REACCIÓN ACROSÓMICA Y GLICOSIDASAS ACROSOMALES EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum*

María Laura Martínez

Tesis para optar el título de doctor

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias Biológicas, Area Biología
I.B.R.-CONICET

Director: Dr. Marcelo O. Cabada

2001

T 57 M385
R 5606
F 14-8-2001

a Esteban y Bernardo

a mis padres y Ma. Inés

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS
BIBLIOTECA
HIPOLITO
GONZALEZ
U. N. R.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Marcelo Cabada, quien ha dirigido mi tesis, por su apoyo y paciencia durante todos estos años. Deseo agradecer a todos los integrantes del Lab 1 y 2 que siempre me brindaron el apoyo que necesitaba y el marco adecuado para las discusiones experimentales. A los integrantes de la cátedra de Estadística de esta facultad por la colaboración generosa en los análisis estadísticos y a Luciano por su participación en algunos de los experimentos finales de este trabajo.

Recuerdo con enorme afecto a la Dra. Silvia Juan quien fue para mi un ejemplo de honestidad e integridad combinado con una hermosa presencia maternal. Quiero agradecer especialmente a Ale Sanchez por su compañía e interés concreto en estos años. Mi cariño también es inmenso por el resto de las brujas para quienes tengo un profundo agradecimiento: Isabel, Nora, Valeria, Elena y Eleonora. Quiero agradecer a Isabel, una amiga confidente, y a Nora su comprensión y valioso aporte.

No puedo dejar de mencionar especialmente a Cristian que siempre estuvo presente a la hora de darme una mano y a Gustavo, con quien compartí muy lindos momentos, por su paciencia y clara transmisión de ideas tanto en castellano como en inglés. También quiero destacar su imprescindible ayuda en el uso de los programas de computación usados en este trabajo.

Agradezco a Angel por sus buenos mates, a Marcos C. que siempre tuvo una sonrisa para darme, a Pablo por las charlas "académicas" (entre otras). No quiero dejar afuera a Leticia, Ale, Gustavo M., al Mosca, Andrés, Gabi García, Ramiro, y a los que han estado como Marcos Vidal, Mariana Tioni, Silvina Felitti, Luis Veggi, Sergio Gradilone, Juliana Stein, Alejandro Colaneri con quienes compartí hermosos y divertidos momentos. Quiero agradecer a la A2A, en general, por su idealismo y optimismo que permitieron mantener vigentes tantos valores positivos.

Finalmente y en un lugar principal, a toda mi familia por apoyarme, comprenderme y acompañarme en todo momento.

mm

Los resultados que se escriben en este trabajo de tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

- "Assessment of the acrosome reaction in *Bufo arenarum* spermatozoa by immunostaining: comparison with other methods". María Laura Martínez and Marcelo O. Cabada. Zygote 4: 181-190 (1996).

- "Purification and biological characterization of N-Acetyl-β D Glucosaminidase from *Bufo arenarum* spermatozoa." María Laura Martínez and Marcelo O. Cabada. Mol Reprod and Develop 57:194-203 (2000).

REUNIONES CIENTÍFICAS

- **XIII Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario.** Rosario, diciembre de 1993. "Evaluación de la ruptura del acrosoma en espermatozoides de *Bufo arenarum* ". María Laura Martínez y Marcelo O. Cabada.

- **VI Congreso de la Sociedad Argentina de Cs. Morfológicas.** Rio Cuarto, Córdoba, 22 al 25 de Marzo de 1994. "Evaluación de la ruptura del acrosoma en espermatozoides de *Bufo arenarum.*" María Laura Martínez y Marcelo O. Cabada.

- **XXX Reunión Anual de S.A.I.B**. Puerto Iguazú 26 al 29 de Octubre de 1994. "Interacción entre gametas. Moléculas implicadas en *Bufo arenarum* . María Laura Martínez, Gustavo A. Barisone y Marcelo O. Cabada.

- **XXXI Reunión Anual de SAIB**. Villa Giardino, Córdoba. 15 al 18 de Noviembre de 1995. "Uso de anticuerpos para la evaluación de la reacción acrosómica en *Bufo arenarum.* Comparación con otros métodos." María Laura Martínez y Marcelo O. Cabada.

- XLI **Reunión Anual de SAIC.** Paraná, Entre Rios, 1 al 3 de Noviembre de 1996. "Detección de una proteína acrosomal de espermatozoides de *Bufo arenarum* que interacciona con cubierta vitelina del ovocito" María Laura Martínez y Marcelo Cabada.

- **XXXIII Reunión Anual de SAIB**. Villa Giardino, Córdoba. Noviembre de 1997. "N-Acetil Glucosaminidasa: enzima acrosomal de espermatozoides de *Bufo arenarum.*

Caracterización y purificación parcial. María Laura Martínez, Alejandro Colaneri y Marcelo Cabada.

- **XVII Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario**. Rosario, Noviembre de 1997. "Detección y caracterización de N-Acetil Glucosaminidasa de espermatozoides de *Bufo arenarum*. María Laura Martínez, Alejandro Colaneri y Marcelo Cabada.

- **X Congreso de la Sociedad Argentina de Cs. Morfológicas.** Tandil, Bs. As., Marzo de 1998. Mesa redonda sobre fecundación. Tema: "Fecundación en anfibios".

- **XII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba.** Merlo, San Luis, 28 de Junio al 2 de julio de 1999. "Glucosaminidasa acrosomal de *Bufo arenarum* arenarum: localización y purificación parcial". M. L. Martinez y M.O. Cabada.

- **XXXV Reunión Anual de la S.A.I.B**. Mendoza, 09 al 12 de Noviembre de 1999. "N-Acetilglucosaminidasa de espermatozoides de *Bufo arenarum*: purificación y estimación del peso molecular." M. L. Martinez, L. Martelotto y M.O. Cabada.

- **XIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**. Rosario, 2 y 3 de Diciembre de 1999. "Purificación de N-Acetilglucosaminidasa de espermatozoides de *Bufo arenarum*" M. L. Martinez, L. Martelotto y M.O. Cabada.

- **Taller Biología de la Reproducción Animal y del Desarrollo Embrionario**. Buenos Aires, 27-29 de Marzo de 2000. "Caracterización biológica de la N-Acetil Glucosaminidasa de espermatozoides de *Bufo arenarum*". M L Martínez y M O Cabada
- **XX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**. Rosario, 4 y 5 de Diciembre de 2000. "N-Acetilglucosaminidasa de *Bufo arenarum*: posible participación en la fecundación" M. L. Martinez y M.O. Cabada.

Abreviaturas xi

I. INTRODUCCIÓN GENERAL 1

1. Fecundación: el comienzo de un nuevo organismo 2

1.1 Visión generalista y especie-especíca del proceso de fecundación 3

2. Estructura de las gametas: el óvulo y el espermatozoide 7

3. Reconocimiento e interacción entre gametas: estrategias en erizo de mar, Mamíferos y Anfibios 12

3.1 Erizo de mar 12

3.2. Mamíferos 15

3.2.1. La interacción primaria entre el espermatozoide y ZP3 17

3.2.2. La interacción secundaria entre el espermatozoide reaccionado y el Ovocito. 18

3.3. Anfibios 22

4. La reacción acrosómica 25

4.1 Significado funcional de la reacción acrosómica 27

4.2 Mecanismos propuestos de la reacción acrosómica en distintas especies 27

II. OBJETIVOS 30

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.Animales 32

2. Preparación de muestras de espermatozoides de *Bufo arenarum* 32

2.1. Obtención de la suspensión de espermatozoides 32

2.2. Obtención de espermatozoides reaccionados 33

2.3. Obtención del extracto total de espermatozoides 33

3. Fraccionamiento subcelular 34

3.1 Aislamiento de espermatozoides reaccionados 34

3.2. Aislamiento de matriz y vesículas acrosomales 35

4. Determinación de la concentración de proteínas 36

5. Procedimientos de tinción para evaluar reacción acrosómica 36

5.1. Tinción con azul de Coomassie 36

5.2 Tinción con lectinas marcadas fluorescentemente 36

5.3. Técnica de inmuno fluorescencia indirecta 37

6. Obtención de anticuerpos policlonales

6.1. Anticuerpos anti-MA 38

6.2. Anticuerpos anti-NAcGlcasa 38

7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida 39

7.1 Detección de proteínas en geles de poliacrilamida 40

8. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa 40

9. Detección de glicoproteínas en membranas de nitrocelulosa 41

9. 1. Revelado con IgG-peroxidasa (inmunodetección) 41

9.2. Revelado con lectinas conjugadas con peroxidasa (lectin-blot) 42

10. Medición de la actividad de glicosidasas

10.1. Medición espectrofotométrica de la actividad enzimática 43

10.2. Medición de la actividad enzimática en gel 44

11. Cromatografía de afinidad con una matriz de EV-Sepharose 44

11.1. Inducción de la ovulación y obtención de ovocitos de ovisaco 44

11.2. Obtención de EV 45

11.3 Preparación de la matriz de afinidad 45

11.4 Corrida cromatográfica 46

12. Fraccionamiento con $(NH_4)_2SO_4$ 46

13. Cromatografía de intercambio iónico en HPLC 47

14. Cromatografía de afinidad de *p*-aminobenzil-1-tio-β-D-galactopiranósido-agarosa 47

15. Cromatografía de afinidad de ConA-Sepharose 48

16. Cromatografía de de interacción hidrofóbica de Phenyl Sepharose 49

17. Purificación de NAcGlcasa 49

17.1. Purificación parcial de NAcGlcasa de espermatozoides 49

17.2. Purificación a homogeneidad de NAcGlcasa de homogenado de hígado 50

18. Cromatografía de exculsión molecular en HPLC 50

19. Ensayos biológicos 51

19. 1. Obtención de espermatozoides y ovocitos 51

19. 2. Obtención de factores solubles de la cubierta gelatinosa (difundido total) 52

19. 3. Fecundación *in vitro* 52

IV. LA REACCION ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum*

1. INTRODUCCIÓN 54

2. RESULTADOS 57

2.1.Detección mediante técnicas microscópicas 57

2.1.1.Tinción con Coomasie blue 58

2.1.2.Tinción con lectinas 59

Ensayo de unión de PNA a glicoproteínas del espermatozoide 63

2.1.3.Inmunofluorescencia indirecta 64

Especificidad de los anticuerpos anti-MA 64

Técnica de inmunofluorescencia indirecta 66

2.2.Inducción de la reacción acrosómica mediante distintas técnicas 69

2.2.1. Inducción de la reacción acrosómica mediante incubación en medio hipotónico 69

2.2.2. Inducción de la reacción acrosómica mediante incubación con ionóforo de calcio 71

3. DISCUSIÓN 76

V. GLICOSIDASAS EN ESPERMATOZOIDES DE *BUFO ARENARUM*

1. INTRODUCCIÓN 82

2. RESULTADOS 86

2.1. Análisis de las glicosidasas 88

2.2. Determinación de las actividades de las glicosidasas en diferentes fracciones subcelulares del espermatozoide 90

2.3.Incubaciones *in vitro* del acrosoma con la EV de ovocitos homólogos 92

N-ACETIL GLUCOSAMINIDASA. ENZIMA ACROSOMAL QUE PARTICIPA EN LA FECUNDACIÓN 95

2.4. Caracterización de NAcGlcasa 95

2.5. Purificación parcial de NAcGlcasa 99

2.6. Propiedades de NAcGlcasa 101

2.6.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática 101

2.6.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática 102

2.6.3. Requerimiento catiónico 103

2.6.4. Determinación del tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión molecular 104

2.7. Localización subcelular 107

2.8. Características cinéticas 109

2.9. Purificación de NAcGlcasa 111

2.10. Producción de anticuerpos anti-NAcGlcasa 115

2.11. Ensayos de fecundación *in vitro* 116

3. DISCUSIÓN 119

VI CONCLUSIONES GENERALES 128

VII RESÚMEN 132

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 137

ABREVIATURAS

Abs	Absorvancia
BrCN	Bromuro de cianógeno
BSA	Albúmina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
DAB	3,3-diaminobenzidina
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido atilendiaminotetraacético
EV	Envoltura vitelina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HRP	Horse redish peroxidase
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
KDa	Kilo Dalton
MA	Matriz acrosomal
4MU-NAcGlc	4-metil-umbelilferil NAcGlc
NAcGal	N-Acetil Galactosamina
NAcGlc	N-Acetil Glucosamina
NAcGlcasa	N-Acetil β-D Glucosaminidasa
PBS	Amortiguador salino de fosfato

MLM

PNA	Aglutinina de *Arachis hypogea*
P/V	Peso en volumen
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
V/V	Volumen en volumen
WGA	Aglutinina de germen de trigo
ZP	Zona pelúcida

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En las últimas décadas, la investigación básica en Biología ha incrementado significativamente el conocimiento acerca de los mecanismos biológicos de las diversas formas de vida con que compartimos el planeta. Algunos de estos logros han elucidado las interrelaciones entre los seres vivos haciendo que la humanidad tome conciencia de sus efectos sobre otros organismos y su ambiente. La aplicación del conocimiento obtenido en estas investigaciones básicas ha permitido disponer, entre otras cosas, de la tecnología para los transplantes de órganos, la erradicación de numerosas enfermedades, el aumento de la producción de alimentos, etc. . En los albores del siglo XXI puede apreciarse la importancia que el conocimiento de la Biología ha tenido para generar la calidad de vida que disfrutan *muchos* de los seres humanos. Pero se puede caer en un gran peligro si sólo se considera a la ciencia como la fuente de la tecnología y se confunde la esencia de la ciencia con su utilización hacia cuestiones aplicadas. Esta meta aplicada es importante, pero la construcción de la realidad es tan atractiva como su comprensión.

En este trabajo de Tesis se ha intentado ahondar en aspectos básicos del reconocimiento entre gametas durante el proceso de fecundación.

1. FECUNDACIÓN: EL COMIENZO DE UN NUEVO ORGANISMO

En algún tiempo se pensó que los gusanos surgían de los pelos de caballo en el agua, las larvas de la carne en descomposición y los sapos del limo del río Nilo. Hoy se sabe que cada ser vivo sólo puede provenir de un organismo preexistente. Si existe alguna característica que pueda mencionarse como la esencia misma de la vida, ésta es la capacidad de los organismos vivos para reproducirse.

En organismos simples la reproducción es asexual, es decir sin la participación de los sexos. La reproducción sexual implica la unión de genomas de dos individuos para producir uno nuevo, genéticamente diferente de otro y de sus progenitores. La mayoría de los animales han adoptado esta forma de reproducción. La unión de genomas se lleva a cabo por fusión de dos células haploides para formar una célula final diploide.

Las células haploides de animales multicelulares especializadas en la fusión sexual se denominan gametas y el proceso por el cual dos células sexuales (gametas) se fusionan para dar origen a un individuo nuevo, con potencialidades genéticas derivadas de ambos progenitores, se conoce como **fecundación** [1].

Si bien existen diferencias considerables en el proceso de fecundación de las distintas especies animales, investigaciones realizadas en Equinodermos, Anfibios y Mamíferos indican que los eventos principales son comunes a todas ellas [2]:

A. Interacción entre gametas, que incluye:

A.1. reconocimiento y unión entre las gametas,

A.2. inducción de la reacción acrosómica,

A.3. penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito.

MLM

B. Regulación de la entrada del espermatozoide al ovocito (incluye el bloqueo de la poliespermia en especies monospérmicas).

C. Fusión del material genético portado por ambas gametas.

D. Activación del metabolismo del huevo para comenzar el desarrollo.

1.1 VISIÓN GENERALISTA Y ESPECIE-ESPECIFICA DEL PROCESO DE FECUNDACIÓN

El estudio del proceso de fecundación puede enfocarse desde dos perspectivas opuestas que dependen de la posición del investigador. Es decir, desde un punto de vista comparativo, enfatizando en la diversidad, o bien haciendo incapié en los procesos comunes .

Albert Tayler sostenía que debían estudiarse diferentes organismos para intentar entender la fecundación [3]. Una de las razones que daba es que, dependiendo de la cuestión a resolver, debe elegirse el mejor organismo para analizar. Por otro lado, sostenía que un estudio comparativo permite llegar a grandes generalizaciones. Desde este punto de vista, las características más importantes de cualquier proceso biológico son aquellas comunes a varios organismos. Por lo tanto, en el estudio del proceso de fecundación se intenta encontrar las reglas generales comparando los mecanismos en diferentes animales. Obviamente, la adaptación que las diferentes especies han desarrollado son importantes, aunque no deberían oscurecer las características básicas y compartidas. Cuando, por ejemplo, un trabajo se basa fundamentalmente en Mamíferos es sumamente útil el conocimiento de la fecundación en

MLM

animales inferiores. El conocimiento de eventos escondidos o no usados en Mamíferos, que estén presentes en otros organismos, puede ser utilizado para comprender mejor el sistema, o para aplicaciones prácticas.

Por el contrario, otros investigadores ponen el énfasis en la diversidad y no en las características comunes del proceso de fecundación. Michael [4], sostiene que la fecundación en Mamíferos difiere en detalles muy importantes con respecto al erizo de mar y otros Vertebrados inferiores por lo que es necesario ser muy cuidadoso al realizar ciertas generalizaciones. El decía, por ejemplo, que la quimiotaxis - la atracción del espermatozoide por el ovocito debida a señales químicas - existía en Vertebrados pero no había evidencias de que existiese en animales superiores. Su argumento era que las gametas de Mamíferos no presentaban este proceso y por lo tanto no debía prestarse atención a los Vertebrados inferiores. Sin embargo, hoy se sabe que ésto es erróneo y hay buenas evidencias de que el fenómeno existe en humanos. En este mismo sentido, existe una amplia y numerosa bibliografía sobre el estudio de la especificidad de especie en la fecundación. Este término se refiere a que el espermatozoide de una especie no es capaz de fecundar los ovocitos de otra. Sin embargo, esta especie-especificidad se observa sólo en un sentido restringido, porque en cierta medida es posible la fecundación entre animales de diferentes especies [5]. Cuando se realizan mezclas de gametas híbridas el porcentaje de embriones heterólogos resultantes varía de 0% a 100% dependiendo de las concentraciones de gametas y de las especies involucradas [6]. Por lo tanto es más apropiado referirse a la especie-selectividad cuando se habla de la fecundación.

Estos puntos de vista son importantes en el sentido que definen la orientación del

MLM

estudio del proceso de fecundación. En este trabajo de tesis, entonces, se utilizó el Anfibio *Bufo arenarum*, ya que constituye el modelo idóneo para lograr generalizaciones válidas: los espermatozoides de esta especie son muy resistentes, de fácil y abundante obtención y podrían aportar a la elucidación de mecanismos fisiológicos comunes aún desconocidos.

El modelo de estudio

Los Anfibios Anuros constituyen un excelente material tanto para la experimentación en Biología del Desarrollo como en el proceso de fecundación. Estos Anfibios presentan una serie de particularidades que los hacen interesantes como modelo de estudio desde este punto de vista:

- Son Vertebrados primitivos, los primeros que pudieron vivir fuera del agua, lo que permite un estudio comparativo con procesos que ocurren en Invertebrados y Vertebrados inferiores por un lado, y en Vertebrados superiores por el otro, permitiendo intentar un análisis evolutivo del proceso de desarrollo embrionario.
- Los Anuros presentan, en general, ovocitos de gran tamaño (desde 1,5 hasta 15 milímetros de diámetro) lo que facilita su manipulación y el trabajo experimental. Es relativamente sencillo inducir la ovulación en hembras sexualmente maduras ya sea mediante la inyección de un homogenado de hipófisis homólogas o bien de gonadotrofinas. El número de ovocitos que puede llegar a deponer una hembra puede superar los 30000 (en un solo evento de ovulación), lo que permite contar con una cantidad de material considerable para la experimentación. En cuanto a la gameta

masculina, se pueden obtener grandes cantidades de espermatozoides fecundantes simplemente mediante la dilaceración de los testículos en soluciones salinas.

- La fecundación en Anfibios es externa. Ocurre, en la mayoría de los casos, cuando el macho abraza a la hembra dorsalmente (amplexus) y ambos deponen sus gametas a través de sus cloacas, las que se encuentran próximas en este proceso. La mayor parte de las especies se reproducen en charcos. Los embriones de Anfibios son grandes y muy resistentes a la manipulación en laboratorio y a la microcirugía sin sufrir infecciones considerables.

Estas consideraciones, junto con la facilidad de captura de los animales y la sencillez con que se lleva a cabo la fecundación artificial, representan una gran ventaja para el diseño y realización de los experimentos.

Si bien se han realizado avances importantes en el conocimiento de la reproducción en Anfibios, aún son muchos los aspectos bioquímicos y moleculares involucrados que se desconocen. Uno de ellos es el estudio de los procesos que ocurren en el espermatozoide luego de la interacción con el ovocito durante la fecundación. En este trabajo de Tesis se ha utilizado el modelo del sapo *Bufo arenarum* (Tabla 1) para abordar este aspecto.

MLM

Orden Anura
Suborden Archaeobatrachia
Superfamilia Discoglossoidea
Discoglossus pictus, Bombina orientalis, Ascaphus truei, Alytes obstetricans
Superfamilia Pipoidea
Xenopus laevis
Superfamilia Pelobatoidea
Suborden Neobatrachia
Superfamilia Bufoidea
Bufo americanus, Bufo arenarum, Bufo bufo japonicus
Superfamilia Microhyloidea
Superfamilia Ranoidea
Rana pipiens, Rana temporaria

Tabla 1: ***Clasificación de Anfibios Anuros*** de acuerdo a Elinson (1986).

2. ESTRUCTURA DE LAS GAMETAS: EL ÓVULO Y EL ESPERMATOZOIDE

Las gametas son las células sexuales maduras especializadas en la fusión para generar un nuevo individuo. En la mayoría de las especies se forman dos tipos de gametas radicalmente distintas entre ellas, una más grande e inmóvil denominada óvulo y otra más pequeña y móvil llamada espermatozoide.

El óvulo

El óvulo es la célula especializada en recibir al espermatozoide e iniciar el desarrollo. El estado de maduración del óvulo en el momento en que ocurre la penetración del espermatozoide varía según los diferentes animales. En el caso del erizo de mar y los

MLM

cnidarios (pe. anémonas de mar), el óvulo ya ha completado su meiosis antes del encuentro con el espermatozoide; en Anfibios, Peces y en la mayoría de los Mamíferos el núcleo alcanza el estado haploide sólo después de la fecundación. Por consiguiente, en estos casos se denomina **ovocito**, en vez de óvulo, a la gameta madura que aún no ha completado su meiosis.

Si bien ambas gametas aportan igual cantidad de material genético, el resto de los componentes celulares son aportados casi exclusivamente por el ovocito. Durante su maduración en el ovario, el mismo acumula proteínas, ribosomas, RNA y factores fundamentales para la especificación de los patrones axiales durante el desarrollo. El citoplasma del ovocito contiene además reservas nutritivas en forma de **vitelo**, rico en lípidos, proteínas y polisacáridos, que habitualmente se halla en estructuras discretas denominadas **plaquetas vitelinas**. En los ovocitos que darán origen a grandes animales que se desarrollan fuera del cuerpo de la hembra, el vitelo puede representar más del 95% del volúmen celular.

Otro aspecto distintivo de estas células es la presencia de estructuras rodeadas de membrana ubicadas por debajo de la membrana plasmática, en una región citoplasmática de mayor densidad denominada **cortex**. Estas vesículas se denominan **gránulos corticales.** Los mismos poseen en su interior enzimas hidrolíticas, mucopolisacáridos, glicoproteínas de adhesión y proteínas hialinas. El contenido de estos gránulos es volcado por exocitosis al exterior de la célula en el momento de la fecundación. Este proceso, denominado **reacción cortical**, preveniene la entrada de otros espermatozoides una vez que el primero ha penetrado al ovocito, es decir evita la **polispermia**.

MLM

Por fuera del ovocito y rodeando al mismo existe una matriz extracelular glicoproteica (llamada **envoltura vitelina, EV,** en erizo de mar y Anfibios y **zona pelúcida** en Mamíferos) de fundamental importancia en el reconocimiento especie-selectivo. Por fuera de esta estructura, algunos ovocitos presentan, a su vez, una **cubierta gelatinosa** (Equinodermos y Anfibios) o una capa de células con su correspondiente matriz extracelular, denominada **cumulus oophorus,** (Mamíferos).

El espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide dotada de un sistema de propulsión. Generalmente consta de dos regiones morfológica y funcionalmente distintas: la **cola** y la **cabeza**. En la mayoría de las especies, la movilidad del espermatozoide está dada por un **flagelo** que conforma la cola del mismo. El núcleo, con su cromatina muy compactada, se encuentra en lo que constituye la cabeza del espermatozoide. Por encima del mismo aparece un lisosoma modificado, llamado **acrosoma**, que contiene enzimas fundamentales para la penetración del espermatozoide a través de la matriz extracelular del ovocito (Fig 1). Entre la cabeza y la cola se encuentra el segmento intermedio, rico en mitocondrias que proveen la energía necesaria para la propulsión. El espermatozoide no contiene otras organelas citoplasmáticas como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, etc.

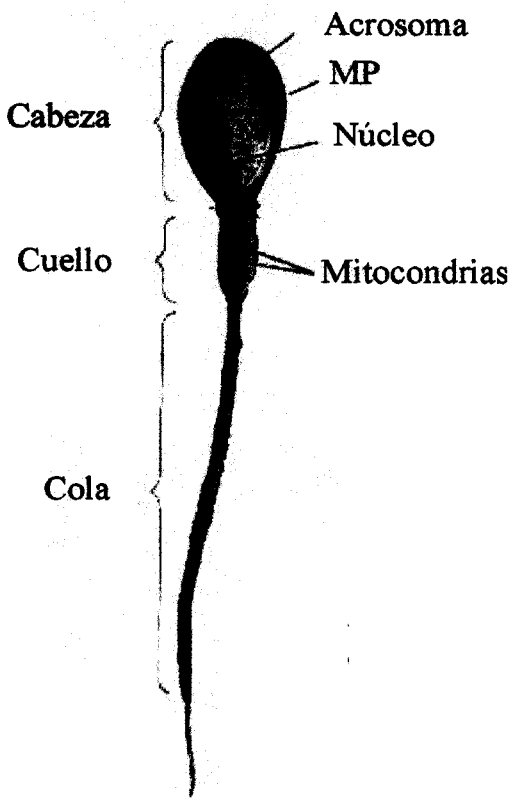

Fig. 1. ***Esquema de un espermatozoide humano.*** La figura, adaptada de ref 2, muestra la morfología básica de un espermatozoide .

Si bien la mayoría de los espermatozoides tienen la misma estructura básica, la morfología varía mucho de una especie a otra (Fig 2).

MLM

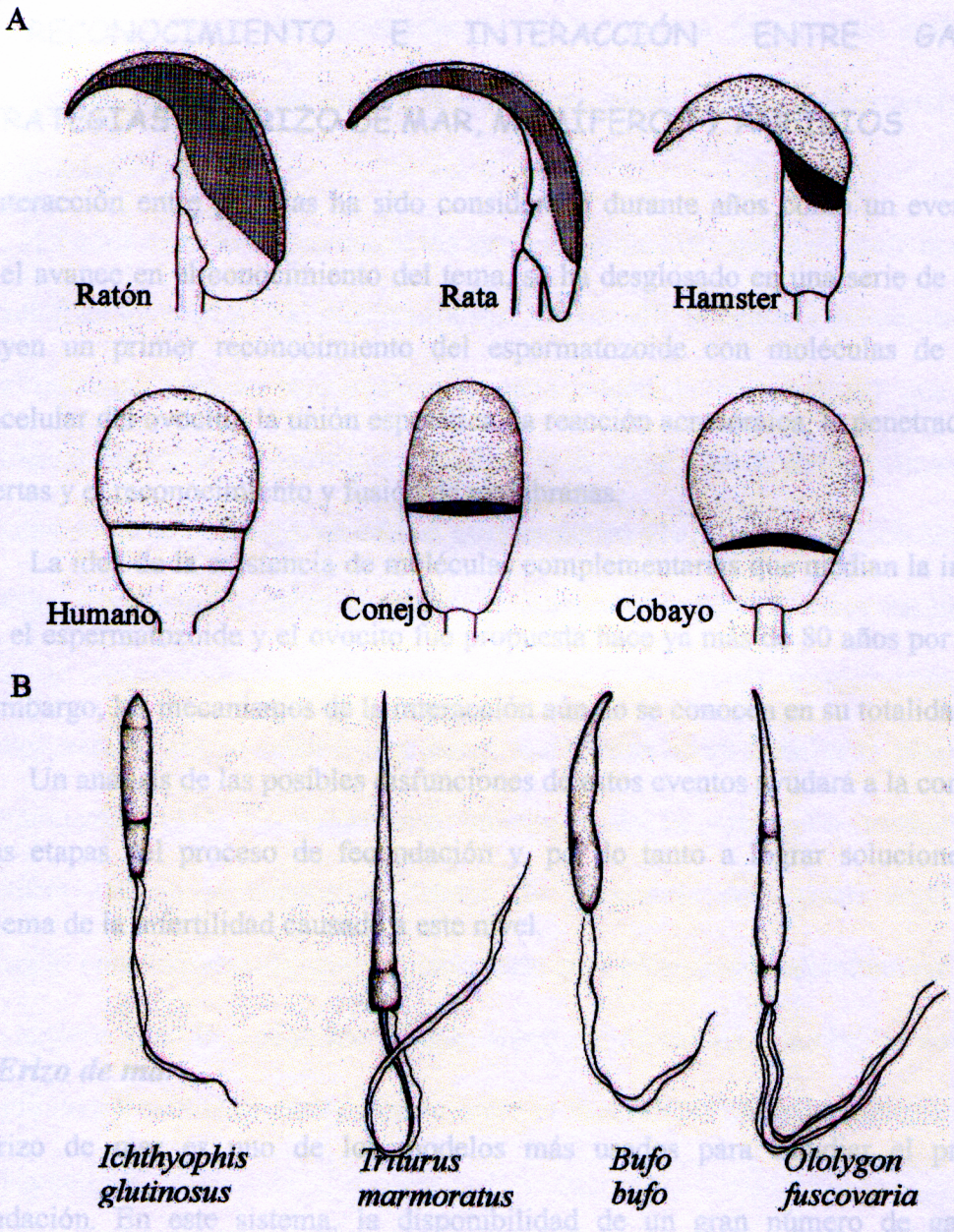

Fig 2. *Morfología de espermatozoides de diferentes especies*. A. Espermatozoides de distintos Mamíferos. Se distinguen las cabezas falciformes de ratón, rata y hamster, mientras que las de humano, conejo y cobayo tienen formas de espátula. (Adaptado de referencia [93]) **B.** Espermatozoides de Anfibios anuros y salamandras (Adaptado de referencia [Duellman 1986])

3- RECONOCIMIENTO E INTERACCIÓN ENTRE GAMETAS: ESTRATEGIAS EN ERIZO DE MAR, MAMÍFEROS Y ANFIBIOS

La interacción entre gametas ha sido considerado durante años como un evento único. Con el avance en el conocimiento del tema, se ha desglosado en una serie de pasos que incluyen un primer reconocimiento del espermatozoide con moléculas de la matriz extracelular del ovocito, la unión específica, la reacción acrosómica, la penetración de las cubiertas y el reconocimiento y fusión de membranas.

La idea de la existencia de moléculas complementarias que median la interacción entre el espermatozoide y el ovocito fue propuesta hace ya más de 80 años por Lillie [7]. Sin embargo, los mecanismos de la interacción aún no se conocen en su totalidad.

Un análisis de las posibles disfunciones de estos eventos ayudará a la comprensión de las etapas del proceso de fecundación y, por lo tanto a lograr soluciones para el problema de la infertilidad causado a este nivel.

3.1. Erizo de mar

El erizo de mar es uno de los modelos más usados para estudiar el proceso de fecundación. En este sistema, la disponibilidad de un gran número de gametas ha permitido una intensiva investigación y un importante avance en el conocimiento de los eventos moleculares. En este tipo de organismos marinos, el éxito en la fusión de las gametas durante la fecundación está asegurado por una serie consecutiva de pasos de reconocimiento intercelular.

Los óvulos de erizo de mar están rodeados por la EV, y por una cubierta

gelatinosa transparente. Los componentes de la primera forman una malla fibrosa, suplementada por glicoproteínas de la membrana plasmática que se extienden hasta la cubierta gelatinosa [8].

El comienzo de la comunicación entre el óvulo y el espermatozoide ocurre con la liberación de los primeros al medio acuoso. Una vez allí, la cubierta gelatinosa del óvulo libera diversos péptidos (su secuencia varía según la especie) [9] que provocan modificaciones en la velocidad y dirección de la motilidad de los espermatozoides, y producen sobre los mismos un **efecto quimiotáctico** [10]. Se han aislado dos péptidos difusibles asociados a la cubierta gelatinosa, *speract* y *resact*, los cuales son liberados de óvulos de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Arbacia punctuata*, respectivamente. Estos péptidos activadores se unen a receptores localizados en la membrana plasmática del espermatozoide [11]. El mecanismo molecular de la activación mediante dichos receptores aún no se conoce en detalle. Se ha podido determinar, usando *speract* conjugado con fluoresceína, que los receptores para el mismo predominan en el flagelo. Esto sugiere que los péptidos actúan sobre la motilidad flagelar y aumenta las probabilidades para el contacto directo entre el espermatozoide y la cubierta gelatinosa del ovocito [12].

Una segunda etapa en el reconocimiento entre gametas es la interacción del espermatozoide con la cubierta gelatinosa del óvulo, que induce en el mismo la **reacción acrosómica** o exocitosis del contenido acrosomal [13-15]. En este proceso, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal subyacente. Así, se forman vesículas mixtas que permiten la liberación de enzimas hidrolíticas que facilitan la

penetración del espermatozoide móvil a través de la cubierta gelatinosa [16].

El paso siguiente es decisivo en el reconocimiento especie-selectivo durante la fecundación: la interacción de la proteína **bindina** del espermatozoide con una glicoproteína homo-multimérica, integral de la superficie del ovocito. Bindina, una proteína de 30,5 kDa, fue identificada hace 19 años por Vaquier y Moy [17]. Esta proteína está presente en el contenido acrosomal y, luego de la reacción acrosómica, se presenta asociada a la membrana acrosomal interna. Debido a que tiene la propiedad de unirse a sí misma, forma una masa insoluble y adhesiva de la proteína sobre el espermatozoide reaccionado [18], que le permite adherirse al óvulo [19]. Finalmente, la bindina podría mediar la fusión de las membranas del espermatozoide y el óvulo [20]. Se han secuenciado bindinas provenientes de distintas especies de erizo de mar [21;22]. Todas ellas presentan homología en un dominio central altamente conservado y carecen de un dominio transmembrana [23].

La molécula del óvulo de erizo de mar que se une a la bindina, posee un extremo citoplasmático corto, un dominio simple transmembrana y un gran dominio extracelular similar a los de la familia de proteínas hsp70 (heat shock protein) [24]. También posee un dominio rico en cisteínas en el extremo N-terminal, que se superpone con el dominio del tipo hsp70, donde existen numerosos sitios potenciales de *N*- y *O*-glicosilación [24]. Utilizando una proteína recombinante, que representa la porción extracelular de la molécula del ovocito, se ha demostrado que realmente esta proteína es especie-selectiva tanto en la unión a las partículas de bindina asociadas al espermatozoide reaccionado o a bindina soluble, como en la inhibición de la fecundación [24]. La cadena polipeptídica y

las hidrocarbonadas de dicho ligando estarían involucradas en la unión con el espermatozoide. Diferentes estudios revelaron que los oligosacáridos *O*- unidos, sulfatados, de mayor carga, son los que interaccionan con el espermatozoide y presentan la más alta actividad inhibitoria de la fecundación en erizo de mar. Sin embargo, esta interacción carece de selectividad de especie. Luego del clonado y secuenciación, se demostró que la proteína recombinante poseía un sitio de unión al espermatozoide especie-selectivo [25].

Ohlendieck y Lennarz han propuesto un modelo de la interacción entre el óvulo y espermatozoide reaccionado en dos etapas : en un primer momento los grupos sulfatos de oligosacáridos *O*-unidos al ligando del ovocito interaccionan con su receptor en el espermatozoide; en una segunda etapa, esta interacción de baja afinidad es seguida por una unión especie-selectiva entre una porción polipeptídica del ligando y el receptor del espermatozoide [25]. Esta unión secundaria del espermatozoide reaccionado mantendría al mismo en las cercanías de la membrana plasmática del ovocito, facilitando la fusión de ambas gametas [25].

3.2. Mamíferos

Estudios realizados en Mamíferos muestran que, si bien los mismos distan de los Equinodermos en millones de años de evolución, las principales etapas de reconocimiento entre gametas se han conservado entre ellos [26].

Los ovocitos de Mamíferos están rodeados por dos envolturas: el **cúmulus ooforus** (una capa de células foliculares que nutren al ovocito) y la **zona pelúcida** (una

matriz extracelular compuesta fundamentalmente por glicoproteínas).

Es posible que el ovocito o las células del cúmulus que lo rodean o la ruptura del folículo ovárico que contiene al ovocito, secreten **sustancias quimiotácticas** que atraigan al espermatozoide hasta el ovocito en sus últimas etapas de migración en el oviducto [27, 28].

Durante el pasaje del espermatozoide por el tracto reproductor de la hembra, el espermatozoide sufre una serie de cambios que lo capacitan para unirse a la zona pelúcida, sufrir la reacción acrosómica y poder penetrar la zona hasta fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Esta serie de eventos previos que transforman al espermatozoide se denomina **capacitación.** A pesar de que existen numerosos trabajos sobre el tema [29-33] aún no se ha consensuado una definición del proceso de capacitación. Entre los eventos discretos del proceso se pueden citar: (1) la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide por alteración en su composición lipídica [34, 35]; (2) la expresión o modificación de antígenos de superficie [36-38] y (3) la fosforilación de protein-quinasas implicadas tanto en la unión del espermatozoide a zona pelúcida como en la mediación de la exocitosis de la vesícula acrosomal [39]. Sin embargo, no está claro si estas alteraciones son una causa o una consecuencia de la capacitación. El resultado es que sólo el espermatozoide capacitado es capaz de fecundar al ovocito fundamentalmente porque adquiere competencia para iniciar la reacción acrosómica [40].

Los espermatozoides capacitados e intactos son capaces de atravesar el cúmulus, mientras que si están reaccionados o no capacitados no lo penetran [41-43]. Los

MLM

componentes solubles del cúmulus parecen estar implicados en la estimulación de la motilidad del espermatozoide. Además podría facilitar la captación del espermatozoide al ofrecer una mayor superficie blanco [44] y filtrar y admitir sólo los espermatozoides aptos para interactuar con el ovocito [30]. Sin embargo, todas estas funciones no parecen ser esenciales en la fecundación, dado que el cumulus no está presente en todas las especies en el momento de la interacción entre gametas.

La zona pelúcida (**ZP**) es la matriz extracelular específica, secretada por el ovocito durante la ovogénesis, que posee los ligandos específicos de unión al espermatozoide [45]. La interacción entre el espermatozoide y la ZP induce la reacción acrosómica, que libera las enzimas necesarias para la digestión de la zona. Luego de la fecundación la modificación de la zona pelúcida evita la polispermia [46], y protege al embrión en desarrollo antes de la implantación [47]. La comprobación de la total necesidad de la zona durante el proceso de fecundación fue corroborada en ratones, dado que los ovocitos que carecen de ZP son totalmente infértiles [48].

La zona pelúcida de humanos, ratones, conejos y hámsters está constituida por tres glicoproteínas distintas denominadas ZP1 (200 kDa), ZP2 (120 kDa) y ZP3 (80 kDa) de acuerdo a su patrón de migración en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes [49]. En cerdo se han encontrado cinco glicoproteínas distintas: ZP1, ZP2, ZP3a, ZP3b y ZP4 [50].

3.2.1. La interacción primaria entre el espermatozoide y ZP3

La ZP juega un papel análogo a la EV de Invertebrados. La primera interacción en

Mamíferos entre el espermatozoide y el ovocito ocurre entre ZP y los receptores en la membrana plasmática del espermatozoide. Esta interacción, denominada **unión primaria**, causa la agregación de los receptores del espermatozoide y la reacción acrosómica [51, 52]. En ratón la glicoproteína del ovocito involucrada es ZP3 [53], más aún el sitio específico se atribuye a oligosacáridos O-unidos a aminoacidos entre la Cys_{328} y Asp_{343} [54]. Sin embrago, no se ha llegado a un acuerdo sobre la identidad del azúcar terminal en el extremo no reductor del oligosacárido. Bleil sugiere que los restos galactosa son fundamentales [55], mientras que Miller le atribuye a residuos N-Acetil Glucosamina la unión con el espermatozoide dado que su remoción por la N-Acetil Glucosaminidasa de los granulos corticales lleva a que ZP3 sea incapaz de unirse al espermatozoide [56]. Pero ninguno de estos monosacáridos aislados es capaz de imitar a ZP3 en su capacidad de inducir la reacción acrosómica [57;58].

Se ha propuesto que un conjunto de proteínas del espermatozoide reconocerían los epitopes glicosídicos de ZP3 pero aún la identidad de dichos receptores no ha sido consensuada. La Tabla 2 muestra algunos receptores de la membrana plasmática del espermatozoide que participarían en la **unión primaria**. Una de las limitaciones para la identificación de los receptores de ZP estriba en la dificultad de obtener cantidades suficientes de cada una de las glicoproteínas puras. Si bien el ratón ha servido como prototipo para el estudio de las proteínas de ZP, presenta el inconveniente de que los espermatozoides son frágiles y puede obtenerse sólo un número limitado de ellos. Por el contrario, los espermatozoides de conejo o cerdo son más resistentes; la purificación de cada una de las proteínas de ZP en estas especies es difícil, por lo que en estas especies se

usa la zona completa para los estudios de interacción.

Candidato	Comentario
Interacción primaria	
Galactosiltransferasa	Se une a residuos NAcGlc de ZP3
Espermadhesinas	Se une a la ZP y a carbohidratos
Sp56	Receptor de ZP3 encontrado en ratón y hamster
ZRK	Se une a ZP3
Interacción secundaria	
Proacrosina	Encontrada ubicuamente dentro del acrosoma de varias especies
Sp38	Proteína de cerdo requerida para la unión a ZP
Sp17	Proteína de conejo que se une a ZP
PH-20	Se la ha encontrado dentro del acrosoma de cobayo

Tabla 2. ***Receptores del espermatozoide.*** La lista corresponde a proteínas propuestas del espermatozoide que participan en la interacción con la zona pelúcida. Tabla adaptada de referencias [66;71]

Una proteína del espermatozoide informada como candidata a la unión con ZP es la **α-1,4-galactosiltransferasa** (GalTasa) de espermatozoides de ratón [59], que reconoce residuos oligosacarídicos de ZP3 [56]. Aparentemente, la GalTasa en su función de receptor actuaría en una forma de tipo lectina, y no catalíticamente, reconociendo restos terminales N-Acetil Glucosamina del oligosacárido del ligando. La agregación de la GalTasa de la superficie del espermatozoide activa una proteína G por lo que se ha propuesto a la GalTasa como un receptor de transducción de señal [60].

Otra proteína propuesta es **sp56**, identificada en ratón y hamster pero no en otros Mamíferos. La proteína se ha localizado en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide. Además, sp56 purificada se une a ZP3 e inhibe *in vitro* la interacción

MLM

ovocito-espermatozoide [61].

Un grupo de proteínas del espermatozoide de bajo peso molecular (15 kDa), llamadas **espermadhesinas**, parecen estar involucradas en la unión a zona. Estas proteínas se producen en epidídimo y vesícula seminal y se adhieren a la membrana plasmática del espermatozoide en su paso por los mismos antes de la eyaculación. Las espermadhesinas se unen fuertemente a ZP y podrían contribuir a la unión *in vivo* del espermatozoide [62].

Una proteína transmembrana de espermatozoide de ratón de 95 kDa posee dos sitios funcionales: uno extracelular que se une a ZP3 y otro intracelular con actividad enzimática de tirosina-quinasa, que es estimulada por ZP3 [63]. A este receptor se lo denomina **ZRK** por el inglés *Zona Receptor Kinase*. La inhibición de la actividad de ZRK evita la reacción acrosómica y bloquea la fecundación [63]. En espermatozoides de humanos la fosfotirosina quinasa mayoritaria también es una proteína de 95kDa cuyos niveles aumentan luego de la capacitación [64].

Estas moléculas son las más firmementes aceptadas como involucradas en la interacción primaria; sin embargo, están surgiendo algunas dudas sobre su protagonismo. Trabajos recientes han mostrado que ratones que no expresan la GalTasa, producidos mediante mutagénesis dirigida, son fértiles aunque el tiempo de gestación es mayor en comparación con los controles [65]. Es posible que la unión e interacción entre ZP3 y la GalTasa optimice el proceso de fecundación en ratones [66]. Por otro lado, existen dudas sobre el rol propuesto para el receptor ZRK dado que es idéntico al proto-oncogen c-*mer* [67]. Finalmente, la similitud entre sp56 con una porteína de la matriz acrosomal, AM67,

cuestiona el rol de sp56 en la interacción entre el espermatozoide intacto y ZP3 ya que no estaría asociada a la membrana plasmática.

A pesar de estas controversias, está claramente establecido que la interacción primaria del receptor con ZP3 lleva al siguiente paso: la reacción acrosómica.

3.2.2. La interacción secundaria entre el espermatozoide reaccionado y el ovocito

A medida que las enzimas de la matriz acrosomal (desde aquí MA) favorecen la penetración, el espermatozoide reaccionado se une nuevamente a la zona a través de otras proteínas. Estas proteínas, presentes en la membrana acrosomal interna, participan de la **unión secundaria** (Tabla 2). Debido a que el ligando de ZP que interviene en esta unión no está consensuado, la clasificación de las proteínas del espermatozoide en esta categoría se establece debido a la habilidad para unirse a ZP y a su localización intra-acrosomal. La **proacrosina** se ha encontrado en el acrosoma de varios Mamíferos y luego de la reacción acrosómica se autotransforma en **acrosina** [26]. La proacrosina parece estar involucrada en la unión y penetración del espermatozoide a través de la ZP [68]. Sin embargo, ratones sin el gen de proacrosina son fértiles aunque aumenta el tiempo necesario para que el espermatozoide penetre a través de las envolturas del ovocito [69]. La unión de acrosina a ZP en ratón tiene lugar a través de **ZP2** [49]. De esta manera, el espermatozoide reaccionado, que permanecía unido a zona por ZP3, transfiere su unión a la molécula ZP2 adyacente.

Otra molécula candidata propuesta en la interacción secundaria es **PH-20**, que es una proteína anclada a membrana mediante un glicosil fosfatidilinositol. Originalmente

MLM

fue descripta en cobayo pero el gen de PH-20 está presente en una gran variedad de Mamíferos [70]. En la actualidad se sabe que existen dos poblaciones de PH-20: una asociada a la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide y otra dentro del acrosoma. Posiblemente la población de la superficie postacrosomal esté relacionada con la penetración a través del cumulus, y la otra con la interacción secundaria con ZP.

Durante las últimas dos décadas se han realizado grandes avances en el establecimiento de los mecanismos moleculares de la fecundación en Mamíferos. A pesar de que la mayoría de estos estudios se han realizado en ratones y otros roedores, se cree que moléculas homólogas a las que participan en la fecundación en estos animales, también participaran en otros Mamíferos [71].

3.3. Anfibios

Las etapas descriptas en Equinodermos y Mamíferos no están aún bien estudiadas en Anfibios, ni se conocen las moléculas involucradas en el reconocimiento y unión del espermatozoide al ovocito.

En Anfibios la fecundación es externa, los espermatozoides son depositados en las proximidades de los ovocitos depuestos por la hembra. A diferencia de los espermatozoides de Mamíferos que completan la maduración en el epidídimo, en estas especies los espermatozoides de testículo son capaces de fecundar al ovocito, por lo que se cree que la maduración fisiológica ocurre en el testículo junto con la diferenciación morfológica. Los espermatozoides son transportados mediante movimientos ciliares y de contracción muscular a lo largo de un sistema muy simple de conductos, el conducto

arquinéfrico. Finalmente el macho los deposita sobre las tiras de ovocitos.

Los ovocitos de Anfibios, en cambio, recorren distancias relativamente largas desde el ovario hasta alcanzar el medio acuoso fuera del cuerpo de la hembra. Los ovocitos están rodeados por la EV y las cubiertas gelatinosas que el espermatozoide debe atravesar antes de la fusión de las membranas. La EV está compuesta por cuatro glicoproteínas denominadas ZPA, ZPB, ZPC y ZPX. Las tres primeras se corresponden con ZP1, ZP2 y ZP3 de Mamíferos respectivamente, mientras que no existe correspondencia con ZPX [79].

El reconocimiento entre gametas en el sapo *Bufo arenarum* podría depender de la unión entre sitios de la EV que unen Concanavalina A y moléculas complementarias en el espermatozoide [72-74]. La eliminación de residuos de manosa de estas glicoproteínas resulta en la pérdida de actividad biológica mientras que la digestión de la región proteica no tiene efecto sobre la misma. Esto indicaría que los residuos manosa de glicoproteínas de EV estarían involucrados en la unión al espermatozoide [75].

Los espermatozoides de *Xenopus laevis* y *Bufo japonicus* se unen fundamentalmente a ZPC de ovocitos homólogos [76;77]. Generalmente la unión del espermatozoide al ovocito implica un único componente de la envoltura de éste que interactua con su receptor en el espermatozoide. Como ejemplo ya fue citado ZP3 de ratón que participa en la unión primaria. Sin embargo, en cerdo la interacción requiere de ZP3 y ZP2 [78]. En *Xenopus* se detectó una situación similar [79]. Si bien ZPC aislada posee actividad de ligando, la combinación de ZPA, ZPB y ZPC (en proporciones similares a las que existe en la EV) actúan en forma sinérgica alcanzando una mayor

cantidad de espermatozoides unidos. Esto podría deberse a 1) Las tres glicoproteínas forman un complejo que altera la conformación de ZPC exponiendo la mayor cantidad de sitios de unión ó 2) la unión estable con el espermatozoide implica un reconocimiento heteroligomérico de dos o más componentes de VE.

En ratón la interacción de las gametas ocurre primero entre el espermatozoide intacto y ZP3 [80], y luego entre el espermatozoide reaccionado y ZP2 [81]. Hedrick postula que esta hipótesis podría aplicarse también para *Xenopus*. ZPC, que es homóloga a ZP3 de ratón, está implicada en la primera unión del espermatozoide [79]. Luego de la activación del ovocito ocurre una hidrólisis enzimática de ZPA que se correlaciona con una disminución de la unión del espermatozoide a ésta. Este hecho observado, podría sugerir que ZPA participa de la unión secundaria al espermatozoide en *Xenopus*. La hipótesis aún no ha podido confirmarse porque es difícil diferenciar al espermatozoide intacto del reaccionado debido a la fragilidad de estas gametas en esta especie.

Los restos NAcGal de la EV de ovocitos de *Bufo japonicus* fueron propuestos como posibles ligandos del receptor en el espermatozoide. En este caso, el enmascaramiento de dichos restos mediante lectinas específicas provoca un efecto inhibitorio de la unión de espermatozoides a la EV en esta especie [76]. En 1985, se propuso la participación de los residuos NAcGlc en la interacción entre gametas en *Xenopus* [82]. Trabajos recientes atribuyen esta unión a los oligosacáridos complejos N-unidos de ZPC [79]. Más aún, la remoción enzimática de restos NAcGlc del extremo no reductor impide la interacción dado que en este caso no se detectaron espermatozoides unidos a la EV.

Sin embargo, es poco posible que un único monosacárido sea el ligando exclusivo responsable de la unión con el espermatozoide. Probablemente, los receptores del espermatozoide reconozcan el entorno estructural de los residuos NAcGlc o NAcGal del ligando.

A pesar de estos avances, no se conocen las moléculas del espermatozoide involucradas en la fecundación en Anfibios. La alta fragilidad de estas células en *Xenopus laevis* y *Bufo japonicus* dificulta su estudio. Por el contrario, los espermatozoides de *Bufo arenarum* son suficientemente resistentes, lo que como se indicó, los hace un interesante modelo de estudio.

4. LA REACCIÓN ACROSÓMICA

El ***acrosoma*** es una estructura de tipo capuchón que cubre la porción anterior del núcleo del espermatozoide, contiene numerosas enzimas hidrolíticas. A pesar que la forma y tamaño varía bastante de una especie a otra, todos poseen la misma estructura básica, como se ilustra en la Fig 3.

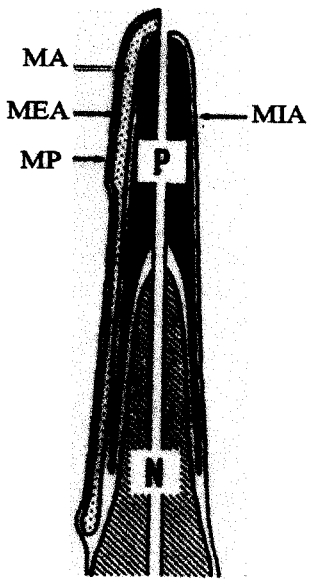

Fig 3. ***Región acrosomal de espermatozoides de anfibios***. El esquema muestra la zona acrosomal de un espermatozoide antes (izquierda) y después (derecha) de la reacción acrosómica. MA: matriz acrosomal, MEA: membrana externa acrosomal, MP: membrana plasmática, MIA: membrana interna acrosomal, N: núcleo, P: *perforatorium* (Adaptado de referencia [123]).

Se cree que el acrosoma es análogo al lisosoma [83;35]. "Las diferentes formas del acrosoma en las distintas especies y la observación de zonas de diferentes densidades sugieren que el acrosoma no es simplemente una bolsa de enzimas. Es posible que existan una serie de proteínas involucradas en mantener la forma del acrosoma y ubicar los diferentes componentes dentro de la MA. Más aún, se requiere un alto grado de organización para asegurar la liberación de los componentes en el orden preciso a medida que el espermatozoide va atravesando las envolturas del ovocito [84]."

La ***reacción acrosómica*** implica múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide permitiendo la liberación de las enzimas hidrolíticas (Fig 4)

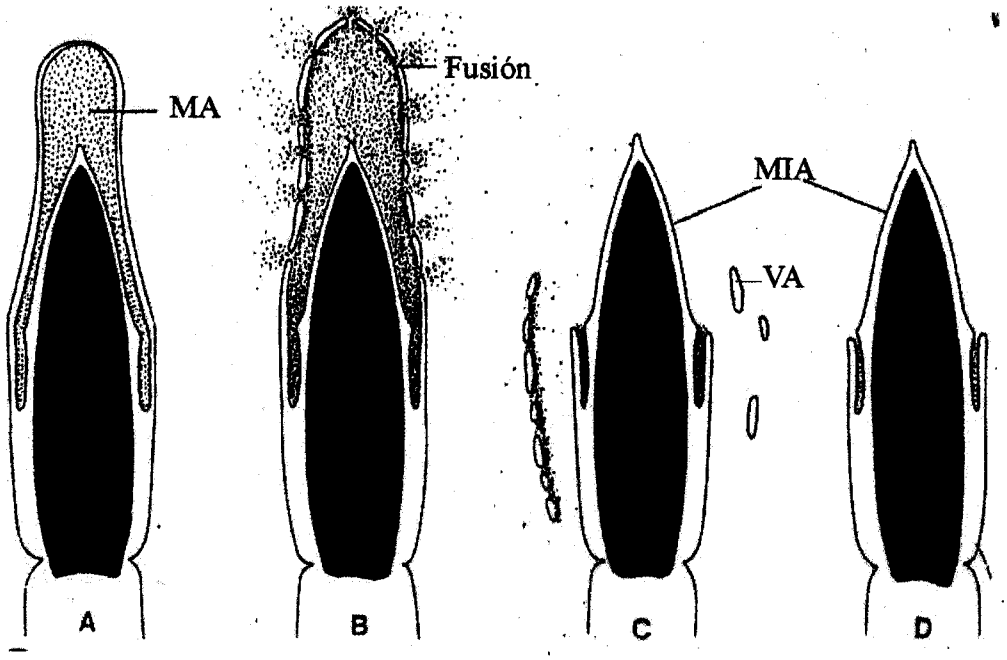

Fig 4. ***Progresión de la reacción acrosómica.*** El esquema ilustra: **A.** La cabeza del espermatozoide intacto. **B.** El comienzo de la reacción con múltiples fusiones entre la membrana plasmática y acrosomal externa, permitiendo la liberación de la matriz acrosomal (MA). **C-D.** El espermatozoide completamente reaccionado expone la membrana interna acrosomal (MIA). Las vesículas híbridas acrosomales (V) pueden dispersarse o quedar unidas por la matriz acrosomal. Ac: acrosoma. (Esquema modificado de referencia [123])

MCM

4.1. Significado funcional de la reacción acrosómica

Los espermatozoides de numerosos animales deben atravesar las envolturas glicoproteicas que rodean al ovocito antes de llegar a la membrana plasmática. La interacción del espermatozoide con estas envolturas provoca la exocitosis del acrosoma como se describió anteriormente. Sólo el espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosómica es capaz de atravesar las envolturas. Las enzimas liberadas digieren la zona y le permiten al espermatozoide atravesarla. En este pasaje la movilidad del espermatozoide gracias a su poderoso flagelo es también de suma importancia [85].

Luego de la reacción acrosómica se expone una nueva superficie del espermatozoide y es ésta la que finalmente se fusionará con la membrana plasmática del ovocito.

4.2. Mecanismos propuestos de la reacción acrosómica en distintas especies

En el ***erizo de mar*** la cubierta gelatinosa que rodea al óvulo inicia la reacción acrosómica [13]. Los componentes de la gelatina que inducen la reacción acrosómica son, en su mayoría especie selectivos [86]. Estudios en *S. purpuratus* sugieren que dos glicoproteínas de cubierta gelatinosa, de 82 y 138 kDa respectivamente, asociadas a un glicoconjugado de fucosas sulfatadas, serían las responsables de inducir la reacción acrosómica [87]. Probablemente estas moléculas se unan a una glicoproteína de 210 kDa del espermatozoide homólogo, relacionada con la entrada de calcio necesaria para el inicio de la reacción acrosómica [88;89]. Sin embargo, aún no se tiene la certeza de su protagonismo ya que deben ser realizados experimentos usando componentes de cubiertas

MLM

gelatinosas con un mayor grado de pureza [25]. La reacción acrosómica, en erizo de mar, posee una segunda etapa: la polimerización de moléculas de actina, ubicadas entre el acrosoma y el núcleo (Fig 5).

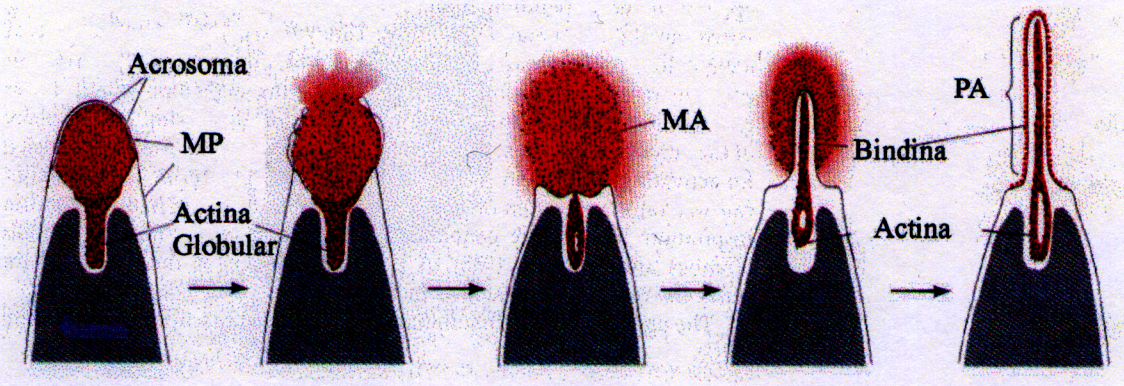

Fig 5. ***La reacción acrosómica en espermatozoides de erizo de mar***. A-C. La membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa y se libera el contenido acrosomal. D y E. Los filamentos de actina se ensamblan formando el proceso acrosomal. En las fotomicrografías se muestran los procesos esquematizados arriba. MP: membrana plasmática, MA: matriz acrosomal, PA: proceso acrosomal. (Adaptado de referencia [2])

La formación de filamentos de actina genera una protrusión en la cabeza del espermatozoide, denominada *perforatorium o proceso acrosomal*, que facilita la penetración del mismo hasta la superficie del óvulo [90]. Esta polimerización parece ser dependiente del aumento del pH que se produce luego de ocurrida la interacción del espermatozoide con la cubierta gelatinosa [90]. El aumento de pH también activa una dineina-ATPasa del espermatozoide que causa una rápida utilización del ATP y un aumento en la respiración mitocondrial. Esta energía generada es usada fundamentalmente para el movimiento flagelar.

La reacción acrosómica en ***Mamíferos*** es inducida por ZP3. La modificación de la cadena polipeptídica de ZP3 impide que ocurra la reacción acrosómica, si bien no se afecta la unión del espermatozoide [91;51]. Experimentos *in vitro* muestran que la agregación de los receptores, por la adición en el medio de anticuerpos anti-galactosiltransferasa o por ZP3 solubilizada, provoca la reacción acrosómica [51;92].

La interacción de ZP3 con el receptor en el espermatozoide induce profundos cambios, incluyendo la activación de proteína G, la apertura de canales iónicos y un aumento del pH intracelular que permiten la liberación de calcio de compartimentos intracelulares y la síntesis de productos fusogénicos que son esenciales para que ocurra la reacción acrosómica [93-95;71].

Se ha demostrado en ***Anfibios*** que una glicoproteína de la cubierta gelatinosa de sapo se une al espermatozoide y evita que ocurra la reacción acrosómica [96]. Por lo tanto el espermatozoide puede atravesar las cubiertas gelatinosas con su acrosoma intacto. Sin embargo, este efecto protector es reversible, lo cual permitiría que posteriormente ocurra la reacción acrosómica Por otro lado, hay evidencias que indican que la reacción acrosómica sucede cerca de la EV [76]. La incubación de glicoproteínas solubilizadas de EV con espermatozoides homólogos, evita que ocurra luego la fecundación. Esto podría deberse a la saturación de sitios de unión de la superficie del espermatozoide que evita la posterior unión del mismo a EV [75]. Sin embargo, mediante ensayos *in vitro* se detectó que los espermatozoides del sapo sufren la reacción acrosómica al ser incubados con la EV de ovocitos homólogos (Barisone, comunicación personal). Este hecho podría explicar la pérdida de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

MLM

CAPITULO II
OBJETIVOS

II OBJETIVOS

Los espermatozoides de la mayoría de los animales, incluyendo Equinodermos, Anfibios y Mamíferos, sufren la reacción acrosómica como un requisito previo a la fusión entre gametas, paso decisivo en la generación de nuevos individuos. De esta manera, la detección del estado acrosomal del espermatozoide, el lugar de ocurrencia y las moléculas implicadas en este fenómeno han sido tema de estudio en numerosas especies animales.

En *Bufo arenarum*, el estado acrosomal sólo puede detectarse mediante microscopía electrónica. Por lo tanto, disponer de una técnica más accesible y que permita el estudio de un gran número de espermatozoides reviste fundamental importancia para elucidar este aspecto del proceso de fecundación.

Luego de producirse la reacción acrosómica se liberan y exponen numerosas proteasas y glicosidasas. La presencia de glicosidasas en espermatozoides de *Bufo arenarum* abre un campo de estudio sobre sus roles en la fecundación. Se ha informado que estas enzimas participan tanto en la interacción entre gametas como en la penetración através de las envolturas del ovocito en animales filogenéticamente muy distantes.

El objetivo del presente trabajo de Tesis abarca dos aspectos del conocimiento de los mecanismos involucrados en la reproducción en *Bufo arenarum*.

- El primero de ellos se refiere al desarrollo de técnicas de microscopía óptica alternativas a la microscopía electrónica para estudiar la reacción acrosómica.
- El segundo abarca la caracterización de las glicosidasas presentes en el acrosoma en

relación con sus posibles funciones biológicas, con especial énfasis en la N-Acetil Glucosaminidasa (desde aquí **NAcGlcasa**).

MCM

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

III MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se emplearon animales sexualmente maduros de la especie *Bufo arenarum* recolectados en zonas aledañas a la ciudades de Rosario y San Miguel de Tucumán. Los ejemplares se mantuvieron en la oscuridad a 15-17°C en un recipiente con humedad adecuada.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ESPERMATOZOIDES DE *BUFO ARENARUM*

2.1. ***Obtención de la suspensión de espermatozoides***

La suspensión de espermatozoides fue preparada por dislaceración testicular. Luego de extraer los testículos de un macho adulto de *Bufo arenarum* previamente sacrificado por desmedulación, se los dislaceró en una cápsula de Petri, en hielo, con una solución de Ringer con solución amortiguadora Tris-HCl 10mM pH 7,6 (**Ringer**). Se verificó la motilidad de los espermatozoides bajo microscopio diluyendo al décimo una alícuota de la suspensión con agua destilada. La suspensión original se filtró a través de varias capas de gasa para eliminar restos tisulares y se centrifugó a 130g durante 10 min a 4°C para descartar restos de tejidos, glóbulos rojos y demás células contaminantes. El sobrenadante

MLM

se centrifugó 10 min a 650g a 4°C. Los espermatozoides sedimentados se denominarán a partir de aquí "espermatozoides intactos".

La suspensión de "espermatozoides intactos" fue obtenida mediante resuspensión de dicho sedimento en Ringer hasta una concentración final de $1x10^6$ células/ml. La estructura del espermatozoide en esta solución no se modifica durante 4 hs de incubación a 0-4°C.

2.2. Obtención de espermatozoides reaccionados

La ruptura acrosomal fue inducida en sedimentos de "espermatozoides intactos" de tres formas diferentes:

2.2.1. Mediante resuspensión en un medio hipotónico, Ringer al 10% con solución amortiguadora Tris-HCl 10mM pH 7,6 (**Ringer 10%**) [97].

2.2.2. Con el agregado de una solución de ionóforo A23187 10 µM en Ringer.

2.2.3 Mediante liofilización y resuspensión en agua destilada [72].

2.3. Obtención del extracto total de espermatozoides

Los espermatozoides fueron reaccionados mediante liofilización y posterior resuspensión en agua con el agregado de Tritón X-100 hasta una concentración final de 0,2%, a fin de solubilizar proteínas de membrana. Esta suspensión se centrifugó 20 min a 45.000g y el sobrenadante, denominado ***extracto total de espermatozoides***, fue conservado a -20°C hasta su utilización.

3. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Luego de realizar el fraccionamiento subcelular se obtuvieron diferentes muestras que se esquematizan en la Fig 6. Brevemente, se indujo la reacción acrosómica a espermatozoides como se describe en 2.2.1. Luego de incubar en Ringer 10% durante 30 min, la suspensión fue centrifugada 10 min a 650g para separar el sedimento, conteniendo **espermatozoides reaccionados**, del sobrenadante enriquecido en **proteínas acrosomales solubles** y **vesículas acrosomales**

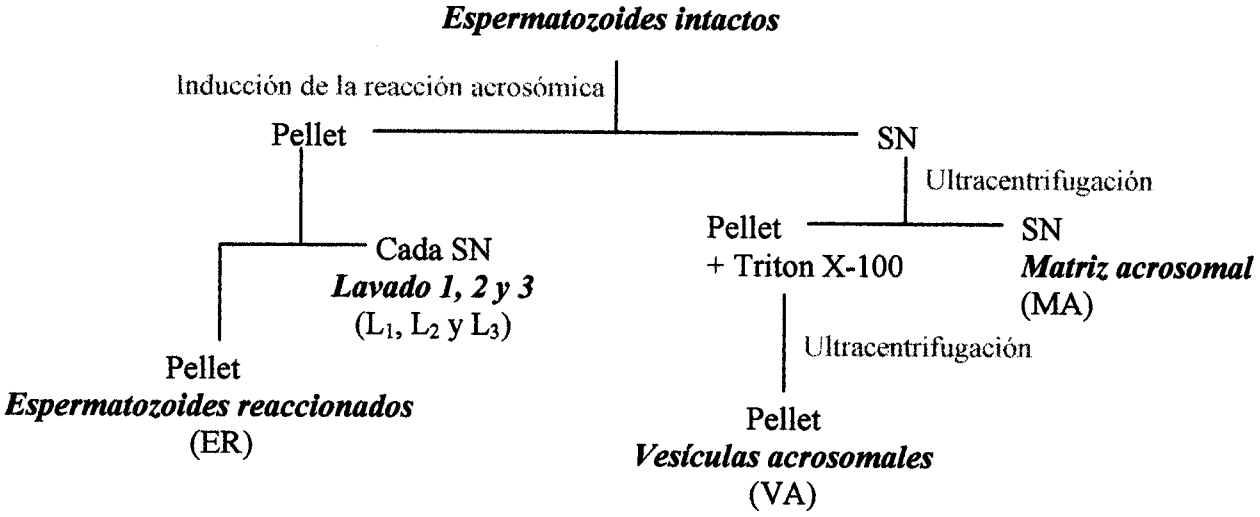

Fig. 6 ***Fraccionamiento subcelular***. Se indujo la reacción acrosómica a espermatozoides intactos mediante incubación en medio hipotónico. Luego de centrifugar se separó la fracción enriquecida en espermatozoides reaccionados de la MA y vesículas acrosomales. Esta última fracción se ultracentrifugó a fin de separar la matriz acrosomal de las vesículas acrosomales. La fracción de espermatozoides reaccionados fue lavada exhaustivamente y se guardó cada sobrenadante.

A continuación se describe el tratamiento realizado a las fracciones obtenidas.

3.1 Aislamiento de espermatozoides reaccionados

MLM

El sedimento de espermatozoides reaccionados, obtenidos como se describió en el ítem anterior, fue sometido a tres lavados consecutivos con Ringer 10% seguidos de centrifugaciones a 650g durante 10 min. Cada sobrenadante fue denominado como Lavado 1, 2 y 3 respectivamente. El último sedimento se incubó 30 min con NaCl 0,5M y EDTA 0,5 mM en Ringer 10% y posteriormente se centrifugó 10 min a 650g. El sobrenadante conteniendo proteínas extrínsecas fue rotulado como NaCl 0,5M. El sedimento resultante se trató con Tritón X-100 1% durante 30 min. Luego de centrifugar 10 min a 12.000g se separó en el sobrenadante la fracción de proteínas de espermatozoides reaccionados solubles en Tritón X-100 y en el sedimento las proteínas insolubles.

3.2. Aislamiento de matriz y vesículas acrosomales

El sobrenadante enriquecido en proteínas acrosomales solubles (desde ahora denominadas Matriz Acrosomal y abreviada MA) y vesículas acrosomales fue ultracentrifugado a 105.000g durante 1 h. La MA quedó en el sobrenadante resultante mientras que la fracción de membranas en el sedimento. Esta última fracción fue resuspendida y nuevamente ultracentrifugada en las mismas condiciones para descartar posibles proteínas solubles que hayan quedado en el sedimento. El sedimento resultante fue tratado 30 min con Tritón X-100 1% para extraer las proteínas de membrana de las vesículas. Luego de ultracentrifugar a 105.000g durante 1 h, se separó el sobrenadante que contenía las proteínas de vesículas acrosomales solubles en Tritón X-100.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col., usando albúmina de suero bovino como estándar [98].

5. PROCEDIMIENTOS DE TINCIÓN PARA EVALUAR REACCIÓN ACROSÓMICA

5.1. Tinción con azul de Coomassie

Alícuotas de 10 µl de las suspensiones de "espermatozoides intactos" y reaccionados (ver 2.1 y 2.2) se colocaron sobre portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina 0,005% [99]. Las muestras fueron incubadas con colorante azul de Coomassie al 0,05% en 40% de metanol durante 2 min y luego se lavaron exhaustivamente con Ringer. La observación de los preparados se realizó con microscopio Olympus BH2.

5.2 Tinción con lectinas marcadas fluorescentemente

Suspensiones de "espermatozoides intactos" y reaccionados (50 µl de cada una) obtenidas como se describen en 2.1 y 2.2 fueron fijadas con formaldehído al 2% en Ringer durante 10 min. Luego de colocarlas sobre portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina 0,005% [99] se realizaron lavados (dos de 5 min cada uno) con el mismo amortiguador. Las muestras fueron incubadas 30 min con soluciones de lectinas fluorescentes en Ringer

conteniendo $MgCl_2$ 1mM. El reactivo no unido fue descartado y se realizaron dos lavados con Ringer de 5 min cada uno. Las muestras se montaron con una solución de fenilendiamina 0,1% en PBS y glicerol 50% y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BH2.

5.3. Técnica de inmuno fluorescencia indirecta

Alícuotas de 10 µl de suspensiones de espermatozoides (ver 2.1 y 2.2) se colocaron sobre portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina 0,005% [99]. Las muestras se fijaron durante 20 min con formaldehído 3% en PBS y, posteriormente se lavaron con PBS (2 de 5 min cada uno). Algunas de estas muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 0,2% durante 4 min [100]. Luego se lavó 4 veces con PBS durante 4 min cada vez. Todas las preparaciones fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-MA diluido 1:100 en PBS durante 45 min seguido de lavados con PBS (3 de 5 min cada uno) [101]. Luego las muestras se incubaron 45 min con anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con FITC (Sigma) y diluidos en PBS 1:200 en el momento de usar. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada vez. Los preparados se montaron con una solución de fenilendiamina 0,1% en PBS y glicerol 50% y se examinaron con microscopio de epifluorescencia Olympus BH2.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda a 18-20°C.

6. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

MLM

6.1 Anticuerpos anti-MA

Las proteínas de la MA fueron inyectadas en un conejo para obtener anticuerpos. La solución del antígeno, que contenía 900μg de proteínas totales, se mezcló con igual volumen de adyuvante completo de Freund's [102]. La inyección subcutánea fue realizada una vez al mes y luego de la tercera estimulación se extrajo sangre al conejo. Se dejó coagular a 37°C y se separó el suero que se guardó a –20°C. El suero preinmune se obtuvo del mismo animal antes de la primera inyección de inmunización. El título de los anticuerpos se determinó por ensayos de dot blot utilizando 10 μg de proteínas de MA y BSA (10μg) como control. Se ensayaron distintas diluciones de los antisueros (1/200, 1/1.000, 1/2.000 y 1/10.000) y de suero preinmune. La reacción dio positiva hasta 1/10.000. Los controles con BSA y con suero preinmune fueron negativos.

6.2.Anticuerpos anti-NAcGlcasa

Se inyectó NAcGlcasa de poroto (Sigma) en conejo para obtener anticuerpos. La solución de antígeno, que contenía 90μg de proteína, se mezcló con igual volumen de adyuvante de Freund's. El conejo fue inyectado subcutáneamente en la semana 0 y 1, e intramuscularmente en la semana 3 y 4. Después de 5 días de la cuarta estimulación se extrajo sangre al conejo. Se dejó coagular a 37°C, se separó el suero y se conservó a –20°C. El suero preinmune se obtuvo del mismo animal antes de la primera inyección de inmunización. El título de los anticuerpos se determinó por ensayos de dot blot utilizando 6 μg de MA y 6 μg de BSA como control. Se ensayaron distintas diluciones de los

MLM

antisueros (1/500, 1/2.000, 1/5.000 y 1/10.000) y de suero preinmune. La reacción dio positiva hasta 1/5.000. Los controles con BSA y con suero preinmune fueron negativos.

7. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron de acuerdo al procedimiento descripto por Laemmli [103]. Se utilizaron geles verticales en placas de 80 mm de altura, 100 mm de ancho y 0,75 mm de espesor. El gel de concentración fue preparado con 5% de poliacrilamida y el gel de separación en gradientes lineales de acrilamida entre 6-12%. En algunos ensayos la concentración final de acrilamida del gel de separación fue constante (8 o 10 % acrilamida). Las muestras fueron disueltas en solución amortiguadora de siembra: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, suplementado con 2% SDS, 10% de β-mercaptoetanol 0,005% (P/V) de azul de bromofenol y 10% de glicerol. Previo a sembrarlas, las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento, en baño de agua hirviendo, durante 5 min.

Las electroforesis en condiciones nativas fueron realizadas de acuerdo al método desarrollado por Davis [104]. Para ello se utilizaron geles de concentración con 5% P/V acrilamida y geles de separación con 10% acrilamida. Las muestras se disolvieron en solución amortiguadora 60mM Tris-HCl pH 6,8 suplementado con 10% glicerol y 0,005% (P/V) azul de bromofenol.

Las electroforesis se realizaron a 15 mA a 4°C.

7.1 Detección de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez finalizadas las electroforesis, los geles se fijaron en una solución de etanol-ácido acético-agua (40 :10 :50). Las proteínas fueron detectadas en los geles por tinción con 0,2% Azul de Coomassie R 250 en etanol-ácido acético-agua (40 :10 :50) durante 3 horas y posterior decoloración con etanol-ácido acético-agua (40 :10 :50). Alternativamente se usaron, para tinciones con mayor sensibilidad, un kit de plata (Sigma) o la tinción de PAS-plata [105].

8. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Una vez terminada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se lavó brevemente en solución amortiguadora de transferencia (20% metanol, glicina 0,15 M, Tris-HCl 25 mM pH 8,3), [106]. A continuación se preparó el siguiente sistema constituido, en el orden indicado, por:

- superficie porosa
- papel Whatman 3MM
- gel a electrotransferir
- membrana de nitrocelulosa (0,2 μm, Sigma)
- papel de filtro Whatman 3MM
- superficie porosa

MLM

Todos estos componentes estaban embebidos en la solución amortiguadora de transferencia y el sistema armado se colocó en la cuba de transferencia (BioRad, Trans-blot) que contenía el mismo amortiguador. La corrida se llevó a cabo a 30 mA durante toda la noche a 4°C.

Las membranas con las proteínas transferidas fueron lavadas en agua destilada, secadas al aire y guardadas entre papeles de filtro hasta su posterior utilización.

9. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

9. 1. Revelado con anti-IgG-peroxidasa (inmunodetección)

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue hidratada en PBS durante 10 min y se lavó con una solución de saturación (leche descremada 5% (P/V), azida sódica 0,02% en PBS) a temperatura ambiente durante 1 h con agitación [107]. La membrana fue incubada durante 2 hs en solución de saturación con el agregado del anticuerpo y lavada con solución de saturación durante una hora (4 lavados de 15 min cada uno). Luego se incubó con inmunoglobulinas anti-IgG total de conejo, conjugadas con peroxidasa (dilución 1:1.500, Sigma) disueltas en la misma solución durante de 1 hora. Se realizaron cuatro nuevos lavados (15 min cada uno) con la misma solución de saturación y un lavado de 1min con PBS. Finalmente, el revelado se llevó a cabo por incubación durante 15-20 min con 20 ml con una solución de sustrato insoluble de peroxidasa en las siguientes proporciones: Tris-HCl 100 mM pH 7,2 conteniendo 2 mg de

3,3-diaminobenzidina (DAB) y 7,5 µl de peróxido de hidrógeno de 30 vol. El desarrollo del color se detuvo por lavado de la membrana con agua destilada.

9.2. Revelado con lectinas conjugadas con peroxidasa (lectin-blot)

Para saturar los sitios inespecíficos en la membrana de nitrocelulosa, las mismas fueron incubadas en una solución de polivinilpirrolidona al 2,5% en PBS. El revelado se realizó usando lectinas PNA, WGA y ConA unidas a peroxidasa (HRP). En los ensayos de unión con PNA-HRP o ConA, se utilizaron concentraciones de las lectinas 6,25 µg/ml preparadas en PBS pH 6,8 conteniendo $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y Tritón X-100 0,5% (V/V). WGA-HRP se preparó en el mismo medio y concentración excepto que el pH se ajustó a 7,2. ConA se conjugó con HRP luego de la incubación de la lectina con la membrana. En este caso, la misma fue incubada con 50 µg/ml HRP en PBS durante 2 hs y lavada con PBS (4 lavados de 15 min cada uno).

Los complejos glicoproteína-lectina-HRP se revelaron con DAB como se describió para la inmunodetección (9.1). Los experimentos de control se realizaron en presencia de azúcares inhibidores (100 mM β-D-galactosa para PNA, 250 mM N-Acetil Glucosamina y 12 mM ácido N-Acetil Neuramínico para WGA, y 100 mM metil α-D-manopiranósido para Con A). Cada azúcar fue incorporado al amortiguador conteniendo la lectina y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, previo al ensayo de unión a las glicoproteínas.

10. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOSIDASAS

10.1. Medición espectrofotométrica de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de las glicosidasas β–D-Galactosidasa, β-D-Glucosidasa, α-D-Glucosidasa, α-D-Manosidasa, N-Acetil β-D-Galactosaminidasa, NAcGlcasa y α-L-Fucosidasa, fueron medidas usando como sustrato los *p*-nitrofenil glucósidos correspondientes a cada una. El medio de reacción contenía una concentración final de azúcar 3mM y solución amortiguadora citrato 10 mM pH 3,6 o el amortiguador especificado. La reacción fue iniciada mediante el agregado de la enzima. Luego de incubar la mezcla 30 min a 30°C se detuvo la reacción mediante el agregado de solución amortiguadora glicina 0,2 M pH 10,4. El *p*-nitrofenol liberado se determinó espectrofotográficamente a 400 nm.

Se definió una unidad (U) como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de *p*-nitrofenol por hora en las condiciones especificadas.

Requerimientos catiónicos: para el estudio de posibles requerimientos catiónicos de la actividad enzimática, la enzima fue preincubada durante 10 min con EGTA (2mM) o con los iones Ba^{2+}, Mg^{2+},Ca^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+} (0,2 mM de cada uno). Luego la medición de la actividad enzimática se llevó a cabo como se describió recientemente.

Efecto de la temperatura: para la medición de la actividad enzimática en función de la temperatura, se dejó tomar temperatura de reacción a la solución amortiguadora y al sustrato antes del agregado de la enzima. La actividad enzimática fue determinada como se describió anteriormente a las temperaturas 0, 4, 20, 30, 50, 60, 80 y 100°C. Se realizó además, un blanco sin enzima para cada muestra.

10.2. Medición de la actividad enzimática en gel

La actividad de NAcGlcasa fue también determinada en geles de poliacrilamida con el sustrato fluorescente 4-metil-umbelilferil NAcGlc (4MU-NAcGlc). Luego de la corrida electroforética, se incubó el gel en solución amortiguadora citrato 400 mM pH 3,6 durante 15 min. Se descartó el amortiguador y se adicionó una solución conteniendo 4MU-NAcGlc 5 mM en solución amortiguadora citrato 100 mM pH 3,6. La banda fluorescente se visualizó en transiluminador a 360 nm.

11. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON UNA MATRIZ DE EV-SEPHAROSE

11.1. Inducción de la ovulación y obtención de ovocitos de ovisaco

La ovulación de hembras adultas de *Bufo arenarum* climatizadas a 18-20°C fue inducida mediante la inyección de una suspensión de hipófisis homóloga en el saco linfático dorsal. Los animales se sacrificaron por destrucción medular, entre 12 y 14 hs de iniciado el tratamiento, y se recogieron de ovisaco los cordones gelatinosos conteniendo a los ovocitos. Las tiras de ovocitos, previamente hidratadas en agua destilada, fueron incubadas en una solución de tioglicolato de sodio al 1% (V/V) pH 8,0. Este tratamiento disuelve la gelatina que rodea a los ovocitos en aproximadamente 3-5 minutos. Pasado este tiempo, los ovocitos se lavaron exhaustivamente con Ringer sin Ca^{2+} para evitar la activación de los mismos.

11.2. Obtención de EV

Los ovocitos, se homogeneizaron en Potter-Blumm con solución Ringer sin Ca^{2+}. Las EV fueron obtenidas por filtración del homogenado a través de una malla metálica de doble hoja de 30μ y lavadas numerosas veces con Ringer sin Ca^{2+}. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Las envolturas vitelinas en Ringer 10% fueron solubilizadas en un baño de agua a 60°C durante 10 min [75]. La suspensión resultante se centrifugó a 3.000g y el sobrenadante se dializó toda la noche contra solución amortiguadora $NaHCO_3$ 0,1 M pH 8,3 suplementado con NaCl 0,5 M.

11.3 Preparación de la matriz de afinidad

Para la preparación de la matriz se utilizó Sepharose 4B activada con BrCN. Para ello 1 g de gel seco fue hidratado y lavado varias veces con HCl 1 mM hasta un volumen total de 200 ml. El HCl preserva la actividad de los grupos reactivos que se hidrolizan a pH altos. Luego se lavó el gel con solución amortiguadora de unión: $NaHCO_3$ 0,1 M pH 8,3 suplementado con NaCl 0,5 M. Inmediatamente se agregó 1 ml de la solución que contenía las envolturas vitelinas (5 mg/ml) preparadas como se describe en el ítem anterior. La incubación se realizó durante 2 hs a 20°C con agitación y transcurrido este lapso se bloquearon los grupos no reactivos con glicina 0,2 M pH 8,0 durante dos horas. Se dejó sedimentar la matriz y luego de descartar el ligando no unido se realizaron 5 ciclos de lavados con solución amortiguadora de unión alternando con solución amortiguadora acetato 0,1 M pH 4,0. La columna EV-Sepharose fue conservada a 4°C.

11.4 Corrida cromatográfica

La columna de EV-Sepharose (2,5 ml de volumen de lecho) fue equilibrada con 10 volúmenes de Ringer 10% pH 7,2. Luego de sembrar el extracto total de espermatozoides, conteniendo 1 mg de proteínas totales, se recogió la fracción que no quedó retenida en la columna y se la lavó con 20 volúmenes del mismo amortiguador. Las proteínas retenidas fueron eluídas con un gradiente discontinuo de NaCl 0,5M, 0,9M, 1,5M y 2M. Las fracciones recolectadas (0,5ml cada una) fueron dializadas y en cada una se determinó concentración de proteínas y actividad de las distintas glicosidasas.

12. FRACCIONAMIENTO CON $(NH_4)_2SO_4$

Se realizaron precipitaciones secuenciales adicionando concentraciones crecientes de $(NH_4)_2SO_4$ a cada sobrenadante obtenido luego de realizar el procedimiento que se detalla a continuación. Se adicionó al extracto total de espermatozoides (1 mg/ml de proteínas totales) $(NH_4)_2SO_4$ hasta alcanzar una concentración final de 20% P/V. Se trabajó siempre con agitación y a 4°C. Una vez disuelta la droga agregada se incubó durante 10 min más para lograr un equilibrio completo entre proteínas agregadas y disueltas. Se centrifugó la mezcla a 4°C, 10 min a 10.000g y luego de medir el volumen del sobrenadante se calculó la cantidad de la sal requerida para el segundo corte a 30% P/V. Se procedió de igual manera con los sobrenadantes obtenidos secuencialmente para lograr concentraciones finales de $(NH_4)_2SO_4$ al 50%, 60% y 80% P/V.

MLM

Cada uno de los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en 0,5 ml de agua y dializados toda la noche contra Ringer 10% a 4°C.

13. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN HPLC

Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico con una matriz de dietilaminoetil (DEAE) al extracto total de espermatozoides. Aproximadamente 300µl de muestra conteniendo 1,5 mg de proteína se sembraron en una columna de Bio-Gel DEAE (Bio-Rad) equilibrada previamente en solución amortiguadora de equilibrio (citrato 10mM pH 5,6) y a un flujo de 1,5 ml/min. Luego se lavó la columna con 15 ml de solución amortiguadora de equilibrio y el material retenido se eluyó con un gradiente lineal desde 0,1 hasta 1,0 M de NaCl. Una vez finalizado el gradiente lineal, se eluyó con solución amortiguadora de equilibrio suplementado con 1,5 M NaCl y 2,0 M NaCl respectivamente. La elución fue monitoreada midiendo la absorbancia a 280 nm. Las fracciones recolectadas, de 1,5 ml cada una, se dializaron y se concentraron por liofilización. La concentración de proteínas y la actividad de NAcGlcasa fue determinada en cada una de las fracciones.

14. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE P-AMINOBENZIL-1-TIO-B-D-GALACTOPIRANÓSIDO-AGAROSA

MLM

El extracto total de espermatozoides fue sembrado en una columna de *p*-aminobenzil-1-tio-β-D-Galactopiranósido-agarosa (6 ml de matriz) equilibrada, previamente, en solución amortiguadora fosfato 50mM pH 6,0. Posteriormente, la columna fue lavada con 10 volúmenes de la misma solución amortiguadora. El material retenido se eluyó con borato de sodio 10 mM pH 10,0 [108] y se recolectaron fracciones de 1,0 ml. Toda la corrida cromatográfica fue realizada con un flujo de 0,4 ml/min. Alícuotas de las fracciones obtenidas en el lavado y en las eluciones se utilizaron para determinar concentración de proteínas. Al resto de cada una se le adicionó 50 µl de solución amortiguadora citrato 1M pH 3,6 y se midió actividad de las distintas glicosidasas.

15. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE ConA-SEPHAROSE

El extracto total de espermatozoides fue sembrado en una columna de ConA-Sepharose. El mismo procedimiento cromatográfico fue utilizado como un paso durante la purificación de la enzima NAcGlcasa. En ambos casos la cromatografía se realizó en idénticas condiciones.

La columna fue previamente equilibrada con solución amortiguadora ConA (acetato 10 mM pH 6,0 suplementado con $CaCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y NaCl 0,1M). La corrida cromatográfica se realizó a una velocidad de flujo de 0,1 ml/min. Se recogió el material no retenido y se lavó la columna con 10 volúmenes de solución amortiguadora ConA. La elución del material unido se realizó con metilmanosa 0,5M en solución amortiguadora ConA y se recolectaron fracciones de 1,5 ml cada una.

MLM

16. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA DE PHENYL SEPHAROSE

El extracto total de espermatozoides fue previamente precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ 1 M y centrifugado 10 min a 10.000g. El sobrenadante se sembró en una columna de interacción hidrofóbica de Phenyl Sepharose. La columna equilibrada con $(NH_4)_2SO_4$ 1 M en Ringer 10%, se lavó con un gradiente escalonado de $(NH_4)_2SO_4$ 1 M, 0,5 M en Ringer 10% (1 volumen de cada solución) y finalmente con 10 volúmenes de amortiguador A ($(NH_4)_2SO_4$ 50 mM en Ringer 10%) El material retenido se eluyó con etilenglicol 20, 40, 60 y 70% en amortiguador A (1 vol de cada solución). Se midió la concentración de proteínas y la actividad enzimática de la NAcGlcasa en las distintas fracciones recolectadas.

17. PURIFICACIÓN DE NAcGlcasa

17.1. Purificación parcial de NAcGlcasa de espermatozoides

El extracto total de espermatozoides (5 mg/ ml) precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ 1 M se sembró en una columna de interacción hidrofóbica de Phenyl Sepharose (20 ml de matriz). La actividad NAcGlcasa se detectó en las fracciones eluídas con etilenglicol al 40 y 60% que fueron dializadas, concentradas por liofilización y sembradas en una columna de ConA-Sepharose. La elución del material retenido se realizó con una solución de

metilmanosa suplementada con NaCl 0,5 M. Las fracciones del lavado y las eluídas con azúcar fueron dializadas y concentradas. En alícuotas de las distintas fracciones se ensayó la actividad de NAcGlcasa. Las fracciones con actividad de los pasos de purificación se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes.

17.2. Purificación a homogeneidad de NAcGlcasa de homogenado de hígado

La purificación a homogeneidad de la glicosidasa se realizó a partir de homogenado de hígados, extraídos de sapos macho, exhaustivamente lavados con solución Riger a 4°C. La homogenización de cinco hígados se realizó en Omnimixer con solución Ringer suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales: pepstatina 1μg/ml, leupeptina 1μg/ml, aprotinina 1μg/ml, PMSF 1mM y EDTA 5mM. El homogenado fue filtrado por varias capas de gasa, centrifugado 1 hora a 45.000g y el sobrenadante se sembró en un gel nativo de poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis se detectó la actividad en el gel con el sustrato 4-MU-NacGlc como se describió en 10.2. La banda fluorescente fue cortada e incubada toda la noche en solución amortiguadora citrato 400 mM pH 3,6 para permitir que la enzima difunda a la solución. Luego se centrifugó la muestra a 5.000g y el sobrenadante se dializó y concentró por liofilización. Finalmente esta muestra fue sembrada en una columna de afinidad de Con A-Sepharose. Las fracciones con actividad NAcGlcasa se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes.

18. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN HPLC

MLM

La enzima parcialmente purificada de espermatozoides fue dializada contra solución amortiguadora fosfato 0,2 M pH 7,0 conteniendo Tritón X-100 al 0,1% y sembrada en una columna de exclusión molecular BioSil Sec. La columna fue previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora a una velocidad de 1 ml/min durante 2 hs. Durante la corrida cromatográfica, la velocidad de flujo fue 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Alícuotas de 100µl de cada fracción fueron utilizadas para determinar la concentración de proteínas, al resto se le adicionó ácido cítrico 1 M hasta llegar a un pH 4,0 y se midió la actividad de NAcGlcasa. La masa molecular de la enzima fue determinada usando como marcadores las proteínas: tiroglobulina (669 kDa), gamaglobulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina bovina (17 kDa) y cianocobalamina (1,37 kDa).

19.ENSAYOS BIOLÓGICOS

19. 1. Obtención de espermatozoides y ovocitos

La suspensión de espermatozoides fue preparada por dislaceración testicular: se extrajeron los testículos de un macho adulto de *Bufo arenarum* previamente sacrificado por desmedulación y se los dislaceró en una cápsula de Petri, en hielo, con una solución de Ringer 10%. Se verificó la motilidad de los espermatozoides bajo microscopio en una alícuota. La suspensión original fue filtrada a través de varias capas de gasa para eliminar

MLM

restos tisulares y se diluyó la suspensión hasta una concentración final de $1x10^6$ células/ml.

Los ovocitos se obtuvieron como se detalla en 11.1.

19. 2. Obtención de factores solubles de la cubierta gelatinosa (difundido total)

Las tiras de ovocitos obtenidas de ovisaco se incubaron tres veces, durante 20 minutos cada vez, con Ringer 10%, con agitación ocasional a 20-22°C [109]. El volumen de solución usada fue el mismo que el peso en gramos de las tiras de ovocitos. Las fracciones conteniendo los factores que difundieron a la solución se guardaron juntas (**difundido total**) a –20°C.

19. 3. Fecundación in vitro

Los ensayos de fecundación fueron realizados en lotes con 45-55 ovocitos, 250µl de difundido total y 25 µl de la suspensión de espermatozoides obtenidos como se describe en 19.1. En distintos lotes, conteniendo lo recién descripto, se realizaron los siguientes tratamientos:

- ✓ El control se realizó agregando Ringer 10%.
- ✓ Se agregó NAcGlc, o NAcGal, o Manosa para obtener una concentración final de 0,1 M de cada uno.
- ✓ Se agregó anticuerpos anti-NAcGlcasa o suero preinmune con una dilución 1:100 en Ringer 10%

MLM

- ✓ Se trataron los ovocitos, antes del agregado de la suspensión de espermatozoides, con 10 µl de NAcGlcasa (0,012 mg/ml) en 250µl de Ringer 10% .

El volumen final en cada caso fue 500 µl.

Luego de 25 minutos se lavaron las distintas muestras con Ringer 10% y al cabo de 4 hs se contaron la cantidad de ovocitos fecundados.

CAPITULO IV

LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum*

IV. LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum arenarum*

1. INTRODUCCIÓN

El acrosoma es una vesícula secretoria presente en la cabeza del espermatozoide; contiene enzimas hidrolíticas que son liberadas por exocitosis durante la reacción acrosómica [110-113]. Este proceso implica la vesiculización progresiva de la membrana externa acrosomal con la membrana plasmática [34;114;115]. El acrosoma varía mucho en forma y tamaño de una especie a otra, pero todas tienen una misma estructura básica: una membrana interna acrosomal y una externa acrosomal. La membrana interna acrosomal linda con la envoltura nuclear y se continúa con la externa acrosomal que está por debajo de la cara interna de la membrana plasmática. La reacción acrosómica normalmente ocurre en la superficie del ovocito y es específicamente inducida por algún componente de éste. Sin embargo, es posible que el espermatozoide sufra una verdadera reacción acrosómica provocada artificialmente por ionóforos de calcio, o por incubación en un medio hipotónico.

El conocimiento del fenómeno que ocurre durante la reacción acrosómica es importante para comprender la fecundación normal y la causa de alguno de sus defectos. Un parámetro importante de la función espermática es la evaluación de la reacción

acrosómica de una dada muestra dado que sólo el espermatozoide que sufre la reacción acrosómica puede fecundar al ovocito.

Se han propuesto muchos métodos para caracterizar el estado acrosomal (revisto en [116;93]). En especies con acrosomas de gran tamaño, como cobayo [93], *Leptodactylus chaquensis* [97] y hamster [117], los cambios en el acrosoma del espermatozoide vivo pueden ser visualizados directamente por microscopía óptica. Sin embargo, en muchas otras especies el acrosoma es más pequeño y no es posible la observación microscópica directa. En estos casos es necesario fijar y teñir al espermatozoide antes de la visualización. Numerosos colorantes se han utilizado para detectar la reacción acrosómica. La coloración con Naftol y Eritrosina ha sido utilizada en espermatozoides de conejo [118]. En algunas especies la tinción con Fast Green y Eosina [119] y en otras con Marrón de Bismark, Rosa de Bengala y Azul de Tripan [120] han dado buenos resultados en la evaluación del estado acrosomal. Lectinas marcadas fluorescentemente han sido ampliamente utilizadas para detectar glicoconjugados de la MA y de la membrana interna acrosomal en numerosos trabajos [121-123]. Otra técnica, desarrollada originalmente para ratón, usa el antibiótico clortetraciclina, que tiñe al espermatozoide en forma diferente dependiendo del estado de éste.

Durante la fecundación en *Bufo arenarum*, el espermatozoide debe atravesar la cubierta gelatinosa y la EV antes de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. La determinación del sitio donde ocurre la reacción acrosómica y las moléculas implicadas en este evento requieren del estudio del estado acrosomal del espermatozoide. En esta especie el acrosoma es más pequeño que en la mayoría de los espermatozoides de

Mamíferos y la reacción acrosómica sólo había podido ser detectada mediante microscopía electrónica [124;115].

En este trabajo se propone un método más rápido y accesible para estimar el estado acrosomal de una mayor cantidad de espermatozoides en comparación con la técnica disponible hasta el momento. Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos contra la MA, se pudo visualizar una fuerte tinción del acrosoma. Estos resultados fueron comparados con otros métodos de tinción utilizando la microscopía óptica y de fluorescencia.

MLM

2. RESULTADOS

2.1. DETECCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA MEDIANTE TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

La morfología de los espermatozoides varía mucho de una especie a otra. En los espermatozoides de *Bufo arenarum* la cabeza es alargada y la cola está constituída por dos filamentos como se observa en la Fig 7.

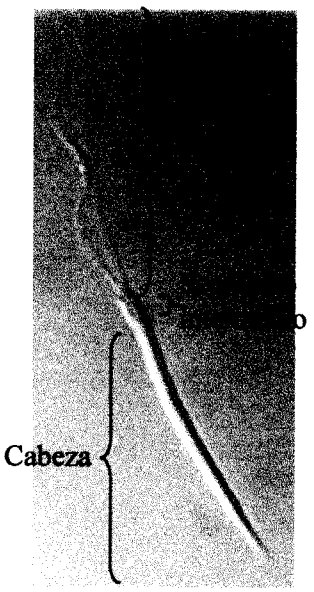

Fig. 7. ***Espermatozoide de Bufo arenarum.*** La micrografía muestra distintas estructuras del espermatozoide: la cabeza, cola y segmento intermedio. Contraste interferencial Nomarski (X1500).

En esta especie el acrosoma es muy pequeño y hasta el momento los mismos sólo podían visualizarse utilizando técnicas de microscopía electrónica. Sin embargo, debido a la dificultad de analizar una población grande de espermatozoides mediante esta técnica, se decidió desarrollar un método alternativo para la observación del estado acrosomal.

MLM

Para ello fueron utilizadas diferentes técnicas de microscopía óptica. En este trabajo se presentan aquellos métodos que han aportado datos sobre la estructura acrosomal.

2.1.1. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE

Alícuotas de la suspensión de "espermatozoides intactos" y reaccionados fueron incubados con solución de azul de Coomassie en metanol. Este solvente permeabiliza las membranas del espermatozoide permitiendo el acceso del colorante a estructuras celulares internas. El método permitió observar, mediante microscopía óptica, algunos cambios morfológicos. Sin embargo, es difícil distinguir entre "espermatozoides intactos" de los que han sufrido la reacción acrosómica dado que en ambos casos la punta de la cabeza se tiñó de azul más intenso que el resto. Los "espermatozoides intactos" se tiñeron fuertemente como se observa en la Fig 8.

En el 20-30% de los espermatozoides reaccionados por adición de ionóforo o de un medio hipotónico, se observó un filamento en la parte anterior de la cabeza que probablemente corresponda al *perforatorium*, detectado previamente por microscopía electrónica [115]. La misma estructura fue visualizada en algunos espermatozoides a los que se indujo la reacción acrosómica mediante liofilización y posterior resuspensión en un medio hipotónico.

La tinción con Coomassie también permitió observar que la liofilización y resuspensión de los espermatozoides no destruye la cabeza de los mismos.

MLM

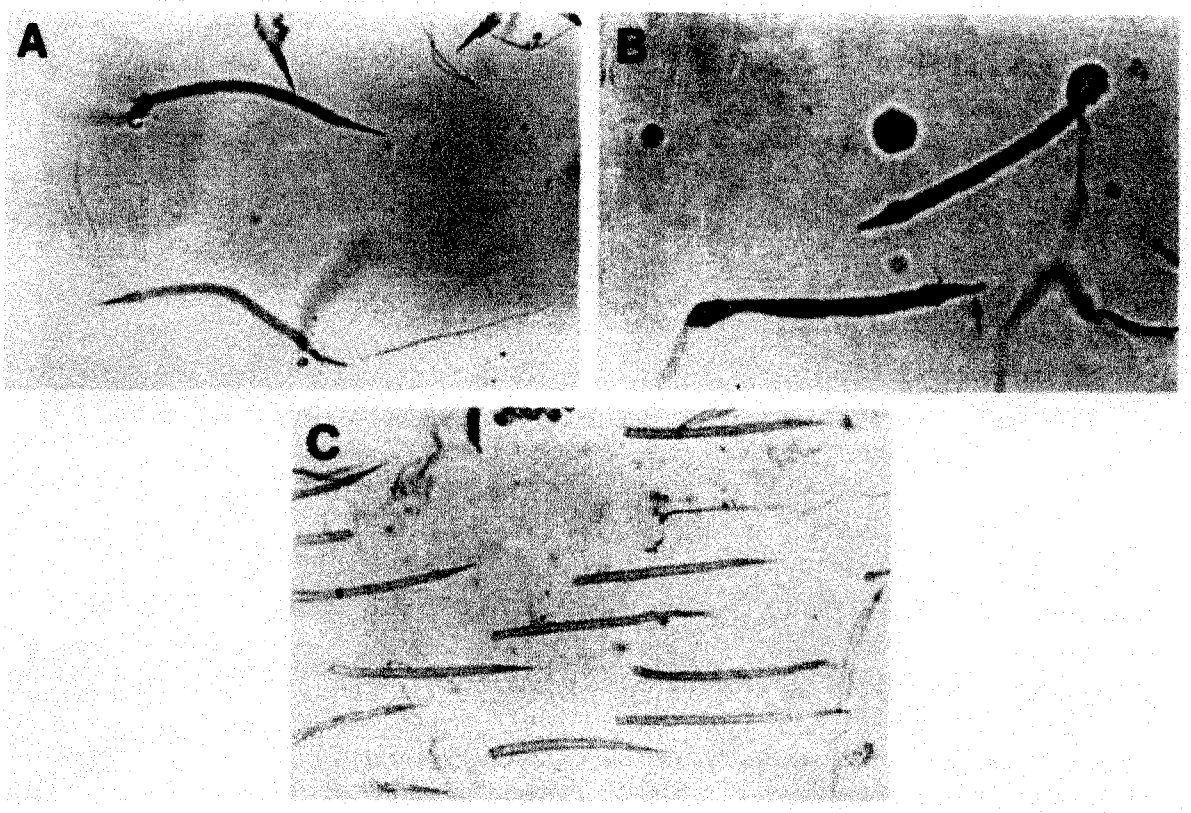

Fig. 8 ***Tinción con Azul de Coomassie.*** Los espermatozoides de *Bufo arenarum* fueron fijados y teñidos con azul de Coomassie como se describe en Materiales y Métodos. Las microfotografías corresponden a: (A) Espermatozoides intactos (X 1000). (B) Espermatozoides a los que se indujo la reacción acrosómica mediante incubación en medio hipotónico. La flecha muestra el *perforatorium* (X 1500). (C) Espermatozoides reaccionados mediante liofilización y posterior resuspensión en solución hipotónica (X 1000).

2.1.2. TINCIÓN CON LECTINAS

Las lectinas marcadas fluorescentemente han sido ampliamente utilizadas para detectar el estado acrosomal en diferentes especies.

Suspensiones de "espermatozoides intactos" o reaccionados fueron incubadas con diferentes lectinas marcadas con FITC (Tabla 3).

MLM

Lectina	Abreviatura	Especificidad
Arachis hypogaea	PNA	β-D-Gal (1,3)-D-NAcGal
Abrus precatorius	APA	β-D-Gal
Canavalia ensiformis	Con A	α-D-Man
Dolichos biflorus	DBA	NAcGal (en oligosacáridos O-unidos)
Glycine max	SBA	β-D-Gal, NAcGal
Pisum sativum	PSA	α-D-Man
Ricinus comunis	RCA	NAcGal; β-D-Gal
Tetragonolobus purpurea	Asp	α-L-Fucose
Triticum vulgaris	WGA	$(NAcGlc)_2$; NAcNeu (en oligosacáridos N-unidos)

Tabla 3: ***Lectinas utilizadas y sus respectivos azúcares específicos***. Gal: galactosa; Glc: glucosa; Man: manosa; NAcGal: N-acetilgalactosamina; NAcGlc: N-acetilglucosamina; NAc Neu Nac: ácido N-acetilneuraminico.

La lectina SBA se unió sólo al espermatozoide reaccionado pero la fluorescencia es muy débil y no pudo registrarse fotográficamente. Cuando las incubaciones se realizaron con las lectinas ConA, WGA y Asp, se observó fluorescencia en todos los espermatozoides es decir tanto en los intactos como en los que habían reaccionado (Tabla 4). Sin embargo, en los espermatozoides tratados con ConA o WGA la marca se observó en toda la cabeza mientras que en los tratados con Asp la marca se detectó principalmente en la punta. Por otro lado, con las lectinas PSA, *Ricinus comunis* y *Abrus precatorius* no se detectó fluorescencia asociada al espermatozoide. Los distintos patrones de tinción

MLM

observados al tratar los espermatozoides con las 8 lectinas mencionadas mostraron que existe una diferente distribución de los residuos glicosídicos expuestos asociados a la cabeza del espermatozoide. Es decir, los restos manosa y NAcGlc se detectaron en toda la cabeza del espermatozoide mientras que los restos Gal y fucosa sólo estarían asociados a la punta.

FITC-Lectina	Intactos	Reaccionados (Medio hipotónico)	Reaccionados (Ionóforo)
PNA	+	−	−
SBA	−	±	±
WGA	$+^{3}$	$+^{3}$	$+^{3}$
Asp	±	±	±
ConA	$+^{3}$	$+^{3}$	$+^{3}$
PSA	−	−	−
RCA	−	±	±
APA	−	−	−
DBA	−	−	−

Tabla 4. ***Tinción de espermatozoides con FITC-lectinas***. Los espermatozoides en condiciones que mantienen su integridad y permeabilizados (***intactos***), reaccionados mediante incubación en un medio hipotónico (***reaccionados, medio hipotónico***) o reaccionados por incubación con Ionóforo de Ca^{2+} (***reaccionados, ionóforo***) fueron incubados con cada una de las lectinas que aparecen en la tabla. Los datos representan la intensidad relativa de fluorescencia detectada en el espermatozoide y se expresan como (−) cuando no se detecta fluorescencia, (±) cuando la fluorescencia es débil y (+) cuando la fluorescencia es intensa. ^{3} significa que la fluorescencia se encontró asociada a toda la cabeza y no sólo en la punta.

En el 10-20% de "espermatozoides intactos" incubados con FITC-PNA se observó la punta de la cabeza fluorescente. Cuando estos espermatozoides fueron permeabilizados con Triton X-100 y posteriormente incubados con la lectina, el 80% mostró fluorescencia en la zona acrosomal (Fig 9A). Mientras que no se observó dicha tinción fluorescente en espermatozoides a los que se les indujo la reacción acrosómica (Fig 9B).

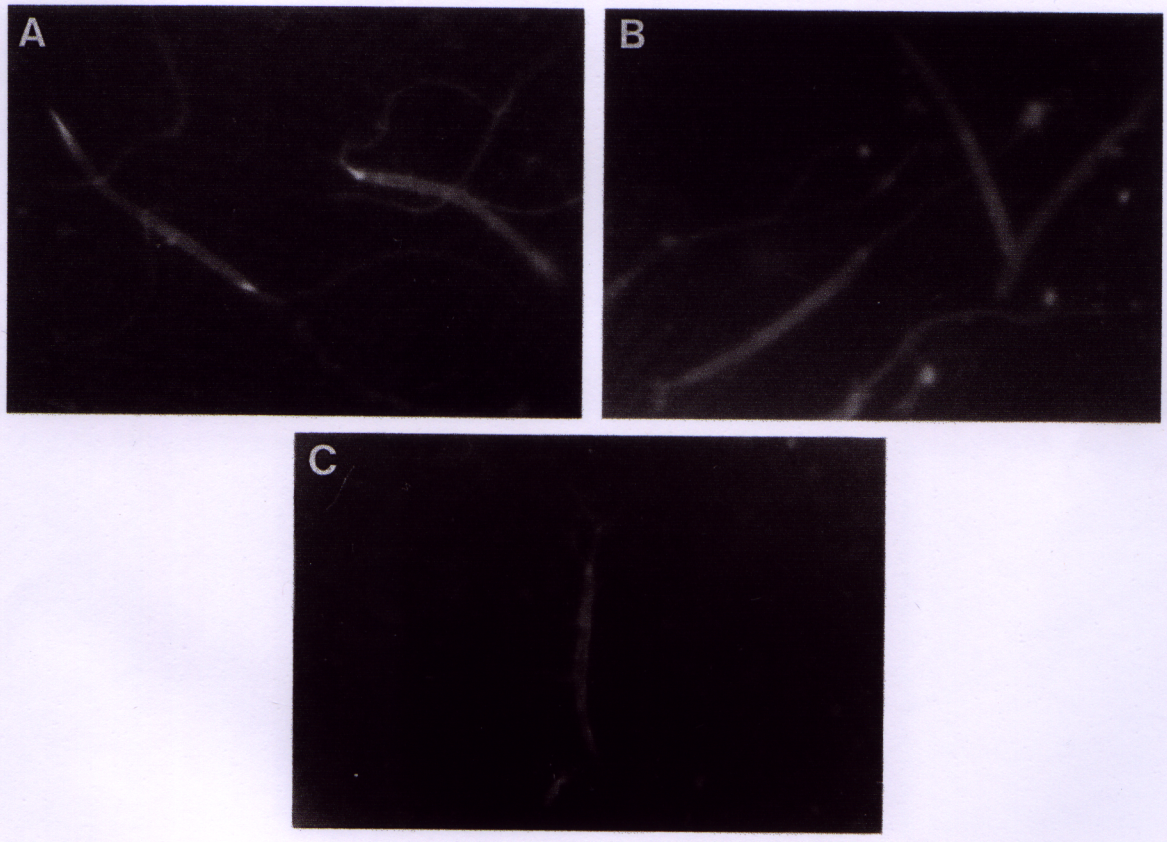

Fig 9. ***Tinción con FITC-PNA***. La suspensión de espermatozoides fue incubada durante 30 min con la lectina PNA como se describe en Materiales y Métodos. (A) Espermatozoides intactos permeabilizados. La región anterior de la cabeza presenta marca fluorescente (X 1500). (B) Espermatozoides reaccionados por shock osmótico (X1500). No se observa la marcación fluorescente en la punta de la cabeza. (C) Espermatozoides intactos permeabilizados tratados con FITC-PNA previamente incubada con galactosa (X1500).

MLM

Esto indicaría que PNA reconoce restos galactosa en la MA, pero dado que la lectina no atraviesa la membrana plasmática, la técnica diferencia a los "espermatozoides intactos" de los que han sufrido la reacción acrosómica sólo si previamente se permeabilizan los espermatozoides.

Sin embargo, en todos los casos la fluorescencia observada se pierde rápidamente lo que dificulta el análisis del estado acrosomal en un número significativo de espermatozoides. Otra desventaja de la utilización de esta lectina fue observada en los estudios realizados con espermatozoides obtenidos durante la época estival, ya que no se observaron resultados reproducibles en los patrones de tinción en los "espermatozoides intactos" o reaccionados.

Ensayo de unión de PNA a glicoproteínas del espermatozoide

Se ensayó la unión de PNA a distintas fracciones subcelulares del espermatozoide mediante análisis de lectinblot con la lectina unida covalentemente a una peroxidasa. Para ello, luego de inducir la reacción acrosómica en los "espermatozoides intactos", se separaron tres fracciones: una enriquecida en contenido acrosomal, otra en membranas acrosomales y la tercera en espermatozoides reaccionados. Cuando las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con PNA marcada con peroxidasa sólo se detectaron bandas en la muestra que correspondía a la MA (Fig 10).

MLM

Estos resultados corroboran las observaciones por microscopía óptica donde sólo los "espermatozoides intactos" muestran marca fluorescente en la zona acrosomal cuando se permeabilizan e incuban con FITC-PNA.

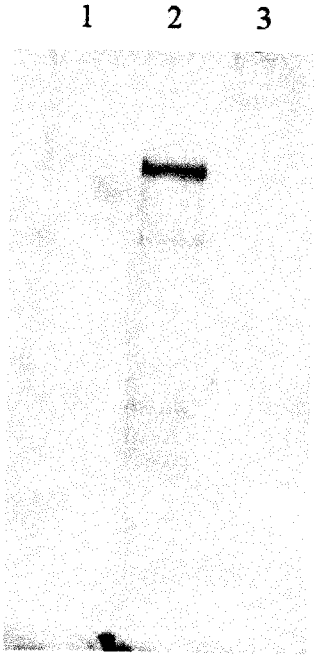

Fig 10 ***Ensayo de unión de PNA a fracciones subcelulares del espermatozoide.*** Proteínas de diferentes fracciones subcelulares (20µg de proteínas totales en cada caso) fueron separadas mediante SDS-PAGE (7-12% de acrilamida) y luego electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se revelaron con la lectina PNA marcada con peroxidasa. En la calle 1 se sembró vesículas acrosomales; en la 2, MA y en la 3, espermatozoides reaccionados.

2.1.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Especificidad de los anticuerpos anti-MA

Se prepararon anticuerpos policlonales contra la MA. Para la obtención de la muestra, se indujo la reacción acrosómica de espermatozoides mediante liofilización y resuspensión de los mismos en un medio hipotónico. La MA fue obtenida como se describe en Materiales y Métodos.

La especificidad de los anticuerpos se analizó por inmunodetección. Se sembraron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes fracciones correspondientes a espermatozoides, MA, EV, EV incubada con MA durante 30 min y el sobrenadante del

MLM

primer y tercer lavado luego de la mencionada incubación. De cada una de las fracciones se sembró igual cantidad de proteínas totales a excepción de la fracción que corresponde al último lavado que fue liofilizada a sequedad antes de ser sembrada en el gel. Luego de la corrida electroforética las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo anti-MA. Se detectaron principalmente dos bandas en las calles donde se sembraron espermatozoides y MA con una masa molecular aparente de 100 y 36 kDa respectivamente. En las calles donde fueron sembradas sólo vesículas acrosomales o EV no se detectó ninguna banda, indicando que no existe reacción cruzada con ambas muestras (Fig 11).

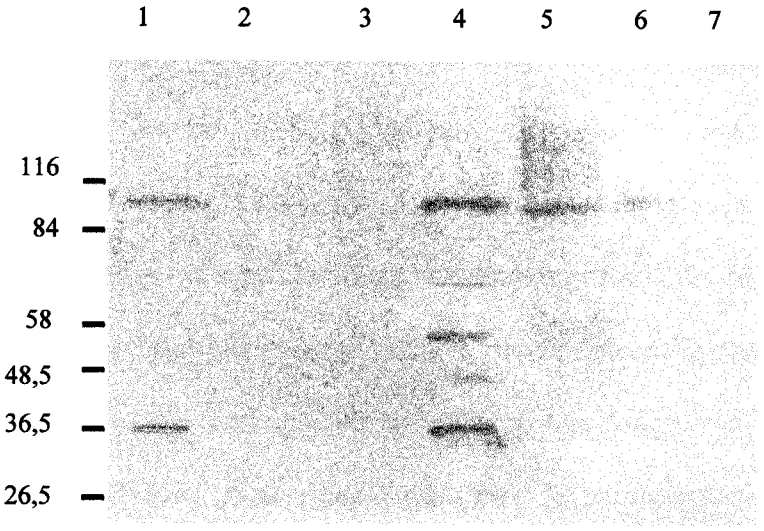

Fig. 11. ***Análisis de los anticuerpos anti-MA por inmunodetección***. Las proteínas de espermatozoides o EV se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con los anticuerpos anti-MA y posteriormente con un segundo anticuerpo anti-IgG total de conejo unido a peroxidasa. Calles: 1, proteínas totales de espermatozoide; 2, proteínas de las vesículas acrosomales; 3, EV; 4, proteínas de MA; 5, EV incubada con MA; 6 y 7: primer y tercer lavado de las EV tratadas respectivamente. En todos los casos se sembraron 15µg de proteínas totales.

La banda de 100 kDa también es detectada en la calle sembrada con muestras de EV incubadas con matriz acrosomal, mientras que no aparece en la que corresponde EV sin tratar. Esto podría significar que esta proteína estaría interaccionando con el ovocito y podría llegar a tener algún rol en la fecundación. Sin embrago, estas posibilidades requieren de un estudio más profundo.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Para disponer de un método que permita el análisis del estado acrosomal con mayor certeza y reproducibilidad, se obtuvieron anticuerpos contra la MA que furon utilizados en una técnica de inmunocitoquímica. Los espermatozoides fueron incubados con lo anticuerpos anti-MA y posteriormente con anticuerpos anti-IgG total de conejo marcados con el fluorocromo FITC. Mediante observación microscópica se contaron los espermatozoides con la punta de la cabeza fluorescente y se refirieron a la población total. Los resultados mostraron claramente diferentes porcentajes de tinción (Fig 12).

En los "espermatozoides intactos" no se detectó fluorescencia en la parte anterior de la cabeza, mientras que en la zona post-acrosomal se observó una débil tinción fluorescente. Por otro lado, en los "espermatozoides intactos" previamente permeabilizados la zona acrosomal se tiñó fuertemente (Fig 13). Estos resultados muestran que los epitopes presentes en la MA no se encuentran en la superficie del espermatozoide intacto.

Luego de la inducción de la reacción acrosómica mediante resuspensión en medio hipotónico o incubación con ionóforo de calcio A23187, se trató la suspensión de

MLM

espermatozoides previamente permeabilizada con los mismos anticuerpos. El porcentaje de los acrosomas teñidos fue significativamente menor que en los "espermatozoides intactos" permeabilizados. En ambos casos fue observado un porcentaje similar de acrosomas fluorescentes (entre 15 y 20%).

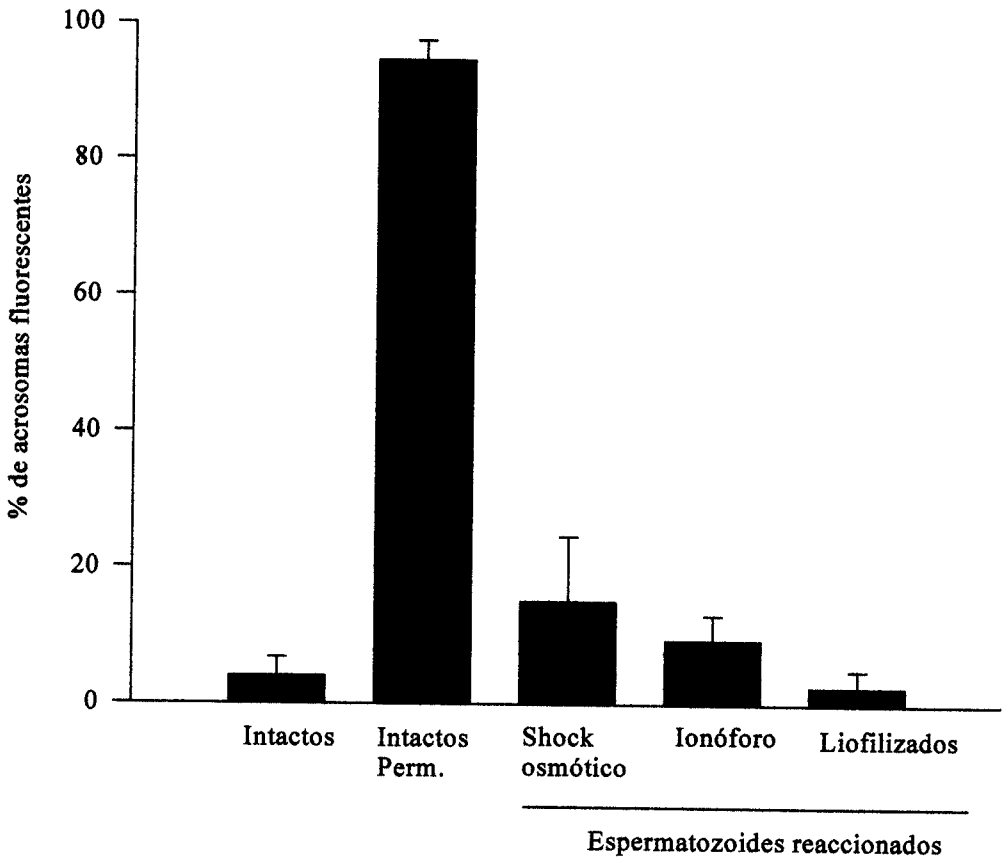

Fig. 12. ***Inmunofluorescencia indirecta.*** Los espermatozoides fueron incubados con los anticuerpos anti-MA y anti-IgG total de conejo marcado fluorescentemente como se describe en Materiales y Métodos. Las barras corresponden a muestras de espermatozoides intactos (***Intactos***), espermatozoides intactos permeabilizados (***Intactos Perm.***) y espermatozoides reaccionados mediante: resuspensión en medio hipotónico (***shock osmótico***), incubación con ionóforo de calcio 20μM (***ionóforo***) o liofilización y resuspensión en medio hipotónico (***liofilizados***).La altura de las barras representa el valor promedio de espermatozoides marcados fluorescentemente ± el desvío medio standard. (n= 10)

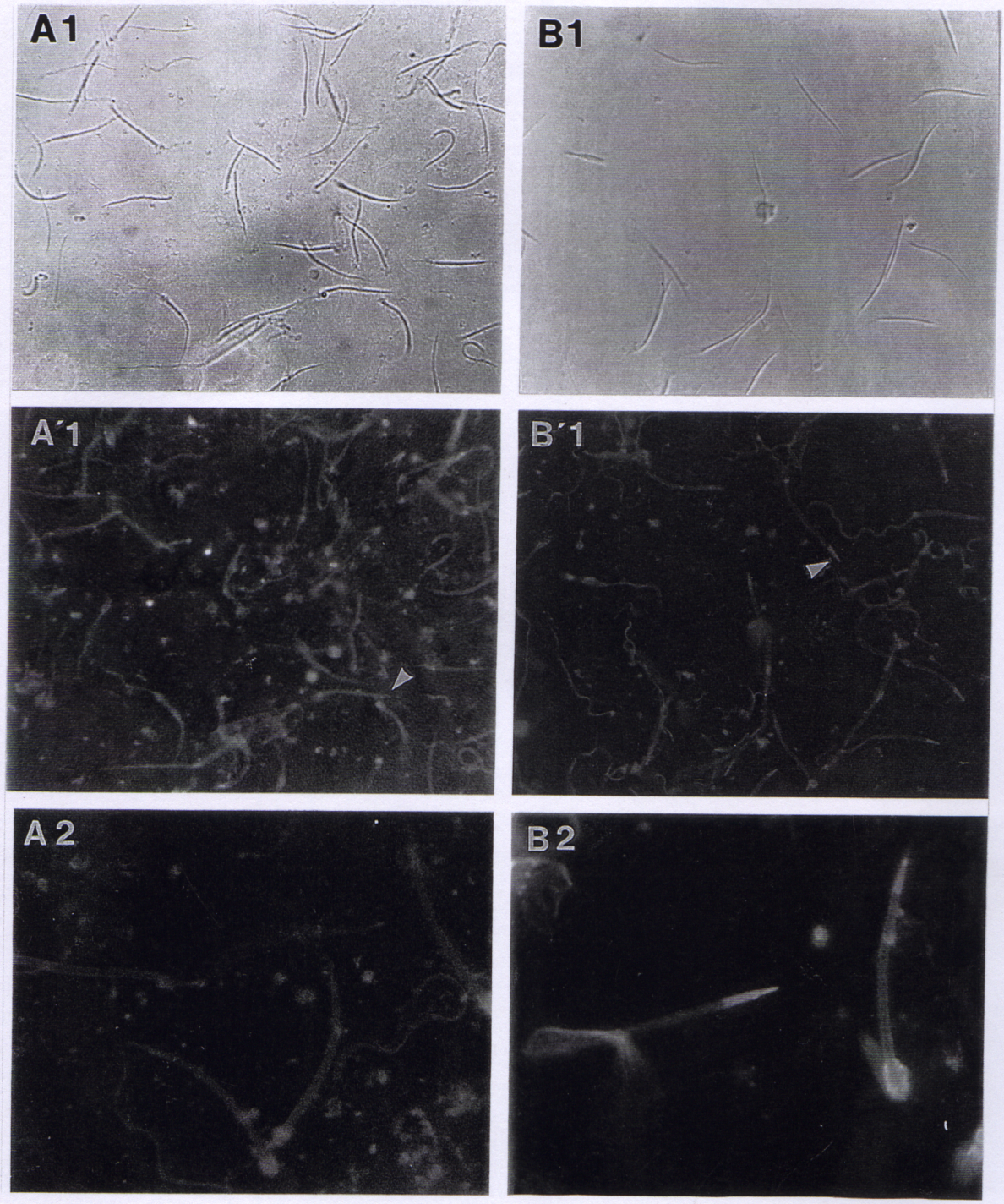

Fig. 13. ***Inmunofluorescencia indirecta***. Los espermatozoides fueron incubados con los anticuerpos anti- MA y posteriormente con anticuerpos anti-IgG total de conejo marcados con FITC. (**A**) Espermatozoides incubados con ionóforo A23187 20μM durante 45 min. No se detectan puntas fluorescentes. (A1) Contraste de fase y (A'1) la correspondiente micrografía de fluorescencia (X 400). (A2) Micrografía de fluorescencia de los mismos espermatozoides con mayor aumento (X1500). (**B**) Espermatozoides intactos permeabilizados. La región acrosomal muestra una intensa fluorescencia. (B1) Contraste de fase y (B'1) y la correspondiente fotomicrografía de fluorescencia (X400) (B2) Micrografías de fluorescencia de espermatozoides vistos con un mayor aumento (X1500). Las puntas de flecha muestran la parte anterior de la cabeza.

En alícuotas de espermatozoides liofilizados, resuspendidos en agua y permeabilizados no se detectó fluorescencia unida a dicha célula.

Se realizaron controles con suero preinmune o con sólo el segundo anticuerpo marcado fluorescentemente y no se detectó fluorescencia en la zona acrosomal en ningún caso. Es decir, ni en los "espermatozoides intactos" ni en los reaccionados, tanto permeabilizados o no.

Estos resultados indican que la técnica de inmunofluorescencia indirecta permite distinguir fácilmente los "espermatozoides intactos" dado que son los únicos que presentan la punta de la cabeza fluorescente luego de ser permeabilizados. Además, es un método simple, accesible y reproducible.

2.2. INDUCCION DE LA REACCION ACROSÓMICA MEDIANTE DISTINTAS TECNICAS

Se evaluó la ruptura acrosomal en diferentes condiciones para ratificar la validez de la técnica de inmunocitoquímica. Para ello suspensiones de espermatozoides fueron incubadas en un medio hipotónico (Ringer 10%) o con ionóforo de calcio A23187 10μM o 20μM para inducir la reacción acrosómica.

2.2.1. Inducción de la reacción acrosómica mediante incubación en medio hipotónico

Los espermatozoides fueron incubados en Ringer 10% durante 20, 40 y 60 minutos y, luego de permeabilizarlos, se los trató con anticuerpos anti-MA. Los resultados presentados en la Fig 14 muestran que el porcentaje de acrosomas marcados

fluorescentemente decrece rápidamente de 85% a 30% en 20 minutos, llegando a 19,5% a los 60 minutos manteniéndose este resultado hasta las dos horas.

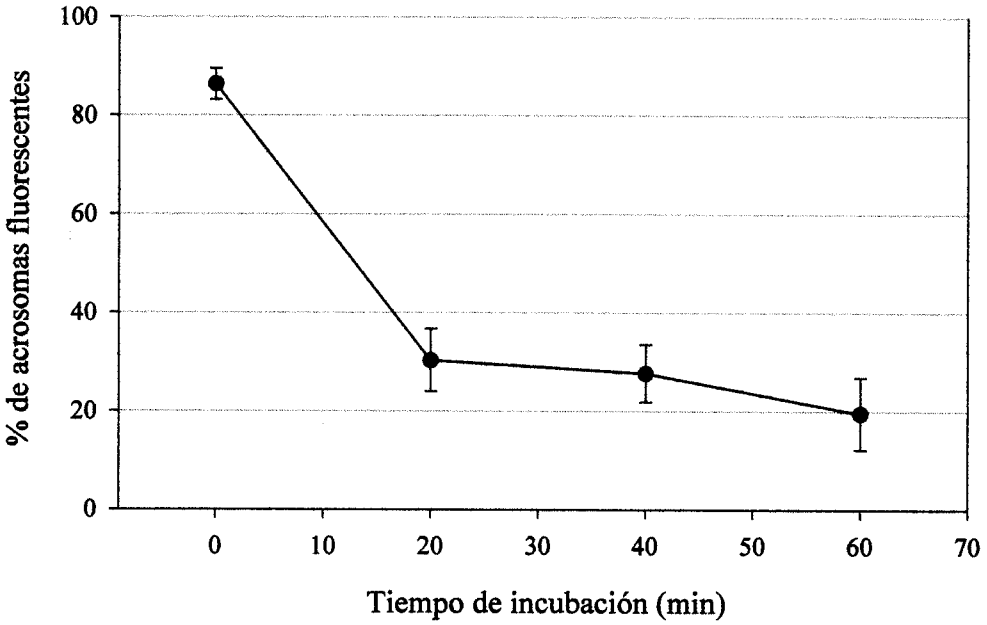

Fig 14: ***Espermatozoides de Bufo arenarum incubados en medio hipotónico.*** Suspensiones de espermatozoides fueron incubadas en Ringer 10% en los tiempos especificados. Luego los espermatozoides se permeabilizaron, se tiñeron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (ver Materiales y Métodos) y se cuantificaron aquellos que presentaron la punta fluorescente. Al menos 100 espermatozoides fueron analizados en cada experimento. Los valores se indican como el promedio ± el desvío medio standard de acrosomas fluorescentes (n= 3).

Comparación del porcentaje promedio de acrosomas teñidos en distintos tiempos de incubación: Los promedios se compararon mediante la técnica de Análisis de la variancia (ANOVA) a un criterio de clasificación ya que previamente se probaron los supuestos de normalidad mediante el test de Shapiro Wilks y la igualdad de variancias mediante el test de Bartlett. De dicha comparación se desprende que existe una diferencia significativa entre los tiempos considerados.

Luego de aplicada la técnica de comparaciones múltiples de Scheffé se concluye que el nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es significativamente mayor para el tiempo 0, no existiendo diferencia entre los promedios de los otros tres tiempos. En la fig 14 se visualiza claramente la gran disminución de acrosomas teñidos luego de 20 minutos de incubación en un medio hipotónico manteniéndose relativamente constante en incubaciones más prolongadas.

2.2.2. Inducción de la reacción acrosómica mediante incubación con ionóforo de calcio

Suspensiones de espermatozoides fueron incubados con 0, 10 y 20µM de ionóforo A23187 durante distintos períodos incubación (30, 45, 75 y 105 min). Luego del procedimiento de tinción, se visualizó una clara y permanente disminución del número de acrosomas fluorescentes con ambas concentraciones de ionóforo (Tabla 5).

Concentración de ionóforo	Tiempo de incubación				
	0 min.	30 min.	45 min.	75 min.	105 min.
0 µM	86.0 ± 5.5	85.0 ± 7.2	75.0 ± 4.2	78.0 ± 4.2	75.0 ± 5.0
10 µM	85.0 ± 6.0	44.5 ± 5.0	42.9 ± 4.4	37.7 ± 7.1	17.7 ± 9.3
20 µM	85.0 ± 6.0	43.6 ± 6.0	14.6 ± 3.0	13.1 ± 4.9	13.0 ± 5.3

Tabla 5: ***Espermatozoides de Bufo arenarum incubados con ionóforo de calcio.*** Los espermatozoides fueron incubados con distintas concentraciones de ionóforo de calcio a distintos tiempos. Los valores indican el promedio ± el desvío medio standard de acrosomas fluorescentes detectados luego de aplicar la técnica de inmunofluorescencia (n = 3).

En la incubación con ionóforo 10μM durante 105 minutos se observó un 17% de espermatozoides marcados. Un porcentaje similar de espermatozoides reaccionados se alcanza luego de incubar la suspensión durante 45 minutos con la solución de ionóforo 20μM y los valores se mantienen con incubaciones más largas (Tabla 5).

Comparación del porcentaje promedio de acrosomas teñidos incubados con distintas concentraciones de ionóforo y durante distintos tiempos: Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA correspondiente a un diseño bifactorial, luego de probado los supuestos de normalidad (Test de Shapiro Wilks) y de igualdad de variancias (Test de Bartlett), detectándose un efecto de interacción significativo ($p < 0,005$) entre ambos factores (tiempo y concentración). Dicha interacción puede observarse en la Fig 15.

MLM

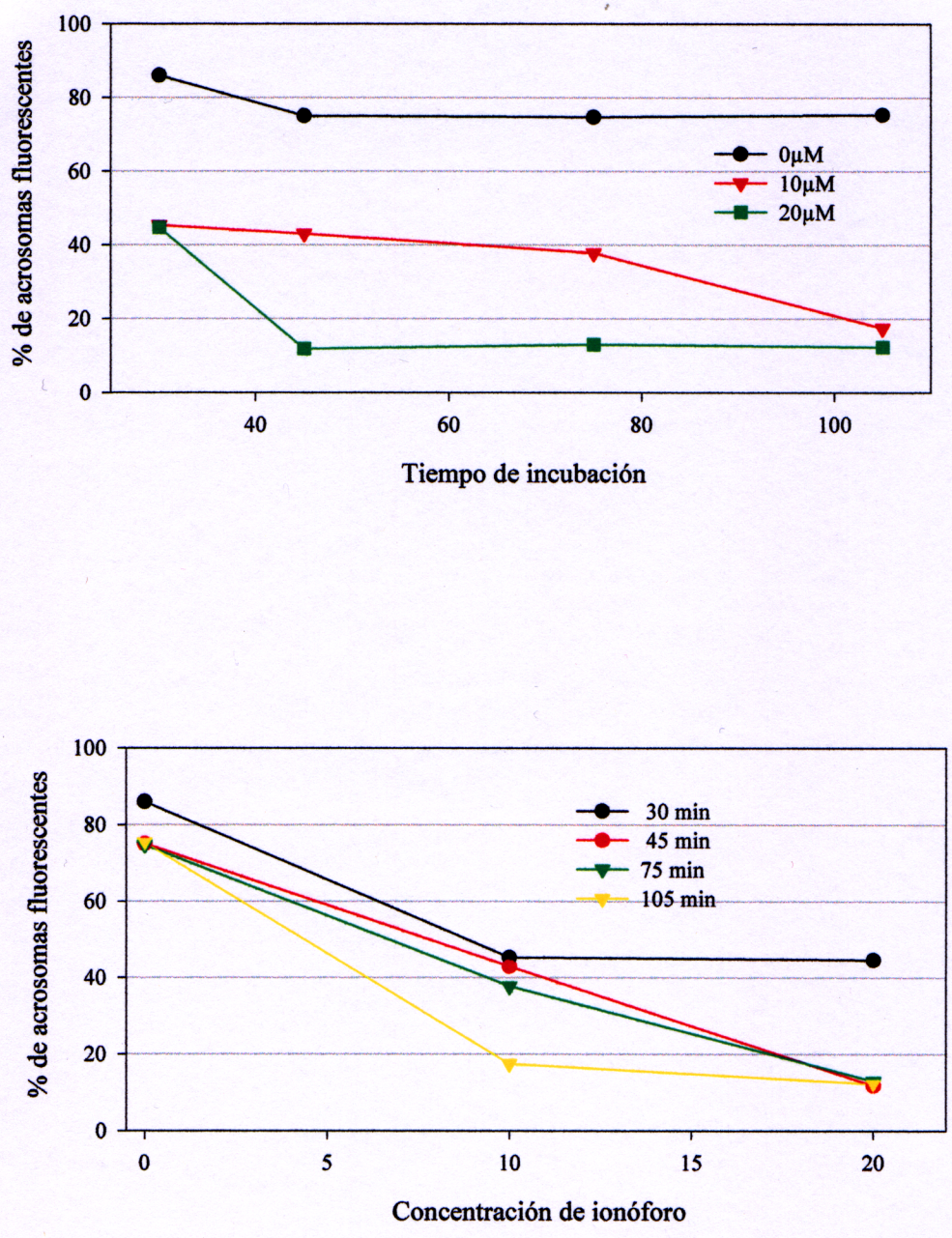

Fig 15: ***Espermatozoides de Bufo arenarum incubados con ionóforo de calcio.*** Los espermatozoides fueron incubados con 0, 10 ó 20 µM de ionóforo A23187 durante el tiempo especificado. Luego, se permeabilizaron y se tiñeron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta como se describe en Materiales y Métodos. En las figuras se grafica el promedio del porcentaje de acrosomas fluorescentes en función de la concentración de ionóforo (**A**) y en función del tiempo de incubación (**B**). Al menos 100 espermatozoides fueron analizados en cada experimento (n = 3).

En consecuencia, se procedió a estudiar el efecto de la concentración para cada tiempo estudiado y el efecto del tiempo para cada concentración.

Analizando los valores promedios presentados en la tabla 5 y luego de aplicada la técnica de contrastes múltiples de Scheffé se concluye que:

1.- Según concentración:

a) No existe diferencia significativa entre tiempos para 0 μM.
b) Existe diferencia significativa entre tiempos para 10 μM.

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es significativamente menor para un tiempo de incubación de 105 minutos, no existiendo diferencia entre los promedios de los otros tres tiempos.

c) Existe diferencia significativa entre tiempos para 20 μM.

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es significativamente mayor para un tiempo de incubación de 30 minutos, no existiendo diferencia entre los promedios de los otros tres tiempos.

2.- Según tiempo:

a) No existe diferencia significativa entre concentraciones para un tiempo de incubación de 0 minutos.

b) Existe diferencia significativa entre concentraciones para un tiempo de 30 minutos.

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es significativamente mayor para 0 μM, no existiendo diferencia entre los promedios de las otras dos concentraciones.

c) Existe diferencia significativa entre concentraciones para un tiempo de 45 minutos.

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es diferente para los tres niveles de concentración.

d) Existe diferencia significativa entre concentraciones para un tiempo de 75 minutos.

MLM

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es diferente para los tres niveles de concentración.

e) Existe diferencia significativa entre concentraciones para un tiempo de 105 minutos.

El nivel promedio del porcentaje de acrosomas teñidos es significativamente mayor para 0 μM, no existiendo diferencia entre los promedios de las otras dos concentraciones.

En conjunto, estos resultados muestran que existe un menor porcentaje de acrosomas teñidos cuando se aumenta el tiempo de incubación con el inductor de la reacción acrosómica. Cuando el inductor es el ionóforo de calcio este porcentaje varía tanto en función del tiempo de incubación como de la concentración de droga utilizada. Esta es una evidencia más de que los anticuerpos detectan la presencia del contenido acrosomal.

MLM

3. DISCUSIÓN

La reacción acrosómica es un requisito para que ocurra la fecundación dado que sólo el espermatozoide reaccionado es capaz de fusionarse con el ovocito. En el estudio del proceso de fecundación es importante poder determinar el sitio donde ocurre la reacción acrosómica y las moléculas implicadas en este proceso. Para ello es fundamental disponer de un método que permita establecer el estado acrosomal del espermatozoide. En *Bufo arenarum* sólo se disponía de técnicas de microscopía electrónica para poder detectar el acrosoma.

En una primera etapa de este trabajo se utilizaron distintos colorantes habituales para teñir acrosomas en espermatozoides de Mamíferos, tales como Eosina B y Fast Green FCF [119], azul de Tripan y Giemsa [125]. Ninguna de estas técnicas mostró resultados satisfactorios en la especie en estudio.

Por el contrario, la tinción con Azul de Coomassie permitió evidenciar ciertos cambios morfológicos durante la reacción acrosómica. En un 20-30% de los espermatozoides de la población a la que se indujo la reacción acrosómica, pudo detectarse la presencia de un filamento que podría corresponder al *perforatorium*. La presencia del *perforatorium* fue descripta en Anfibios Anuros, y aún se desconoce su rol durante la fecundación. Estos cambios observados probablemente correspondan a un estadio de la reacción acrosómica y no identifiquen a todos los espermatozoides reaccionados. El porcentaje de espermatozoides con esta morfología es menor que el

MLM

correspondiente a los espermatozoides reaccionados detectados con otras técnicas descriptas en este trabajo.

Esta técnica fue exitosamente utilizada con espermatozoides de hamster y ratón en los cuales el contenido acrosomal se tiñe fuertemente en comparación con el resto de la cabeza [126]. Sin embargo, el acrosoma de *Bufo arenarum* es más pequeño que los de las especies anteriores. La punta anterior de la cabeza del espermatozoide se tiñe más oscuro que el resto de la cabeza tanto en condiciones que preservan el acrosoma intacto como en las que inducen la reacción acrosómica. Dado que el colorante de Azul de Coomassie tiñe proteínas, la marca detectada en la parte anterior de la cabeza puede deberse a proteínas del contenido acrosomal y proteínas que queden asociadas al espermatozoide luego de que haya ocurrido la reacción acrosómica. Esta podría ser una razón que explique porqué es difícil distinguir entre "espermatozoides intactos" de los que han sufrido la reacción acrosómica.

Los marcadores fluorescentes proporcionan un mayor contraste entre las regiones acrosomales de las que no lo son [116]. La pérdida del contenido acrosomal ha sido detectada por lectinas fluorescentes en humanos [121], perros [127] y *Drosophila melanogaster* [128], entre otros. El derivado fluorescente de la lectina PNA fue utilizado para detectar el estado acrosomal en *Bufo japonicus* [123]. Esta lectina se une a la membrana interna acrosomal pero no al contenido de la matriz, por lo tanto permite detectar los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica.

Los resultados en *Bufo arenarum* muestran que la lectina FITC-PNA se une a los glicoconjugados de la MA en espermatozoides obtenidos de animales recogidos en otoño

o invierno. La punta de la cabeza se marca en los "espermatozoides intactos" permeabilizados con Triton. Mientras que los "espermatozoides intactos" sin permeabilizar o a los que se indujo la ruptura acrosomal no se tiñen. La ausencia de marca fluorescente en los espermatozoides que no sufrieron reacción acrosómica y que no han sido permeabilizados sugiere que la lectina no se une a la membrana plasmática. Estos resultados fueron corroborados mediante análisis por lectin blot donde sólo se observaron bandas en las calles correspondientes a la fracción de MA.

A pesar que el ensayo de detección del estado acrosomal con la lectina PNA es rápido, la fluorescencia observada es débil y se pierde rápidamente en todas las condiciones ensayadas, dificultando el análisis en un número superior a los 30-40 espermatozoides en cada muestra. Otra desventaja del uso de FITC-PNA se observó cuando los animales son recogidos a finales de la primavera o verano dado que el patrón de tinción no es reproducible. Una explicación posible a este resultado podría relacionarse con lo que sucede en Mamíferos, donde los espermatozoides, durante su tránsito por epidídimo o por el oviducto de la hembra, sufren una serie de cambios asociados a alteraciones en la composición glucídica [129;130;93] . En los sapos, la espermatogénesis es un proceso discontinuo durante el año. Por lo tanto, asociado a las distintas etapas podría existir un contenido glucídico diferente de los glicoconjugados reconocidos por esta lectina. Por otro lado, la lectina no puede ser utilizada para detectar el estado acrosomal en espermatozoides en presencia de glicoconjugados de la EV y la cubierta gelatinosa de ovocitos de la misma especie ya que los ovocitos se tiñen fuertemente al ser incubados con dicha lectina [131]. Para evaluar los efectos de las glicoproteínas de la

matriz extracelular de los ovocitos en el reconocimiento e inducción de la reacción acrosómica es necesario disponer de otra técnica.

La reacción acrosómica en Mamíferos también ha sido evidenciada mediante el uso de anticuerpos contra la membrana acrosomal [132] o contra un homogenado del espermatozoide entero [121]. En este último caso el núcleo fue considerado pobremente inmunogénico y la concentración de antígenos superior en el acrosoma que en el resto del espermatozoide.

Para disponer de una técnica más específica en la determinación del estado acrosomal, se obtuvieron anticuerpos en conejos contra el contenido acrosomal de espermatozoides de *Bufo arenarum*. Se aislaron proteínas acrosomales de las organelas y fracciones membranosas para lograr una mayor especificidad. Análisis electroforéticos revelaron numerosas bandas proteicas asociadas a membranas que no fueron detectadas en la fracción que correspondía a proteínas solubles del contenido acrosomal. Este contenido fue usado para la inmunización. La especificidad del anticuerpo fue probada mediante análisis por inmunodetección. Los anticuerpos anti-MA reconocen por lo menos dos proteínas, sin embargo no se detectó reacción positiva en la muestra de vesículas membranosas. Este resultado sugiere que los anticuerpos no interaccionan, o no se alcanza a detectar, con proteínas de la membrana plasmática por encima del acrosoma. Además, mediante el mismo análisis, no se detectaron bandas en la calle donde se sembró EV solubilizada. Este resultado es importante ya que evidencia que el antisuero puede ser utilizado en presencia de esta muestra.

MLM

Mediante la técnica de inmunocitoquímica descripta en este trabajo se visualizaron por microscopía de fluorescencia claras diferencias entre el espermatozoide intacto y el espermatozoide reaccionado.

Para evaluar el método de inmunofluorescencia indirecta se analizaron diferentes condiciones de inducción de la reacción acrosómica. Se vio que el porcentaje de acrosomas intactos de la suspensión de espermatozoides disminuye con el aumento del tiempo de incubación con el inductor de la reacción acrosómica: incubación en un medio hipotónico o con ionóforo de calcio. Por otro lado, si bien ambos inductores han sido utilizados previamente para el mismo fin en otras especies, aún no habían sido evaluados en *Bufo arenarum*. En este trabajo se determinó que una incubación durante 20 minutos en un medio hipotónico induce la ruptura en el 70% de los espermatozoides. Este método es rápido y no requiere del agregado de un agente exógeno como lo es el ionóforo de calcio. Sin embargo, cuando dicho componente no interfiere en los ensayos posteriores, la incubación con ionóforo 20µM durante 45 minutos sería el método de elección ya que es el más eficiente y reproducible para la inducción de la reacción acrosómica.

La técnica de inmunofluorescencia presenta otra gran ventaja dado que puede utilizarse para determinar el estado acrosomal en presencia de glicoconjugados de la matriz extracelular del ovocito. En efecto, se ha establecido que los espermatozoides de *Bufo arenarum* mantienen su acrosoma intacto cuando está presente una glicoproteína de la cubierta gelatinosa en un medio hipotónico, que simulan las condiciones ambientales naturales [96]. Por otro lado, y también utilizando la técnica de inmunofluorescencia se

MLM

observó que los componentes de la EV inducen rápidamente la reacción acrosómica en los espermatozoides homólogos (Barisone, comunicación personal).

En conclusión, la técnica de inmunofluorescencia indirecta es un método accesible para distinguir "espermatozoides intactos" de los que han sufrido la reacción acrosómica. Esta técnica permite el análisis del estado acrosomal de una población más grande en comparación con los que pueden analizarse mediante microscopía electrónica. Los resultados son sencillos de evaluar dado que solamente los espermatozoides permeabilizados y con su acrosoma intacto muestran una intensa fluorescencia, mientras que en los que no han sido permeabilizados o los que han sufrido reacción acrosómica no se detecta la tinción fluorescente. Además, es una técnica que puede utilizarse para determinar el efecto de los componentes de la matriz extracelular de los ovocitos sobre el acrosoma del espermatozoide dado que puede ser desarrollada en presencia de dichos glicoconjugados.

CAPITULO V

GLICOSIDASAS EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum*

V. GLICOSIDASAS EN ESPERMATOZOIDES DE *Bufo arenarum*

1 INTRODUCCIÓN

El proceso de fecundación es el resultado de una serie de eventos moleculares entre el espermatozoide y el ovocito. En la mayoría de las especies animales el receptor presente en la superficie del espermatozoide intacto reconoce y se une a residuos glucosídicos del ovocito homólogo. Por lo tanto, la interacción entre el espermatozoide y el ovocito depende de moléculas que reconozcan azúcares ya sea enzimas (glicosidasas y/o glicosiltransferasas) o proteínas de tipo lectina presentes en el espermatozoide [45;133-137].

Se ha informado la participación de diferentes enzimas en el reconocimiento y unión entre gametas. En espermatozoides de ascidias, las glicosidasas fueron propuestas como las moléculas de unión al ovocito [138;139]. α-L-Fucosidasa y N-Acetil Glucosaminidasa fueron detectadas asociadas a la membrana plasmática del espermatozoide y se demostró que intervienen en la unión a la EV en *Ciona intestinalis* [140; 141] y *Phallusia mammillata*, [142].

La participación de glicosidasas y glicosiltransferasas en la fecundación ha sido estudiada también en numerosas especies de Mamíferos. La inhibición de α-L-Manosidasa de la superficie del espermatozoide de ratones inhibe la interacción con el

ovocito [143]. PH-20 es una proteína con actividad hialuronidasa [144] y degrada ácido hialurónico durante el pasaje a través de las células del *cumulus* en cobayo [145]. La misma enzima fue detectada también en el espermatozoide reaccionado de numerosas especies de Mamíferos [146] y se postuló la participación de la misma en la unión a la zona pelúcida [147].

La galactosiltransferasa está presente en el espermatozoide de varias especies, y funcionaría como un receptor de transducción de señal (revisto en [137]). En ratón, el reconocimiento inicial entre el espermatozoide y el ovocito está mediado por la unión de la galactosiltransferasa de la superficie del espermatozoide a restos N-Acetil Glucosamina de ZP3. Después de esta unión, el agregado de los receptores induce la reacción acrosómica. Durante este proceso el espermatozoide permanece unido a la zona pelúcida dado que la galactosiltransferasa se redistribuye en la superficie lateral del espermatozoide reaccionado. Posteriormente, el espermatozoide que completó la reacción acrosómica, se asocia a la zona pelúcida por un segundo tipo de unión e involucra otra proteína, ZP2 [55]. Las enzimas liberadas del acrosoma permiten que el espermatozoide reaccionado atraviese la zona pelúcida [93]. El espermatozoide contiene además de las actividades genéricas de proteasas, como acrosina, enzimas que específicamente previenen adhesiones moleculares estables entre los receptores del espermatozoide y ligandos de la zona pelúcida [56]. La presencia de la galactosiltransferasa en el espermatozoide reaccionado podría impedir la penetración del espermatozoide a través de la zona mediante la unión de la enzima a los azúcares expuestos del ovocito. Este problema es eliminado por la enzima acrosomal N-Acetil Glucosaminidasa que remueve

MLM

los sitios de unión de la galactosiltransferasa en las proximidades del sitio de penetración [56]. La glicosidasa podría funcionar catalíticamente, removiendo residuos N-Acetil Glucosamina o funcionar en una forma de tipo lectina reconociendo y enmascarando dichos residuos. Después de la activación del ovocito se produce la reacción cortical que libera la enzima N-Acetil Glucosaminidasa destruyendo globalmente todos los sitios de unión de la galactosiltransferasa [56]. Si bien este mecanismo está bien estudiado en ratón, la presencia de la galactosiltransferasa y N-Acetil Glucosaminidasa en otras especies animales podría significar que el mecanismo es semejante en distintos sistemas y que la especificidad en la fecundación esté dada por otras moléculas asociadas [137].

En Anfibios, el espermatozoide debe atravesar las cubiertas gelatinosas y la EV del ovocito [148;149], ambas compuestas por glicoproteínas [150;72;151]. En *Bufo arenarum*, el espermatozoide atraviesa la cubierta gelatinosa sin necesidad de la actividad lítica de las enzimas acrosomales [112]. Más aún, se ha visto que una proteína difusible de la cubierta gelatinosa de ovocitos de *Bufo arenarum* protege al espermatozoide y evita que ocurra la reacción acrosómica [96]. Es posible que este efecto de estabilización esté relacionado con la conservación del acrosoma hasta la llegada del espermatozoide a las cercanías de la EV, donde ocurre la reacción acrosómica [74;76]. Mediante experimentos *in vitro* se detectó que la incubación de espermatozoides con la EV induce la reacción acrosómica (Barisone, comunicación personal) liberando glicosidasas [152], Juan (resultados no publicados) y proteasas [74] necesarias para penetrar a través de la EV [153;112].

La presencia de glicosidasas en el espermatozoide abre un campo de estudio y especulación sobre sus roles en la fecundación en Anfibios. En este trabajo se estudian las glicosidasas presentes en el espermatozoide de *Bufo arenarum*. La actividad N-Acetil Glucosaminidasa (NAcGlcasa) fue la mayor detectada en comparación con el resto de las actividades glicosidasas medidas. Esta enzima se unió *in vitro* a la EV de los ovocitos de la misma especie, sugiriendo un posible rol en la fecundación. Se caracterizó y purificó la glicosidasa como un paso importante en la comprensión de su función.

MLM

2. RESULTADOS

La participación de diversas enzimas hidrolíticas en la fecundación fue ampliamente documentado. En el presente trabajo se estudiaron las actividades glicosidasas presentes en el espermatozoide de *Bufo arenarum*. Los espermatozoides aislados, como se detalla en Materiales y Métodos, fueron liofilizados y resuspendidos en solución hipotónica para inducir la reacción acrosómica. La extracción fue completada mediante el agregado de Tritón al 0,1%, que permitió la solubilización de proteínas asociadas a las membranas del espermatozoide. Finalmente, en el extracto total de espermatozoides se realizó la medida de distintas glicosidasas utilizando como sustrato el *p*-nitrofenil-glicosido correspondiente (Tabla 6).

ENZIMA MEDIDA	ACTIVIDAD (U / mg)
NAcGlcasa	2,00
β-Galactosidasa	0,47
β-Glucosidasa	0,36
α-Manosidasa	0,35
α-Fucosidasa	0,12
α-Glucosidasa	0,10

Tabla 6. ***Medida de actividad de diferentes glicosidasas de espermatozoides de Bufo arenarum.*** Alícuotas del extracto total de espermatozoides fueron incubadas con los *p*-nitrofenil glucósidos correspondientes a cada una de las glicosidasas citadas. La actividad enzimática fue medida como se describe en Materiales y Métodos.

MLM

La mayor actividad medida fue la de la NAcGlcasa (2,00 U/mg), cinco veces mayor que las de β–D-Galactosidasa, β-D-Glucosidasa y α-D-Manosidasa. NAcetil Galactosaminidasa también fue detectada con un valor de actividad que corresponde al 50% de la NAcGlcasa. Podría ocurrir que ambas actividades se adjudiquen a la misma enzima ya que la mayoría de las NAcGlcasas descriptas tienen también actividad NAcetil Galactosaminidasa [154]. También fueron detectadas bajos niveles de actividad de α-L-Fucosidasa y α-D-Glucosidasa (0,12 y 0,10 U/mg, respectivamente).

Sin embargo, *in vivo* estas glicosidasas no están expuestas a 30°C y a rangos de pH como los utilizados en las medidas de actividad. Por ello se decidió estudiar si las mismas relaciones en actividades enzimáticas se mantenían cuando se llevaban a cabo estas mismas determinaciones enzimáticas a pH 5,0 ó pH 7,0 y a una temperatura de 18°C que es la temperatura aproximada del ambiente donde ocurre la fecundación. El estudio a dos pH diferentes se realizó dado que ambas situaciones podrían tener lugar durante la fecundación. El pH 7,0 puede encontrarse en el agua de charco donde ocurre la fecundación. Mientras que luego de la reacción acrosómica podría crearse un microambiente acídico debido a la liberación del contenido acrosomal. Los resultados que se detallan en la Tabla 7 muestran que en todos los casos la mayor actividad enzimática detectada corresponde a la NAcGlcasa.

MLM

	pH 3,6	pH 5,0	pH 7,0
NAcGlcasa	2,00	1,60	0,70
	1,15	0,90	0,50
Galasa	0,60	0,50	0,27
	0,47	0,40	0,15
β-Glcasa	0,50	0,36	0,22
	0,36	0,20	0,09
Manasa	0,35	0,30	0,15
	0,35	0,29	0,10
Fucasa	0,20	0,15	0,06
	0,12	0,09	0,02
α-Glcasa	0,20	0,15	0,08
	0,10	0,08	–

Tabla 7. ***Actividad glicosidasa a distintos pHs y temperaturas***. Las mezclas de reacción, conteniendo 25µl de extracto total de espermatozoides y 3 mM de los *p*-nitrofenol glucósidos en solución amortiguadora ac.cítrico-fosfato a los pHs especificados (3,6; 5,0 y 7,0), fueron incubadas a 18°C ó a 30°C durante 30 min. Luego de finalizada la reacción se determinaron las actividades de las glicosidasas (expresadas como U / mg). Los datos en azul corresponden a los valores de actividad enzimática a 18°C y los datos en gris a 30°C.

2.1. ANÁLISIS DE LAS GLICOSIDASAS

Se han determinado diferentes propiedades bioquímicas de las glicosidasas detectadas en el extracto total de espermatozoides como un paso preliminar para subsiguientes estudios (Tabla 8).

Mediante precipitaciones diferenciales con sulfato de amonio se estableció que α-L-Fucosidasa precipita a una concentración entre 30 y 50% de la sal, β-D-Glucosidasa y

β-D-Galactosidasa entre 50 y 60% y NAcGlcasa, NAcetil β-D-Galactosaminidasa fundamentalmente al 65%.

Cuando el extracto total de espermatozoides se sembró en una columna de ConA-Sepharose, se recuperaron en la fracción no retenida en la columna las siguientes actividades enzimáticas: β-D-Galactosidasa, β-D-Glucosidasa, α-D-Fucosidasa y α-D-Glucosidasa. Mientras que las actividades de N-Acetil β-D-Galactosaminidasa, NAcGlcasa y α-L- Manosidasa se recuperaron en el eluído con el azúcar correspondiente (metilmanosa 0,5M). Con otra alícuota de la misma muestra se realizó una cromatografía de afinidad utilizando una matriz de *p*-aminobenzil-1-tio-β-D-Galactopiranosido-agarosa. En este caso las enzimas responsables de las actividades de α-D-Glucosidasa, β-D-Glucosidasa y α-D-Manosidasa no se unieron a la matriz. Por otro lado, las actividades de NAcetil β-D-Galactosaminidasa, NAcGlcasa, β-D-Galactosidasa y α-L-Fucosidasa fueron detectadas unidas en distintas proporciones a la columna, como se detalla en la Tabla 8.

Los resultados sugieren que de las glicosidasas estudiadas α-D-Glucosidasa, β-D-Glucosidasa, α-D-Manosidasa, β-D-Galactosidasa y α-L-Fucosidasa corresponden a distintas entidades moleculares, mientras que NAcetil β-D-Galactosaminidasa y NAcGlcasa no mostraron diferencias en las propiedades analizadas. Esto podría apoyar la hipótesis que ambas actividades enzimáticas puedan ser atribuidas a la misma proteína.

MLM

Enzima	% $(NH_4)_2SO_4$	ConA-Sepharose		p-AminoGal agarosa	
		No unido	*Unido*	*No unido*	*Unido*
NAcGlcasa	60-70%	0,10 (23%)	1,50 (77%)	0,27 (15%)	1,50 (85%)
Fucosidasa	30-50%	0,08 (92%)	nd	0,04 (50%)	0,04 (50%)
Manosidasa	id	0,03 (30%)	0,27 (70%)	0,36 (100%)	nd
α-Glucosidasa	id	0,08 (100%)	nd	0,08 (80%)	0,02 (20%)
β-Glucosidasa	50-60%	0,34 (100%)	nd	0,34 (86%)	0,05 (14%)
Galactosidasa	50-60%	0,35 (88%)	0,03 (10%)	0,15 (45%)	0,20 (55%)

Tabla 8. ***Propiedades bioquímicas de las glicosidasas.*** El extracto total de espermatozoides fue sometido a los distintos tratamientos detallados en cada columna y realizados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la actividad enzimática, expresada en U/ml, en las fracciones unidas y no unidas para las columnas de afinidad. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de la actividad total que representa cada valor. Para el $(NH_4)_2SO_4$ el porcentaje se refiere a la concentración de la sal a la cual se ha detectado la mayor actividad de cada enzima en el precipitado. nd= no detectable, id= igualmente distribuido.

2.2. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LAS GLICOSIDASAS EN DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DEL ESPERMATOZOIDE.

Algunas glicosidasas acrosomales participan en la digestión de las cubiertas del ovocito para permitir el paso del espermatozoide, mientras que otras han sido vinculadas con el reconocimiento y unión entre gametas. Las glicosidasas que participan en dicha interacción fueron detectadas unidas a las membranas del espermatozoide, mientras que las que participan en la penetración a través de la matriz extracelular del ovocito se

MLM

encuentran principalmente solubles en el acrosoma o asociados al espermatozoide reaccionado. Se comenzó con el estudio de la localización de las glicosidasas dado que es de fundamental importancia para determinar posibles funciones en la fecundación.

Para ello las distintas muestras subcelulares del espermatozoide fueron obtenidas como se describe en Materiales y Métodos. Luego de inducir la reacción acrosómica a los espermatozoides, se separó la fracción enriquecida en contenido acrosomal y membranas acrosomales (ver Fig 6). El resto de la suspensión, que contenía espermatozoides reaccionados fue lavada exhaustivamente.

En las distintas fracciones subcelulares se midió actividades de las glicosidasas (Tabla 9). En todos los casos analizados las mayores actividades se encuentran en la fracción correspondiente al contenido acrosomal. Sin embargo, en la fracción de espermatozoides reaccionados se detectó una actividad de NAcGlcasa 0,60 U/mg que corresponde a un 10-20% de la actividad medida en el contenido acrosomal.

La fracción de membranas acrosomales se separó del contenido acrosomal mediante ultracentrifugación (Fig 6). Luego de lavar, el sedimento enriquecido en membranas se incubó con Tritón X-100, para extraer proteínas intrínsecas que fueron separadas por ultracentrifugación. En este último sobrenadante resultante se detectó actividad de α-Manosidasa sugiriendo que la enzima se encuentra asociada a las membranas plasmática y/o acrosomal.

MLM

	NAcGlcasa	Galasa	Manasa	β Glcasa	Fucasa	αGlcasa
MA	3,20	0,50	0,42	0,30	0,14	0,09
VA	nd	nd	0,20	nd	nd	0,01
1°L	0,80	0,20	0,21	0,12	0,07	0,04
2°L	0,09	0,10	0,10	0,01	0,02	0,01
3°L	0,02	0,01	0,01	Nd	nd	nd
ER	0,60	nd	nd	0,03	nd	nd

Tabla 9. ***Localización subcelular de las distintas glicosidasas***. La actividad de cada una de las glicosidasas citadas, expresada como U / mg, se midió en alícuotas (25µl) de las fracciones especificadas en la columna de la izquierda: Matriz Acrosomal (***MA***), Vesículas Acrosomales (***VA***), Espermatozoides Reaccionados (***ER***) y en cada uno de los SN de los lavados de los ER (***1°, 2° y 3° L***). nd= no detectado.

2.3. INCUBACIONES *IN VITRO* DEL ACROSOMA CON LA EV DE OVOCITOS HOMÓLOGOS

Para determinar si alguna de las glicosidasas participa en la interacción entre gametas, se realizaron incubaciones *in vitro* de proteínas del espermatozoide con EV. Para ello, se preparó una matriz de afinidad conteniendo proteínas totales de EV. Las EV fueron solubilizadas mediante calentamiento y unidas covalentemente a Sepharose activado con bromuro de cianógeno. La columna fue equilibrada con Ringer 10% pH 7,2. Estas condiciones de baja osmolaridad y pH levemente alcalino simulan el medio de fecundación. El extracto total de espermatozoides se sembró en dicha columna y se

midieron las actividades de las glicosidasas en las fracciones no unidas a la columna comparándose con las actividades del extracto total sembrado.

En el material no unido a la columna fueron detectadas actividades de β-Galactosidasa (Galasa), β-Glucosidasa (β-Glcasa), α-Fucosidasa (Fucasa) y α-Manosidasa (Manasa). Mientras que se encontró que sólo la enzima NAcGlcasa había disminuido considerablemente su actividad en esta fracción, indicando una interacción con las proteínas de EV (Tabla 10).

	EC	No unido	Unido
NAcGlcasa	1,40 ± 0,04	0.07 ± 0,007	1,2 ± 0,05
Galasa	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,01	nd
β-Glcasa	0,37 ± 0,01	0,26 ± 0,02	nd
Manasa	0,28 ± 0,02	0,20 ± 0,006	nd
Fucasa	0,05 ± 0,006	0,04 ± 0,003	nd

Tabla 10. ***Cromatografía de afinidad: EV-Sepharose.*** 1 mg de extracto total de espermatozoides fue incubado con EV unida covalentemente a Sepharose como se describió en Materiales y Métodos. Los datos representan la actividad enzimática (expresada como U / ml) medida en el material de partida (***EC***), en la fracción que no quedó retenida en la columna (***No unido***) y en la fracción unida y posteriormente eluída con NaCl 1M (***Unido***). β-Galactosidasa (Galasa), β-Glucosidasa (β-Glcasa), α-Fucosidasa (Fucasa) y α-Manosidasa (Manasa). n=5 y nd = no detectable.

Luego de exhaustivos lavados con el solución amortiguadora de siembra, la actividad NAcGlcasa se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl (Fig 16). Estos datos muestran que la enzima NAcGlcasa interacciona en las condiciones experimentales

MLM

con la EV, dado que se necesitó adicionar NaCl hasta una concentración de 1,5M para eluirla completamente. Sin embrago, se sugiere que en estas condiciones la enzima no muestra actividad catalítica, debido a que no fue detectada la actividad en la fracción correspondiente al lavado. Además, la matriz fue reutilizada en repetidos ensayos y la actividad de la enzima siempre fue detectada en el material retenido sugiriendo que los restos de interacción no fueron removidos catalíticamente.

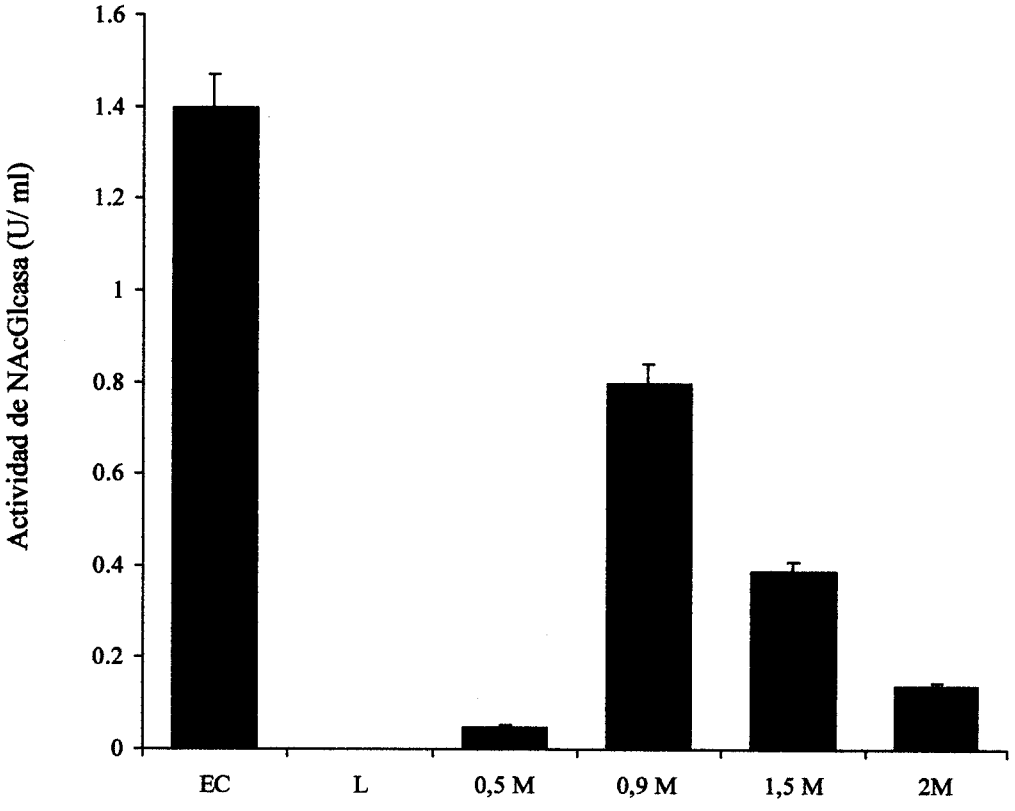

Fig 16. ***Cromatografía de EV-Sepharose de NAcGlcasa.*** 1 mg de extracto total de espermatozoides (***EC***) fue sembrado en la columna de EV-Sepharose como se describe en Materiales y Métodos. Después de exhaustivos lavados (***L*** corresponde a la fracción de lavado), se eluyó el material retenido con concentraciones crecientes de NaCl (***0,5 M, 0,9 M, 1,5 M*** y ***2,0M,*** respectivamente). La actividad de NAcGlcasa, expresada como U / ml, fue medida en cada fracción. Las barras de error corresponden al desvío medio standard. n=5.

MLM

NAcGlcasa: ENZIMA ACROSOMAL QUE PARTICIPA EN LA FECUNDACIÓN

La actividad de NAcGlcasa es la actividad glicosidasa predominante en el extracto total de espermatozoides de *Bufo arenarum*. La enzima se une *in vitro* a la EV de la misma especie, sugiriendo algún rol en la fecundación de esta glicosidasa. Trabajos en *Bufo japonicus* y *Xenopus laevis* sugieren que los restos NAcGlc podrían ser el ligando presente en los ovocitos dado que la remoción o enmascaramiento de dichos restos azúcares de la EV evitan la interacción con el espermatozoide [76;77]. Es un punto importante, entonces, poder determinar si la glicosidasa es el receptor en el espermatozoide de la NAcGlc. La alta resistencia del espermatozoide de *Bufo arenarum*, en comparación con otras especies de Anfibios, hace de éste un buen sistema para el estudio de las moléculas implicadas en la fecundación. Como un paso en la caracterización de la función biológica de la NAcGlcasa, en este trabajo se ha purificado y caracterizado a la enzima.

2.4. CARACTERIZACIÓN DE NAcGlcasa

La caracterización de la enzima se inició con el estudio del comportamiento de la misma en matrices de cromatografías de intercambio aniónico, de interacción hidrofóbica y de afinidad.

Cromatografía de intercambio aniónico en HPLC. El extracto total de espermatozoides fue sembrado en una columna de Bio-Gel DEAE (Bio-Rad) previamente equilibrada con solución amortiguadora citrato pH 5,6. La elución del material retenido se realizó con concentraciones crecientes de NaCl y la actividad de NAcGlcasa se detectó fundamentalmente en las fracciones eluídas entre 0,5 y 0,9 M de NaCl en solución amortiguadora citrato pH 5,6 (Fig 17).

Estos resultados pueden sugerir que la glicosidasa tiene al menos una región cargada negativamente. Más aún, las proteínas que tienen una distribución de cargas asimétrica son retenidas en una columna de intercambio aniónico en HPLC en su punto isoeléctrico o levemente por debajo de dicho valor [155]. Por otro lado y como se verá más adelante la actividad fue visualizada, luego de separar el extracto de espermatozoides electroforéticamente en condiciones nativas, en una banda con un Rf = 0,5. Esta importante migración en un gel al 10% ocurre según su carga negativa intrínseca, y podría ser otro indicio de que la NAcGlcasa tiene al menos una región cargada negativamente.

MLM

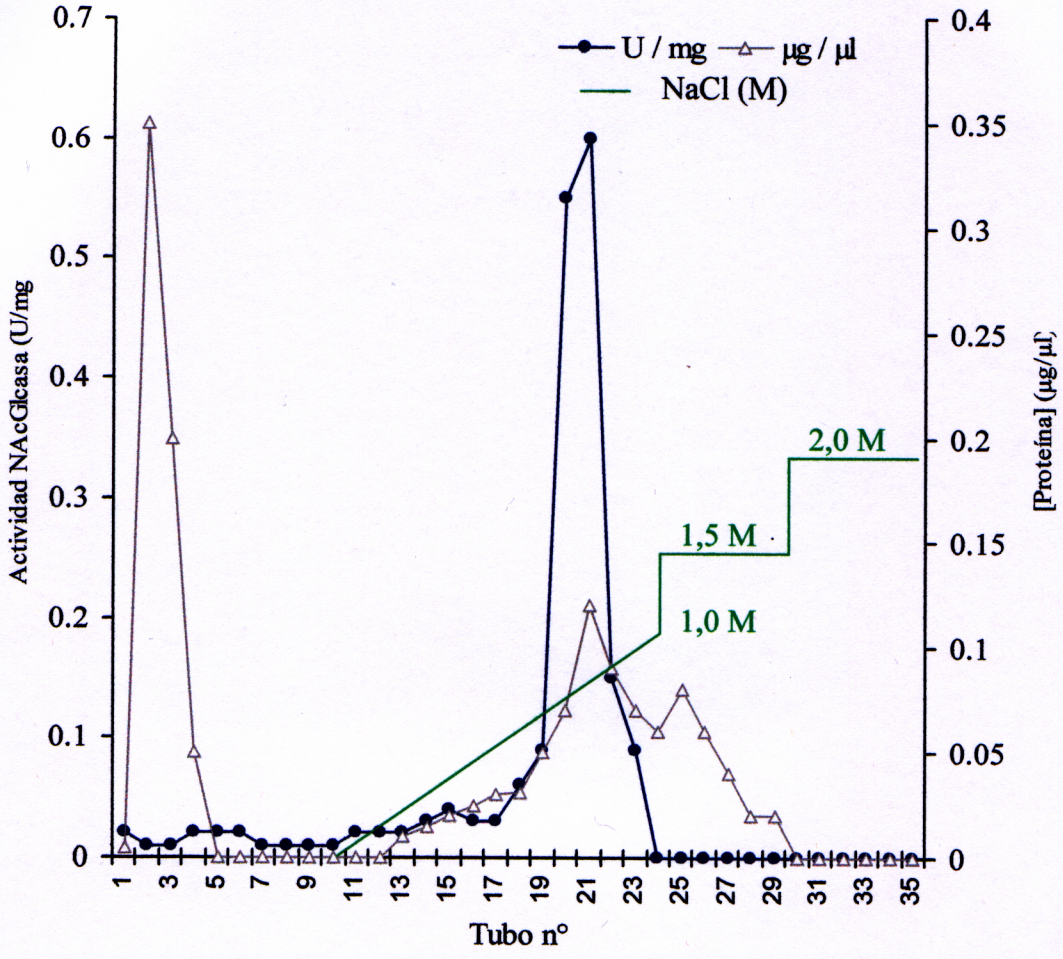

Fig. 17 ***Cromatografía de intercambio aniónico en HPLC.*** Proteínas extracto total de espermatozoides (1,5 mg) en solución amortiguadora citrato 10 mM pH 5,6 se sembraron en una columna de Bio-Gel DEAE. La elución se realizó con 20 ml de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M y luego con un gradiente no lineal de NaCl 1,5 M y 2M. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a las que se les determinó la actividad de NAcGlcasa (U / mg) y concentración de proteínas totales (µg / µl)

La *cromatografía de interacción hidrofóbica* se realizó con una matriz de Phenyl-Sepharose. El extracto total de espermatozoides se precipitó con $(NH_4)_2SO_4$ 1M y el sobrenadante se sembró en dicha columna. Posteriormente se realizó la elución con concentraciones decrecientes de $(NH_4)_2SO_4$ y luego con concentraciones escalonadas y crecientes de etilenglicol. La enzima NAcGlcasa interacciona fuertemente con la matriz, ya que es necesario adicionar etilenglicol al 60% para eluirla completamente (Fig 18).

MLM

Esta fuerte retención a la columna en condiciones que mantienen la integridad de la proteína indica que la enzima posee grupos hidrofóbicos expuestos en su superficie.

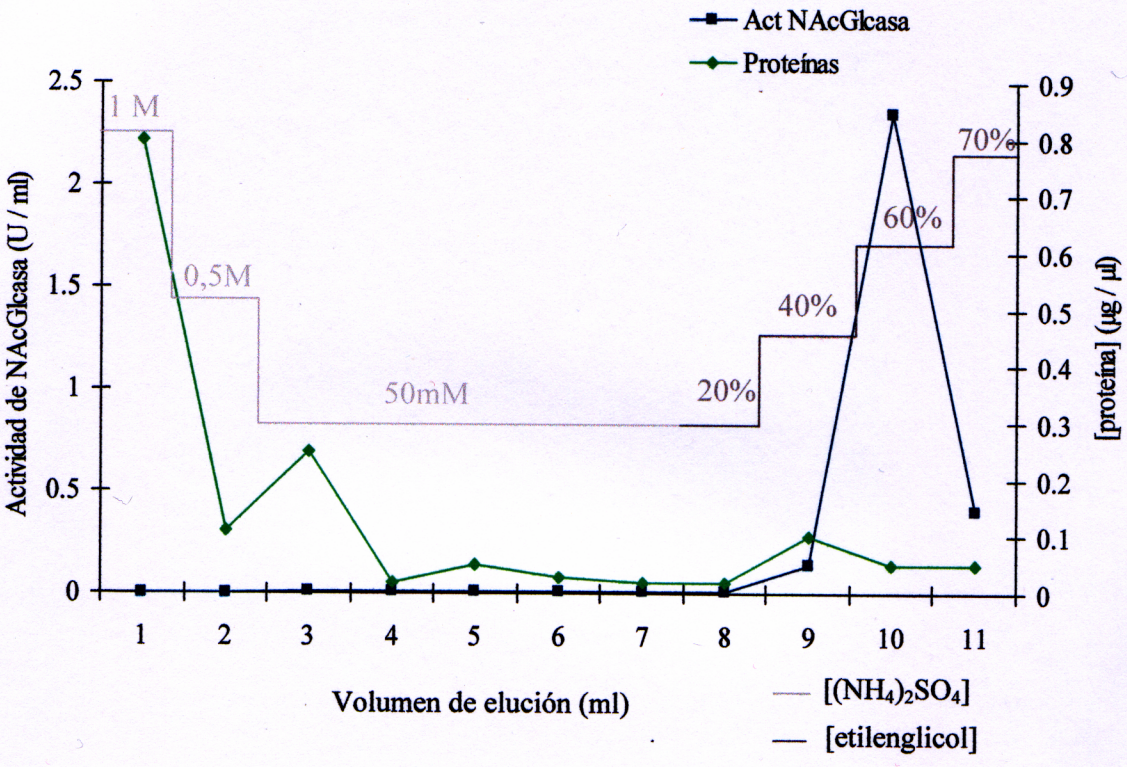

Fig 18 ***Cromatografía de interacción hidrofóbica.*** El extracto total de espermatozoides (1 mg / ml) fue precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ 1M y el sobrenadante se sembró en una columna de Phenyl Sepharose. La elución se realizó sucesivamente con concentraciones decrecientes de $(NH_4)_2SO_4$ (línea roja), y posteriormente con etilenglicol en buffer Ringer 10% conteniendo 50 mM de $(NH_4)_2SO_4$ (línea gris oscura). Se recogieron alícuotas de 1 ml a las que se les midió actividad NAcGlcasa (expresada como U / ml) y concentración de proteínas totales (µg / µl).

Se realizaron también *cromatografías de afinidad con lectinas* para determinar si la enzima está glicosilada y poder sugerir los carbohidratos presentes en su estructura [156]. Se utilizaron matrices de Peanut aglutinin-Sepharose (PNA- Sepharose) que une restos galactosa teniendo una mayor afinidad por el disacárido β-D-Gal (1,3)-DNAcGal y

Wheat germ-Sepharose (WGA- Sepharose) que reconoce restos de NAcGlc y ácido neuramínico. Cuando se sembró extracto total de espermatozoides en ambas columnas el 98% de la actividad sembrada se detectó en la fracción no unida. Esto sugiere que la enzima no posee restos galactosa, NAcGlc o ácido neuramínico expuestos en su superficie.

Como se describió anteriormente, cuando el extracto total de espermatozoides se sembró a una columna de ConA-Sepharose, la enzima quedó retenida. La adición del azúcar competitivo, metil manosa, permitió la elución del 100% de la actividad sembrada. Esto demuestra que la enzima está glicosilada y que contiene restos manosa en su composición. Como en el caso de otras enzimas acrosomales descriptas, esta glicosidasa podría estar sometida a una N-glicosilación durante su síntesis [157; 158].

2.5. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA NAcGLcasa

Para la caracterización de la NAcGlcasa de espermatozoides se realizó una purificación parcial de la enzima utilizando las propiedades de unión a las matrices recientemente descriptas. Se partió del extracto total de espermatozoide al que se le adicionó $(NH_4)_2SO_4$ 1M. Luego de centrifugar la muestra, se sembró el sobrenadante en una columna de Phenyl-Sepharose. Las fracciones eluídas con 40 y 60% de etilenglicol, en las que se detectaron actividad NAcGlcasa, fueron dializadas e incubadas con una matriz de ConA-Sepharose. Finalmente se eluyó la enzima unida a la columna con metil manosa 0,5M y NaCl 0,5M. Luego de la diálisis, las fracciones con actividad se concentraron por liofilización. Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con

MLM

Plata (kit Sigma). Se detectaron al menos 4 bandas de masa molecular aparente de 130, 94, 45 y 29 kDa (Fig 19B). Sin embargo, cuando la fracción que posee la enzima parcialmente purificada fue resuelta en un gel nativo y teñido con el plata se detectaron sólo dos bandas (Fig 19A).

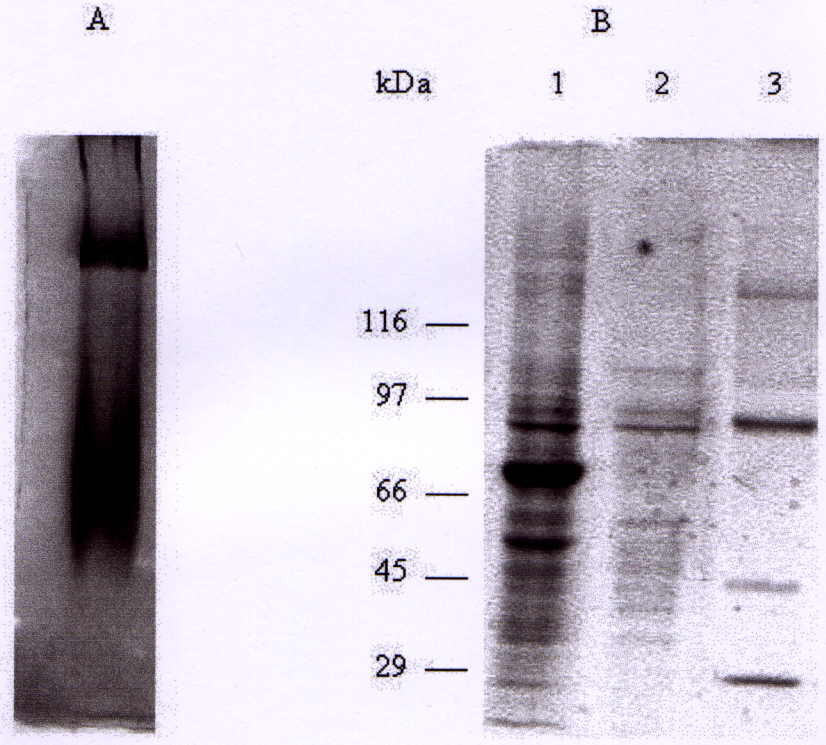

Fig 19 ***Purificación parcial a partir de NAcGlcasa de espermatozoides***. **A** *Electroforesis en condiciones nativas*. Una alícuota de la muestra parcialmente purificada (5µg de proteínas totales) fue analizada en un gel nativo (10% de acrilamida). **B** *SDS-PAGE*. Fracciones de los distintos pasos de purificación, en las que se detectó actividad NAcGlcasa, fueron separados mediante SDS-PAGE en gradiente de acrilamida 6-12% en condiciones reductoras. Calle1, extracto total de espermatozoides (20µg de proteínas totales); calle 2, fracción unida a la Phenyl Sepharose (5µg) y calle 3, fracción unida a la ConA-Sepharose (5µg). Los marcadores de masa molecular se muestran a la izquierda del gel (los números indican la masa molecular en kDa). Ambos geles fueron teñidos con plata.

2.6. PROPIEDADES DE NAcGlcasa

2.6.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Para el estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática la reacción fue llevada acabo mediante incubación de la enzima parcialmente purificada con *p*-nitrofenilo NAcetilGlucosamina en soluciones amortiguadoras de ácido citrico y fosfato monoácido de sodio [159] cubriendo un rango de pH entre 3,0 y 8,0 y a 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 20.

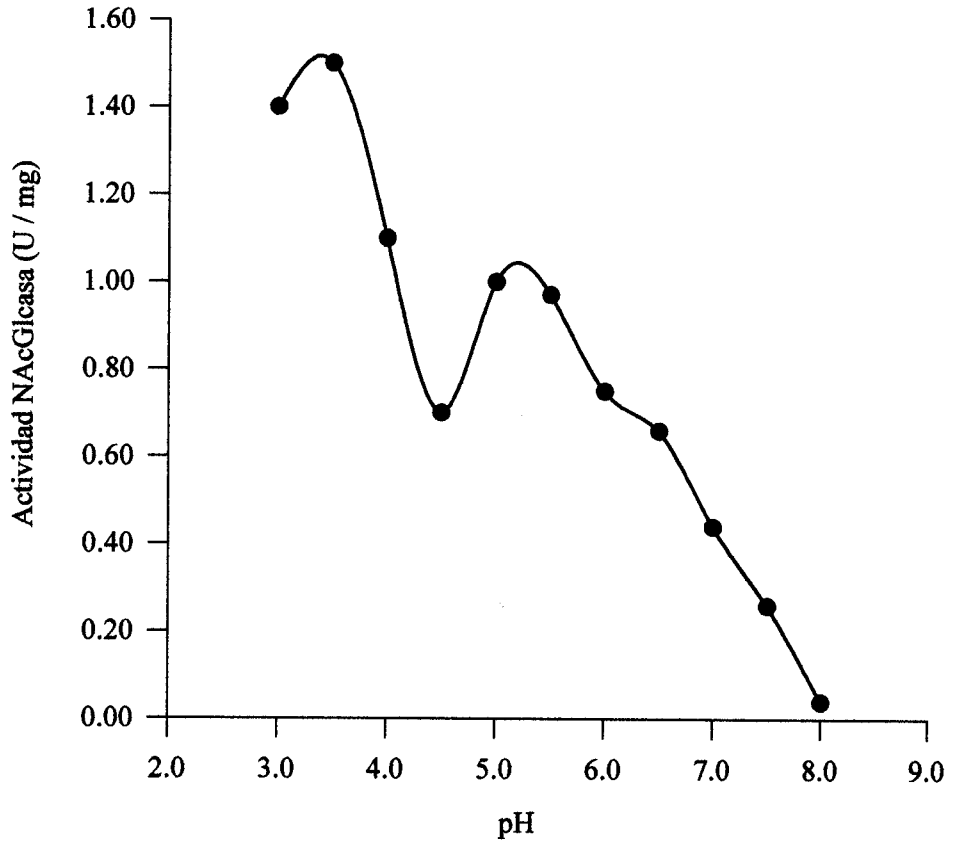

Fig 20. ***Dependencia de la Actividad de NAcGlcasa con el pH.*** Alícuotas (25µl) de la enzima parcialmente purificada fueron adicionadas a las soluciones de *p*-nitrofenil-NAc Glc en soluciones amortiguadoras de ac. cítrico-fosfato a los pHs indicados. La actividad de NAcGlcasa se expresa como U / mg.

MLM

Se detectó una máxima actividad enzimática a pH 3,5, con un pico menor de actividad a pH 5,0. Esto indicaría que podría haber más de una isoforma de la enzima con dos pH óptimos diferentes, pero esta hipótesis requiere del aislamiento de ambas formas putativas.

La actividad de la enzima se inhibe a pH mayores a 8,0. Sin embargo, cuando la enzima es preincubada a pH mayores a 8,0 durante una hora y luego se mide la actividad enzimática a pH 5,0, se observa una recuperación total de la misma. Esto podría indicar que a pHs altos no existe una desnaturalización de la enzima, sino una pérdida de la afinidad por el sustrato y/o disminución de la saturación de la enzima

2.6.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Se analizó también el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en soluciones conteniendo a la enzima parcialmente purificada. Se dejó tomar temperatura de reacción a la solución amortiguadora y al sustrato antes del agregado de la enzima. La reacción mostró un aumento de actividad enzimática con el aumento de la temperatura hasta alcanzar la óptima a 55°C, detectándose actividad entre 15 y 70°C (Fig 21). Por otro lado, se comprobó que la enzima prácticamente mantiene su actividad (sólo disminuyó un 5%) cuando luego de ser incubada a 4°C durante 4 días se midió la actividad glicosidasa a 30°C.

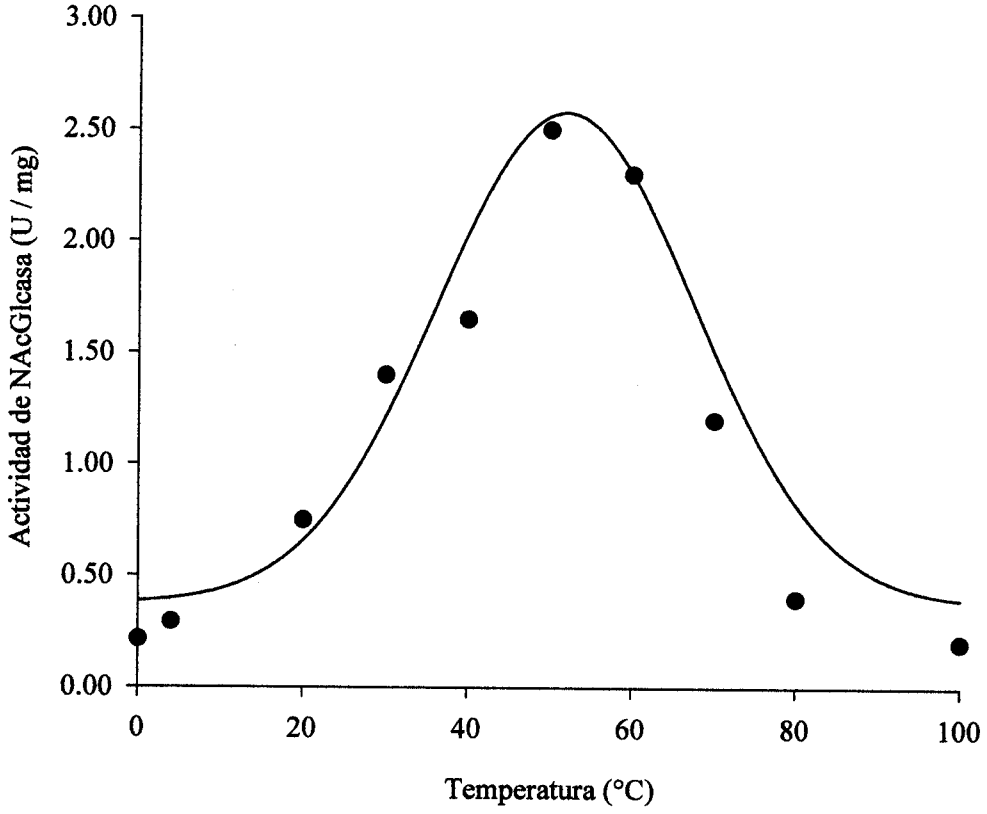

Fig 21. ***Influencia de la temperatura sobre la actividad de NAcGlcasa.*** La mezcla de reacción, conteniendo a la enzima parcialmente purificada y *p*-nitrofenil-NAcGlc 3mM en solución amortiguadora de citrato pH 3,6, fue incubada durante 30 min. a la temperatura de reacción indicada en el gráfico. La actividad de NAcGlcasa se expresa como U / mg.

2.6.3. Requerimiento catiónico

Debido a que numerosas actividades enzimáticas requieren de la presencia de determinados iones se realizó el estudio de posibles requerimientos catiónicos de la NAcGlcasa. La enzima fue preincubada durante 10 min con los iones Ba^{2+}, Mg^{2+},Ca^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 11). La actividad enzimática detectada aumentó al doble en presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} 0,2mM en comparación con los controles, mientras que Ba^{2+}, Mn^{2+} y Zn^{2+}

MLM

no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de la misma. Además, la actividad fue menor cuando se determinó en presencia de EGTA, corroborando la dependencia con los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+}.

Catión	Actividad de NacGlcasa (U / mg)
Control	0,79
Ca^{++}	1,65
Mg^{++}	1,62
Mn^{++}	0,70
Ba^{++}	0,79
Zn^{++}	0,78

Tabla 11. ***Requerimiento catiónico de la actividad de NAcGlcasa***. La actividad de la enzima parcialmente purificada se determinó en presencia de 0,2mM de los diferentes cationes mencionados en la columna de la izquierda. En el control la actividad de la enzima se midió sin el agregado de dichos cationes o EGTA. Los datos representan los valores de actividad de la glicosidasa, expresados como U / mg.

2.6.4. Determinación del tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión molecular

Se determinó el peso molecular de la enzima mediante cromatografías de filtración en gel. En primer lugar se realizó una cromatografía de exclusión molecular con una matriz de Sephacryl 200. Una fracción de MA, obtenida como se describe en 3.2, Cap III, se sembró en la columna y se realizaron las correspondientes medidas de concentración de

proteínas y actividad de NAcGlcasa en las fracciones eluídas. La Fig 22 muestra que la enzima es apenas incluida en la matriz.

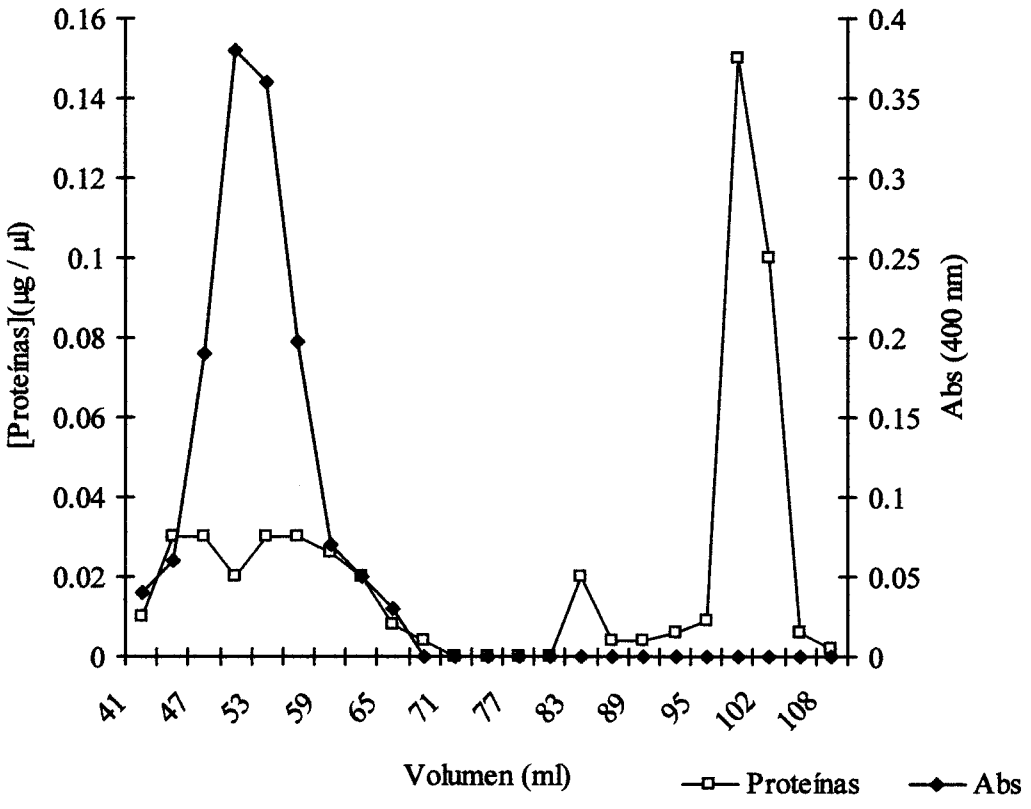

Fig. 22 ***Cromatografía de exclusión molecular en una matriz de Sephacryl 200.*** La fracción de matriz acrosomal (2 mg de proteínas totales) fue sembrada en una columna de Sephacryl 200. Luego de descartar el volumen muerto (40 ml), se recogieron las fracciones eluídas (3 ml). Se midió a cada una actividad (expresada como absorbancia a 400nm) y concentración de proteínas totales (expresada como µg /µl)

Para una mejor determinación de la masa molecular se realizaron análisis por HPLC en una columna BioSil Sec 250. La muestra fue previamente sometida a la purificación parcial mediante cromatografías de interacción hidrofóbica y de afinidad como se describió anteriormente. La corrida cromatográfica en HPLC en presencia de

Tritón X-100 permitió estimar una masa molecular 45-50 kDa (Fig 23). Sin embargo, cuando el mismo experimento se realizó en ausencia de detergente se detectó un segundo pico con actividad correspondiente a una masa molecular de 190-200 kDa.

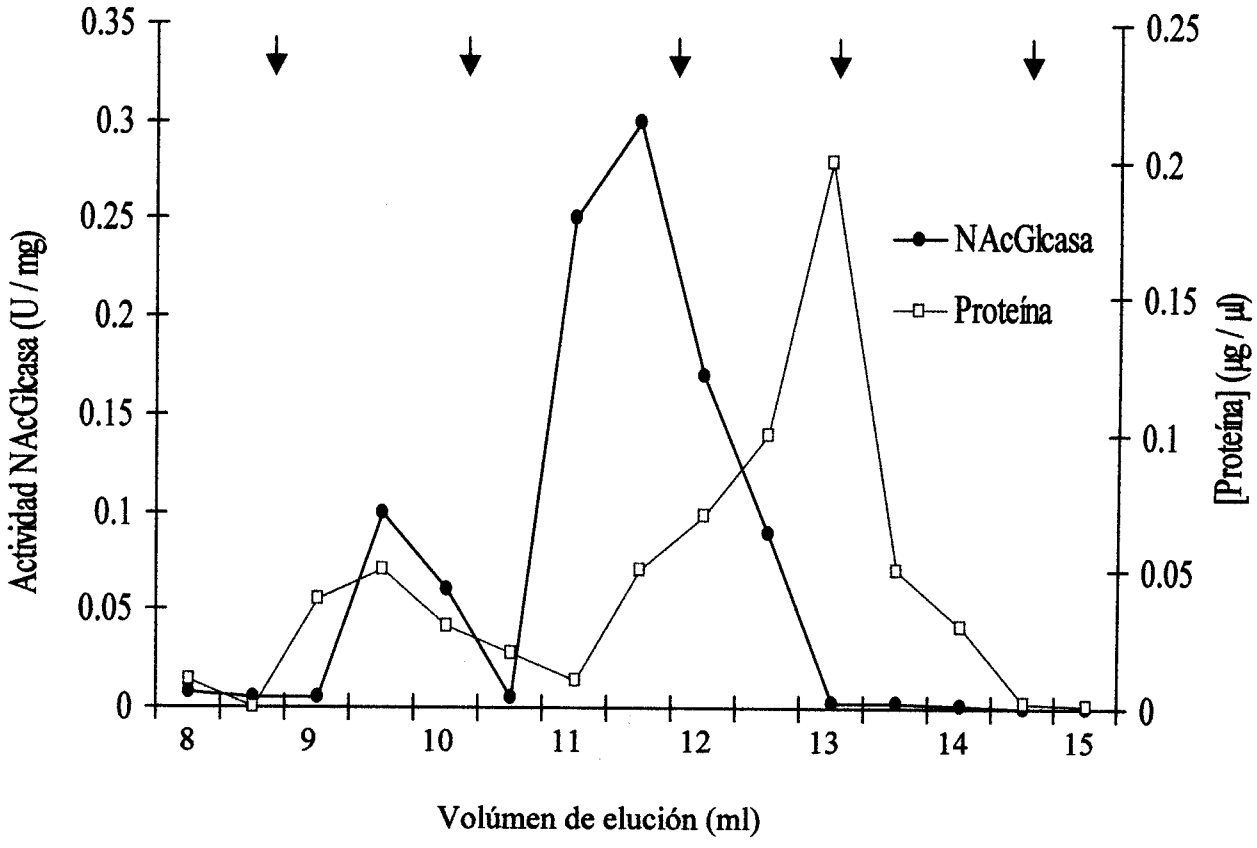

Fig 23. ***Exclusión molecular en HPLC de la NAcGlcasa.*** La enzima parcialmente purificada (0,5 mg de proteína total) en buffer fosfato pH 7,0 se sembró en una columna BioSil Sec. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se midió en cada una la actividad enzimática y la concentración de proteínas. Las flechas muestran el volumen de elución de los marcadores de masa molecular, de izquierda a derecha, de: 660, 158, 44, 17 y 1,35 kDa.

MLM

2.7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Como fue descripto anteriormente, la mayor actividad NAcGlcasa se encontró fundamentalmente en la fracción soluble del contenido acrosomal. Sin embargo, también se detectó actividad unida al espermatozoide reaccionado.

La suspensión de espermatozoides reaccionados fue lavada exhaustivamente hasta no detectar actividad enzimática en los lavados. Incubaciones de estos espermatozoides con solución de ClNa 0,5M y EDTA 5mM no fueron capaces de liberar actividad enzimática (Fig 24). La enzima requirió de la adición del detergente no iónico Triton X-100 al último sedimento para una completa solubilización. Estos resultados sugieren que una fracción de la enzima, aproximadamente el 15-20% de la actividad total detectada en el espermatozoide, está asociada a las membranas, probablemente a la membrana acrosomal interna.

MLM

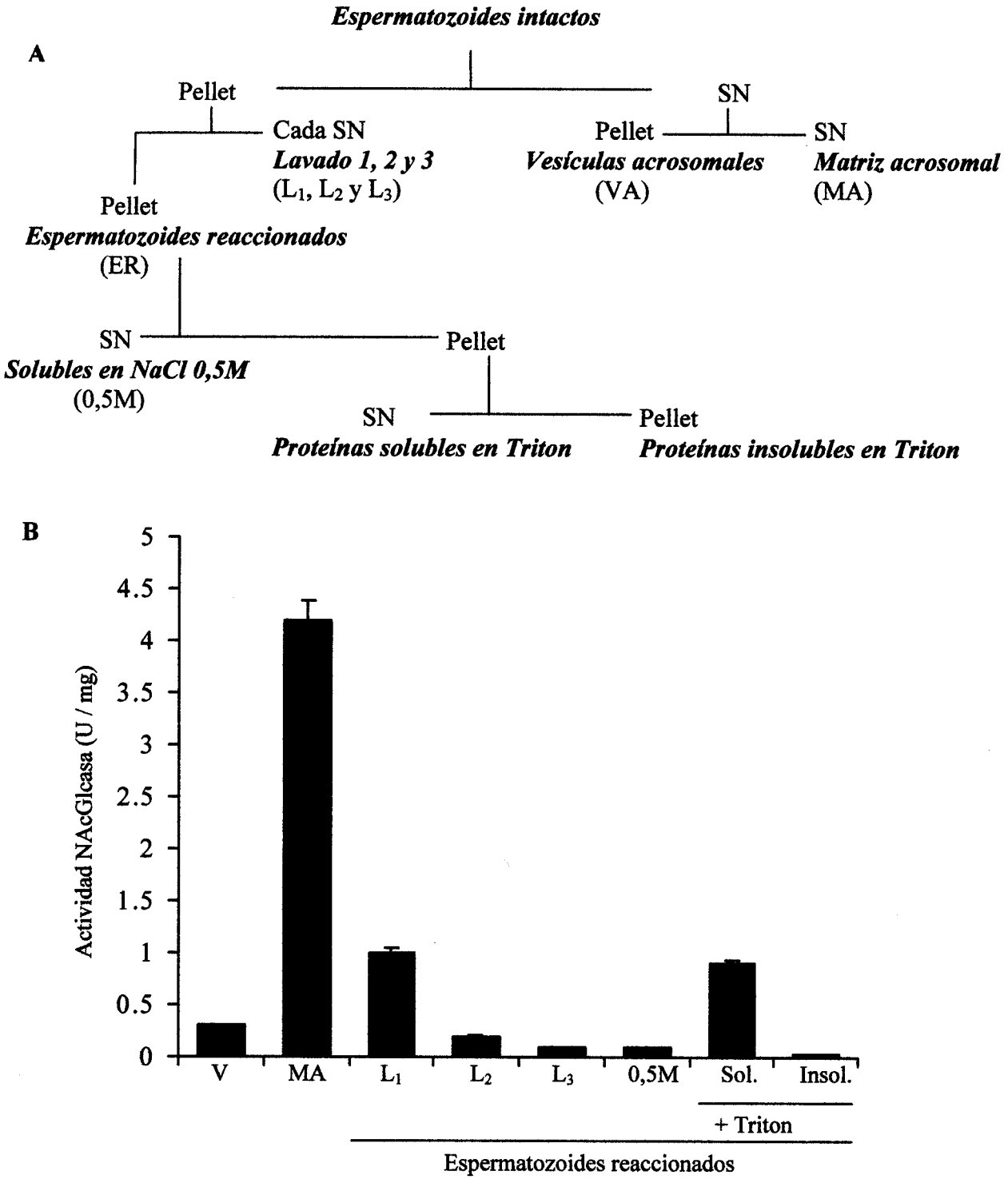

Fig 24. ***Localización subcelular de NAcGlcasa.*** **A.** Diagrama de las diferentes fracciones subcelulares obtenida a partir de una suspensión de espermatozoides intactos. En negrita cursiva se destacan los nombres asignados a las fracciones y entre paréntesis se muestra la abreviatura para cada una de ellas. **B.** Alícuotas de las distintas fracciones subcelulares fueron incubadas con *p*-nitrofenil-NAcGlc 3 mM en buffer citrato pH 3,6 y se determinó la actividad de NAcGlcasa. Los datos muestran los valores de actividad específica expresados como U/mg. SN: sobrenadante

2.8. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

Se analizó la actividad de la NAcGlcasa en función del tiempo de incubación con el *p*-nitrofenil-glucosido correspondiente . Las reacciones fueron detenidas a 0, 10, 20, 30, 60 y 90 min y se midió espectrofotométricamente la liberación del *p*-nitrofenol. En la Fig 25 se muestra que el aumento de la absorbancia es directamente proporcional al incremento del tiempo hasta los 60 minutos.

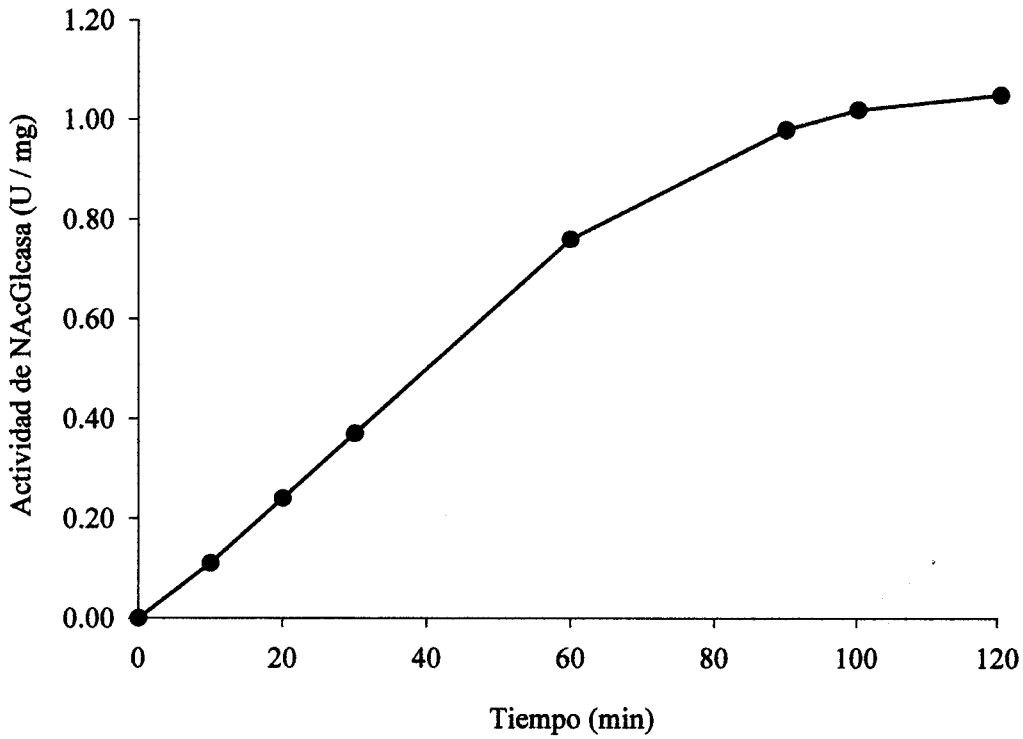

Fig 25 ***Actividad de NAcGlcasa en función del tiempo.*** Se midió actividad a la mezcla de reacción contenía la enzima parcialmente purificada y *p*-nitrofenil NAcGlc 3mM en buffer citrato pH 3,6. Luego de incubar la mezcla a 30°C durante el tiempo especificado, se midió el *p*-nitrofenol liberado. Los valores de actividad se expresan como U / mg.

En base a estos resultados se estableció, para los sucesivos ensayos de actividad, un tiempo de incubación de la mezcla de reacción de 30 min.

Los análisis de cambios en la velocidad de reacción de la enzima NAcGlcasa en función de la concentración de sustrato permitieron establecer que la enzima tiene un comportamiento cinético hiperbólico. Por lo tanto, para la estimación de los parámetros cinéticos se realizó un ajuste no lineal a la siguiente ecuación: $v = V_{max} \times [S]/ (K_m + [S])$. De esta manera se estimó una V_{max} aparente de 3,18 ± 0,10 (U/ mg) y una K_m para *p*-nitrofenil-NAcGlc de 0,25mM ± 0,04 (Fig 26).

Los ensayos de inhibición se realizaron con los azúcares N-Acetil Glucosamina y N-Acetil Galactosamina por separado utilizando concentraciones crecientes de los mismos hasta 20mM. La actividad se midió con concentraciones del sustrato *p*-nitrofenil-NAcGlc entre 0,24 y 7mM en solución amortiguadora citrato pH 3,6. Los resultados, presentados en la Fig 27, muestran que NAc Gal es un potente inhibidor de la actividad de NAcGlcasa. El gráfico de la doble recíproca de velocidad versus la concentración de sustrato (Lineweaver-Burk) muestra que la inhibición es de tipo competitiva (Fig 27A). La K_i de 1,5mM fue calculada mediante el gráfico de Dixon (Fig 27B).

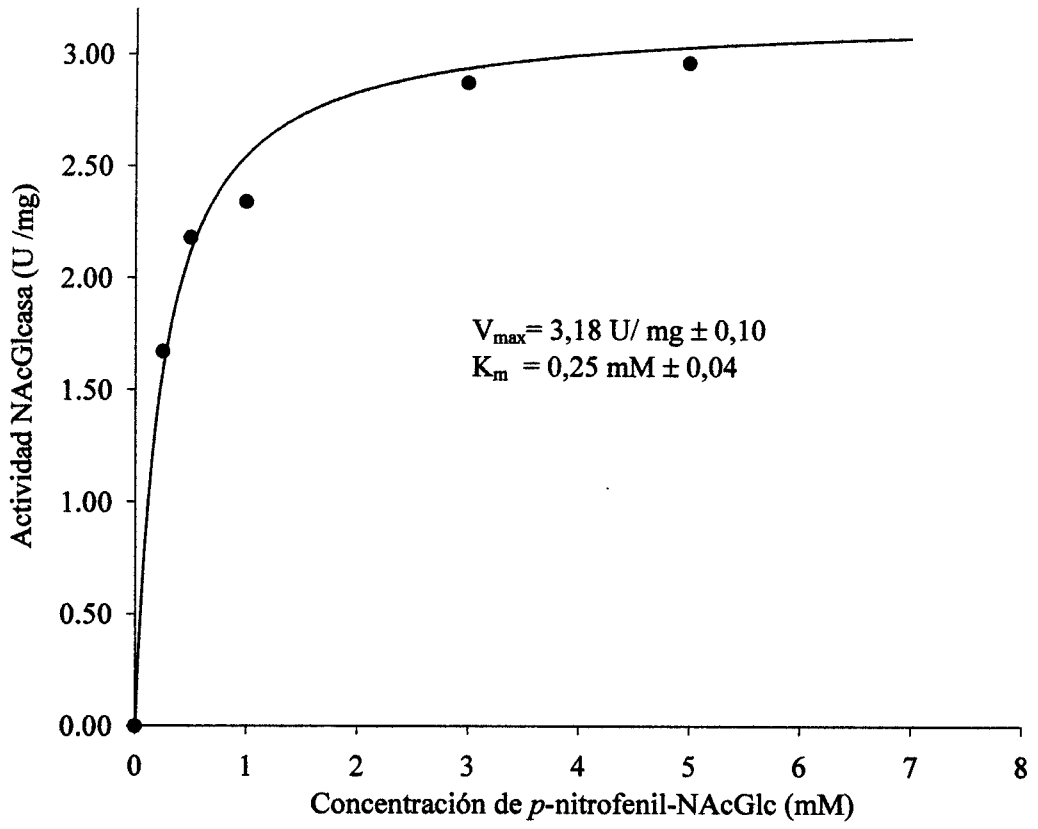

Fig. 26. ***Representación de la actividad de NacGlcasa en función de la concentración de sustrato.*** Se midió la actividad de la enzima (expresada como U/ mg) en presencia de distintas concentraciones de *p*-nitrofenil NAcGlc. El ajuste de la curva a una hipérbola permitió estimar los valores de V_{max} y K_m aparentes que se señalan en el gráfico.

2.9. PURIFICACIÓN DE LA NAcGlcasa

Como un paso importante en el estudio de la función de la NAcGlcasa se realizó la purificación de la misma. Se utilizó como material de partida homogenado de hígado de *Bufo arenarum*, debido a que la disponibilidad de este material es considerablemente mayor.

MLM

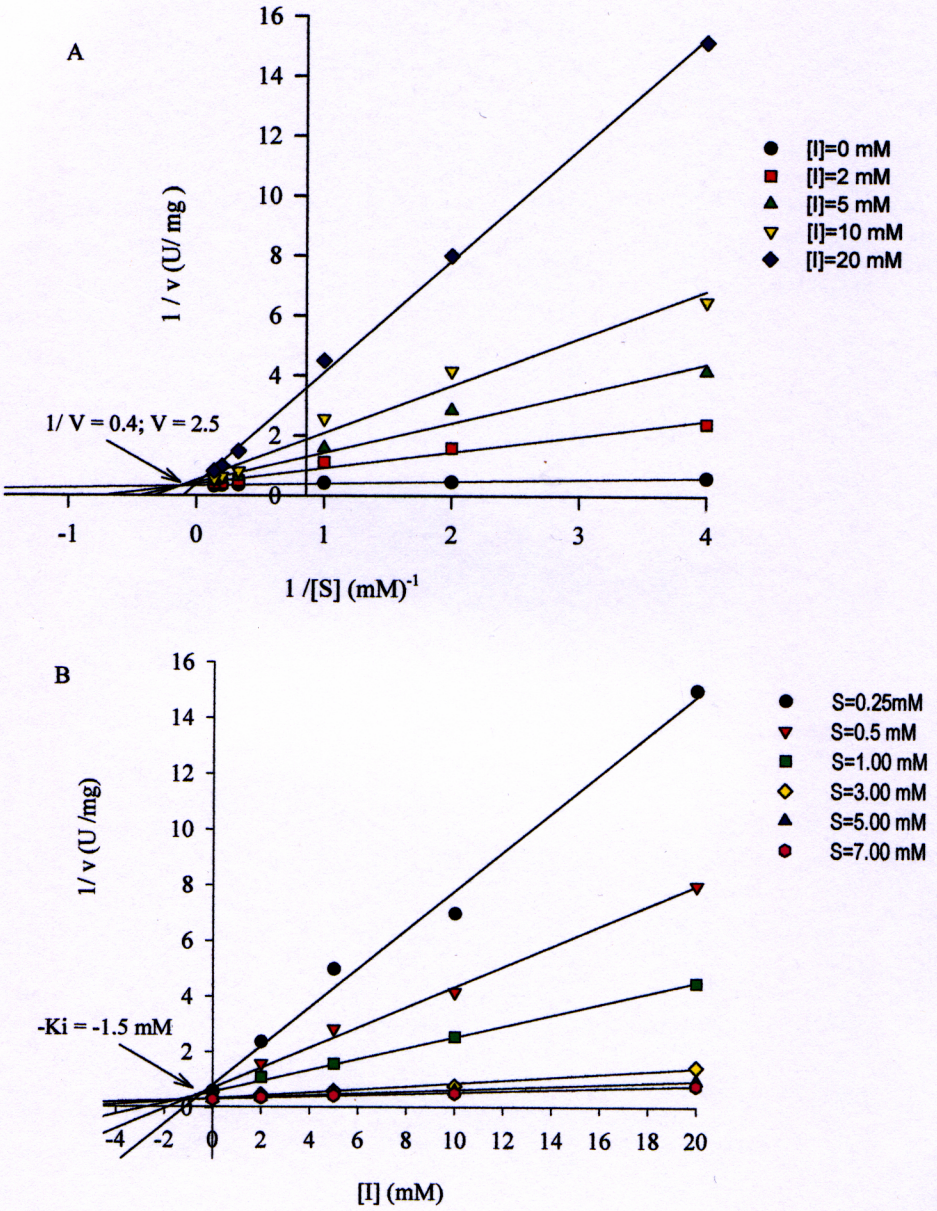

Fig 27. ***Inhibición competitiva por NAcGal.*** Se midió la actividad enzimática de la NAcGlcasa parcialmente purificada en presencia de distintas concentraciones del azúcar NAcGal. La reacción comenzó con el agregado de 0,25, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 ó 7,0 mM de *p*-nitrofenil-NAcGlc en solución amortiguadora de citrato pH 3,6. **A.** El gráfico muestra la doble recíproca de la actividad en función de la concentración de *p*-nitrofenil NAcGlc (Lineweaver-Burk). Se muestra la V_{max} aparente obtenida. **B.** Gráfico de la recíproca de la actividad en función de la concentración del inhibidor (NAcGal). Se señala la K_i obtenida para dicho inhibidor.

Para determinar si las actividades enzimáticas, detectadas en hígado o espermatozoides podían atribuirse a la misma proteína se realizaron diferentes estudios: a) Anticuerpos policlonales contra NAcGlcasa reconocen una banda de igual peso molecular aparente en SDS-PAGE en muestras de ambos orígenes (Fig 29). b) La enzima de ambas fuentes presenta máxima actividad a pH 3,6 y a 55°C. c) Ambas quedan fuertemente retenidas en una columna de Phenyl-Sepharose y ConA-Sepharose. Estos resultados muestran que las características estudiadas para la NAcGlcasa de hígado y de espermatozoides son idénticas.

El procedimiento de purificación fue llevado a cabo partiendo de 70 mg de proteínas totales del homogenado de hígado. Luego de resolver esta muestra en un gel nativo se detectó la actividad con el sustrato fluorescente 4-MU-NAcGlc. Como se describió anteriormente, la actividad de NAcGlcasa no se altera luego de someter a la enzima a las condiciones de la corrida electroforética, es decir, pH 8,8 y 4°C durante 12 horas. La banda activa fue cortada e incubada en solución amortiguadora citrato 400mM durante toda la noche. Posteriormente, se sometió a la muestra eluída del gel a una cromatografía de afinidad en una columna de ConA-Sepharose. La enzima purificada se resolvió electroforéticamente en un gel nativo y se detectó una única banda teñida con plata (Fig 28 A) que se corresponde con la migración de la enzima al revelar la actividad en el gel. Cuando se analizó la misma muestra en un SDS-PAGE una única banda de una masa molecular aparente de 45 kDa fue visualizada al revelar el gel con plata (Fig 28B). Esta misma banda fue detectada luego de transferir las proteínas resueltas

MLM

electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y revelarla por inmunoreacción con anticuerpos policlonales anti-NAcGlcasa (Fig 28 C).

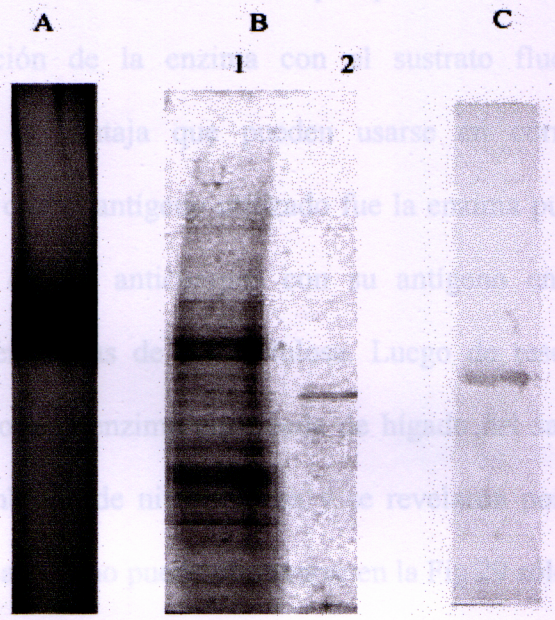

Fig 28. ***Purificación de NAcGlcasa a partir de homogenado de hígado***. La purificación de la enzima fue realizada como se describe en Materiales y Métodos. **A** La muestra purificada fue analizada mediante electroforesis en condiciones nativas (10%). **B** Alícuotas de 15µl se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras. El gel de separación se realizó en gradiente de acrilamida 6-12%. Calle 1, homogenado de hígado (15µg de proteínas totales), calle 2, enzima purificada (1µg). Luego de ambas electroforesis los geles se tiñeron con plata. **C** Una alícuota de la enzima purificada a homogeneidad (1µg) y resuelta en SDS-PAGE (6-12% de acrilamida) fue transferida a una membrana de nitrocelulosa y revelada con anticuerpos anti-NAcGlcasa y anticuerpos anti-IgG total de conejo marcados con peroxidasa.

MLM

2.10. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-N-AcGlcasa

Se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejo contra NAcGlcasa para ser utilizados en ensayos biológicos. Por otro lado, los anticuerpos pueden utilizarse como un método alternativo a la detección de la enzima con el sustrato fluorescente en análisis electroforéticos y con la ventaja que pueden usarse en corridas en condiciones desnaturalizantes. Dado que el antígeno utilizado fue la enzima purificada de poroto, se verificó la reactividad de los anticuerpos con su antígeno en *Bufo arenarum* por inmunodetección en membranas de nitrocelulosa. Luego de resolver las muestras de homogenado de testículo y la enzima purificada de hígado del sapo en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron por inmunoreacción con antisuero anti-NAcGlcasa. Como puede observarse en la Fig 29 sólo se detecta una banda reactiva correspondiente a un peso molecular aparente de 45 kDa en las muestras de ambas fuentes. Las bandas inmunoreactivas presentes en ambos homogenados parecen ser específicas ya que no fueron detectadas en la inmunotransferencia realizada con el suero preinmune (Fig 29B).

MLM

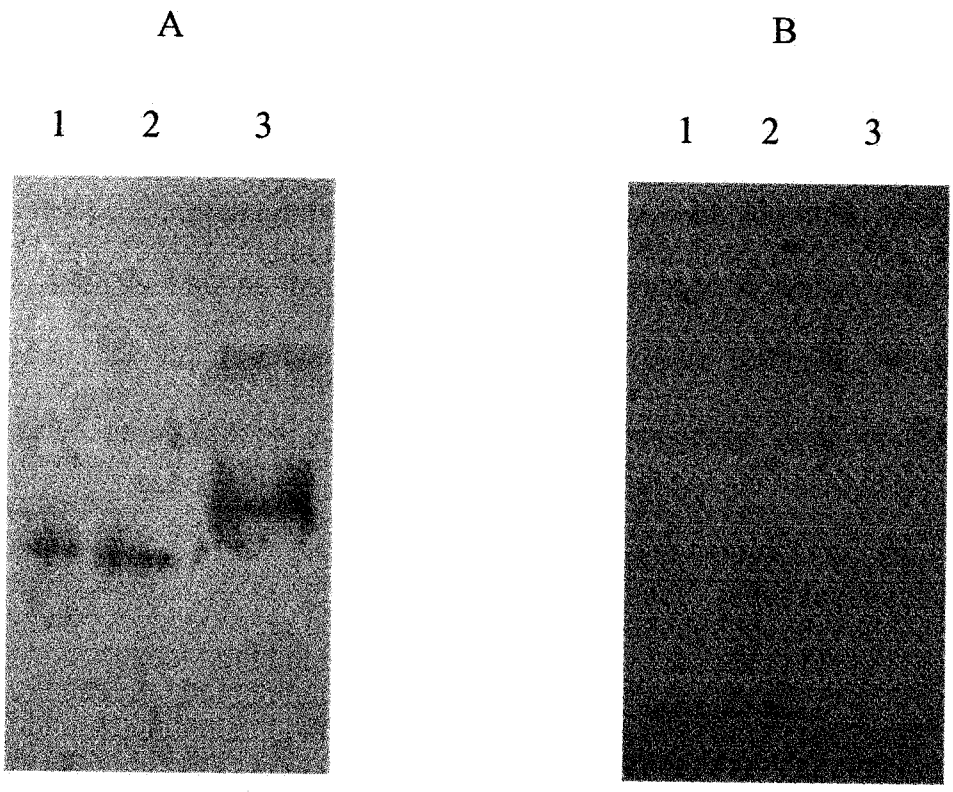

Fig 29. ***Inmunodetección de NAcGlcasa de distintos orígenes***. Homogenados de testículos e hígado de *Bufo arenarum* y NAcGlcasa de poroto (20µg de proteínas totales/calle) se analizaron por SDS-PAGE 10%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló con anticuerpos anti-NAcGlcasa (**A**) o suero preinmune (**B**). Calle 1, homogenado de testículo, calle 2, homogenado de hígado, calle 3: NAcGlcasa de poroto.

2.11. ENSAYOS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Se analizó la posible participación de la enzima NAcGlcasa en la fecundación en *Bufo arenarum* mediante ensayos de fecundación *in vitro*. Para ello se incubaron espermatozoides con ovocitos en diferentes medios suplementados con inhibidores o competidores de la enzima. Como se mencionó anteriormente, la NAcGlcasa es inhibida por los azúcares NAcGal y NAcGlc. Alternativamente, se bloqueó la enzima por el agregado de anticuerpos anti-NAcGlcasa o se utilizó la enzima purificada de hígado como competidora de la presente en los espermatozoides.

En los controles, la fecundación fue llevada a cabo en el medio salino habitual (Ringer 10%) y el porcentaje de ovocitos fecundados fue entre 70 y 80%. Por el contrario, la fecundación *in vitro* de ovocitos se redujo al 1% cuando se realizó en presencia de anticuerpos (Fig 30). Los controles específicos con suero preinmune demostraron la especificidad del anticuerpo, ya que, en este caso el porcentaje de ovocitos fecundados fue entre 65-80%.

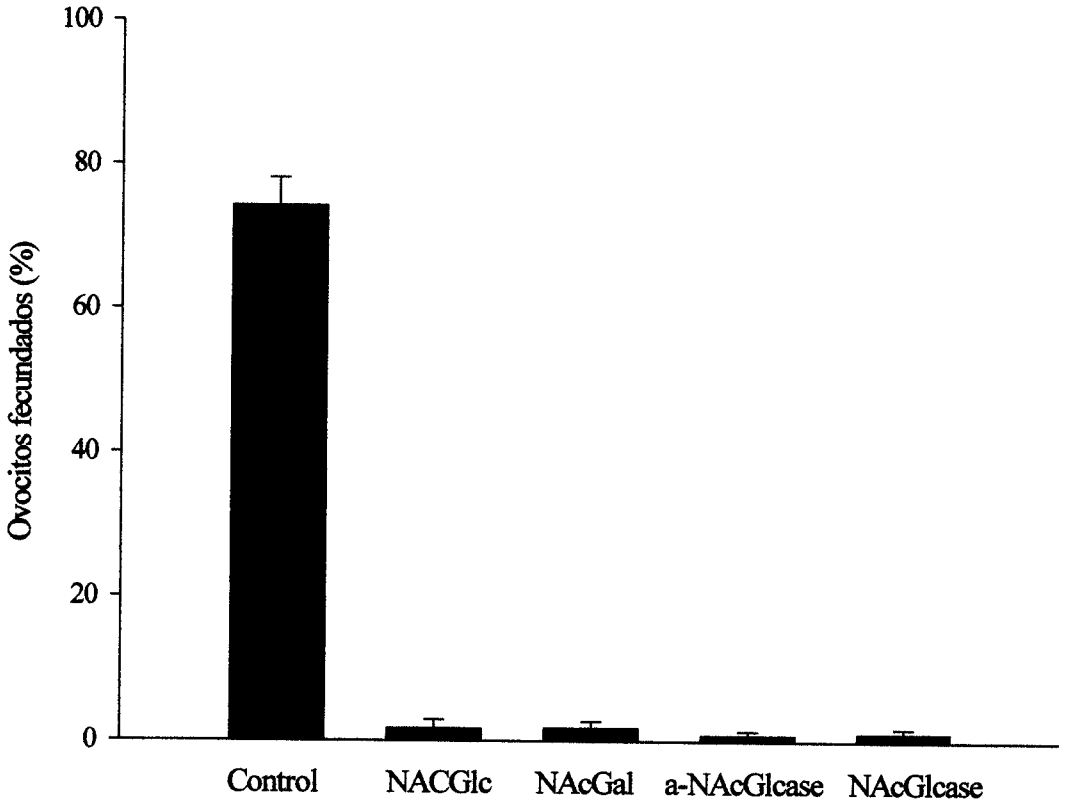

Fig 30. ***Ensayos de fecundación in vitro***. Ovocitos sin cubierta gelatinosa fueron incubados con 25µl de la suspensión de espermatozoides (10^6 células/ ml) en distintos medios que contenían: Ringer 10% (*Control*), 0,1M de *NAcGlc*, 0,1M *NAcGal*, anticuerpos anti-NAcGlcasa en una dilución 1:100 (*a-NAcGlcasa*) ó 0,12 µg de *NAcGlcasa*. Los datos representan el porcentaje de ovocitos fecundados y las barras de error el desvío medio standard de 8 experimentos independientes donde se evaluaron al menos 50 ovocitos en cada uno.

fecundación de manosa 0,1 M y el porcentaje de ovocitos fecundados se mantuvo entre 70 y 75 %.

El bloqueo de la fecundación también fue provocado por el agregado de la enzima purificada observándose sólo un 1% de los ovocitos fecundados en estas condiciones. Cuando la enzima purificada fue inactivada por calentamiento los porcentajes de ovocitos fecundados fueron similares a los controles (70%).

En conjunto, estos resultados indicarían que la NAcGlcasa juega un importante rol en la fecundación de sapos.

3. DISCUSIÓN

Los espermatozoides de Anfibios deben atravesar la cubierta gelatinosa y EV antes de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito [148;149]. Se ha demostrado que la incubación de espermatozoides con EV aislada provoca la reacción acrosómica, permitiendo la liberación de proteasas y glicosidasas al medio. Existen numerosas evidencias experimentales sobre la participación de estas enzimas en la fecundación. Las glicosidasas y glicosiltransferasas están implicadas tanto en la interacción entre gametas como en la penetración a través de las cubiertas del ovocito en especies de animales filogenéticamente muy distantes [56; 137;140-143;147;160;161].

Glicosidasas en espermatozoides de Bufo arenarum

En espermatozoides de *Bufo arenarum* se detectaron las actividades de NAcGlcasa, β–D-Galactosidasa, β-D-Glucosidasa, α-D-Manosidasa y NAcetil Galactosaminidasa. También se determinaron bajos niveles de actividad de α-D-Glucosidasa y α-L-Fucosidasa (con valores 20 veces menores que NAcGlcasa). En base a los resultados presentados en este trabajo se sugiere que las actividades de las glicosidasas mencionadas están asociadas a moléculas diferentes. La única excepción se encontró con las actividades NAcGlcasa y NAcetil Galactosaminidasa que posiblemente puedan ser atribuidas a la misma proteína. La enzima purificada de hígado en este trabajo posee las dos actividades, por lo que sería posible adjudicar a la enzima NAcGlcasa de

espermatozoides ambas actividades catalíticas. Además, la mayoría de las NAcGlcasas descriptas tienen también actividad NAcetil Galactosaminidasa [154].

Los estudios de la ***distribución subcelular*** de cada una de las seis glicosidasas analizadas revelaron que, en todos los casos, la mayor actividad está presente en la fracción acrosomal. Sin embargo, en la fracción de las membranas del espermatozoide se detectó actividad de α-Manosidasa. La asociación de esta enzima a la membrana fue corroborada por la necesidad de agregar Tritón X-100 para la completa solubilización de la glicosidasa. La presencia de la manosidasa asociada a las membranas podría llegar a ser un interesante tema de estudio dado que numerosas enzimas asociadas al espermatozoide intacto fueron informadas como receptores de moléculas presentes en el ovocito [141; 142; 143]. Además, cuando se enmascaran los restos manosa de la EV de los ovocitos de *Bufo arenarum* se pierde la capacidad de éstos de ser fecundados sugiriendo que estos restos pueden estar implicados en la unión entre gametas [75].

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar las actividades glicosidasas presentes en espermatozoides de *Bufo arenarum* posiblemente involucradas en la fecundación. Las incubaciones de espermatozoides con la EV de ovocitos homólogos mostraron que la única glicosidasa que interaccionó con la EV fue la NAcGlcasa, sugiriendo que ésta puede tener alguna participación en el proceso de fecundación. Por otro lado, se informó que la liberación de la NAcGlcasa de los gránulos corticales de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* inhibe la unión posterior del espermatozoide con el mismo [82;162]. En trabajos con otras dos especies de Anfibios, *Xenopus laevis* y *Bufo japonicus*, se vio que la remoción o enmascaramiento de restos NAcGlc del ovocito

reduce la unión del espermatozoide [76;77;79]. Estos resultados sugieren que los residuos NAcGlc participan en la fecundación en Anfibios. Por estas observaciones, el análisis de la enzima resultó un tema de estudio importante como un paso en la comprensión de su función en la fecundación.

Estudio de la NAcGlcasa de espermatozoides

El proceso de purificación desarrollado en este trabajo es un método relativamente rápido ya que sólo requiere de dos pasos. Esto evita la pérdida de actividad que se observaba con los sucesivos pasos en protocolos más largos. En este protocolo de purificación se partió de un homogenado de hígado, lo que constituyó una ventaja dado que la cantidad de la enzima en este material es alta. Los estudios por SDS-PAGE e Inmunodetección usando anticuerpos policlonales anti-NAcGlcasa, revelaron una única banda en las muestras de la enzima de espermatozoides y de la purificada de hígado. En ambos casos la banda posee una masa molecular aparente de 45kDa. Los análisis de la enzima de testículo, mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC en presencia de Tritón X-100, muestran un pico de actividad correspondiente a una proteína de masa molecular de 45 kDa. Sin embrago, cuando la cromatografía se llevó a cabo en ausencia de detergente, se detectó un pico de mayor actividad aproximadamente a los 190-200 kDa. Estos resultados, junto con los obtenidos mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección, sugieren que la NAcGlcasa puede presentarse como un tetrámero constituida por subunidades de 45 kDa, cada una de las cuales tiene actividad catalítica. Si bien, muchas NAcGlcasas informadas se presentan

como dímeros (hetero u homodímeros) [56;142] se describió la posibilidad de que la enzima sea multimérica [163-165]. Las subunidades podrían estar ensambladas mediante interacciones hidrofóbicas dado que el pico de actividad a 190-200 kDa fue detectado sólo en ausencia de detergente no iónico.

La enzima en estudio posee características informadas para otras enzimas acrosomales: posee un pH óptimo acídico y queda fuertemente retenida en una columna de ConA-Sepharose indicando que la glicosidasa está manosilada como ocurre en otras enzimas acrosomales [142;157;158;166;167] Más aún, dado que la elución de la NAcGlcasa de *Bufo arenarum* de la columna de ConA-Sepharose requiere altas concentraciones del azúcar (más de 0,1 M), los oligosacáridos deben ser N-unidos y del tipo híbrido o alta manosa pero no del tipo complejo [168]. Sería interesante conocer la estructura de la cadena de azúcares unidos dado que las cadenas de oligosacáridos son importantes en el empaquetamiento y transporte intracelular de las glicosidasas (revisto en [169;170]). Esto permitiría dilucidar cómo estas glicosidasas son dirigidas al acrosoma.

Los estudios de las ***propiedades cinéticas*** mostraron que la NAcGlcasa posee una V_{max} aparente 3,18 ± 0,10 (U/ mg) y una K_m para *p*-nitrofenil-NacGlc de 0,25mM ± 0.04. En otros casos informados las K_m para el mismo sustrato están igualmente en el orden mM, entre 0,55 y 0,77mM, son todos superiores al determinado para la NAcGlcasa estudiada en este trabajo, sugiriendo que la enzima de *Bufo arenarum* posee una mayor afinidad por el sustrato [82;142;164;171].

MLM

El monosacárido NAcGal inhibe en forma competitiva la actividad de la NAcGlcasa. El residuo NAcGal no está expuesto en la EV de ovocitos homólogos [131]. Por lo tanto, si la enzima actúa en la fecundación este residuo no sería su sustrato. Sin embargo, una vez que el ovocito fue fecundado, la EV sufre una serie de modificaciones, debido a la actividad enzimática del contenido de los gránulos corticales, constituyendo la envoltura de fecundación [172]. En esta nueva envoltura están presentes residuos NAcGal [131].

Las ***condiciones de máxima actividad*** de la NAcGlcasa son a 55°C y a un pH acídico. Cuando se mide la actividad a temperaturas similares a las del medio de fecundación (18-22°C), la actividad de la glicosidasa sigue siendo la mayor actividad glicosidasa medida en el espermatozoide. Este hecho puede ser interesante si además se considera que la envoltura vitelina contiene glicoproteínas con residuos terminales NAcGlc [131], que podrían ser potenciales ligandos de la enzima en cuestión. La actividad enzimática de la NAcGlcasa aumenta en presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+}. Estos datos pueden ser relevantes dado que la interacción entre el espermatozoide y la EV en ranas requiere de la presencia de al menos uno de estos cationes [77;79]. En el sapo *Bufo japonicus* dicha interacción requiere tanto de Ca^{2+} como de Mg^{2+} [76]. Por el contrario, en condiciones de baja salinidad se inhibe la interacción entre las gametas y se favorece la conversión de la envoltura de fecundación. Por lo tanto, la necesidad de aumento de la salinidad para que ocurra la fecundación también favorece el aumento de la actividad de la NAcGlcasa.

MCM

La participación de la NAcGlcasa en la fecundación fue analizada mediante pruebas biológicas *in vitro*. En este trabajo se mostró que cuando se inhibe a la enzima por la adición de anticuerpos anti-NAcGlcasa al medio de fecundación se observa una importante disminución del número de ovocitos fecundados. Este resultado podría explicarse debido a que el anticuerpo bloquea a la enzima impidiendo su acción biológica. Para corroborar que este bloqueo no es simplemente estérico, se agregaron al medio de fecundación los monosacáridos inhibidores NAcGlc o NAcGal y en estos casos también se observó una fuerte inhibición de la fecundación que no se debió a una disminución de la movilidad de los espermatozoides en este medio. Por lo tanto, la disminución del porcentaje de fecundación podría explicarse como consecuencia de la inhibición de la glicosidasa. Finalmente, el tratamiento de los ovocitos con la enzima purificada provocó prácticamente una inhibición completa de la fecundación. Estos ensayos, colectivamente, sugieren que la enzima NAcGlcasa participa en la fecundación aunque su rol preciso no se conoce.

Especulando sobre el posible rol biológico de la glicosidasa, podrían plantearse al menos dos hipótesis: 1) que la NAcGlcasa participe directamente en la interacción entre gametas; 2) que la enzima sea requerida en la penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito. En la interacción entre gametas se han propuesto distintas glicosidasas unidas a la membrana del espermatozoide como los receptores de los ligandos presentes en el ovocito. En este trabajo la NAcGlcasa es la única glicosidasa que se une *in vitro* con la EV en condiciones de baja osmolaridad y pH 7,2, que simulan las condiciones del medio de fecundación. Esta interacción sin catálisis podría ocurrir dado

MLM

que la enzima tiene un pH óptimo acídico y la velocidad de hidrólisis a pH alcalinos es baja. Entonces, la unión con la cubierta podría ocurrir en el pH alcalino del medio de fecundación. Sin embargo, la baja especificidad de las glicosidasas en comparación, por ejemplo, con la galactosiltransferasa que ha sido propuesta en la interacción entre gametas en ratón [133], sería una desventaja en su rol como receptor. En la segunda hipótesis se propone que la enzima podría participar en la penetración del espermatozoide. En Mamíferos existen evidencias que la NAcGlcasa detectada dentro del acrosoma cumple esta función en la fecundación [56;166;173]. En este caso podría funcionar catalíticamente removiendo los residuos NAcGlc o funcionar en una manera de tipo lectina enmascarando dichos residuos. Los ensayos de actividad enzimática mostraron que la glicosidasa posee máxima actividad a pH ácidos y se inhibe reversiblemente a pH superiores a 8,0. Teniendo en cuenta que la fecundación se lleva a cabo a pHs neutros, la NAcGlcasa podría actuar uniéndose y enmascarando residuos NAcGlc. Sin embargo, considerando que la enzima se encuentra en el acrosoma, podría ocurrir también que tenga una función catalítica. Este hecho podría explicarse si se considera que el pH interior del acrosoma es acídico y que, luego de la reacción acrosómica el microambiente que se genera podría ser suficientemente ácido como para permitir que la enzima manifieste su actividad hidrolítica.

Un paso importante en el análisis de la función biológica de la enzima NAcGlcasa es la determinación de su localización subcelular. La reacción acrosómica libera las enzimas acrosomales y expone una nueva superficie del espermatozoide: la membrana acrosomal interna. Los estudios presentados en este trabajo revelan que la mayor

actividad de la NAcGlcasa se encuentra en la MA. Sin embargo, aproximadamente un 10% de la actividad de la enzima de todo el espermatozoide se encuentra asociada a la membrana de la gameta reaccionada. Además, la actividad de la glicosidasa queda fuertemente retenida en una matriz de interacción hidrofóbica (Phenyl- Sepharose). Este resultado sugiere que la glicosidasa posee grupos hidrofóbicos expuestos en su superficie que le permitirían integrarse a la membrana. Por lo tanto, la NAcGlcasa puede encontrarse tanto soluble en el acrosoma como asociada con la membrana del espermatozoide reaccionado y parece ser en este caso una proteína intrínseca. Si la enzima participa en la penetración del espermatozoide, la presencia de la glicosidasa en la MA permitiría la remoción de residuos implicados en la interacción entre gametas. Más aún, si parte de la enzima queda unida al espermatozoide reaccionado, como ocurre con otras enzimas acrosomales [174], la misma podría actuar durante toda la penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito. En este sentido, no puede descartarse una tercera hipótesis donde la NAcGlcasa soluble de la MA actúe catalíticamente a los pH ácidos acrosomales y la glicosidasa unida a la membrana interna acrosomal participe en la unión entre el espermatozoide reaccionado y el ovocito.

De acuerdo a lo expuesto en este capítulo, se concluye que la enzima NAcGlcasa es la glicosidasa con mayor actividad detectada en el espermatozoide de *Bufo arenarum*. Dado que los restos NAcGlc están presentes en ovocitos homólogos y que dichos residuos participan en la interacción con el espermatozoide tanto en sapos como en ranas, el estudio de la NAcGlcasa presente en el espermatozoide que reconoce dichos residuos resultó de sumo interés. A pesar que el rol biológico preciso todavía no se conoce, la

MLM

glicosidasa interacciona *in vitro* con EV. Más aún, la inhibición de la enzima provoca la inhibición de la fecundación. Este resultado muestra que la NAcGlcasa podría jugar un rol indispensable en la fecundación en sapos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES GENERALES

VI. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de Tesis se ha estudiado la reacción acrosómica en el espermatozoide de *Bufo arenarum* mediante distintas técnicas microscópicas y la participación de las glicosidasas acrosomales, especialmente la NAcGlcasa, en la fecundación. Las conclusiones de los resultados presentados en los capítulos IV y V se exponen a continuación.

1. DETECCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

En este trabajo se han presentado diferentes métodos para estudiar el estado acrosomal de los espermatozoides de *Bufo arenarum.*

La tinción con Coomassie permitió evidenciar por microscopía óptica el *perforatorium*, que como se ha descripto en otras especies se forma durante la reacción acrosómica. A pesar que este cambio morfológico no se ha detectado con otras tinciones, el método fue descartado para evidenciar el estado acrosomal dado que esta protrución no se ha detectado en todos los espermatozoides reaccionados.

Por otro lado, se han estudiado la distribución de azúcares en los espermatozoides mediante la utilización de diferentes lectinas. Los restos Manosa y NAcGlc se han detectado distribuidos en toda la cabeza del espermatozoide mientras que los restos Gal y fucosa están asociados fundamentalmente a la punta. La presencia de estos residuos en la región acrosomal podrían tener algún rol en la interacción entre el espermatozoide y el

MLM

ovocito. Uno de los objetivos de este estudio fue intentar establecer diferencias en los glúcidos asociados a "espermatozoides intactos" y reaccionados. La lectina PNA se une al espermatozoide intacto y permeabilizado, no detectándose unión al que ha sufrido la reacción acrosómica. Este es un método rápido y sensible cuando se trabaja con sapos recolectados desde el otoño hasta el principio de la primavera. Cuando los animales son recolectados en verano no se han podido visualizar las diferencias mencionadas. Otra dificultad de esta técnica es que la lectina PNA reconoce a los glicoconjugados que constituyen la matriz extracelular de los ovocitos por lo que la lectina no puede usarse para evaluar el estado acrosomal en presencia de dichas glicocoproteínas.

La inmunofluorescencia indirecta es un método altamente sensible que permite distinguir fácilmente "espermatozoides intactos" o reaccionados. Además puede analizarse el estado acrosomal de una gran población de espermatozoides en comparación con la microscopía electrónica, que era la única técnica alternativa hasta el momento. El método requirió de la preparación de anticuerpos policlonales en conejo contra componentes de la MA. Estos anticuerpos no presentan reacción cruzada con los componentes de la EV ni con las proteínas de la cubierta gelatinosa del ovocito. Este hecho es sumamente ventajoso ya que la inmunocitoquímica puede utilizarse para evaluar el efecto de los componentes del ovocito sobre el espermatozoide.

2. GLICOSIDASAS ESPERMÁTICAS

En el espermatozoide de *Bufo arenarum* fueron detectadas las enzimas NAcGlcasa, β-Galactosidasa, β-Glucosidasa, α-Manosidasa, α-Glucosidas y α-Fucosidasa. En los

MLM

estudios de distribución subcelular se detectó que todas las glicosidasas mencionadas tienen su mayor actividad en la fracción correspondiente a la MA. También se midieron actividades de α-Manosidasa en las vesículas acrosomales y de NAcGlcasa en el espermatozoide reaccionado.

La mayor actividad glicosidasa asociada al espermatozoide es la NAcGlcasa que es la única que se une *in vitro* a la EV de los ovocitos de la misma especie.

Con los resultados obtenidos de la caracterización de la enzima y de su actividad enzimática se concluye que la NAcGlcasa de espermatozoides de *Bufo arenarum* posee un pH óptimo acídico y se inhibe reversiblemente a pH superiores a 8,0. Es inhibida de forma competitiva tanto por NAcGlc como por NAcGal. La enzima está manosilada y se une a una matriz de intercambio aniónico como se describió para otras enzimas acrosomales [142;157;158;166;167]. La NAcGlcasa estudiada en este trabajo posee una mayor afinidad por el *p*-nitrofenil-NAcGlc en comparación con otras NAcGlcasas descriptas [82;142;164;171]. Además, la enzima presenta restos hidrofóbicos expuestos en su superficie ya que muestra una fuerte interacción con una matriz de interacción hidrofóbica.

La masa molecular de la enzima analizada en condiciones desnaturalizantes es de 45 kDa. Mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de Tritón X-100 se detectó actividad asociada a proteínas de 45-50 kDa. Cuando la cromatografía se llevó a cabo en ausencia de detergente se detectó un pico de mayor actividad aproximadamente a los 190-200 kDa. Estos resultados sugieren que la NAcGlcasa puede presentarse como un

MLM

tetrámero constituida por subunidades de 45 kDa, cada una de las cuales tiene actividad catalítica.

Las subunidades podrían estar ensambladas mediante interacciones hidrofóbicas dado que no fue necesario el agregado de detergente no iónico para detectar el pico de actividad a 190-200 kDa.

Se evaluó la posible participación de la NAcGlcasa en la fecundación debido a la interacción de la glicosidasa con la EV en condiciones que simulan el medio de fecundación y a que permanece unida al espermatozoide reaccionado. La inhibición de la enzima por el agregado de NAcGlc, NAcGal, anticuerpos específicos o bien agregando la enzima purificada al medio de fecundación resultó en una drástica disminución del porcentaje de ovocitos fecundados. Estos resultados sugieren fuertemente la importancia de la actividad de NAcGlcasa en la fecundación.

Inicialmente las glicosidasas fueron informadas como enzimas que participan en la hidrólisis de oligosacáridos y glicoconjugados en la vía endosítica. Sin embrago, se ha sugerido que las glicosidasas también pueden ser secretadas extracelularmente, por ejemplo facilitando junto con otras proteasas las metástasis tumorales [175]. De una forma similar, la NAcGlcasa descripta en este trabajo podría facilitar la penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito, probablemente removiendo restos azúcares intervinientes en la interacción entre las gametas.

MLM

CAPITULO VII
RESUMEN

VII. RESUMEN

La reacción acrosómica es un requisito para que ocurra la fecundación. En Anfibios este proceso es poco conocido debido a que la alta fragilidad del espermatozoide en numerosas especies dificulta el análisis. Sin embargo, en *Bufo arenarum* esta gameta posee una alta resistencia que permite utilizarlo como modelo de estudio.

En este trabajo de tesis se describen:

A) Métodos para la evaluación de la ruptura acrosomal en espermatozoides de *Bufo arenarum.*

B) Estudio de las glicosidasas asociadas al espermatozoide.

C) Caracterización de la NAcGlcasa en relación al proceso de fecundación.

A. Evaluación de la ruptura acrosomal en espermatozoides de Bufo arenarum

En *Bufo arenarum* el acrosoma es más pequeño que en la mayoría de las especies informadas y la única forma de visualizarlo era mediante técnicas de microscopía electrónica. Este método es dificultoso, costoso y no puede utilizarse para el análisis de un gran número de espermatozoides.

En este trabajo se han presentado diferentes métodos para evaluar el estado acrosomal en esta especie. Sólo mediante la tinción con Coomassie se ha podido detectar por microscopía óptica el *perforatorium* en algunos espermatozoides reaccionados.

MLM

El uso de la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) marcada fluorescentemente permitió diferenciar "espermatozoides intactos" de los que habían sufrido la reacción acrosómica. Sin embargo, cuando se trabaja con sapos recolectados en verano, los patrones de tinción con la lectina no son tan claramente distinguibles. El método de la inmunocitoquímica es el de elección para detectar la reacción acrosómica. La técnica es sencilla y sensible. Tiene la ventaja que puede usarse en presencia de los componentes de la matriz extracelular de los ovocitos para estudiar los roles de éstos en la fecundación y fundamentalmente sus efectos en el espermatozoide.

Por otro lado, mediante la utilización de la técnica de inmunofluorescencia se han establecido las mejores condiciones para la inducción de la reacción acrosómica. La incubación durante 20 minutos en un medio hipotónico induce la ruptura en el 70% de los espermatozoides. Sin embargo, cuando el ionóforo de calcio no interfiere en los ensayos posteriores la inducción mediante el agregado de ionóforo 20μM durante 45 minutos sería el tratamiento de elección ya que es más eficiente y los resultados son más reproducibles.

B. Glicosidasas asociadas al espermatozoide

Actividades NAcGlcasa, N-AcetilGalactosaminidasa, β-Galactosidasa, β-Glucosidasa, α-Manosidasa, α-Glucosidas y α-Fucosidasa fueron detectadas en el espermatozoide de *Bufo arenarum*, siendo la NAcGlcasa la mayor de las actividades medidas. Todas estas glicosidasas pertenecen a entidades proteicas diferentes a excepción de las actividades de NAcGlcasa y N-Acetilgalactosaminidasa que parecen estar relacionadas a la misma proteína. Los estudios de la distribución subcelular de las distintas glicosidasas revelaron

MLM

que la mayor actividad detectada para cada una de ellas está en la fracción de MA. Sin embargo, en el espermatozoide reaccionado se encontró el 10% de la actividad total de NAcGlcasa. Por otro lado, en la fracción que corresponde a las vesículas acrosomales se detectó actividad α-manosidasa.

Mediante experimentos *in vitro*, se vio que NAcGlcasa es la única de las seis glicosidasas anteriormente mencionadas que interacciona con la EV de los ovocitos de la misma especie en condiciones que simulan el medio de fecundación.

C. Caracterización de la enzima NAcGlcasa

Estudios en otras especies de Anfibios anuros revelaron que los restos NAcGlc del ovocito podrían estar implicados en la interacción con el espermatozoide. La NAcGlcasa es la mayor actividad glicosidasa detectada en espermatozoides de *Bufo arenarum.* Además, la enzima se une *in vitro* a la EV sugiriendo algún rol en el proceso de fecundación. Debido a estas consideraciones se comenzó con el estudio de la glicosidasa.

La enzima fue parcialmente purificada a partir de espermatozoides mediante cromatografías de interacción hidrofóbica y de afinidad en una matriz de ConA. La fuerte unión de la NAcGlcasa a estas matrices permiten sugerir que la enzima posee dominios hidrofóbicos y restos manosa en su composición.

La muestra parcialmente purificada fue utilizada para analizar diferentes propiedades cinéticas y bioquímicas.

El pH óptimo es 3,6 y la actividad se inhibe total y reversiblemente a pHs superiores a 8,0. Cuando se estudió el efecto de la temperatura, se vio que la actividad

MLM

aumenta hasta alcanzar un máximo a 55°C. Además, la enzima posee la ventaja de ser estable a 4°C durante varios días, este hecho facilitó la manipulación.

Las propiedades cinéticas descriptas muestran que la V_{max} aparente es 3,18 ± 0,10 (U/ mg) y la K_m para el *p*-nitrofenil NAcGlc es 0,25mM ± 0.04. Los azúcares NAcGlc y NAcGal son potentes inhibidores de tipo competitivo, siendo la K_i para NAcGal 1,5 mM.

Los análisis de los requerimientos catiónicos mostraron que el aumento de la concentración tanto de Ca^{2+} como de Mg^{2+} en el medio de reacción resultó en un igual aumento de la actividad.

La purificación de la enzima a homogeneidad se realizó a partir de un de hígado de machos de *Bufo arenarum* debido a que se disponía de cantidades limitantes de la enzima de origen espermático. Las enzimas de ambas fuentes poseen propiedades bioquímicas y cinéticas comparables. El protocolo de purificación requiere únicamente de dos pasos. Luego de realizar una corrida electroforética en condiciones nativas, se cortó la banda en donde se detectó la actividad y finalmente la enzima fue purificada mediante una cromatografía de afinidad con una matriz ConA. El análisis electroforético en condiciones reductoras de la enzima purificada reveló que posee un masa molecular aparente de 45 kDa. Esta misma banda es detectada en las muestras de homogenado de hígado y de espermatozoides en análisis por Inmunodetección usando los anticuerpos anti-NAcGlcasa. Más aún, los análisis mediante exclusión molecular en HPLC muestran un pico de actividad a 45 kDa y otro a 190-200 kDa sugiriendo que la enzima pueda ser un tetrámero constituido por subunidades de 45 kDa.

La reacción acrosómica permite la liberación de las enzimas acrosomales y expone la membrana interna acrosomal. La NAcGlcasa de *Bufo arenarum* es la mayor actividad medida en el contenido acrosomal pero también se detectó actividad de esta glicosidasa asociada al espermatozoide reaccionado.

Se ha analizado la participación de la NAcGlcasa en la fecundación mediante experimentos *in vitro*. La inhibición de la enzima por la adición de anticuerpos anti-NAcGlcasa reduce el porcentaje de ovocitos fecundados en comparación con los controles. Para corroborar que este bloqueo no es simplemente estérico, se agregaron al medio de fecundación NAcGlc o NAcGal, que tienen un efecto inhibitorio de la actividad enzimática, y en estos casos también se observó una fuerte inhibición de la fecundación. Finalmente, el tratamiento de los ovocitos con la enzima purificada provocó prácticamente una inhibición completa de la fecundación.

En resumen, la enzima NAcGlcasa es la glicosidasa con mayor actividad detectada en el espermatozoide de *Bufo arenarum*. A pesar que el rol preciso de la enzima no se conoce, se detectó que interacciona con la EV. Dado que la inhibición de la enzima implica una inhibición de la fecundación se sugiere que la NAcGlcasa juega un papel importante en la fecundación en Anfibios.

CAPITULO VIII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molecular Biology of the Cell. En: Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing Inc; 1994: 1021-1035.

[2] Gilbert S. En: Developmental Biology. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc Publishers; 1994.

[3] Tyler A. Introduction: problems and procedures of comparative gametology and syngamy. En: A Monroy and C Metz (ed.), Fertilization. New York: Academic Press; 1967: 7-8.

[4] Bedford J. Fertilization. En: CR Austin and RV Short (ed.), Germ Cells and Fertilization. Cambridge: Cambridge University Press; 1982: 130.

[5] Lillie F. Problems of fertilization. Chicago: University of Chicago Press; 1919: 184-226.

[6] Vacquier V, Swanson W, Hellberg M. What have we learned about sea urchin sperm bindin? Develop Growth Differ 37, 1-10. 1995.

[7] Lillie F. Studies in fertilization. The mechanism of fertilization in Arbacia. J Exp Zool 16, 523-590. 1914.

[8] Mozingo N, Chandler D. Evidence for existence of two assembly domains within the sea urchin eggs. Dev Biol 146, 148-157. 1991. Chandler, DE.

[9] Suzuki N. Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracelular coat of sea urchin eggs. Zool Sci 12, 13-27. 1995.

[10] Hardy D, Harumi T, Garbers D. Sea urchin receptor for egg peptides. Semin Dev Biol 5, 217-224. 1994.

[11] Ramaro C, Gabers D. Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. J Biol Chem 260, 8390-8396. 1985.

[12] Cardullo R, Herrick S, Peterson M, and Dangott L. Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analogue. Dev Biol 162, 600-607. 1994.

MLM

[13] Dan J. Acrosome reaction and lysins. En: Eds.CB Metz and A Monroy (ed.), Fertilization, 1 ed. New York: Academic press; 1967: 237-293.

[14] Franklin L. Fertilization and the rol of acrosomal reaction in non-mammals. Biol Reprod (Suppl) 2, 159-176. 1970.

[15] Levine A, Walsh K, Fodor J. Evidence of an acrosine-like enzyme in sea urchin sperm. Dev Biol 63, 299-306. 1978.

[16] Colwin A, Colwin L. Role of the gamete membranes in fertilization in Saccoglossus kowalevskii (Enteropneutra). I. The acrosome reaction and it changes in early stages of fertilization. J Cell Biol 19, 477-500. 1963.

[17] Vacquier V, Moy G. Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc Natl Acad Sci USA 74, 2456-2460. 1977.

[18] Miraglia S, Glabe C. Characterization of the membrane-associating domain of the sperm adhesive protein, bindin. Biochem Biophys Acta 1145, 191-198. 1993.

[19] Moy G, Vacquier V. Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. Curr Top Dev Biol 13, 31-44. 1979.

[20] Metz E, Kane R, Yanagimachi H, Palumbi S. Fertilization between closely related sea urchins is blocked by incompatibilities during sperm-egg attachment and early stages of fusion. Biol Bull 187, 23-34. 1994.

[21] Gao B, Klein L, Britten R, Davidson E. Sequence of mRNA coding for bindin, a specie-specific sea urchin sperm protein require for fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 83, 8634-8638. 1986.

[22] Minor J, Gao B, Davidson E. The molecular biology of bindin. En: Academic Press (ed.), The molecular biology of fertilization. San Diego: 1989: 773-788.

[23] Hofman A, Glabe C. Bindin, a multifunctional sperm ligand, and the evolution of new species. Semin Dev Biol 5, 233-242.

[24] Foltz K, Partin J, Lennarz W. Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and Hsp70. Science 259, 1421-1425. 1993.

[25] Ohlendieck K, Lennarz W. Molecular mechanisms of gamete recognition in sea urchin fertilization. Curr Top Dev Biol 32, 39-58. 1996.

[26] Barros C, Crosby J, Moreno R. Early step of sperm-egg interaction during mammalian fertilization. Cell Biol Intern 20, 33-39. 1996.

[27] Hunter R. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female tract. Zool J Linn Soc 95, 117-124. 1989.

[28] Ralt D. Sperm attraction to a folicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. Proc Natl Acad Sci USA 88, 2840-2844. 1991.

[29] Austin C. The "capacitation" of the mammalian sperm. Nature 170, 326. 1952.

[30] Florman H, Babcock D. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. En: PM Wassarman (ed.), Elements of mammalian fertilization. Boca Raton, Fl: CRC Press; 1991: 105-132.

[31] Benoff S. Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Hum Reprod 8, 2001-2006. 1993.

[32] Baldi E, Krausz C, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Forti G. Actions of progesterone on human sperm: a model of non genomic effects of steroids. J Steroid Biochem Mol Biol 53, 199-203. 1995.

[33] Fraser L. Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. Hum Reprod 10, 22-30. 1995.

[34] Barros C, Bedford J, Franklin L, Austin C. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. J Cell Biol 34, 1-2. 1967.

[35] Friend D. The organization of the sperm membrane. En: Edidin M, Johnson M (eds.), Immunology of gametes. Cambridge: Cambridge University Press; 1977: 5-30.

[36] Lopez L, Bayna E, Litoff D, Shaper J, Shaper N, Shur B. Receptor function of mouse sperm galactosiltransferase during fertilization. J Cell Biol 101, 1501-1510. 1985.

[37] Poirier G, Sackson J. Isolation and characterization of two proteinase inhibitors from the male reproductive tract of mice. Gamete Res 4, 555-569. 1981.

[38] Wilson W, Oliphant G. Isolation and biochemical characterization of the rabbit sperm acrosome stabilizing factor. Biol Reprod 37, 1123-1130. 1987.

[39] Leyton L, Sailing P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. Cell 57, 1123-1130. 1989.

[40] Bedford J. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol Reprod 28, 108-120. 1983.

MLM

[41] Cunning J, Yanagimachi R. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated *in vitro* in relation to the timing to the acrosome reaction. Gamete Res 15, 187-212. 1986.

[42] Suarez S, Katz D, Meizel S. Changes in motility that accompany the acrosome reaction in hyperactivated hamster spermatozoa. Gamete Res 10, 253-265. 1984.

[43] Talbot P. Sperm penetration through oocytes investments in mammals. Am J Anat 174, 331-346. 1985.

[44] Bedford J, Kim H. Cumulus oophurus as a sperm sequestering device, *in vivo*. J Exp Zool 165, 321-328. 1993.

[45] Wassarman P, Listcher E. Sperm-egg recognition mechanism in mammals. Curr Top Dev Biol 30, 1-19. 1995.

[46] Bleil J, Wassarman P. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. Cell 20, 873-882. 1980.

[47] Mintz B. Experimental study of the developing egg after removal of the zona pellucida. Science 135, 594-595. 1962.

[48] Liu C, Listcher E, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch R, Stewart C, Wassarman P. Targeted disruption of the mzp3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. Proc Natl Acad Sci USA 93, 5431-5436. 1996.

[49] Wassarman P. Mouse gamete adhesion molecules. Biol Reprod 46, 186-191. 1992.

[50] Dunbar B, Avery S, Lee V, Prasad S, Schuahn D, Schowoebel E, Skinner S, Wilkins B. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. Reprod Fertil Dev 6, 331-347. 1994.

[51] Leyton L, Sailing P. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J Cell Biol 108, 2163-2168. 1989.

[52] Aarons D, Boettger-Tong H, Holt G, Poirier G. Acrosome reaction induced by immunoaggragation of a proteinase inhibitor bound to the murine sperm head. Mol Reprod and Dev 30, 258-264. 1991.

[53] Wassarman P. Mammalian fertilization: egg and sperm glycoprotein that support gamete adhesion. Am J Reprod Immunol 33, 253-258. 1995.

[54] Kinloch R, Sakai Y, Wassarman P. Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. Proc Natl Acad Sci USA 92, 263-267. 1995.

[55] Bleil J, Wassarman P. Galactose at the non-reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. Proc Natl Acad Sci USA 85, 6778-66782. 1988.

[56] Miller D, Gong X, Shur B. Sperm require β-NAcetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. Development 118, 1279-1289. 1993.

[57] Florman H, Bechtol K, Wassarman P. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. Dev Biol 106, 243-255. 1984.

[58] Listcher E, Juntunen K, Seppo A, Penttila L, Niemela R, Wassarman P. Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs *in vitro*. Biochemistry 34, 4662-4669. 1995.

[59] Shur B, Hall N. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. J Cell Biol 95, 574-579. 1982.

[60] Gong X, Dubois D, Miller D, Shur B. Activation of a G protein complex by aggregation of β-1,4-galactosyltransferase on the surface of the sperm. Science 269, 1718-1721. 1995.

[61] Bookbinder L, Cheng A, Bleil J. Tissue and specie-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. Science 269, 86-89. 1995.

[62] Töpfer-Petersen E, Clvete J, Sanz L, Siniwatz F. Spermadhesins: a novel group of carbohydrate-binding proteins that function in fertilization. J Reprod Dev 39 (suppl), 45-47. 1993.

[63] Leyton L, Le Guen P, Bunch D, Sailing P. Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. Proc Natl Acad Sci USA 89, 11692-11695. 1992.

[64] Burks D, Carballada M, Moore H, Sailing P. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. Science 269, 83-86. 1995.

[65] Lu Q, Shur B. Sperm from β1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. Development 124, 4121-4131. 1997.

MCM

[66] McLeskey S, Dowds C, Carballada M, White R, Sailing P. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. International Review of Cytology 177, 57-113. 1998.

[67] Bork P. Sperm-egg binding protein or proto-oncogen? Science 271, 1431-1432. 1996.

[68] Töpfer-Petersen E, Henschen A. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. FEBS Lett 226, 38-42. 1987.

[69] Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosine gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. J Biol Chem 269, 31845-31849. 1994.

[70] Phelps B, Primakoff P, Koppel D, Low M, Myles D. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. Science 240, 1780-1782. 1988.

[71] Wassarman P. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocitosis, and fusion. Cell 99, 175-183. 1999.

[72] Cabada M, Mariano MI, Raisman J. Effect of trypsin inhibitors and concanavalin A on the fertilization in of Bufo arenarum coelomic oocytes. J Exp Zool 204, 409-416. 1978.

[73] del Pino E, Cabada M. Lectin-binding sites in the vitelline envelopes of *Bufo arenarum* oocytes. Role in fertilization. Gamete Res 17, 333-342. 1977.

[74] Raisman J, Cabada M. Acrosomic reaction and proteolityc activity in the spermatozoa of an Anuran Amphibian, *Leptodactylus chaquensis*. Develop Growth Differ 19, 227-232. 1977.

[75] Valz-Gianinet J, del Pino E, Cabada M. Glycoproteins from *Bufo arenarum* vitelline envelope with fertility-impairing effect on homologous spermatozoa. Dev Biol 146, 416-422. 1991.

[76] Omata S, Katagiri C. Involvement of carbohydrate moieties of the toad egg vitelline coat in binding with fertilizing sperm. Develop Growth Differ 38, 663-672. 1996.

[77] Vo L, Hedrick J. Sperm binding to the ZPC component of egg envelopes in *Xenopus laevis*. Molecular biology of the cell 9 SUPL 311. 1998.

[78] Yurewickz E, Sacco A, Gupta S, Xu N, Gage D. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. J Biol Chem 273 (13), 7488-7494. 1998.

[79] Vo L, Hedrick J. Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoproein ZPC in *Xenopus laevis*. Biol Reprod 62, 766-774. 2000.

[80] Florman H, Wassarman P. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell 41, 313-324. 1985.

[81] Moller C, Wassarman P. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse egg. Dev Biol 132, 103-112. 1989.

[82] Prody G, Greve L, Hedrick JL. Purification and characterization of an N-acetyl Glucosaminidase from cortical granules of *Xenopus laevis*. J Exp Zool 235, 335-340. 1985.

[83] Allison A, Hartree E. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J Reprod Fertil 21, 501-515. 1970.

[84] Phillips D. Electron microscopy of mammalian fertilization. En: Wassarman P (ed.), Elements of mammalian fertilization. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1991: 249-267.

[85] Stauss C, Votta T, Suarez S. Sperm motility hyperactiviation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. Biol Reprod 53, 1280-1285. 1995.

[86] Summers R, Hylander B. Species-specificity of acrosome reaction and primary gamete binding inequinoids. Exp Cell Res 96, 63-68. 1975.

[87] Keller S, Vacquier V. The isolation of the acrosome-reaction-inducing glycoproteins from sea urchin egg jelly. Dev Biol 162, 304-312. 1994.

[88] Trimmer J, Vacquier V. Activation of sea urchin gametes. Ann Rev Cell Biol 2, 1-26. 1986.

[89] Trimmer J, Schalackman R, Vacquier V. Monoclonal antibodies increase intracellular Ca^{2+} in sea urchin spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 83, 9055-9059. 1986.

[90] Schackman R, Eddy E, Shapiro B. The acrosome reaction of *Stronglyocentrotus purpuratus* sperm: Ion requirements and movements. Dev Biol 65, 483-495. 1978.

[91] Endo Y, Lee M, Kopf G. Characterization of an islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. Dev Biol 129, 12-24. 1988.

[92] Macek M, Lopez L, Shur B. Aggregation of β-NAcetylgalactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. Dev Biol 147, 440-444. 1991.

MLM

[93] Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: E Knobil, JD Neil (eds.), The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; 1994: 189-317.

[94] Sailing P. Gamete interaction leading to fertilization in mammals: principles, paradigms and paradoxes. En: Reproductive endocrinology, surgery and technology. Raven Press, New York, EY Adashi, JA Rock and Z Rosenwaks. 1996: 403-421.

[95] Florman H, Arnoult C, Kazam I, Li S, O'Toole C. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. Biol Reprod 59, 12-16. 1998.

[96] Arranz S, Cabada M. A difusible, highly glycosilated protein from *Bufo arenarum* egg jelly coat: biological activity. Mol Reprod and Dev . 2000.

[97] Raisman J, de Cunio R, Cabada M, del Pino E, Mariano M. Acrosome breakdown in *Leptodactylus chaquensis* (amphibia anura) spermatozoa. Develop Growth Differ 22, 289-297. 1980.

[98] Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275. 1951.

[99] Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. J Cell Biol 66, 198-200. 1975.

[100] Rudnicki M, McBurney M. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. En: EJ Robertson (ed.), Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. Oxford: IRL Press; 1987: 37-49.

[101] Martinez M, Cabada M. Assessment of the acrosome reaction in *Bufo arenarum* spermatozoa by immunostaining: comparison with other methods. Zygote 4, 181-190. 1996.

[102] Harlow E, Lane D. Immunizations. En Antibodies, a laboratory manual. New York: Cold SprEng Harbor Laboratory; 1988: 100-105.

[103] Laemmly U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685. 1970.

[104] Davis B. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci 121, 404-427. 1964.

[105] Gradilone S, Arranz S, Cabada M. Staining of glycosylated proteins in polyacrilamide gels. Anal Biochem 261, 224-227. 1998.

MLM

[106] Towbin H, Staechelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelluloce sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354. 1979.

[107] Harlow E, Lane D. Immunoblotting. En: Antibodies, a laboratory manual. New York: Cold Spring Laboratory; 1988: 497-509.

[108] Gorgan D. Evidence that β-galactosidase of *Sulfoglobus sulfataricus* is only one of several activities of a thermostable β-D-Glycosidase. Appl Environm Micribiol 57, 1644-1649. 1991.

[109] Diaz Fontdevila M, Bloj B, Cabada M. Effect of egg water from *Bufo arenarum* on the fertilizing capacity of homologous spermatozoa. J Exp Zool 257, 408-414. 1991.

[110] Yamada Y, Aketa K. Vitelline layer lytic activity in sperm extracts of sea urchin, Hemicentrotus pulcherrimus. Gamete Res 4, 193-202. 1981.

[111] Yamasaki H, Takamune K, Katagiri C. Classification, inhibition and specificity studies of the vitelline coat lysin from toad sperm. Gamete Res 20, 287-300. 1988.

[112] Cabada M, Manes M, Gomez M. Spermatolysins in *Bufo arenarum*: their activity on oocyte surface. J Exp Zool 249, 409-416. 1989.

[113] Tesarik J, Drahorad J, Testart J, Mendoza C. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. Development 110, 391-400. 1990.

[114] Yudin A, Gottlieb W, Meizel S. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. Gamete Res 20, 11-24. 1988.

[115] Diaz Fontdevila M, Bloj B, Cabada M. Effect of cholesterol and phosphatidylcholine of different chain length on acrosome breakdown and fertilizing capacity of amphibian spermatozoa. Gamete Res 21, 59-70. 1988.

[116] Cross N, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol Reprod 41, 635-641. 1989.

[117] Meizel S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocitotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol Rev 59, 125-157. 1984.

[118] Bryan J, Akruk S. A naphtol yellow S and erythrosin B staining procedures for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. Stain Technol 52, 47-51. 1977.

[119] Wells M, Awa O. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. J Dairy Sci 53, 227-232. 1970.

[120] Talbot P, Chacon R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Exp Zool 215, 201-208. 1981.

[121] Cross N, Morales P, Overstreet J, Hanson F. Two simple methods for detecting the acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 15, 213-226. 1986.

[122] Mortimer D, Curtis D, Miller R. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. J Reprod Fertil 81, 127-135. 1987.

[123] Takamune K. Detection of acrosome-reacted toad sperm based on specific lectin binding to inner acrosomal membrane. Gamete Res 18, 215-223. 1987.

[124] Burgos M, Fawcett D. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad *Bufo arenarum*. J Biophys Biochem Cytol 2, 223-240. 1956.

[125] Didion B, Dobrinsky J, Giles J, Graves C. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Res 22, 51-57. 1989.

[126] Moller C, Bleil J, Kinloch R, Wassarman P. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. Dev Biol 137, 276-286. 1990.

[127] Kawakami E, Vandervoort C, Mahi-Brown C, Tollner T, Overstreet J. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple sataining for evaluating acrosome reaction of dog sperm. J Exp Zool 265, 599-603. 1993.

[128] Perotti M, Passini M. Glycoconjugates of the surface of the spermatozoa of Drosophila melanogaster: a qualitative and quantitative study. J Exp Zool 271, 311-318. 1995.

[129] Magargee S, Kunze E, Hammerstedt R. Changes in lectin binding features of ram sperm surfaces associated with the epididymal maturation and ejaculation. Biol Reprod 38, 667-685. 1988.

[130] Cross N, Overstreet J. Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. Gamete Res 16, 23-35. 1987.

[131] Stein J. Efecto de los azúcares libres, glicoproteínas y glicolípidos sobre la fecundación en Anfibios. Facultad de Cs. Bioq. y Farm. UNR; 1996. Tesina.

[132] Sanchez R, Töpfer-Petersen E, Aitken R, Schill W. A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. Andrology 23, 197-203. 1991.

[133] Miller D, Macek M, Shur B. Complementary between sperm surface galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature 357, 589-592. 1992.

[134] Yonezawa N, Aoki H, Hatnaka Y, Nakano M. Involvement of N-linked carbohydrates chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. Eur J Biochem 233, 35-41. 1995.

[135] Tulsiani D, yoshida-Komiya H, Yoshi A. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. Biol Reprod 57, 487-494. 1997.

[136] Pereyra B, Abou-Haila A, Tulsiani D. Rat sperm surface mannosidase is first expressed on the plasma membrane of testicular germ cells. Biol Reprod 59, 1288-1295. 1998.

[137] Shur B, Evans S, Lu Q. Cell surface galactosyltransferase: current issues. Glycoconjugate J , 537-548. 1998.

[138] Hoshi M, de Santis R, Pinto M, Cotelli F, Rosati F. Sperm glycosidases as a mediators of sperm-egg binding in the ascidians. Zool Sci 2, 65-69. 1985.

[139] Hoshi M, Takizawa S, Hirohashi N. Glycosidases, proteases and ascidian fertilization. Semin Dev Biol 5, 201-208. 1994.

[140] Hoshi M. Sperm glycosidase as a plausible mediator of sperm binding to the vitelline envelope in Ascidians. En: JL Hedrick (ed.), The molecular and cell biology of fertilization. New York: Plenum Press; 1986: 251-260.

[141] Casazza G, de Santis R, Pinto M. Plasma membrane glycoproteins of *Ciona intestinalis* spermatozoa that interact with the egg. Develop Growth Differ 30, 147-158. 1987.

[142] Godknecht A, Honegger T. Isolation, characterization and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata* . Dev Biol 143, 398-407. 1991.

[143] Cornwall G, Tulsiani D, Orgebin-Crist M. Inhibition of the mouse sperm surface α-manosidase inhibits sperm-egg binding *in vitro*. Biol Reprod 44, 913-921. 1991.

[144] Hunnicutt G, Primakoff P, Myles D. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional. One activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. Biol Reprod 55, 80-86. 1996.

[145] Lin Y, MK, Lathrop W, Myles D, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH20 enables the sperm to penetrate the cumuls cell layer surrounding the egg. J Cell Biol 125, 1157-1163. 1994.

[146] Lin Y, Kimmel L, Myles D, Primakoff P. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH20. Proc Natl Acad Sci USA 90, 10071-10075. 1993.

[147] Primakoff P. Sperm proteins being study for use in a contraceptive vaccine. Am J Reprod Immunol 31, 208-210. 1994.

[148] Katagiri C. Role of oviductal secretions in mediating gamete fusion in anuran amphibians. Zool Sci 4, 1-4. 1987.

[149] Hedrick J, Nishihara. Structure and function of the extracelular matrix of anuran eggs. J Electr Microsc Tech 17, 319-335. 1991.

[150] Wolf D, Nishihara T, West D, Wyrick R, Hedrick JL. Isolation, physicochemicals properties and the macromolecular composition of the vitelline and fertilization envelopes from *Xenopus laevis* eggs. Biochemistry 15, 348-359. 1976.

[151] Arranz S, Albertali I, Cabada M. *Bufo arenarum* egg jelly coat: purification and characterization of two highly glycosilated proteins. Biochem J 323, 307-312. 1997.

[152] Shyhara M, Seshadri H. Studies on some enzymes of the toad (*Bufo melanostictus*) testis and their possible role at the time of fertilization. Experientia 41, 1113-1118. 1985.

[153] Iwao Y, Katagiri C. Properties of the vitelline coat lysin from toad sperm. J Exp Zool 219, 87-95. 1982.

[154] Beeley J. Glycoprotein and proteoglycan techniques. En: RH Burdon and PH Van Knippenberg (ed.), Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. 1985: 254-263.

[155] Chicz R, Regnier F. HPLC: effective protein purification. En: Deutscher M (ed.), Protein Purification. Methods in Enzymology, 182 ed. San Diego, USA: Academic Press, Inc; 1990: 403-409.

[156] West I, Goldring O. Lectin affinity chromatography. En: Shawn Doonan (ed.), Protein Purification Protocols. Totowa, New Yersey: Human Press; 1996: 177-185.

[157] Hankock L, Raab L, Aronson N. Synthesis and processing of rat-sperm associated α-L-Fucosidase. Biol Reprod 48, 1228-1238. 1993.

MLM

[158] Lambert C. Ascidian sper penetration and the translocation of a cell surface glycosidase. J Exp Zool 249, 308-315. 1989.

[159] Mc Ilvaine J. JBC 49, 183. 1921.

[160] Tulsiani D, Skudlarek M, Orgebin-Crist M. Novel α-D-Manosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interaction. J Cell Biol 109, 1257-1267. 1989.

[161] Tulsiani D, Skudlarek M, Orgebin-Crist M. Human sperm plasma membranes possess α-D-Manosidase activity but no galactosyltransferase activity. Biol Reprod 41, 843-858. 1990.

[162] Greve L, Prody G, Hedrick JL. N-acetyl-β-D-Glucosaminidaseactivity in the cortil garnules of *Xenopus laevis* eggs. Gamete Res 12, 305-312. 1985.

[163] Matsuura K, Sawada H, Yokosawa H. Purification and properties of N-acetylglucosaminidase from eggs of the ascidia, *Halocynthia roretzi*. Eur J Biochem 218 (2), 535-541. 1993.

[164] Molloy C, Cannon R, Sullivan P, Shepherd M. Purification and characterization of two forms of N-acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. Microbiology 140, 1543-1553. 1994.

[165] Lambert C, Goode C. Glycolipid linkage of a polyspermy blocking glycosidase to the ascidian egg surface. Dev Biol 154, 95-100. 1992.

[166] Faraoqui A, Srivastava P. Isolation of β-NAcetylhexosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization. Biochem J 191, 827-834. 1980.

[167] Skudlarek M, Tulsini D, Nagdas S, Orgebin-Crist M. β-D-Galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. Biol Reprod 49, 204-213. 1993.

[168] Cummings R. Use of lectins in analysis of glycoconjugates. En: Murray P.Deutscher (ed.), Methods in enzymology, 230 ed. San Diego, USA: Academic Press, Inc.; 1994: 66-86.

[169] Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. Ann Rev Cell Biol 5, 483-525. 1989.

[170] von Figura K, Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. Ann Rev Biochem 55, 167-193. 1986.

[171] Li S, Li Y. Studies on the glycosidases of jack bean meal. J Biol Chem 245, 5153-5169. 1970.

[172] Hedrick JL, Nishihara T. Structure and function of the extracelular matrix of anuran eggs. J Electr Microsc Tech 17, 319-335. 1991.

[173] Takada M, Yonezawa N, Yoshisawa M. pH-sensitive dissociation and association of β-NAcetylglucosaminidase from boar sperm acrosome. Biol Reprod 50, 860-868. 1994.

[174] Kopecny V, Flechnon J. Fate of acrosomal glycoproteins during the acrosome reaction and fertilization, a light and electron microscope autoradiographic study. Biol Reprod 24, 201-216. 1981.

[175] Liotta L, Rao C, Wewer U. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. Ann Rev Biochem 55, 1037-1057. 1986.