

11
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**IDENTIFICACION Y LOCALIZACION DE
ANEXINAS EN EL ESPERMATOZOIDE
DE CUYO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

JUANA CRUZ TREJO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Enrique Othon Hernández González

México, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres: Agustín
y
Consuelo

A mis hermanas:

Marcela
Ma. del Carmen
Alejandra
Adriana

Agradecimiento

A la Dra. Adela Mújica

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos por dedicarme su tiempo, experiencia y conocimientos durante el tiempo que desarrollé este trabajo. Los cuales considero muy valiosos en mi formación.

Así mismo agradezco todas las facilidades que me brindó para la realización del trabajo.

A todo mis compañeros de laboratorio: Lety Neri, Zaira, Ana María, Alba. Víctor por su colaboración en el trabajo en el laboratorio.

Al personal de la UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRONICA, por su apoyo y asesoría en el uso del microscopio de fluorescencia.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología Celular DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio que está a cargo de la Dra. Adela Mújica.

INDICE

| | Pág |
|---|-----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| El espermatozoide..... | 1 |
| La capacitación..... | 8 |
| La reacción acrosomal..... | 10 |
| Inductores de la reacción acrosomal..... | 12 |
| El calcio y su papel en la reacción acrosomal..... | 14 |
| Significado funcional de la reacción acrosomal..... | 15 |
| Anexinas..... | 16 |
| Clasificación de las anexinas..... | 17 |
| Las anexinas y su papel en la exocitosis..... | 18 |
| JUSTIFICACION..... | 20 |
| HIPOTESIS..... | 21 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 21 |

| | |
|--|----|
| MATERIAL Y METODOS..... | 22 |
| Purificación de las anexinas IV o VI..... | 22 |
| Producción de anticuerpos (policlonales anti-anexina)..... | 23 |
| Obtención de los espermatozoides del cuyo..... | 24 |
| Solubilización de los espermatozoides del cuyo..... | 24 |
| Inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides... | 25 |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS).... | 25 |
| Inmunodetección de las anexinas por Western blot..... | 26 |
| Detección de la anexina en el espermatozoide, por inmunofluorescencia indirecta..... | 28 |
| Tinción de gel por el método de Morrissey (1981)..... | 29 |
| RESULTADOS..... | 31 |
| Purificación de anexinas..... | 31 |
| Inmunodetección de las proteínas 33-35 KDa y 66 KDa en el espermatozoide del cuyo..... | 36 |
| Localización de las proteínas 33-35 y 66 KDa en espermatozoide del cuyo, por inmunofluorescencia indirecta... | 36 |
| Inmunodetección de las proteínas de 33-35 KDa y 66 KDa, en las vesículas de reacción acrosomal..... | 39 |
| DISCUSION..... | 42 |
| CONCLUSION | 45 |

APENDICE 47

BIBLIOGRAFIA..... 52

RESUMEN

Se purificaron dos proteínas del testículo del cuyo, cuyos pesos moleculares relativos fueron 66 kDa y un doblete de peso molecular de 33-35 kDa, al aplicar un procedimiento descrito para la purificación de anexinas. Ambas proteínas fueron utilizadas para la preparación de anticuerpos.

Los anticuerpos contra la proteína de 33-35 kDa, reconocieron en el espermatozoide del cuyo a una proteína de 38 kDa; y los anticuerpos contra la proteína 66 del testículo, en el espermatozoide identificaron a una proteína del mismo peso molecular, 66 kDa.

La proteína identificada por el anticuerpo 33-35 kDa se localizó exclusivamente en la región apical del acrosoma de los espermatozoides no capacitados así como en los capacitados con acrosoma intacto; mientras que en los espermatozoides capacitados, con acrosoma contraído, para iniciar la reacción acrosomal, la fluorescencia se observó distribuida en todo el acrosoma. En los espermatozoides con reacción acrosomal, carecían de acrosoma y de fluorescencia en la cabeza.

El anticuerpo contra la proteína testicular de 66 kDa no reconoció en el espermatozoide recién obtenido a la proteína, ni cuando el espermatozoide fue capacitado, ni tampoco cuando iniciaba la reacción acrosomal.

La localización de las proteínas espermáticas detectadas por los anticuerpos contra 33-35 y 66 kDa es membranal, ya que en

las vesículas de reacción acrosomal fueron detectadas una banda de 35 kDa y una de 66 kDa, respectivamente.

INTRODUCCION

El espermatozoide

El espermatozoide o gameto masculino es una célula haploide cuya función es fertilizar al óvulo, para originar un nuevo individuo de la misma especie.

El espermatozoide fue descrito hace 300 años por Van Leeuwenhoek, en 1677 quien lo observó en el semen y en el testículo. Toda duda concerniente a su significado fue finalmente desvanecida por la observación de Barry's en (1843) que el espermatozoide entra en el huevo y por la demostración de Oscar Hertwig's en (1875) que la fertilización involucra la unión de el núcleo del espermatozoide con el óvulo (citado en Roy y col., 1976).

La forma y el tamaño del espermatozoide son característicos de cada especie. Sus componentes principales son la cabeza, la cola o flagelo y una región entre ambos, que sirve de pieza de conexión que se la denomina cuello (Fig. 1) (Austin, 1982). La cabeza esta constituida por el acrosoma y el núcleo, este último cumple dos funciones: una genética y la otra activadora. La genética se engloba en el núcleo y el acrosoma participa en la activación del óvulo durante la fertilización (Torrey, 1978)

El acrosoma es de forma vesicular y semeja a un capuchón, que cubre la porción anterior del núcleo. En los mamíferos euterios, el tamaño y la forma del acrosoma varían

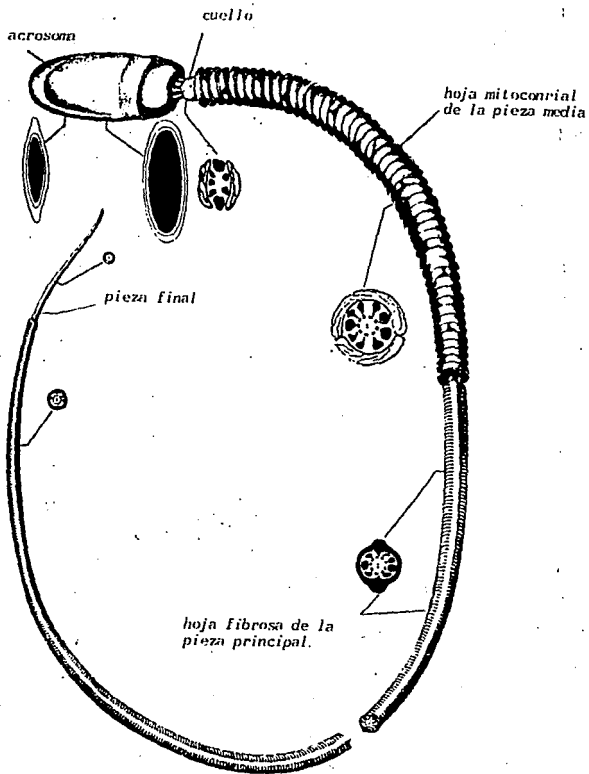


Figura. 1. Representación esquemática de un espermatozoide de mamífero, en el que la membrana plasmática está ausente (tomado de Fawcett, 1975).

considerablemente de una especie a otra (Fawcett, 1975), y consiste básicamente de una membrana continua, de la cual la región cercana al núcleo recibe el nombre de membrana acrosomal interna, mientras que a la adyacente a la membrana plasmática se le denomina membrana acrosomal externa que esta cubierta por una serie de moléculas glucopéptidicas. La matriz acrosomal está constituida por una serie de enzimas hidrolíticas como son: la acrosina, la hialuronidasa, las fosfolipasas A y C, la catepsina D, la acetilglucosaminidasa y otras más (Yanagimachi, 1988). Debido a su composición el acrosoma es considerado como un análogo de los lisosomas (Eddy, 1988).

El núcleo del espermatozoide es pequeño y compacto, consiste de cromatina altamente condensada en la que el DNA está asociado a proteínas muy básicas, de peso molecular bajo, conocidas como protaminas (Austin, 1982).

Localizada entre la cabeza y la cola, la pieza de conexión o cuello es una región pequeña y estructuralmente compleja formada por una placa basal - el capitel- y 9 columnas estriadas adosadas, cada una de ellas, a una fibra gruesa que se continua en el flagelo; en el cuello también se localiza el residuo de cuando menos un centriolo (Fig. 2). En las estructuras presentes en el flagelo espermático se consideran 3 regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza final o terminal (Eddy, 1988)

El axonema es el aparato motor del espermatozoide, que corre a todo lo largo del flagelo y se localiza en su parte central (Fig 3). Está conformado, al igual que en los flagelos de

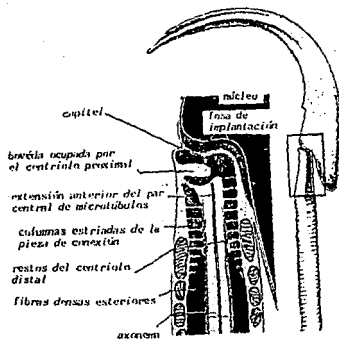


Figura. 2. Las estructuras que conforman la región del cuello del espermatozoide (tomado de Fawcett, 1975)

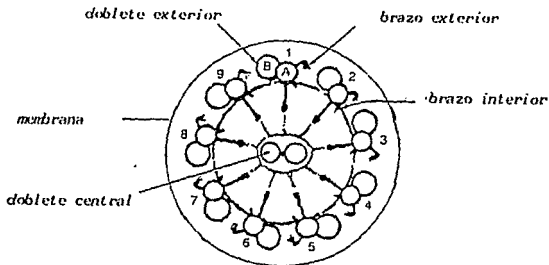


Figura. 3. Representación esquemática de la organización del axonema de cilios y flagelos (tomado de Fawcett, 1975).

otros organismos, por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobles de microtúbulos (Eddy, 1988). Cada doblete consiste de un microtúbulo A y un microtúbulo B. Los microtúbulos están compuestos de α -tubulina y β -tubulina, proteínas cuyos pesos moleculares son 54 KDa y 56 KDa, respectivamente (Eddy, 1988).

Las fibras gruesas son estructuras flagelares voluminosas (Fig. 4), que se originan en el cuello y siguen a lo largo de casi todo el flagelo. Corren paralelas a los dobles externos de microtúbulos (una a uno). Son similares en su forma y asimétricas en cuanto a su longitud; terminan a diferentes alturas en la pieza principal del flagelo (Eddy, 1988).

La hoja mitocondrial, caracteriza a la pieza media (Fig. 5), y está formada por las mitocondrias, que unidas entre sí por sus extremos, se arreglan helicoidalmente alrededor del extremo inicial del flagelo. El número de hélices paralelas y de giros de una misma hélice así como el largo de la pieza media varía entre las especies (Eddy, 1988).

La capa fibrosa es la estructura que caracteriza a la pieza principal del flagelo; presenta forma cilíndrica, y consiste de dos columnas longitudinales conectadas por costillas circunferenciales (Fig. 6). Las columnas corren por fuera de las fibras densas 3 y 8 con las cuales tiene un punto de unión a nivel de la parte proximal de la pieza principal (Eddy, 1988).

La pieza terminal del flagelo consiste sólo del axonema cubierto por la membrana plasmática (Eddy, 1988). La membrana plasmática (MP) recubre a todo el espermatozoide. Al microscopio

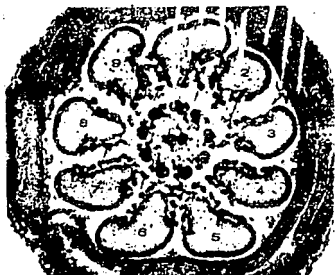


Figura. 4. Corte transversal de la pieza media de un espermatozoide de cuyo, las fibras densas están indicadas con los números del 1 al 9. Las flechas señalan las fibras satélite que rodean a los bordes internos de las fibras densas (tomado de Fawcett, 1975).

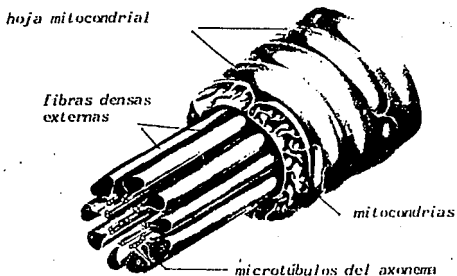


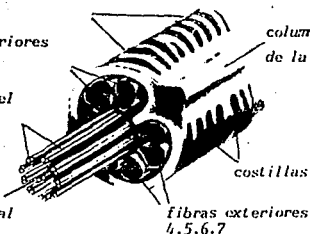
Figura. 5. Un segmento de la pieza media de un espermatozoide típico de mamífero, mostrando la estrecha proximidad entre la hoja mitocondrial y las fibras densas externas, y la relación de estas últimas con los dobletes del axonema (tomado de Fawcett, 1975).

*costillas circunferenciales
de la capa fibrosa*

*fibras exteriores
1,2,9*

*dobletes del
axonema*

par central



*columna longitudinal
de la capa fibrosa*

costillas

*fibras exteriores
4,5,6,7*

Figura. 6. Representación esquemática de un segmento de la pieza principal de un espermatozoide (tomado de Fawcett, 1975).

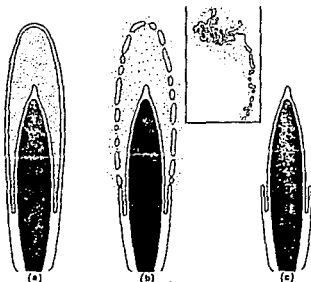


Figura. 7. Representación esquemática de la reacción acrosomal del espermatozoide a) acrosoma intacto en un espermatozoide no estimulado mostrando el contorno de la membrana plasmática sobre el acrosoma, b) desarrollo de la fusión de los puntos múltiples entre la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, c) pérdida del acrosoma en el espermatozoide para empezar a penetrar a la sustancia de la zona. (tomado de Meizel, 1984).

electrónico su imagen es similar a la membrana de otras células. Se considera una estructura polarizada, con dominios específicos, relativos a su función; por ejemplo la región acrosomal, en la que la MP, de esta zona, estará involucrada en un proceso de fusión de membranas denominado la reacción acrosomal (Eddy ,1988).

La capacitación

Los espermatozoides de los mamíferos euterios deben sufrir algunos cambios fisiológicos en el tracto reproductivo de la hembra para poder fertilizar. Esta observación fue comunicada de manera independiente por dos investigadores (Austin, 1951; Chang, 1951). Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido entre el reconocimiento de la necesidad de la capacitación, como se denominó al proceso, el fenómeno aún no se conoce en su totalidad (citados en Hinrichsen y col., 1983).

Por definición, en la actualidad, la capacitación se considera como el conjunto de cambios que deben ocurrirle al espermatozoide para poder sufrir la reacción acrosomal. Este proceso involucra cambios estructurales que habilitan al gameto como espermatozoide fertilizante (Yanagimachi, 1988).

Aparentemente en la capacitación del espermatozoide participan todas las regiones del tracto reproductor femenino. En el útero de la coneja se han capacitado espermatozoides de diferentes especies. Esto lleva a dos consideraciones: que no existe una especificidad de especie y que el útero podría ser el sitio de la capacitación natural. Sin embargo, se ha determinado

que tanto el moco servical, así como las secreciones del oviducto coadyuvan en la capacitación del espermatozoide; y para algunos autores este último órgano puede ser el principal sitio de capacitación (Bedford, 1983).

Se ha podido reproducir el proceso "in vitro". Al igual que lo observado "in vivo", el tiempo que el espermatozoide requiere para su capacitación varía con la especie, 1 h el espermatozoide del ratón, 5-6 h el del ser humano. También ha sido aparente, que los espermatozoides de una misma muestra no logran su capacitación al mismo tiempo. Algunos factores que controlan o afectan la capacitación son: la temperatura, variaciones individuales, los componentes del medio, el pH, la osmolaridad y también el origen de los espermatozoides a capacitar; es decir, si son obtenidos de los conductos del macho (cola del epididimo o de conductos deferentes, o bien provengan de un eyaculado) Yanagimachi, 1988.

Las alteraciones iniciales de la capacitación incluyen modificación, redistribución o pérdida de proteínas del plasma epididimal y seminal que cubren la superficie del espermatozoide eyaculado. Las evidencias que apoyan lo anterior son el reconocimiento negativo por anticuerpos anti-plasma seminal en los espermatozoides capacitados, en comparación con los eyaculados. De igual manera se observa la pérdida de glicoproteínas epididimales. De estudios con lectinas, se ha llegado también a la conclusión de que la membrana plasmática del espermatozoide se altera durante la capacitación (Hinrichsen y col., 1983).

No sólo la superficie de la membrana plasmática es

alterada durante la capacitación, sino que también se reconoce que existen cambios intrínsecos. Esto ha sido evidenciado por la restricción al movimiento lateral, de proteínas intramembranales, dentro de la membrana. Estas modificaciones intramembranales, las cuales ocurren durante la capacitación llevan a la formación de áreas, tanto ricas como pobres en glicoproteínas, las cuales coexisten en una topografía semejjando parches, y son consistentes con un patrón de fusión de membrana observada durante la reacción acrosomal (Hinrichsen y col., 1983).

Otro cambio importante a nivel de membrana, que ha sido relacionado con la capacitación es el relativo a un intercambio de lípidos, tales como la fosfatidil colina y el colesterol; lo cual induce la desestabilización de la membrana y una permeabilidad aumentada al calcio, que a su vez promueve la fusión y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1988).

Tanto el metabolismo energético oxidativo y como el glicolítico, se ha descrito que se incrementan con la capacitación. Así mismo, el movimiento del espermatozoide se vuelve más enérgico y de características singulares, al cual se le denomina movimiento hiperactivado, que se sugiere ayuda al espermatozoide a vencer las barrera física que el óvulo presenta como cubierta más interna, la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988).

La reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es el último proceso que sufre el espermatozoide, antes de ser capaz de fertilizar al óvulo. En

condiciones naturales, la RA ocurre en el ampulla del oviducto, sitio donde se realiza la fertilización, y más específicamente en la vecindad del óvulo o en contacto con el mismo (Austin, 1982; Yanagimachi, 1988). En la reacción acrosomal, la membrana externa del acrosoma se fusiona con la membrana plasmática que la cubre, liberándose el contenido acrosomal (Fig. 7). La fusión de las membranas ocurre en múltiples sitios, produciéndose pequeños orificios por donde inicialmente escapa el contenido acrosomal (Nague y col., 1986). Las membranas fusionadas dan lugar a una serie de vesículas mixtas, membrana plasmática-membrana acrosomal externa, que se separan del espermatozoide (Peterson y col., 1978), por lo que el resto del contenido acrosomal es liberado al medio ambiente. A consecuencia de la reacción acrosomal se pierde la membrana acrosomal externa y un segmento de la membrana plasmática, sólo una porción de la membrana acrosomal externa cercana al segmento ecuatorial permanece, y se fusiona con la membrana plasmática que cubre esta región del acrosoma, dando como resultado una continuidad de la membrana plasmática con la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1981).

Existen una serie de evidencias que señalan que un influjo de calcio es esencial para que ocurra la reacción acrosomal en espermatozoides de invertebrados y de vertebrados (Sidhu y Guraya, 1989). El mecanismo por el cual el calcio lleva a la fusión de las membranas es desconocido.

Yanagimachi y Usui (1974) propusieron que el calcio neutraliza las cargas negativas de la superficie externa de la membrana acrosomal externa y la superficie interna de la membrana plasmática,

permitiendo a las membranas acercarse para la fusión, y también, que el calcio puede producir dominios cristalinos de fosfolípidos en la membrana que facilitan la fusión entre ellas.

Inductores de la reacción acrosomal

De la zona pelucida se purificó una glicoproteína denominada ZP₃ de 80 KDa, la cual induce la reacción acrosomal, de manera específica, de los espermatozoides del ratón, rata y del ser humano (Sidhu y Guraya, 1989). La capacidad de la ZP₃ para inducir la reacción acrosomal depende de la cadena de polipéptidos y oligosacáridos, ya que ninguno de estos dos componentes por separado puede inducir la reacción acrosomal (Wassarman, 1987). Mediante estudios de autorradiografía se ha demostrado que esta proteína ZP₃ se une preferentemente a los espermatozoides con acrosoma intacto, mientras que otra proteína de la zona pelucida, la ZP₂, se une a espermatozoides que ya sufrieron la reacción acrosomal (Bleil y Wassarman, 1986).

Por otro lado, en los espermatozoides del cuyo y del bovino se observó que los glicosaminoglicanos (GAG) en el cumulus oophorus, pueden inducir la reacción acrosomal (Lenz y col., 1983; Ax y Lenz, 1985; Cherr y col., 1986). Meizel (1985) sugiere que los GAG pueden estimular enzimas requeridas para la reacción acrosomal. Se han sugerido otros factores con función inductora de la reacción acrosomal que se presentan en el fluido folicular ovárico de varias especies; ya que la adición del fluido

incrementa el número de espermatozoides que sufren reacción acrosomal "in vitro" (Meizel, 1985; Siiteri y col ., 1988).

Meizel (1984) propone cuatro mecanismos de acción de la acrosina en la inducción de la reacción acrosomal. 1.- La acrosina junto con la calicreína activan al zimógeno de la fosfolipasa A_2 en los espermatozoides (Guerette y col., 1988) la cual está involucrada en la producción de agentes fusogénicos de membranas. 2.- La acrosina puede hidrolizar proteínas de la membrana del espermatozoide, promoviendo la fusión de la membrana. 3.- La acrosina puede estimular a la adenilato ciclasa del espermatozoide como en otras células (Anderson y Jaworski, 1981) y , producir un incremento del AMPc intracelular, que ha sido implicado en la capacitación y en la reacción acrosomal (Tash y Means, 1982). 4.- La acrosina puede modificar la superficie del espermatozoide, y así incrementar la entrada de calcio, que lleva a la vesiculación de membranas (Sidhu y Guraya, 1989).

La aseveración de que la Fosfolipasa A_2 juega un papel preponderante en la reacción acrosomal, tiene como base las siguientes observaciones 1) La actividad de fosfolipasa A_2 está presente en el espermatozoide y su actividad aumenta varias veces durante la reacción acrosomal (Langlais y Roberts, 1985). 2) Los inhibidores de la fosfolipasa A_2 tales como la mepacrina y el compuesto Upjohn 1002 inhiben la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1981; Llanos y col, 1982). 3) La fosfolipasa A_2 exógena estimula la reacción acrosomal de los espermatozoides del hámster y del cuyo (Singleton y Killian, 1983; Llanos y col., 1982). 4) Los

productos de la fosfolipasa A₂, por ejemplo los fosfolípidos, estimulan la reacción acrosomal en el espermatozoide del ser humano, cuyo, conejo y toro (Fleming y Yanagimachi, 1984).

El calcio y su papel en la reacción acrosomal

La reacción acrosomal, al igual que la exocitosis, es un proceso totalmente dependiente de calcio. La primera utiliza exclusivamente al calcio extracelular (Yanagimachi y Usui, 1974), mientras que la segunda puede usar tanto al catión extracelular como al intracelular.

Se sugiere que el calcio requerido para la reacción acrosomal puede llegar a la célula por un influjo masivo del catión (Yanagimachi, 1988), aunque debe considerarse que un incremento gradual del calcio citoplasmático puede también aumentar la concentración hasta alcanzar el umbral necesario para desencadenar la reacción acrosomal. Al respecto, Coronel y Lardy (1987) han mostrado que los espermatozoides, incubados "in vitro", captan gradualmente al calcio desde antes de que suceda la reacción acrosomal.

Ahora bien, el mecanismo por el cual el calcio es introducido al interior de la célula es desconocido, aparentemente no es a través de canales, ya que éstos no han podido ser detectados en los espermatozoides de los mamíferos. Para la entrada del calcio al espermatozoide se sugieren dos hipótesis: 1) Langlais y Roberts (1985) postulan que la captación de calcio puede ser la consecuencia de un cambio en la relación

colesterol/fosfolípidos de la membrana plasmática, debido a la pérdida de colesterol aumentando la permeabilidad al ión calcio (durante la capacitación espermática se pierde colesterol), y 2) Por otro lado, se ha sugerido que el receptor espermático de la molécula inductora de la reacción acrosomal pudiera ser una proteína acarreadora de calcio, la cual permitiría un influjo masivo del catión al interior del espermatozoide en el momento de la interacción (Yanagimachi, 1988).

Por otro lado, el calcio tiene como función la de activar proteínas y enzimas, que se sugiere intervienen en la reacción acrosomal, como son las fosfolipasas A₂, C y D (Langlais y Roberts, 1985) y una proteína cinasa (Roldan y Mollinedo, 1991).

Significado funcional de la reacción acrosomal

Yanagimachi (1988) señala que la reacción acrosomal tiene dos funciones primordiales: 1) la de ayudar al espermatozoide a penetrar a través de las envolturas del óvulo (formada por las células de la granulosa y la capa acelular denominada zona pelúcida), mediante la liberación de enzimas, que ocurre durante el proceso y 2) la de reorganizar la membrana plasmática a nivel de la región ecuatorial, para que pueda ser reconocida por la membrana plasmática del óvulo y fusionarse con ella.

Otras características que presenta el espermatozoide que ha sufrido reacción acrosomal y que aparentemente están relacionadas con su capacidad de fertilizar son: 1) una motilidad

incrementada o hipermotilidad (Yanagimachi, 1981), 2) la translocación de proteínas, de una región específica del espermatozoide a otra también específica del mismo (Saxena y col., 1986; Aguas y Pinto de Silva, 1989; Trejo y Mujica, 1990) y 3) la activación de proteasas, que intervienen en la interacción del espermatozoide con el óvulo (Cowan y col., 1987; Phelps y col., 1990).

Anexinas

Las anexinas descritas en células de mamíferos, son actualmente siete diferentes proteínas, las cuales se unen a la membrana celular de manera dependiente de calcio (Newman y col., 1991. Las anexinas están extensamente distribuidas, se les encuentra en plantas, insectos y animales, lo cual sugiere que ellas tienen un importante papel biológico común para muchos organismos (Ernest y col., 1991; Newman y col., 1991).

Las anexinas están conformadas por cuatro u ocho secuencias repetidas de 70 unidades de aminoácidos formando dominios que presentan la capacidad de unir calcio. La región N-terminal de la proteína es la que muestra la más grande variación en secuencia y tamaño entre los miembros de la familia (Barton y col., 1991). El dominio N-terminal puede ser fosforilado en sus residuos de tirosina o de serina, lo que se piensa confiere a cada una de las anexinas especificidad funcional (Glennay col., 1986; Weber y Johnson, 1986). Por otro lado, se sugiere que los sitios repetidos conservados son los sitios activos de las anexinas; los

cuales se unen al calcio y a los fosfolípidos (Barton y col., 1991).

Un gran volumen de evidencias bioquímicas relacionan a diferentes anexinas en múltiples funciones: en la inhibición de la fosfolipasa A, la regulación de las inflamaciones y en la fusión de las membranas, así como en la organización del citoesqueleto, en la coagulación de la sangre, en la transducción de señales por calcio, en la actividad de inositol hidrolasa y también como reguladoras del crecimiento celular (De y col., 1986; Funakoshi y col., 1987; Flower y Blackwell, 1979; Glenney, 1986; Glenney y Tack, 1985; Pipinsky y Sinclair, 1986; Ross y col., 1990; Sudhof y col., 1982).

Las anexinas se clasifican de diversas formas, una de las cuales es la que se indica a continuación.

Clasificación de las anexinas

Modificado de Crumpton y Dedman, 1990; Zaks y Creutz, 1990.

| Anexinas | Nombres comunes |
|----------|---|
| I | Lipocortina I, p35 o Calpactina II |
| II | Lipocortina II, p36 o Calpactina I |
| III | Lipocortina III, 35- α Calcimedina |
| IV | 32.5K Calelectrina, Endonexina I, 35-B Calcimedina |
| V | 35K Calelectrina, Endonexina II, 35- δ Calcimedina |
| VI | 67K Calelectrina, p68, p70, 67 Calcimedina, Sinibina. |
| VII | Sinexina |

Las anexinas y su papel en la exocitosis

La exocitosis es un proceso de secreción por el cual el material contenido en vesículas intracelulares (gránulos secretorios) es liberado de las células. La liberación se da por la fusión de las membranas de los gránulos secretorios con la membrana plasmática, seguido de la descarga del contenido de los gránulos hacia el espacio extracelular. Aparentemente las anexinas poseen la capacidad de interactuar con la membrana de los gránulos secretorios y con la membrana plasmática (Zaks y Creutz, 1990).

La calpactina, la sinexina, la sinibina y las calelectrinas han sido localizadas justo debajo de la membrana plasmática y también asociadas a la membrana de los gránulos cromafines y de las vesículas sinápticas (Burgoyne y Cheek, 1987), por lo que se las sugirió como mediadoras de la fusión de dichas membranas en la exocitosis, además de que poseen la capacidad de unir y promover la agregación, dependiente de calcio de los gránulos de las células cromafines de la médula adrenal (Geisow y Burgoyne, 1982). Al respecto, Sudhof y col., (1984) mostraron que las calelectrinas a bajas concentraciones pueden unirse a las membranas de los gránulos cromafines y además a concentraciones mas altas ($>10 \mu\text{M}$) inducen la agregación de estas membranas. Por lo anterior se ha sugerido que las anexinas pueden participar en las interacciones entre la membrana plasmática y la membrana de los gránulos secretorios que ocurre durante la exocitosis (Creutz

y col., 1987; Sudhof y col., 1982; Drust y Creutz, 1988), siendo la sinexina y las calelectrinas las más involucradas en este proceso (Sudhof 1984; Creutz y col., 1979).

Las anexinas I, II, IV y VI fueron encontradas en los espermatozoides del ser humano, bovino y cerdo, aunque se desconoce su función en la reacción acrosomal (Sudhof, 1984; Berruti, 1988; Berruti y col., 1989). La anexina I se encuentra en cola y segmento ecuatorial y por inmunoblot tiene revelado en espermatozoide de jabalí, la anexina II se encuentra a nivel del cuello y pieza media, anexina IV en el acrosoma, anexina VI en acrosoma y cola.

JUSTIFICACION

Como se indicó anteriormente, la reacción acrosomal es un proceso muy importante en la fisiología del espermatozoide, ya que es un requisito indispensable para que el gameto pueda cumplir su función única, la de fertilizar al óvulo para producir un nuevo individuo. La reacción acrosomal es un proceso dependiente de calcio, en el cual es altamente probable la participación de proteínas reguladoras de la función del catión como son la calmodulina y las anexinas.

Estos dos tipos de proteínas han sido localizadas en algunos espermatozoides de mamíferos. Además, ambas han sido involucradas en la exocitosis. La reacción acrosomal se considera como un proceso de exocitosis. En el modelo que se trabaja en nuestro laboratorio, el espermatozoide del cuyo, en el se ha descrito la presencia de la calmodulina, pero no se ha investigado si contiene anexinas, por lo que consideramos importante definir, si las anexinas están presentes; específicamente aquellas anexinas que han sido involucradas en la exocitosis de otros tipos celulares, y si por su localización las anexinas podrían ser señaladas como probables participantes en la reacción acrosomal del espermatozoide del cuyo.

HIPOTESIS

Si las anexinas IV o VI se presentan en la región del acrosoma de los espermatozoides del cuyo, su participación en la reacción acrosomal es altamente probable, porque la reacción acrosomal es un proceso de exocitosis y en otros tipos celulares la participación de estas anexinas en este tipo de proceso ha sido previamente descrita.

OBJETIVO GENERAL

Detección de las anexinas IV o VI (Calelectrinas 32.5K y 67K respectivamente) en los espermatozoides del cuyo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A.- Purificación de las anexinas IV o VI de hígado o testículo del cuyo.
- B.- Producción de anticuerpos contra anexinas.
- C.- Inmunolocalización de anexinas de espermatozoide del cuyo, tanto por inmunofluorescencia como por inmunotransferencia.

MATERIAL Y METODOS

I.- Purificación de las anexinas IV o VI.

Las anexinas se purificaron siguiendo el método descrito por Mathew y col. (1986), que comprende cuatro pasos de purificación por cromatografía. Las anexinas se obtuvieron del hígado o del testículo del cuyo. El tejido (100g) fue homogeneizado en licuadora, en 500 ml del amortiguador A (ver apéndice I). Todo el procedimiento se realizó a 4°C. El homogenado se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min en un rotor GSA-Survall (Du Pont Instruments) y el sobrenadante se dializó contra el amortiguador B (ver apéndice I).

A.- Cromatografía en DEAE-celulosa. El dializado, fue aplicado a una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con el amortiguador B. La columna se lavó hasta que la D.O. a 280 nm del eluato fue menor a 0.05 U; en seguida, la columna se lavó, con el amortiguador B adicionado de NaCl 100 mM, hasta que la D.O. bajo a menos de 0.05 U y subsecuentemente las proteínas fueron eluidas con el amortiguador B adicionado de 500 mM de NaCl. El eluato se dializó contra el amortiguador C (ver apéndice I (A)).

B.- Cromatografía en Fenil-Sefarosa. El eluato dializado de la columna anterior se pasó por una columna de Fenil-Sefarosa, equilibrada con el amortiguador C. La columna fue lavada con el amortiguador C adicionado con 500 mM de NaCl y enseguida con el mismo amortiguador pero sólo con 75 mM de NaCl, en ambos casos hasta que la D.O. fue menor de 0.05 U. La proteína se eluyó con el amortiguador C, en el cual se sustituyó el CaCl_2 por EDTA 2 mM. Las proteínas eluidas se dializaron contra el amortiguador D (ver apendice I (B)).

C.- Cromatografía en DEAE-celulosa. El dializado anterior se pasó a través de una columna de DEAE-celulosa equilibrada con el amortiguador D. Las proteínas fueron eluidas mediante un gradiente discontinuo de NaCl: 50, 100, 200, 250, 300 y 500 mM (ver apendice I (C)).

D.- Cromatografía en Ultragel ACA-44. La proteína se purificó aún más por cromatografía en Ultragel. Se empleó para equilibrar la columna el amortiguador E (ver apendice I (D)) y la proteína se eluyó con el siguiente amortiguador (ver apendice I (D)).

II.- Producción de anticuerpos (policlonales anti-anexina)

La proteína purificada, la anexina (IV o VI), se usó para obtener el respectivo anticuerpo policlonal, mediante la

inmunización de conejos siguiendo un esquema habitual, que consiste en la aplicación subcutánea de la proteína (1 mg) emulsificada en adyuvante completo de Freud. Quince días después se inyectó el animal con la misma cantidad de proteína emulsificada en adyuvante incompleto. Después de quince días el animal se inmunizó por tercera vez, con la proteína en adyuvante incompleto.

III.- Obtención de los espermatozoides del cuyo.

Los espermatozoides fueron obtenidos de los conductos deferentes del cuyo. Una cánula se insertó en la luz del conducto y las células se expulsaron al inyectar con una jeringa una solución isotónica de NaCl 0.154 M. Las células se lavaron dos veces, por resuspensión-centrifugación, en la solución de NaCl. El paquete celular se resuspendió a una concentración de 100 millones de espermatozoides/ml en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 9 con inhibidores de proteasas (ver apéndice III).

IV.- Solubilización de los espermatozoides

La solubilización de los espermatozoides se hizo siguiendo el método descrito por Hernández-Montes y col. (1973). A los espermatozoides lavados y resuspendidos en Tris-inhibidores (1×10^8 células/ml) se les añadió 0.4 ml del agente reductor ditiotreitól (DDT) 90 mM diluido en Tris-HCl 50 mM, pH 9 y se

incubaron por 10 min a temperatura ambiente. En seguida se les adicionó 0.4 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, y la muestra se sonicó por 1 min a 50 mA, para fluidificarla.

V.- Inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides del cuyo

La reacción acrosomal fue inducida mediante el tratamiento de los espermatozoides con un ionóforo de calcio, el A23187 (ionóforo específico para calcio). Los espermatozoides se incubaron en medio de cultivo mínimo que contenía piruvato de sodio y ácido láctico (MCM-PL) a una concentración de 50×10^6 células por ml a 37°C durante 20 min. En seguida el ionóforo se añadió a una concentración final de 1.3 μ M. Bajo este tratamiento, del 70%-80% de los espermatozoides expresan la reacción acrosomal en los primeros diez minutos posteriores a la adición del A23187.

VI.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS).

Se empleó básicamente el método de Laemmli (1970). El gel separador se preparó al 10% y el concentrador al 3%. A las muestras solubilizadas se les adicionó el amortiguador de la muestra (a un volumen de muestra, 1/4 volumen de amortiguador) y la mezcla se calentó en agua a ebullición durante 2 min. Se aplicó a cada pozo del gel un volumen adecuado de muestra. La electroforesis se realizó a 90 V durante la primera hora y después

a 125 V, hasta que el marcador del frente de la corrida (pironina G) alcanzó el extremo inferior del gel, en este momento se detuvo la corrida y el gel se removió del molde. El gel se tñó con azul de Coomassie, para revelar el patrón electroforético de las proteínas, o bien, fue transferido a papel de nitrocelulosa para la inmunodetección de la anexina.

VII.- Inmunodetección de las anexinas por "Western blot".

A) La transferencia de las proteínas del gel (PAGE-SDS) a papel de nitrocelulosa se efectuó por el método de Towbin y col., (1979).

Para la transferencia se ensambló el gel en un paquete compuesto de los siguientes elementos, que se colocaron superpuestos: fibra scotch brite, papel filtro doble, gel (PAGE-SDS), papel de nitrocelulosa, papel filtro doble y fibra scotch brite. Durante el ensamblaje, todos los componentes se mantuvieron sumergidos en el amortiguador de transferencia (véase abajo); eliminando las burbujas entre los elementos ensamblados. Con los soportes de la cámara colocados a cada lado del paquete, éste se sujetó con ligas y se colocó en la cámara de transferencia. La transferencia se realizó a 20 mA durante 18 h. El amortiguador de transferencia empleada contenía: glicina 2.42g, Tris-base 11.265g, metanol 200 ml, en 1 litro con agua.

B) Inmunolocalización de la anexina.

El papel de nitrocelulosa se tñó con rojo de Ponceau, para asegurar que las proteínas fueron transferidas y para recortar adecuadamente el patrón correspondiente a cada muestra; en seguida las tiras se destañeron en agua. El papel se lavó en amortiguador de fosfatos (PBS) y se le trató para bloquear los sitios inmunológicos inespecíficos para lo cual, el papel fue sumergido en una mezcla de PBS-Tritón X-100 al 1% (PBS-T), leche descremada al 5% y suero de cayo al 10%, durante 1 hr a 37°C. Se lavó nuevamente en PBS-T, tres veces. En seguida, se puso a interaccionar con el primer anticuerpo, (anti-anexina producida en conejo) diluido apropiadamente en PBS-T al 1% con leche descremada al 5%, y suero de cayo al 10%, durante 1 hr a 37°C. El exceso del anticuerpo se retiró lavando el papel, tres veces rápidamente y en seguida 3 veces más en PBS-T, por 10 min cada vez.

Se incubó durante 1 hr a 37°C con el segundo anticuerpo (IgG de chivo anti IgG de conejo) conjugado con peroxidasa, diluido apropiadamente en PBS-T al 1%, leche descremada al 5% y suero de cayo al 10%. El título del anticuerpo fue previamente determinado por "ELISA". Se lavó el papel en seguida 3 veces con PBS-T por 10 min cada vez, seguida de 3 veces más en PBS por 10 min cada vez y 3 veces más en amortiguador de fosfatos por 10 min cada vez, se incubó por 10 min a temperatura ambiente en el amortiguador de preincubación.

Este amortiguador se preparó mezclando lentamente las soluciones concentradas de diamino bencidina (40 ml) y cloruro de

níquel y cobalto (1.2 ml). En seguida, el papel se incubó en el amortiguador de preincubación, añadido de H_2O_2 al 0.005% concentración final, hasta que se reveló la peroxidasa, con un tiempo de incubación hasta de 30 min. Luego la tira se lavó en el amortiguador de fosfatos 50 mM y finalmente en agua. Solución concentrada de diamino bencidina: diamino bencidina 40 mg en 80 ml de amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4; la solución se agitó en la oscuridad durante 20 min y se usó de inmediato. Solución de níquel y cobalto ($NiCl_2$ 30 mg, $CoCl_2$ 30 mg y 3.0 ml de agua. La solución se agita en la oscuridad y se usa de inmediato.

VIII.- Detección de la anexina en el espermatozoide, por inmunofluorescencia indirecta.

Los espermatozoides se fijaron en suspensión, en formaldehído al 1.5% en PBS, por 30 minutos. En seguida se colectaron por centrifugación, se desechó el sobrenadante y las células se incubaron en cloruro de amonio al 0.05% en PBS por 10 min, para neutralizar el exceso de grupos aldehído. Los espermatozoides se lavaron 3 veces en PBS, una vez en H_2O y se resuspendieron en H_2O para preparar frotis. Las muestras, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 hrs. Los espermatozoides se permeabilizaron en acetona a $-20^\circ C$ durante 5 min. Las laminillas, de inmediato se lavaron en PBS, tres veces. Las células se incubaron con el primer anticuerpo (anti-anexina) diluido apropiadamente colocando 100 μl del anticuerpo y con un

cubre objetos sobre la gota se dejaron a 37°C durante 1 hr. Se lavó 3 veces en PBS, y se trataron con el segundo anticuerpo (IgG de chivo anti IgG de conejo) conjugado a rodamina, durante 1 hr a 37°C, se empleó la dilución recomendada por el fabricante.

Las laminillas se lavaron 3 veces en PBS, y para la observación al microscopio, se montaron en PBS-glicerol (v/v) con cubre objetos y se sellaron con barniz de uñas. Para la observación se utilizó un microscopio con óptica para fluorescencia y las fotografías se tomaron en película kodak Tri-X, 400 ASA.

IX.- Tinción de gel por el método de Morrissey (1981)

El gel fue fijado en una solución que contenía metanol al 50% y ácido acético al 10%, durante 30 min. Este paso fue seguido por un lavado en una solución de metanol al 5%, ácido acético al 7%, por 30 min.

El gel fue postfijado con glutaraldehído al 10%, durante 30 min. Se retiró el exeso del fijador lavando el gel con agua destilada, realizando varios cambios, de 15 min cada uno, durante 2 hrs.

El gel fue sumergido en una solución de ditiotreitól ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) por 30 min. Transcurrido el tiempo se sacó al gel de la solución anterior y sin lavar se adicionó nitrato de plata al 0.1% por 30 min.

Para revelar las bandas, el gel fue lavado una vez rápidamente con una pequeña cantidad de agua destilada y dos veces

con una pequeña cantidad de la solución desarrolladora (carbonato de sodio al 3% adicionado con formaldehído, 50 μ l/100 ml) hasta que alcanzó el color deseado.

La tinción fue parada, adicionando 5 ml de ácido cítrico 2.3 M directamente en la solución de desarrollo y agitando por 30 min.

Se lavó con agua destilada varias veces por periodos de 30 min.

Para conservar el gel se lavó por 10 min en carbonato de sodio al 0.03% (previene el blanqueamiento).

Todos los pasos se realizaron en agitación constante.

RESULTADOS

I.- Purificación de anexinas

Las anexinas fueron purificadas de testículos de cuyos, de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos modificando solamente la última cromatografía.

El extracto de testículo, después de la centrifugación y diálisis fue analizado por electroforesis en PAGE-SDS. El patrón electroforético de las proteínas del extracto se muestra en la Fig. 8 línea B; en el patrón se observa un elevado número de proteínas. Este extracto fue purificado parcialmente por cromatografía en DEAE-celulosa y analizado por electroforesis, mostrando un patrón proteico todavía complejo (datos no mostrados).

De las proteínas obtenidas de la cromatografía de DEAE-celulosa, se purificaron aquéllas con capacidad de asociarse a grupos hidrofóbicos (fenilos) de manera dependiente de calcio, para lo cual el eluato se separó por la cromatografía de afinidad en columna de fenil-sefarosa. En presencia de calcio varias proteínas se asociaron a la columna, y ellas fueron eluidas al quelar el calcio con EDTA. El análisis electroforético de estas proteínas se muestra en la Fig. 8 línea C.

De las proteínas con capacidad de asociarse a grupos

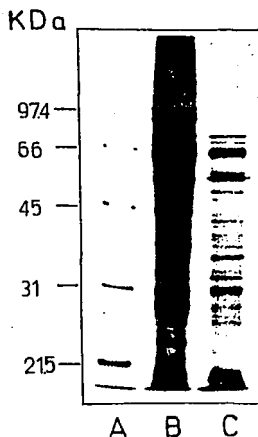


Figura. 8. Análisis electroforético mediante geles de poliacrilamida-SDS. (A) Marcadores de peso molecular: fosforilasa B 97.4 KDa, albúmina de suero de bovino 66.2 KDa, ovoalbúmina 45 KDa, anhidrasa carbónica 31 KDa, inhibidor de tripsina de soya 21.5 KDa. (B) patrón proteico del extracto total de testículo, que se usó para purificar las anexinas y (C) patrón de las proteínas asociadas a la columna de fenil-Sefarosa en presencia de calcio y eluidas quelando el calcio con EDTA.

hidrofóbicos de manera dependiente de calcio fueron purificadas las anexinas, mediante cromatografía en DEAE-celulosa, que fue corrida bajo condiciones diferentes a como se realizó la primera cromatografía (ver Material y Métodos). Las anexinas fueron eluidas mediante un gradiente discontinuo de fuerza iónica (NaCl). A una concentración 50 mM de NaCl se eluyó una proteína de peso molecular de 66 KDa (Fig. 9 línea A). Al aumentar a 500 mM la concentración de NaCl, se eluyó un doblete de proteínas de peso molecular de 33-35 KDa (Fig. 9 línea B). Las proteínas fueron obtenidas en las primeras fracciones, mientras que en las últimas fracciones se obtuvo una proteína de peso molecular bajo (17 KDa), la cual pudiera ser calmodulina Fig. 9 línea C.

El doblete proteico de 33-35 KDa así como la proteína de 66 KDa, fueron repurificadas por cromatografía de filtración, usando Biogel-P100 como filtro molecular. El resultado obtenido de estas cromatografías, es mostrado en la Fig. 10 líneas B y C, respectivamente. La pureza fue alta, ya que la electroforesis no mostró ninguna otra proteína, a pesar de que el método de tinción empleado con plata es muy sensible.

El rendimiento final también fue alto, ya que de 500 gramos de tejido inicial se obtuvieron aproximadamente 6 mg de la proteína de 33-35 KDa y 2 mg de la proteína de 66 KDa. Estas, por su grado de pureza pudieron ser usadas para producir anticuerpos policlonales contra ellas.

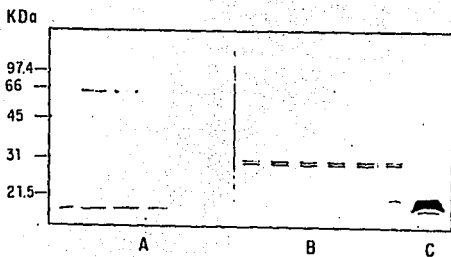


Figura. 9. Análisis electroforético mediante PAGE-SDS, de las proteínas eluidas de la columna de DEAE-Celulosa. Las fuerzas iónicas usadas fueron: A) NaCl 50mM, B) y C) 500 mM. En A) se muestra la obtención de una proteína de Mr 66 KDa, en B) un doblete de Mr 33-35 KDa y en C) una proteína de peso molecular semejante al de la calmodulina (17 KDa).

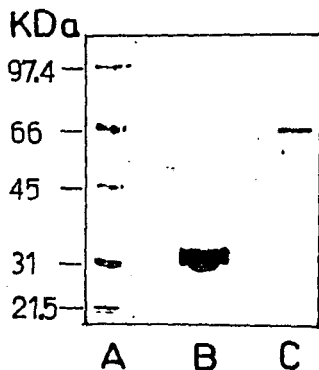


Figura. 10. Analisis electroforético A) Marcadores de peso molecular, B) proteínas de 33-35 KDa y C) 66KDa, repurificación por cromatografía de filtración (Biogel P100). El gel fue teñido con plata siguiendo la técnica de Morrissey , 1981.

II.- Inmunodetección de las proteínas 33-35 KDa y 66 KDa en el espermatozoide del cuyo.

Las proteínas del espermatozoide solubilizado fueron corridas en electroforesis y transferidas a papel de nitrocelulosa. El patrón proteico fue revelado tiñendo una tira de papel con negro de amido (Fig. 11 línea B). Otras tiras de papel fueron tratadas con los anticuerpos anti 33-35 o anti 66 KDa, para distinguir si estas proteínas estaban presentes entre las proteínas del espermatozoide.

Con el anticuerpo anti 33-35 KDa se detectó una banda ancha de peso molecular de 38 KDa (Fig. 11 línea C). Cuando se utilizó el anticuerpo anti 66 KDa, éste sí reveló una proteína de 66 KDa (Fig. 11 línea D).

III.- Localización de las proteínas 33-35 KDa y 66 KDa en espermatozoide del cuyo, por inmunofluorescencia indirecta.

Se trabajaron dos tipos de muestras, espermatozoides recién obtenidos de los conductos deferentes y lavados en solución isotónica de NaCl (154 mM), y en espermatozoides incubados en MCM-PL, capacitados y algunos con reacción acrosomal. Las muestras fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas como se describe en Material y Métodos.

Cuando se usó, en los espermatozoides lavados, el anticuerpo anti 33-35, se vió marca fluorescente exclusivamente en la región apical del acrosoma (Fig. 12 b). Los controles,

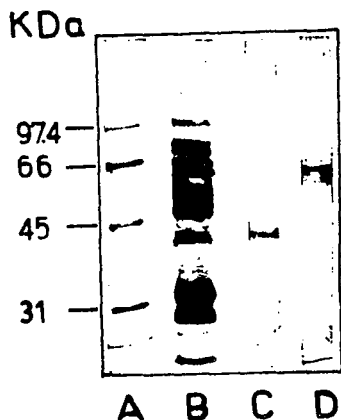


Figura. 11. Detección de anexinas en espermatozoide de cuyo, por Inmunoblot. A) Marcadores de peso molecular. B) Patrón proteico del espermatozoide total de cuyo. C) Inmunodetección utilizando los anticuerpos contra la proteína de 33-35 KDa. D) Inmunodetección usando los anticuerpos contra la proteína de 66 KDa.

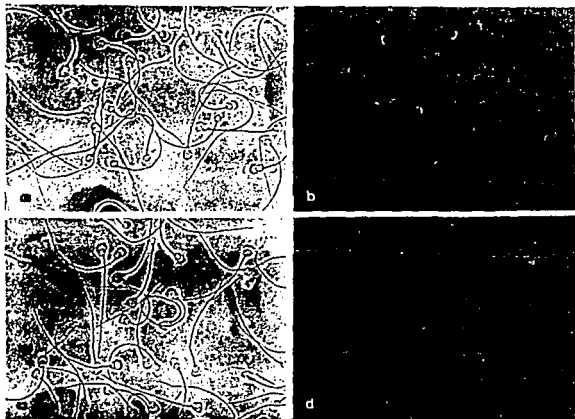


Figura 12. Detección de la anexina 33-35 KDa, en espermatozoide de cuyo, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). a) Microscopía de Contraste de fases de espermatozoide de cuyo. b) IFI de los espermatozoide de cuyo, usando los anticuerpos contra la proteína de 33-35 KDa. Los espermatozoides muestran fluorescencia únicamente en la región acrosomal. c) Controles negativos: se úso IgG de conejo inespecífica o bien se suprimió sin primer anticuerpo y un tercer anticuerpo se adsorbió con la proteína de 33-35 KDa. d) En ningún caso se observó fluorescencia (250 X).

utilizando sólo el segundo anticuerpo o una IgG inespecífica de conejo, como primer anticuerpo, dieron resultados negativos (Fig. 12 d).

En los espermatozoides capacitados que aún conservaban el acrosoma, aparentemente normal, mostraron como los espermatozoides lavados, fluorescencia restringida a la región apical del acrosoma (Fig. 13 b), mientras que, en los espermatozoides que mostraban un acrosoma contraído, la fluorescencia se vio difusa y distribuida en todo el acrosoma (Fig. 13 b). La marca fluorescente se perdió junto con el acrosoma en los espermatozoides que sufrieron reacción acrosomal (Fig. 13 b).

Con el anticuerpo correspondiente no se detectó en el espermatozoide el antígeno de anti 66 KDa, ni en espermatozoide lavado, ni en capacitados y tampoco en los que presentaban reacción acrosomal.

IV.- Inmundefección de las proteínas de 33-35 KDa y 66 KDa. en las vesículas de reacción acrosomal.

Preparamos vesículas de reacción acrosomal, inducida ésta con el ionoforo A 23187. El patrón proteico de las vesículas se muestra en la (Fig. 14 línea B). La inmundefección con los anticuerpos policlonales mono-específicos, producidos contra las proteínas de 33-35 y 66 KDa, del testículo de cuyo, revelaron una proteína de 33-35 KDa (Fig. 14 línea C) y una proteína de 66 KDa (Fig. 14 línea D), respectivamente.

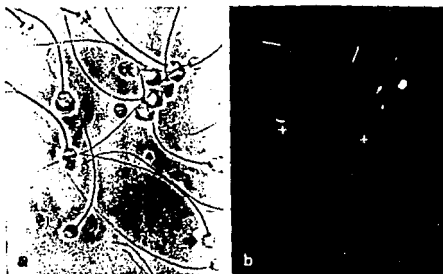


Figura. 13. Detección de la anexina 33-35 por IFI KDa en espermatozoide capacitados, en aquéllos que están sufriendo reacción acrosomal y en los que han perdido el acrosoma. a) Microscopía de contraste de fase de los espermatozoides. b) Inmuno-detección usando el anticuerpo contra la proteína de 33-35 KDa. (+) espermatozoides capacitados, (-) espermatozoides sufriendo RA, (-→) espermatozoides sin acrosoma (400 X).

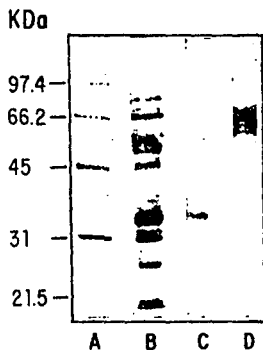


Figura. 14. Inmunodetección de las anexinas en vesículas mixtas de reacción acrosomal (VMRA), mediante Inmunoblot. A) Marcadores de peso molecular. B) Patrón proteico de las VMRA. C) Inmunodetección usando los anticuerpos contra la proteína de 33-35 KDa. D) Inmunodetección usando los anticuerpos contra la proteína de 66 KDa.

DISCUSION

Mediante el procedimiento empleado de purificación de anexinas , del testículo del cuyo se logró la purificación de 2 proteínas, una de peso molecular de 66 KDa, y otra un doblete de 33-35 KDa. La proteína de 66 KDa ya fue identificada por (Hernández y col., en preparación) como anexina VI, mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal comercial, obtenido de ICN en trabajo posterior a éste. No se ha identificado aún como anexina, a la proteína 33-35 KDa aunque probablemente no se trata de la anexina IV.

Zaks y Creutz en 1990 comunicaron la purificación de las anexinas IV (calelectrina 32 KDa) y VI (calelectrina 67 KDa) también de testículo, pero no señalan la especie empleada.

Por inmunoblot pudo demostrarse la presencia de proteínas espermáticas reconocidas por los anticuerpos producidos contra las proteínas 33-35 y 66 KDa de testículo de cuyo. Sin embargo, la proteína reconocida en el espermatozoide por el anticuerpo 33-35 KDa mostró un peso relativo de 38 KDa. Es importante señalar, que cuando el reconocimiento se hizo por inmunoblot, en las proteínas de las vesículas mixtas de la reacción acrosomal, anti 33-35 KDa reconoció a una proteína de 35 KDa. Esto podría significar, que la proteína de 38 KDa sufrió una degradación ligera durante la reacción acrosomal, proceso en el que se liberan y activan proteasas. Otra posibilidad podría ser, que la proteína de 38 KDa, del espermatozoide, estuviera ligeramente glicosilada y que durante la reacción acrosomal perdiera carbohidratos y por ello

cambiara su movilidad relativa.

Se esperaba la localización de ambas proteínas 33-35 y 66 KDa en el acrosoma del espermatozoide del cuyo debido a que Súdhof (1984) había localizado anexinas de pesos similares (32.5 y 67 KDa) en el acrosoma de espermatozoides del bovino. Además, este autor encontró que el anticuerpo contra la anexina de 67 KDa también teñía al flagelo del espermatozoide. Los resultados mostrados en este trabajo indicaron que la proteína de 66 KDa no está expuesta, para ser reconocida en la célula por el anti-66 KDa. Pero se puede afirmar que la proteína de 66 KDa sí está en la región acrosomal, esto, con base en la detección de ella en las vesículas de reacción acrosomal. Con nuestros datos, no podemos concluir si la proteína de 66 KDa del espermatozoide del cuyo es igual a la de 67 KDa del gameto del bovino.

En los espermatozoides maduros se ha comunicado la presencia de otras anexinas: calpactinas I y II en el del humano por Berruti (1988) y anexinas I, II y VI en los del carnero (Feinberg y col., 1991). Ninguna de estas anexinas fue localizada en el acrosoma; ellas están presentes en el flagelo de los espermatozoides.

La presencia de la proteína de 33-35 KDa en la región acrosomal del espermatozoide del cuyo, la cual muy probablemente se trate de una anexina, permite sugerir su participación en la reacción acrosomal, considerando a este proceso como una exocitosis. La base de la consideración anterior sería: a) las anexinas I y II (cuyos pesos son 35 Kda y 36 KDa, respectivamente) participan en la exocitosis de los gránulos de

secreción (Burgoyne y Morgan 1990; Burgoyne, y col., 1991; Ali, y col., 1989; b) la proteína de 33-35 KDa sufre redistribución en el acrosoma, previa a la reacción acrosomal; de una localización apical a una localización homogénea en todo el acrosoma, distribución que podría permitir la fusión de las membranas en sitios múltiples, como ocurre en la reacción acrosomal y c) la proteína 33-35 KDa está localizada en el sitio adecuado para que ocurra la fusión de las membranas; es decir, entre la membrana plasmática y la acrosomal externa ya que pudo ser detectada en las vesículas de reacción acrosomal.

CONCLUSIONES

1.- Mediante la técnica empleada de purificación de anexinas de testículo del cuyo se pueden purificar dos proteínas (probablemente anexinas), un doblete de Mr 33-35 KDa y un polipeptido de Mr 66 KDa.

2.- Con los anticuerpos contra las proteínas 33-35 y 66 KDa de testículo en el patrón proteico del espermatozoide pueden reconcerse dos proteínas de pesos moleculares similares, 38 KDa y 66 KDa respectivamente.

3.- Con base en los resultados de inmunocitoquímica se concluye que la proteína de 38 KDa es acrosomal y está circunscrita a la parte apical del acrosoma. Además, que en los espermatozoides que están sufriendo reacción acrosomal, la proteína se distribuye a todo el cuerpo del organelo.

4.- La inmunolocalización positiva de la proteína 38 KDa (como un barrido desde 38-35 KDa) en el patrón proteico de vesículas de reacción acrosomal confirma que la zona acrosomal es el sitio de la localización de la proteína de 38 KDa. Adicionalmente, que la proteína es parcialmente degradada durante la reacción acrosomal.

5.- De los resultados con el anticuerpo contra la proteína testicular de 66 KDa negativa la inmunocitoquímica del espermatozoide, positiva la inmunodetección en el patrón proteico

de espermatozoide total y de vesículas de reacción acrosomal que concluye lo siguiente que la localización de la proteína 66 KDa es acrosomal. Además que la proteína 66 KDa se encuentra bloqueada en el espermatozoide.

APENDICE I

Amortiguador A: Tris 40 mM

NaCl 75 mM

EDTA 2 mM

NaN₃ al 0.05%,

pH 7.5

adicionado de inhibidores de

protesas:

(PMSF) 2 mM metil-sulfonil fluoruro

(PHMB) 4 mM p-hidroaximercuribenzoato

(PAB) 2 mM p-aminobenzaamidina

Amortiguador B: Tris 10 mM

EDTA 1 mM

NaN₃ al 0.025%

pH 7.5

APENDICE I (A)

Amortiguador B: Tris 10 mM
EDTA 1 mM

NaCL 100 mM
NaN₃ al 0.025%
pH 7.5

Amortiguador B: Tris 10 mM
EDTA 1mM
NaCL 500 mM
NaN₃ al 0.0025%
pH 7.5

Amortiguador C: Tris 40 mM
NaCl 100 mM
CaCl₂ 2mM
pH 7.4

APENDICE I (B)

Amortiguador C: Tris 40 mM
NaCl 500 mM
CaCL₂ 2mM
pH 7.4

Amortiguador C: Tris 40 mM
NaCl 75 mM
CaCl₂ 2mM
pH 7.4

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
pH 6.2

APENDICE I (C)

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
NaCl 50 mM
pH 6.2

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
NaCl 100 mM
pH 6.2

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
NaCl 200 mM
pH 6.2

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
NaCL 250 mM
pH 6.2

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1 mM
NaCL 300 mM
pH 6.2

Amortiguador D: Imidazol 10 mM
EDTA 1mM
NaCl 500 mM
pH 6.2

APENDICE I (D)

Amortiguador E: Tris 50 mM
NaCl 200 mM
EDTA 2 mM
NaN₃ al 0.05%
pH 7.5

Amortiguador: Hepes 10 mM
NaCl 100 mM
EDTA 1 mM

pH 7.4

APENDICE III

Amortiguador: Tris-HCL 50 mM
pH 9
con lo siguientes inhibidores
de proteasas:
PMSF 5 mM
(TLCK) 2 mM N-ptosil-L- lisina
clorometil cetona
(NEM) 5 mM N-etilmaleimida
PHMB 2mM
leupeptina 20 μ M

BIBLIOGRAFIA

Aguas, A. P. y Pinto de Silva, P. (1989). Biomodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during Ca^{2+} -dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *J. Cell Sci.* 93; 467-479.

Ali, S. M., Geisow, M. J. y Burgoyne, D. R. (1989). A role for calpactin in exocytosis in adrenal chromaffin cell. *Nature.* 340; 313-315.

Anderson, W. B. y Jaworski, C. J. (1981). Potentiation of hormone-stimulated accumulation of cyclic AMP in cultured fibroblasts by trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 207; 465-468.

Austin, C. R. (1982): *Fertilization En: Germ Cell and Fertilization* eds. Austin and Shorts. 2nd Ed. Cambridge University Press Cambridge, pp. 63-101

Ax, R. L. y Lenz, R. W. (1985). Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. *J. Dairy. Sci.* 68; 387-390.

Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S., y Crumpton, M. J. (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *J. Biochem.* 198; 749-760.

Bedford, J. M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in euterian mammals. *Biol. Reprod.* 28; 108-120.

Berruti, G. (1988). Calpactin like proteins in human spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 179; 374-384.

Berruti, G. y Martegani, E. (1989). Identification of protein cross-reactive to phosphotyrosine antibodies and tyrosine kinase activity in boar spermatozoa. *J. Cell Sci.* 93; 667-674.

Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.* 102; 1363-1370.

Burgoyne, R. D. y Cheek, T.R. (1987). Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis, *Biosci. Res.* 7; 281-288.

Burgoyne, R. D., Handel, S. E., Morgan, A., Rennison, M., Turner, M. D. y Wide, J. (1991). Calcium, the cytoskeleton and calpactin (annexin II) in exocytotic secretion from adrenal chromaffin and mammary epithelial cell. *Biochem. Soc. Trans.* vol.19; 1085-1089.

Burgoyne, R. D. y Morgan, L. (1990); Evidence of calpactin in calcium-dependent exocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 18; 1101-1104.

Coronel, C. E. y Lardy, H. A. (1987). Characterization of calcium uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 37; 1097-1107.

Cowan, E. A., Primakoff, P. y Myles, G. D. (1987). Sperm exocytosis increases the amount of PH 20 antigen on the surface of guinea pig sperm. J. Cell Biol. 103; 1289-1297.

Creutz, G. E., Pozole, C. J., y Pollard, H. B. (1979). Self-association of synexin in the presence of calcium. J. Biol. Chem. 254; 553-558.

Creutz, G. E., Zaks, W. J., Hamman, H. C., Crave, S., Martin, E. H., Gould, K. L., Oddie, K. M. y Parsons, S. J. (1987): Identification of chromaffin granule binding protein: Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin and the tyrosine kinase substrate p36 and p36. J. Biol. Chem. 262; 1860-1868.

Crumpton, M. J. y Dedman, J. R. (1990). Protein terminology tangle. Nature 345; 212.

Cherr, G. N., Lambert, H., Meizel, S. y Katz, D. F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zonae pellucida and induction by homologous soluble zone pellucidae. Dev. Biol. 114; 119-131.

De, B. K., Misono, K. S., Lukas, T. J., Mroczkowski, B. y Cohen,

S. (1986). A - calcium - dependent 35 KDa substrate for EGF receptor/Kinase isolated from normal tissue. J. Biol. Chem. 261; 13784-13792.

Drust, D. S. y Creutz, C. E. (1988). Agregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. Nature 331;88-94.

Eddy, E. M. (1988). The spermatozoon En: The physiology of reproduction eds Knobil and J. D. Neill. Raven Press, New York, pp. 27-68.

Ernest, J. D., Hoye, E., Blackwood, R. A. y Mok, T. L. (1991). Identification of a domain that mediates vesicle aggregation reveals functional diversity of annexin repeats. J. Biol. Chem. 266; 6670-6673.

Fawcett, D. W. (1970). A comparative view of sperm ultrastructura. Biol. Reprod (Suppl) 2: 90-127.

Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoa. Dev. Biol. 44; 394-436.

Feinberg, J. M., Rainteau, D. P., Kaetzel, M. A., Dacheux, J. L., Dedman, J. R. y Weinman S. (1991). Diferential localization of anexinas in ram germ cell. A biochemical and inmunocytochemical study. J. Histochem Cytochem 39; 955-963

Fleming, A. D., y Yanagimachi R. (1984). Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229; 485-489.

Flower, R. J., y Blackwell, G. J. (1979). Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. 278; 456-459

Funakoshi, T., Heimark, L., Hendrickson, L. E., Mc Mullen, B. A., y Fujikawa, K. (1987). Human placental anticoagulant protein: Isolation and characterization. *Biochemistry* 26; 5572-5578

Geisow, M. J., y Burgoyne, R. D. (1982). Calcium-dependent binding of cytosolic proteins by chromaffin granules from adrenal medulla, *J. Neurochem.* 38; 1735-1741.

Glenney, J. R. (1986). Two related but distinct from of the Mr 36 000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a calcium dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Uci. USA* 83; 4258-4262.

Glenney, J. R., Boudreau, M., Galyean, R., Hunter, T. y Tack, B. (1986). Association of the S-100 related calpactin I light chain with the N-terminal tail of the 36 KDa heavy chain. *J. Biol. Chem.* 261; 10485-10488.

Glenney, J. R., y Tack, B. F. (1985). Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: Identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 82; 7884-7888.

Guerette, P., Langlais, J., Antaki, P., Chapdelaine, A. y Roberts, K. D. (1988). Activation of phospholipase A₂ of human spermatozoa by proteases. *Gamete Res.* 19; 203-214.

Hernández - Montes H., Iglesias, G. y Mújica, A. (1973). Selective solubilization of mammalian spermatozoa structure. *Exp. Cell Res.* 76; 473-440.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685.

Langlais, J. y Roberts, K. D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12; 183-224.

Lenz, R. W., Ball, G. D., Lohse, J. K., First, N. L. y Ax, R. L. (1983). Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 28; 683-690.

Llanos, M. N., Lui, C. W. y Meizel, S. (1982). Studies of phospholipase A₂ related to the hamster sperm acrosome reaction.

J. Exp. Zool. 221; 107-117.

Mathew, J. K., Krolak, K. M. y Dedman, J. R. (1986). Calcimedins: Purification and characterization from chicken gizzard and rat and bovine livers. J. Cell. Biochem. 32; 223-234.

Meizel, S. (1984). The importance of hidrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol. Rev. 59; 125-157.

Meizel, S. (1985). Molecules that initiate or help stimulate the 30 acrosome reaction. Their interaction with the mammalian sperm surface. Am. J. Anat. 174; 285-302.

Morrissey, J. H. (1981). Silver stain from proteins in polyacrylamide gel: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117; 307-310.

Nagae, T., Yanagimachi, R., Srivastava, P. N. y Yanagimachi, H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. Fertil. Steril. 45; 701-704.

Newman, R. H., Leonard, K. y Crumpton, M. J. (1991). 2D Crystal forms of annexin IV on lipid monolayers. FEBS Lett. 279; 21-24.

Peterson, R., Russell, L., Bundman, D. y Freund, M. (1978). Presence of microfilaments and tubular structures in boar

spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction. Biol. Reprod. 19; 459-466.

Phelps, B. M., Koppel, D. E., Primakoff, P. y Myles, D. G. (1990). Evidence that the proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. J. Cell Biol. 111; 1839-1847.

Pipinsky, R. B., y Sinclair, L. K., (1986). Epidermal growth factor dependent phosphorylation of lipocortin. Nature 321; 81-84.

Roldan, E. R. S. y Mollinedo, F. (1991): Diacylglycerol stimulates the calcium-dependent phospholipase A of ram spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176; 294-300.

Ross, T. S., Tait, Jonathan, F., y Majerus, P. W. (1990). Identity of inositol 1,2- cyclic phosphate 2- phosphohydrolase with lipocortin III. Science 248; 605-607

Roy, O. G., Marjorie, A. K. y Frederick, S. J. (1976). Reproduction y human welfare: A Challenge to research, sponsored by the Ford Foundation. pp. 5.

Saxena, N., Sharif, S., Saxena, N. K., Russel, L. D. y Peterson, R. N. (1986). Changes in plasma membrane (PM) organization during in vitro capacitation of boar sperm detected by monoclonal antibodies (MCAs). Fed. Pro. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 45; 305

Sidhu, K. S. y Guraya, S. S. (1989). Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int. Rev. Citol.* 118; 231-280.

Siiteri, J. E., Glottlieb, W. y Meizel, S. (1988). Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction in vitro. *Gamete. Res.* 20; 25-42.

Singleton, C. L., y G. J. Killian (1983). A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. *J. Androl.* 4; 150-156

Sudhof, T. C. (1984). The calelectrins: New and ubiquitous calcium-regulated proteins with a possible role in cytotic processes: *Biochem. Soc. Trans.* 12; 972-974.

Sudhof, T. C., Ebbecke, M., Walker, J.H., Fritsche, V. y Boustead, C. (1984). "Isolation of mammalian calelectrins: A new class of ubiquitous Ca-regulated proteins", *Biochemistry.* 23; 1103-1109.

Sudhof, T. C., Walker, H. H. y Obrocki, T. (1982). Calelectrin self-aggregates and promotes membrane aggregation in the presence of calcium. *EMBO J.* 1; 1167-1170.

Tash, J. S. y Means, A. R. (1982). Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar

motility. Biol. Reprod. 27; 745-763.

Trejo, R. y Mújica, A. (1990). Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Molec. Reprod. Rev. 26; 366-376.

Torrey, W. 1978. Los gametos. Morfología de los vertebrados. Ed. Limusa. México, D.F 3ra Ed. pp 575.

Towbin, H., Staehelin, T. y J. Gordon. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Pro. Natl. Acad. Uci. USA. 76; 4350-4354.

Wassarman, P. M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. Science 235; 553-560

Weber, K. y Johnsson N. (1986). Repeating sequence homologies in the p36 target protein of retroviral protein kinase and lipocortin, the p37 inhibitor of phospholipase A2. FEBS Lett. 203; 95-98.

Yanagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In: Fertilization and embryonic development in vitro Mastroiani, L Jr. and J. D. Bigger (eds), Plenum Press, New York. pp. 82-182.

Yanagimachi, R. R. (1988). Mammalian fertilization En: The

physiology of reproduction. eds. Knobil y J. Neil. Reven Press,
New York, pp. 135-185

Yanagimachi, R. y Usui, N. (1974). Calcium dependence the
acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp.
Cell. Res. 89; 161-174.

Zaks, W. J. y Creutz, C. E. (1990): Evaluation of the annexins as
potential mediators of membrane fusion in exocytosis. J
Bioenerget and Biomemb. 22: 97-120.