa que la PH-20 en la membrana plasmática de espermatozoides con el acrosoma intacto y en la membrana acrosomal interna de espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica es como muestra su actividad de hialuronidasa, necesaria para la penetración a través de las células del cúmulo y para participar en la unión del espermatozoide en la ZP, lo que se conoce como unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida.(4).

Ya que la PH-20 es enzimáticamente activa a pH ácido y neutro, se ha postulado

que la actividad enzimática como hialuronato es la de degradación de las líneas celulares del cúmulo durante la penetración espermática. También se ha propuesto que la actividad enzimática pudiera ser importante para la digestión del hialuronato cerca o en la superficie de la ZP para la unión y penetración espermática a la zona (40). Sin embargo, trabajos más recientes han debilitado estas teorías (41). Ratones a los que les falta la PH-20 siguen siendo fértiles (46), lo que proporciona evidencias de que no es imprescindible para la fecundación. Sin embargo, los ratones a los que se insemina con espermatozoides sin PH-20 tardan 3 veces más en fecundar los ovocitos, sin que se encontrasen diferencias en la unión a la ZP. Este retardo quizás pueda ser debido a la dificultad en atravesar las células del cúmulo. Se ha sugerido igualmente que la Hya/5 pudiera jugar un papel primordial en la penetración espermática a través de las células del cúmulo, posiblemente en cooperación con PH-20, ya que una fracción proteica deficiente de PH-20 y enriquecida con Hya/5 es capaz de dispersar las células del cúmulo (41).

Aunque las hiasas reproductivas son responsables de la hidrólisis del hialuronato en las células del cúmulo y unión a la zona pelúcida, se ha cuestionado recientemente su papel en los espermatozoides de ratón (45). Estos autores publicaron que la HYAL· existe en dos isoformas en espermatozoides humanos y de ratón, residiendo en la membrana plasmática de la cabeza y en el segmento intermedio. La actividad de la HYAL3 fue confirmada utilizando inmunoprecipitado HYAL3 y espectrofotometría, confirmando por primera vez actividad de hialuronidasas tanto neutras como ácidas activas en el espermatozoide. Ya que la SPAM1 es la única hiasa neutra activa en el espermatozoide humano, este descubrimiento sugiere que el papel de la HYAL3 en la función espermática es diferente al del ratón, en relación con la penetración en las células del cúmulo.

Reese y col (45) sugieren que la adquisición de HYAL3 sucede in vivo durante la maduración espermática en el epidídimo y que la cantidad de proteína de la superficie del espermatozoide depende de la longitud de tiempo que los espermatozoides estén almacenados en la región caudal. Así, bajas cantidades de HYAL3 en la superficie del espermatozoide pueden ser debidas a cortos periodos de almacenamiento en el epidídimo, implicando a SPAM1 (43).

Recientemente se ha sugerido (48) la existencia de un polipéptido activador de la

adenil-ciclasa (PACAP), un miembro de la familia de los péptidos intestinales secretina/glucagón, que, en respuesta a su liberación por el espermatozoide, las células del cúmulo liberan un factor soluble que probablemente estimule la movilidad y la reacción acrosómica, con lo que, por ello, promueve la fecundación.

## **Glicodelina en la interacción espermatozoide y células del cúmulo**

### ***Propiedades y tipos de glicodelina***

La glicodelina es una glicoproteína que media acciones biológicas en la reproducción humana y el sistema immune. Los oligosacáridos de la glicodelina varían significativamente de un tejido reproductivo a otro y tienen un efecto en su propia secreción y en la comunicación celular. En base a sus diferencias en la glicosilación, las isoformas caracterizadas están definidas como glicodelina A (líquido amniótico, endometrio decidua y suero materno) (49), glicodelina S (plasma seminal y vesículas seminales) (50), glicodelina F (fluido folicular y oviducto) (51) y glicodelina C (cúmulo) (52).

La Organización para el Genoma Humano (HUGO), ha registrado como el símbolo oficial del gen de la glicodelina a un progestágeno asociado a una proteína endometrial (PAEP) (53). El gen tiene 5,05 kb de longitud, y como muchos otros genes lipocalínicos, está dividido en siete exones.

La glicodelina es un miembro de la familia de las proteínas lipocalínicas y su secuencia primaria está formada por 180 residuos de aminoácidos, con una significativa similitud a varias especies de beta lactoglobulinas.

Todas las isoformas de la glicodelina, la A, S, F y C, se unen a la cabeza del espermatozoide humano. La glicodelina F tiene dos sitios de unión. Uno de ellos es compartido con la glicodelina A, que puede desplazar hasta un 70% la glicodelina F unida al espermatozoide. (52). La glicodelina F está localizada en la región acrosomal del espermatozoide. Estudios realizados con neoglicoproteínas han mostrado que la unión de la glicodelina A al espermatozoide implica ligandos de manosa, fucosa y posiblemente E-selectina, miembros que la glicodelina F implica ligandos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina, pero no ligandos de selectina (54).

La glicodelina S podría contribuir a un estado de decapacitación en los espermatozoides humanos en el plasma seminal y prevenir así la capacitación prematura (54).

### ***Papel de la glicodelina en la fecundación***

El fluido folicular inhibe la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que las células del cúmulo reducen este efecto (55). Para clarificar los factores que sustentan estas observaciones, dos laboratorios de investigación, uno en Helsinki y otro en Hong Kong, desarrollaron investigaciones que permitieron la identificación de la glicodelina como una molécula efectora importante en este fenómeno.

Cuando los espermatozoides migran a través de la matriz del cúmulo, la actividad inhibitoria dependiente de la interacción de gametos tanto de la glicodelina A como de la F, se reduce. El consumo de estas dos isoformas por las células del cúmulo se ha encontrado de forma única entre la familia proteica de la lipocalina. Además del consumo de glicodelina, las células del cúmulo también deglicosilan parcialmente la glicodelina F, obteniéndose una interesante isoforma, la glicodelina C, que tiene un efecto opuesto: estimula la unión entre espermatozoide y zona pelúcida. (56).

Estas observaciones podrían explicar porqué retirar las células del cúmulo antes de la Fecundación in vitro (FIV), no mejora los resultados, sino más bien lo contrario. Los resultados sugieren que el papel biológico de la glicodelina F podría estar relacionado con la prevención de una reacción acrosómica prematura inducida por la progesterona, antes de que los espermatozoides hayan penetrado en el cúmulo (57).

Sin embargo, aún hay algunas cuestiones sin resolver. Por ejemplo, no se sabe todavía si todos los espermatozoides que atraviesan las células del cúmulo están libres de glicodelina F cuando alcanzan la zona pelúcida, o cuantos de ellos transportan la glicodelina C. Parece ser que la penetración de los espermatozoides en el cúmulo los modifica de dos formas. La primera es la eliminación de los efectos inhibitorios de la glicodelina A y F en el espermatozoide unido al ovocito y reaccionado, y la segunda es la estimulación de la glicodelina C para que los espermatozoides sean capaces de unirse a la zona pelúcida (56). Incluso si las células del cúmulo no eliminaran o modificaran las isoformas inhibitorias de todos los espermatozoides, los resultados sugieren que el espermatozoide fertilizador esté libre de las isoformas inhibitorias. Queda aún por determinar cuándo los espermatozoides capaces de fertilizar requieren glicodelina C estimulante en su cabeza (57).

### *Papel del cúmulo en la selección espermática*

Como ya se ha comentado previamente, alteraciones en la formación del cúmulo, puede afectar a la capacidad fertilizadora de los espermatozoides y a su función (21). La acción de las células del cúmulo sobre la función espermática puede ser mediada vía productos de secreción celular (9, 10). Pero a pesar de las evidencias que demuestran la importancia de las células del cúmulo para la fecundación del ovocito (21), el papel fisiológico del mismo aún no está del todo claro, debido a su limitada disponibilidad. Lo mismo ocurre con la concentración de los productos de secreción analizados, mucho más baja en los medios condicionados que lo que realmente existe in vivo en el cúmulo (8).

Se han utilizado varios modelos in vitro para estudiar los efectos del cúmulo en la función espermática. Estos modelos incluyen la incubación de espermatozoides con complejos cúmulo-ovocito (COC), pero tienen el inconveniente de que no representan la situación in vivo. Hong y col (58) desarrollaron un modelo en el cual, el cúmulo se sitúa en un capilar y se deja a los espermatozoides que migren desde el extremo del mismo, y lo atraviesen. Los resultados de este experimento demostraron que los espermatozoides que atravesaban las células del cúmulo presentaban en gran proporción, una morfología normal, patrones de capacitación y reacción acrosómica y capacidad de unión a la zona. Desde el punto de vista de su cinética, presentaron una mayor velocidad progresiva (VAP), velocidad curvilínea (VSL), batida del flagelo (BCF) y linealidad (LIN), pero menor desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), así como menor número de espermatozoides hiperactivados. Estos autores, explicaban el aumento del número de espermatozoides capacitados por la capacidad de las células del cúmulo para estimular la capacitación de los espermatozoides que lo atraviesan. Respecto a la selección de espermatozoides morfológicamente normales, no se ha encontrado explicación, aunque se sabe que la morfología espermática está relacionada con la capacidad fertilizadora (59). Los cambios en los patrones de movilidad encontrados en los espermatozoides de este experimento están relacionados con la mejora para atravesar las células del cúmulo. Se ha sugerido que el cambio en el patrón de movilidad espermática en un medio viscoso, como es la matriz del cúmulo, podría ser debido a heterogeneidad



local en el mecanismo de resistencia de la matriz (60). La mayoría de los espermatozoides que penetraron en el cúmulo, en este ensayo, habían experimentado la reacción acrosómica comparado con los controles. Este hecho es consistente con otros estudios (61), que mostraban que el COC humano incrementaba el porcentaje de espermatozoides reaccionados cuando se co-incubaban 14-18 horas post inseminación.

El medio de cultivo condicionado con células del cúmulo, donde se han incubado ovocitos y espermatozoides, después de FIV, y tras recogerlo de las placas de cultivo 16-18 post inseminación, inducen la reacción acrosómica de los espermatozoides (62), sugiriendo que existen productos de secreción celular implicados. Uno de los principales candidatos es la progesterona, la cual estimula la reacción acrosómica espermática (63). Otro componente en las células del cúmulo que puede tener efecto sobre la reacción acrosómica es el ácido hialurónico, el cual incrementa el influjo de calcio intracelular en el espermatozoide (64). La acción del ácido hialurónico hace al espermatozoide más susceptible de sufrir la reacción acrosómica bajo inducción de los constituyentes del cúmulo y la zona pelúcida (64).

Hong y col (65) publicaron un trabajo en el que, por primera vez se estudia el efecto de la matriz del cúmulo intacta en las funciones de los espermatozoides. Este estudio demostró que pocos espermatozoides son capaces de atravesar la matriz del cúmulo, sugiriendo que las CC afectan a la penetrabilidad de los espermatozoides a través de la matriz.

Las CC pueden proporcionar un microambiente óptimo y beneficioso tanto para el ovocito como para el espermatozoide capaz de fertilizarlo. Las CC pueden afectar la función espermática modificando la concentración de nutrientes de la matriz del cúmulo. El lactato es la principal fuente de energía de los espermatozoides. Una enzima específica, la lactato deshidrogenasa isoenzima C4 está presente en el espermatozoide para su metabolismo energético. La lactato deshidrogenasa se ha localizado en la región post-acrosomal del espermatozoide y su deficiencia está asociada con una disminución de la movilidad y concentración espermática y por lo tanto con la infertilidad masculina (66).

En un estudio realizado por Hong y col. (67), el medio de incubación contenía

glucosa pero no lactato. Las CC activan el metabolismo de glucosa a lactato in vitro. Por eso la concentración de glucosa era probablemente más baja y la de lactato más alta en el cúmulo que en el medio que los rodea.

En este estudio también se investiga por primera vez el efecto del ácido hialurónico a una concentración de 1.0 mg/mL, (similar a la que existe fisiológicamente en el CC), en la función espermática. Así, se demuestra que el ácido hialurónico no afecta a la reacción acrosómica pero si modula la movilidad espermática. Este hecho concuerda con el hallazgo de receptores de ácido hialurónico en los espermatozoides humanos (68). El ácido hialurónico tiene un efecto diferencial en función de la capacidad de movimiento. Así, a una concentración de 200 ng/mL, el ácido hialurónico facilita la movilidad espermática en muestras de semen normozoospermicas y oligozoospermicas (69). Sin embargo, la movilidad de los espermatozoides procesados por swim-up aumentaba solo cuando la concentración de ácido hialurónico era mayor (650 ng/mL), sugiriendo que bajas concentraciones de ácido hialurónico afectan solo la movilidad de las subpoblaciones menos móviles (70). A concentraciones similares a las existentes en las células del cúmulo, el ácido hialurónico incrementa VAP, VSL y LIN de los espermatozoides.

Aunque el ácido hialurónico no afecte a la reacción acrosómica, se ha demostrado que si facilita la reacción acrosómica a través de la progesterona. Este efecto es mediado por PH-20, que, como se ha comentado previamente, aumenta los niveles de calcio intracelular (67). Por otra parte, extracto de cúmulo induce la reacción acrosómica espontánea. Las moléculas implicadas en este hecho no se conocen aún, aunque podría ser así mismo la progesterona, ya que las CC producen progesterona, la cual induce la reacción acrosómica.

### ***Reacción acrosómica y penetración en el cúmulo***

Generalmente se ha asumido, al menos en el ratón, que ha sido la especie más estudiada a este respecto, que la reacción acrosómica (RA) tiene lugar en la superficie de la zona pelúcida (ZP). Aunque se sabe que, además del ratón, los espermatozoides de varias especies son capaces de sufrir la RA en la superficie de la ZP, se ha publicado por diversos investigadores la presencia de espermatozoides móviles

dentro del cúmulo en varios estadios de RA (71, 72). Esto ha promovido el análisis de cuando realmente se produce la misma, si antes o después de la unión a la ZP. Los puntos clave para sostener la teoría de que se produce cuando hay contacto con la ZP son: i) los espermatozoides con el acrosoma intacto se unen a la ZP; ii) una glicoproteína de la ZP, la ZP3, puede desencadenar la RA; iii) la población de espermatozoides reaccionados en la superficie de la ZP aumenta con el tiempo (71,73). Sin embargo, experimentos realizados con espermatozoides expresando EGFP de ratones transgénicos, han fallado en detectar AR en la ZP de ovocitos decumulados (74). De acuerdo con Gahlay (75), la ZP de ratones transgénicos eran incapaces de inducir RA, aunque los ovocitos de estos ratones podían seguir fertilizándose, sugiriendo que la AR ocurre durante el paso de los espermatozoides a la zona, o antes de alcanzarla. Estos descubrimientos sugieren que el dogma de que la RA ocurre en la ZP, requiere una seria reconsideración.

La Fecundación *in vitro* e *in vivo* es posible sin las células del cúmulo. Sin embargo, el cúmulo parece ser esencial para la fecundación. En opinión de Toyoda y col. (76), la tasa de fecundación de los ovocitos decumulados *in vitro* es más bien errática, mientras que aquellos ovocitos rodeados de la matriz del cúmulo son más consistentes. Aunque la ZP, en particular su componente, la ZP3, es capaz de inducir la RA bajo condiciones experimentales (72,73), los componentes del cúmulo tienen la capacidad de inducir la RA o al menos de iniciarla (77). La matriz del cúmulo, como hemos visto anteriormente, también es importante para seleccionar espermatozoides competentes para la fecundación (78).

Jin y col. (79), en un reciente experimento con espermatozoides de ratón transgénico, han demostrado que los espermatozoides que tenían acrosomas intactos, cuando contactaban con ZP al azar, pasaban a través de ella, mientras aquellos que comenzaban la RA (pérdida de EGFP acrosomal) antes de contactar con la ZP, no podían hacerlo. Esto implica que la relevancia fisiológica de la RA comienza antes de que los espermatozoides contacten con la ZP, y que esto es más la excepción que la regla.

Sin embargo, queda aún por confirmar, que factores del cúmulo son los que inducen la reacción acrosómica.

### **Papel de las células del cúmulo en los fallos de fecundación**

La matriz extracelular de las células del cúmulo está formada principalmente por glicosaminoglicano, hialuronato, que forma una red interconectada con varias proteínas y proteoglicanos (17). La formación de esta matriz resulta en el fenómeno conocido como expansión del cúmulo o mucificación.

Datos de estudios animales indican que el ovocito secreta factores paracrinos que pueden regular la diferenciación y expansión de las células del cúmulo (1). Esta expansión parece ser debida al incremento de la síntesis de hialuronato, posiblemente a través de la secreción del ovocito de factores de diferenciación como GDF-9, (9), proteína BMP-15 (10) y otros activadores de la señal SAD 2/3 (18). Adicionalmente, la proteína BMP-15 secretada por el cúmulo, previene la apoptosis (21).

Un aumento de la apoptosis de las células del cúmulo está relacionado con una baja tasa de fecundación en el proceso de FIV (80). Además, los ovocitos pueden dirigir directamente la actividad estereoidogénica y el metabolismo del cúmulo (81). La función de dirección del ovocito sobre las células del cúmulo parece ser debida, en parte, vía regulación de los niveles de células del cúmulo transcritas (82). Así, las células del cúmulo pueden reflejar la salud del ovocito. Así mismo, existen datos de que las células del cúmulo pueden ser predictores válidos de la capacidad de fecundación y competencia de desarrollo del ovocito (83).

De esta forma, aunque las células del cúmulo puedan tener una apariencia normal, una maduración alterada de las mismas puede ocasionar una secreción anormal de factores ovocitarios tales como GDF-9 o BMP-15, esenciales para un adecuado crecimiento y función de las células del cúmulo. Este medio ambiente del cúmulo alterado, tiene el potencial, no solo de impedir el paso del espermatozoide, sino comprometer procesos que están asociados con este tránsito para lograr la fecundación, tales como la capacitación, o la reacción acrosómica (84).

Aunque pudiera pensarse que procedimientos tales como la ICSI, en el cual previamente se han decumulado los ovocitos, evitan este problema, parece ser que los defectos persisten en el origen, y son responsables de determinados fallos de fecundación (21).

## Bibliografía

1. YANAGIMACHI, R. (1994). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. and Neill J. eds. (New York: Raven Press), pp. 189-317.
2. SNELL, W. J. AND WHITE, J. M. (1996). The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85: 629-637
3. WASSARMAN, P. M. (1999). Mammalian Fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183.
4. FLORMAN, H. M. AND DUCIBELLA, T. (2006). Fertilization in mammals. In *The Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Neill, J. D. ed. (New York: Elsevier), pp. 55-112.
5. Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M (2012) Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction Advance Publication* first posted on 1 October 2012 as Manuscript REP-12-0279.
6. Kim, E. Yamashita, N. Kimura, M, Honda, AA, Kashiwabara, S and Baba, T. (2008) Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 677-682
7. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. (2001) Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*;121:647-653
8. Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT, Gilchrist RB. (2004) Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biol Reprod*;71:1142-1149.
9. Gilchrist RB, Ritter LJ, Cranfield M, Jeffery LA, Amato F, Scott SJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Lankinen H, Mottershead DG et al. (2004) Immunoneutralization of growth differentiation factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic activity. *Biol Reprod* 71:732-739
10. Gilchrist, RB. Lane, M and Thompson J (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, Vol.14, No.2 pp. 159-177.

11. Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, Ritvos O, Mottershead DG. (2006) Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci*;119:3811–3821.
12. Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. (2007) Metabolism of the bovine cumulus–oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl*;64:179–190
13. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. (2002) Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*;124:675–681.
14. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*;65:349–353.
15. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* ;58: 560–567.
16. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. (2005) Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol*;279:20–30.
17. Russell DL, Salustri A. (2006) Extracellular matrix of the cumulus–oocyte complex. *Semin Reprod Med*;24:217–227.
18. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. (2005) Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*;146:2798–2806.
19. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Thompson JG, Armstrong DT, Gilchrist RB. (2006) Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol Reprod*;76:848–857.
20. Russell DL, Robker RL. (2007) Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*;13:289–312.
21. Swain, JE and Pool TB. (2008) ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction Update*, Vol.14, No.5 pp. 431–446
22. Ikawa, M. Inoue, I. Benham, AM. and Okabe, M. (2010) Fertilization: a sperm's journey and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* Volume 120 : 4, 1-11.

23. MYLES, D. G. AND PRIMAKOFF, P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* 56: 320-327.
24. Phelps BM, Koppel DE, Primakoff P, Myles DG. (1990). Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol* 111:1839-1847.
25. Cowan AE, Myles DG, Koppel DE. (1991). Migration of the guinea pig sperm membrane protein PH-20 from one localized surface domain to another does not occur by a simple diffusion-trapping mechanism. *Dev Biol* ; 144:189-198.
26. Wolf DE, Voglmayr JK. (1984). Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J Cell Biol* ; 98:1678-1684.
27. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* ; 125:1157-1163.
28. Teves ME, Guidobaldi HA, Unates DR, Sanchez R, Miska W, Publicover SJ, Morales Garcia AA, Giojalas LC. (2009) Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*;4:e8211
29. Eisenbach M, Giojalas LC. (2006) Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7:276 – 285.
30. Iqbal M, Shivaji S, Vijayasathy S, Balaram P. (1980) Synthetic peptides as chemoattractants for bull spermatozoa structure activity correlations. *Biochem Biophys Res Commun* ;96:235 – 242
31. Zamir N, Riven-Kreitman R, Manor M, Makler A, Blumberg S, Ralt D, Eisenbach M. (1993) Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*;197:116 – 122.
32. Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N. (2002) The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*;17:1441 – 1446.
33. Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. (2006) Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril*;86:745 – 749
34. Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D,

- Ledent C, Mollereau C, Ge' rard C, Perret J et al. (1992) Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells *Nature* 355:453 – 455.
35. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. (2003) Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*;299:2054 – 2058
36. Fukuda N, Yomogida K, Okabe M, Touhara K. (2004) Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci*;117:5835 – 5845
37. Yoshida, M. and Yoshida, K. (2011) Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca. *Molecular Human Reproduction*, Vol.17, No.8 pp. 457–465.
38. FROST, G. I., CSÓKA, T., AND STERN, R. (1996). The hyaluronidases: a chemical, biological, and clinical overview. *Trends Glycosci. Glycotech.* 8: 419-434.
39. PRIMAKOFF, P., HYATT, H. AND MYLES, D. G. (1985). A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* 101: 2239-2244.
40. CHERR, G. N., MEYERS, S. A., YUDIN, A. I., VANDEVOORT, C. A., MYLES, D.G., PRIMAKOFF, P. AND OVERSTREET, J. W. (1996). The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev. Biol.* 175: 142-153.
41. KIM, E., BABA, D., KIMURA, M., YAMASHITA, M., KASHIWABARA, S., AND BABA, T. (2005). Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18028-18033.
42. MILLER, K. A., SHAO, M., AND MARTIN-DELEON, P. A. (2007). Hyalp1 in murine sperm function: evidence for unique and overlapping functions with other reproductive hyaluronidases. *J. Androl.* 28: 67-76.
43. Martin-DeLeon PA. (2006) Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol.*250:114–121
44. Chen H, Griffiths G, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. (2006) Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biol Reprod.* 74:923–930.



45. Reese, KL, Aravindan, RG, Shao, M, Wang, Y, Galileo, DS, Atmuri, V, Triggs-Raine, B, and Martin-DeLeon, P. (2010). Acidic hyaluronidase activity is present in mouse sperm and is reduced in the absence of SPAM1: Evidence for a Role for Hyaluronidase 3 in mouse and human sperm. *Mol Reprod Dev.*77(9): 759–772.
46. Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. (2002) Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem.* 277:30310–30314.
47. Deng X, Czymmek K, Martin-DeLeon PA. (1999) Biochemical maturation of Spam1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. *Mol Reprod Dev.* 52:196–206.
48. Tanii, I, Aradate, T, Muatsuda, K, Komiya, A, and Fuse, H. (2011) PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. *Reproduction* ; 141 163–171.
49. Koistinen H, Easton RL, Koistinen R et al. (2003) Differences in glycosylation and sperm-egg binding inhibition of pregnancy-related glycodelin. *Biol Reprod;*69:1545–51.
50. Morris HR, Dell A, Easton RL et al. (1996) Gender specific glycosylation of human glycodelin affects contraceptive activity. *J Biol Chem;* 271: 32159–67.
51. Tse JYM, Chiu PCN, Lee KF et al. (2002) The synthesis and fate of glycodelin in human ovary during folliculogenesis. *Mol Hum Reprod;*8:142–8.
52. Chiu PCN, Chung M-K, Koistinen R et al. (2006).Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding. *J Biol Chem;* Dec 27 (Epub ahead of print).
53. Kamarainen M, Julkunen M, Seppala M. (1991). HinfI polymorphism in the human progesterone associated endometrial protein (PAEP). *Nucleic Acids Res;*19:5092
54. Chiu PCN, Tsang HY, Chung MK et al. (2005) Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem;*280:25580–9.
55. Hong SJ, Tse JY, Ho PC et al. (2003) Cumulus cells reduce the spermatozoa-

- zona binding inhibitory activity of human follicular fluid. *Fertil Steril*; 79(suppl. 1):802– 7
56. Chiu PCN, Chung M-K, Koistinen R et al. (2007) Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding. *J Cell Sci*;120:33 –44.
57. M.Seppala, M. Koistinen, H. Koistinen, R. Chiu, PCN and Yeung, WSB. (2007) Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Human Reproduction Update*, Vol.13, No.3 pp. 275–287.
58. Hong , SJ. Chiu, PC. Lee, KF. Tse, JMY. Ho, PC. And Yeung, WSB. (2004) Establishment of a capillary±cumulus model to study the selection of sperm for fertilization by the cumulus oophorus. *Human Reproduction* Vol.19, No.7 pp. 1562±1569
59. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ and Ombelet W (2001) Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 7,495±500
60. Drobnis EZ, Yudin AI, Cherr GN and Katz DF (1988) Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res* 21,367±383
61. Stock, C.E., Bates R, Lindsay KS, Edmonds DK and Fraser LR (1989) Human oocyte±cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 86, 723±730.
62. Siiteri, J.E., Dandekar P and Meizel S (1988) Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J. Exp. Zool.* 246, 71±80
63. Kay VJ, Coutts JR and Robertson L (1994) Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* 9, 2318±2323
64. Sabeur, K., Cherr GN, Yudin AI and Overstreet JW (1998) Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6, 103±111
65. Hong SJ, Tse JYM, Ho PC and Yeung WSB (2003) Cumulus cells reduce the spermatozoa-zona binding inhibitory activity of human follicular fluid. *Fertil Steril* 79 Suppl 1,802±807.

66. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT.(2002) Lactate dehydrogenase-C4 is involved in heparin- and NADH-dependent bovine sperm capacitation. *Andrologia*;34:91–
67. Hong, SJ. Ngong, PC. Lee, KF. Tse Y. Ho,P. and Yeung, W. (2009)Cumulus cells and their extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass. *Fertil Steril\_* Vol. 92, No. 3,971-82.
68. Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. (1994) Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev*;38:69–76.
69. Huszar G, Willetts M, Corrales M. (1990) Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril*;54:1127–34.
70. Bains R, Miles DM, Carson RJ, Adeghe J. (2001) Hyaluronic acid increases motility/ intracellular CA2p concentration in human sperm in vitro. *Arch Androl*; 47:119–25.
71. Storey BT, Lee MA, Muller C, Ward CR, Wirtshafter DG (1984) Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: Evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol Reprod* 31:1119–1128.
72. Schroer SC, Yudin AI, Myles DG, Overstreet JW (2000) Acrosomal status and motility of guinea pig spermatozoa during in vitro penetration of the cumulus oophorus. *Zygote* 8:107–117
73. Bleil JD, Wassarman PM (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95:317–324
74. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J (2007) Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 134:933–943.
75. Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J (2010) Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 329:216–219
76. Toyoda Y, Sato E, Naito K (1993) Role of the cumulus oophorus in mammalian fertilization. *Biology of the Germ Line in Animals and Man*, eds Mohri H, Takahashi M, Tachi C (Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan), pp 111–124.

- 
77. Yin L, et al. (2009) A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell Mol Life Sci* 66:900–908.
  78. Cummins JM, Yanagimachi R (1982) Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 5:239–256
  79. Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. (2011) Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108:4892–4896.
  80. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. (2001) Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*;18:490–498.
  81. Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*.;135: 111–121.
  82. Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. (2007) Oocytes are required for the pre-antral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Dev Biol*;305: 300–311.
  83. Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. (2008) Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*.;23: 1118–1127.
  84. Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. (1998) Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote*;6:103–111.