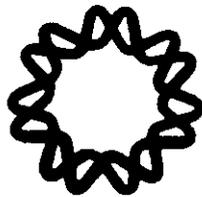




00551

17

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA MOLECULAR**



299062

**Localización de metaloproteasa(s) que unen zinc  
en el espermatozoide de erizo de mar y su  
participación en la Reacción Acrosomal.**

**T E S I S**

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

presenta

**Gisela Granados González**

**Asesor: Dra. María del Carmen Beltrán Nuñez**

Cuernavaca, Mor

2001.



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 esta 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.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Carmen Beltrán en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca, Mor

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
<b>FECUNDACIÓN</b> .....	6
<b>EL ESPERMATOZOIDE</b> .....	7
<b>EL ÓVULO</b> .....	11
<b>EL ZINC</b> .....	13
<i>El zinc y la fecundación</i> .....	13
<b>METALOPROTEASAS</b> .....	14
<i>Metaloproteasas y fecundación</i> .....	16
<b>INHIBIDORES DE METALOPROTEASAS</b> .....	17
<i>Quelantes de metales</i> .....	18
OBJETIVOS.....	20
METODOLOGÍA.....	21
<b>I. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES</b> .....	21
<b>II. REACTIVOS</b> .....	21
<b>III. ENSAYOS DE REACCIÓN ACROSOMAL</b> .....	22
<b>IV. PREPARACIÓN DE GELATINA</b> .....	22
<b>V. PREPARACIÓN DEL FACTOR</b> .....	22
<b>VI. OBTENCIÓN DE LAS DIFERENTES PARTES DEL ESPERMATOZOIDE</b> .....	23
<i>Vi.a Lavado de espermatozoides</i> .....	23
<i>Vi.b Separación de cabezas y flagelos de espermatozoides</i> .....	24
<i>Vi.c Aislamiento de membranas totales y citosol de cabezas de espermatozoides</i> .....	24
<i>Vi.d Aislamiento de acrosomas</i> .....	26
<i>Vi.e Aislamiento de vesículas híbridas</i> .....	26
<b>VII. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD</b> .....	29
<b>VIII. ZIMOGRAMAS</b> .....	30
<b>IX. ENSAYOS DE UNIÓN ESPECÍFICA AL <sup>65</sup>ZN</b> .....	31

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b><i>EFFECTO DE INHIBIDORES DE METALOPROTEASAS SOBRE LA RA DE ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR .....</i></b>	<b>32</b>
<b><i>EFFECTO DE UN SUSTRATO FLUORESCENTE PARA METALOPROTEASAS SOBRE LA RA EN ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....</i></b>	<b>37</b>
<b><i>ACTIVIDAD DE METALOPROTEASA EN EL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR.....</i></b>	<b>38</b>
<b><i>PROTEÍNAS QUE UNEN ZINC EN EL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR .....</i></b>	<b>45</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Título	Página
Figura 1.	Fecundación .....	6
Figura 2.	El erizo de mar .....	7
Figura 3.	El espermatozoide de erizo de mar.....	8
Figura 4.	El óvulo de erizo de mar .....	11
Figura 5.	Estructura del fosforamidón .....	18
Figura 6.	Estructura de los quelantes de metales pesados 1,10-fenantrolina y EDTA .....	19
Figura 7.	Preparación de membranas totales de cabezas de espermatozoides de erizo de mar .....	25
Figura 8.	Preparación de membrana acrosomal de espermatozoides de erizo de mar .....	27
Figura 9.	Preparación de vesículas híbridas de espermatozoides de erizo de mar .....	28
Figura 10.	Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA de espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> .....	33
Figura 11.	Estructura de la 1,10-fenantrolina y 4,7-fenantrolina .....	34
Figura 12 A.	Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA de espermatozoides de <i>L. pictus</i> .....	35
Figura 12 B.	Efecto del fosforamidón sobre la RA de espermatozoides de <i>L. pictus</i> .....	36
Figura 13.	Estructura del sustrato par metaloproteasas SAAF.....	37
Figura 14.	El SAAF inhibe la RA en el espermatozoide de erizo de mar.....	38
Figura 15 A.	Actividad de metaloproteasas en el espermatozoide de <i>S.purpuratus</i> .....	41
Figura 15 B.	Efecto del fosforamidón sobre la actividad de metaloproteasas en el espermatozoide <i>S. purpuratus</i> .....	42
Figura 16.	Actividad de metaloproteasas en el espermatozoide de <i>L. pictus</i> .....	43
Figura 17 A.	Actividad de metaloproteasas en el citosol de cabezas de espermatozoides de <i>L. pictus</i> .....	44
Figura 17 B.	Efecto del fosforamidón sobre la actividad de metaloproteasas en el citosol de cabezas de espermatozoides de <i>L. pictus</i> .....	44
Figura 18.	Proteínas que unen $^{65}\text{Zn}^{2+}$ en el espermatozoide de <i>S. purpuratus</i> .....	46
Figura 19.	Proteínas que unen $^{65}\text{Zn}^{2+}$ en el espermatozoide de <i>L. pictus</i> .....	48
Tabla I.	Proteínas con actividad de metaloproteasas y con sitio de unión a $^{65}\text{Zn}^{2+}$ en el espermatozoide de <i>S. purpuratus</i> y de <i>L. pictus</i> .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Acrosoma(s)
AA	Aminoácido(s)
ATP	Trifosfato de adenosina
AMA	Agua de mar artificial
AMA 1 Ca	Agua de mar artificial 1 mM Ca <sup>2+</sup> pH 7.0
AMP <sub>c</sub>	Adenosina 3',5'-monofosfato
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CC	Citosol cabezas
CCR	Citosol cabezas reaccionadas
CG	Capa de gelatina
CV	Capa vitelina
DIDS	Acido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
EGTA	Etilenglicol-bis-(• -amino-etileter)N, N'-ácido tetracético
E <sub>m</sub>	Potencial de membrana
GC	Guanilato ciclasa
GMP <sub>c</sub>	Guanosina 3',5'-monofosfato
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trisfosfato
kDa	Kilodaltones
MC	Membrana de cabezas
Mr	Movilidad relativa
O-fen	1,10-fenantrolina
4,7-fen	4,7-fenantrolina
PA-SDS	Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
pH <sub>i</sub>	pH intracelular
PMFS	Fenil metil sulfonil fluoruro
RA	Reacción Acrosomal
ST	Solubilizado total
STR	Solubilizado total reaccionado
SAAF	Succinil-alanina-alanina-fenilalanina-7-amido-4-metilcoumarina
VH	Vesículas híbridas

## RESUMEN

La reacción acrosomal (RA) en el espermatozoide del erizo de mar es un evento esencial para que éste fecunde al óvulo. Dicha reacción se induce por el factor presente en la capa más externa del óvulo homólogo. En el espermatozoide de erizo de mar *Lytechinus pictus* 0.1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  inducen la RA en ausencia del factor. En *Strongylocentrotus purpuratus* existe una metaloproteasa soluble que tiene como cofactor al  $\text{Zn}^{2+}$ , que participa en la RA. Esta metaloproteasa se inhibe por 1,10-fenantrolina (O-fen) o EDTA, pero no por fosforamidón. El substrato fluorescente para metaloproteasas succinil-alanina-alanina-fenilalanina-4 amido-7metilcumarina (SAAF) bloquea la RA inducida por la gelatina del óvulo o por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187, independientemente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El objetivo de este trabajo fue determinar la localización de la(s) metaloproteasa(s) que unen  $\text{Zn}^{2+}$  y estudiar su participación en la RA de espermatozoides de erizo de mar, haciendo un estudio comparativo entre *L. pictus* y *S. purpuratus*. Mediante zimogramas observamos que las metaloproteasas se encuentran localizadas principalmente en la cabeza de los espermatozoides no reaccionados (control) y reaccionados en ambas especies. En *S. purpuratus* la actividad de metaloproteasas está asociada al citosol y hay también actividad asociada a la membrana plasmática de la cabeza de espermatozoides. En *L. pictus* la actividad de metaloproteasas la encontramos asociada al citosol de cabezas de espermatozoides de dicha especie. Además observamos que en espermatozoides de *L. pictus* la RA se inhibe con EDTA y O-fen pero no con fosforamidón ni con la 4,7-fenantrolina (un análogo de O-fen). Estos resultados sugirieron que al igual que en *S. purpuratus* los espermatozoides de *L. pictus* también poseen una metaloproteasa que participa en la RA. Con la idea de identificar si alguna de las proteínas con actividad de metaloproteasas presentan sitio(s) de unión a  $\text{Zn}^{2+}$ , realizamos ensayos de unión específica utilizando el radioligando  $^{65}\text{Zn}^{2+}$ . En el caso cabezas de espermatozoides no reaccionados de *S. purpuratus*, encontramos cuatro metaloproteasas dependientes de  $\text{Zn}^{2+}$  dos en la membrana de cabeza (MC) (Mr 94 y 77 kDa) y dos en el citosol (115 y 109 kDa). En el citosol de cabezas de espermatozoides no reaccionados de *L. pictus* identificamos dos metaloproteasas dependientes de zinc (Mr ~ 120, 103 kDa).

## INTRODUCCIÓN

### FECUNDACIÓN

En organismos con reproducción sexual la fecundación es un evento primordial para la generación de un nuevo individuo. El óvulo y el espermatozoide son las células encargadas de llevar a cabo este proceso (fig. 1). La fecundación puede ser interna como en el caso de los mamíferos, donde los espermatozoides se eyaculan dentro del tracto genital femenino, o bien externa como en el caso del erizo de mar, donde los gametos se expulsan al medio ambiente. Desde el punto de vista experimental, se considera que el estudio de la fecundación es más fácil de abordar en aquellos organismos de fecundación externa, ya que las variables tales como la composición del medio externo, temperatura o pH se pueden controlar fácilmente.

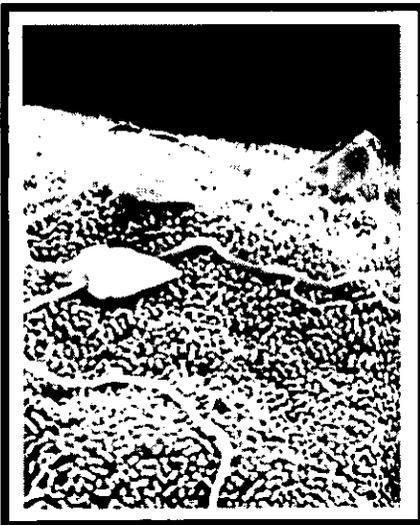


Figura 1. Micrografía electrónica del espermatozoide de erizo de mar en la superficie del óvulo homólogo (Alberts., *et al.* 1994).

El erizo de mar es un excelente modelo para el estudio de la fecundación ya que es una especie con sexos separados. Tanto el macho como la hembra producen una gran cantidad de gametos. De un erizo macho se obtienen  $\sim 10^{10}$  espermatozoides y de la hembra  $10^6$  óvulos. En este trabajo utilizamos 2 especies diferentes de erizo de mar las cuales presentan una temporalidad reproductiva diferente: *S. purpuratus* (Noviembre a Junio- ver fig. 2 A) y *L. pictus* (Mayo a Septiembre- ver fig. 2 B). Estas 2 especies están separadas evolutivamente  $\sim 30-40$  millones de años (Smith, 1988).

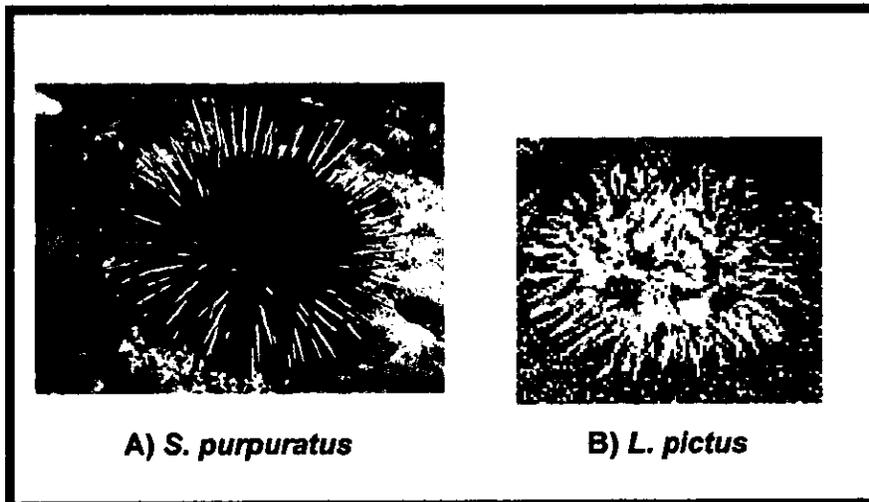


Figura 2. Erizos de mar: A) *S. purpuratus* y B) *L. pictus* (Patton, et al., 2001).

## EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula muy especializada encargada de llegar hasta el óvulo homólogo y fecundarlo. Generalmente los espermatozoides son las células más pequeñas en los organismos de reproducción sexual, y en el erizo de mar constituyen un modelo relativamente simple para estudiar los cambios iónicos, así como las modificaciones bioquímicas y fisiológicas necesarias para la fecundación.

El espermatozoide de erizo de mar es una célula muy pequeña (~ 15  $\mu\text{m}$ ) compuesta por dos partes principales: la cabeza y el flagelo (fig. 3 A). El flagelo posee un complejo axonémico (un par de microtúbulos centrales rodeado de 9 pares de microtúbulos) y tiene como función impulsar al espermatozoide hacia el óvulo. La cabeza a su vez, contiene solo una mitocondria que proporciona la energía necesaria para el movimiento flagelar, un núcleo haploide cuya cromatina está altamente condensada y un gránulo acrosomal, el cual contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a pasar a través de la capa externa del óvulo (Sardet, y Tilney, 1970).

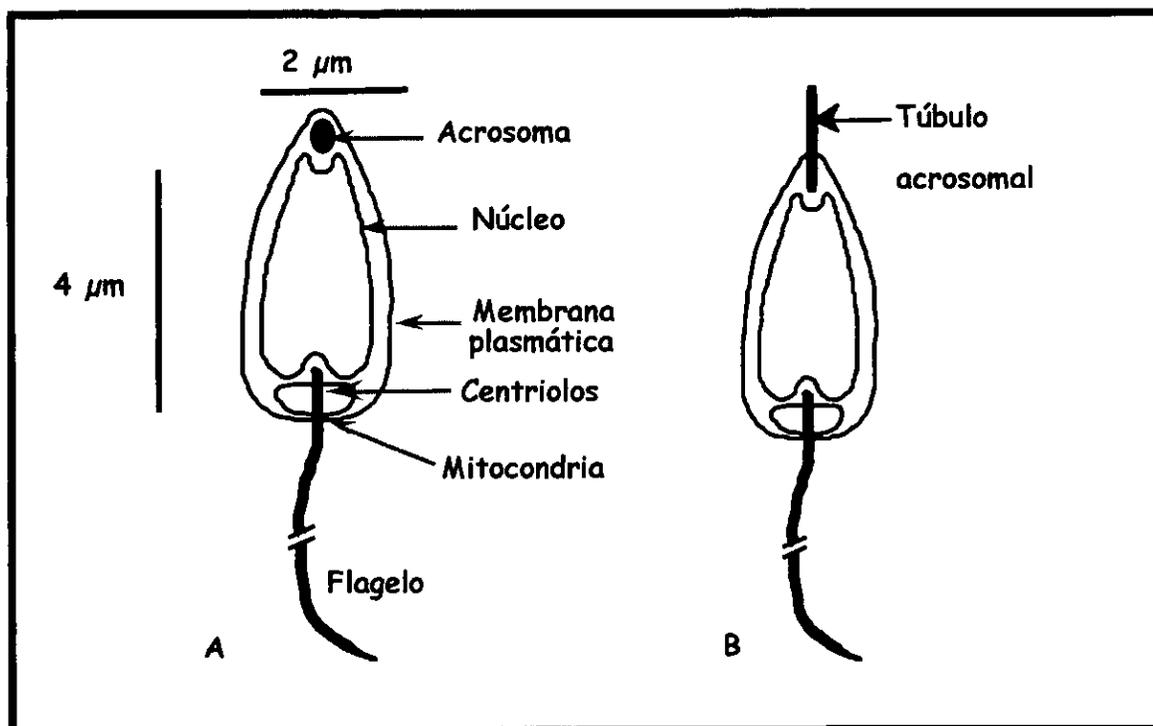


Figura 3. Esquema del espermatozoide de erizo de mar. A) Espermatozoide no reaccionado mostrando sus diferentes componentes. B) Espermatozoide reaccionado.

La activación del espermatozoide para la fecundación consiste de 2 pasos principales: a) La activación de la movilidad de la célula y b) la inducción de la RA. En el espermatozoide del erizo de mar los canales iónicos tienen una importancia primordial en la activación de la respiración y la movilidad, así como en la quimiotaxis, y la RA. Los canales iónicos están presentes en la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar y en sus organelos internos. Para revelar los mecanismos moleculares involucrados en la comunicación entre el espermatozoide y el óvulo, es necesario entender cual es el papel de estos sistemas de transporte iónico y cómo se regulan en cada uno de los procesos antes mencionados.

La RA es un requisito indispensable para que el espermatozoide fecunde al óvulo homólogo, e involucra cambios fisiológicos y morfológicos. De manera natural la RA se dispara cuando el factor, que es un polímero de fucosa sulfatada que se encuentra en la capa más externa del óvulo (capa de gelatina, fig. 4), se une a un receptor de la superficie del espermatozoide. Los cambios morfológicos se dan especialmente en la zona del acrosoma. Ocurre la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana del gránulo acrosomal, liberándose el contenido de éste, que son enzimas líticas cuya función es degradar las cubiertas extracelulares del óvulo y una proteína adhesiva responsable de la unión especie-específica entre ambos gametos (Fig. 3 B). La célula responde con un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, que involucra una entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ . Al mismo tiempo se produce una elevación en el  $\text{pH}_i$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), así como una hiperpolarización seguida de una depolarización de la membrana plasmática (Lee, *et al.*, 1983; Darszon, *et al.*, 2001- ver fig. 4). Además, se sabe que en la RA participa una metaloproteasa y hay un aumento en las concentraciones de nucleótidos cíclicos como AMPc, inositol 1,4,5 trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ), y en la actividad de una fosfolipasa D (Vacquier, 1986 ; Farach, *et al.*,

1987; Ward, y Kopf, 1993; Foltz, *et al.*, 1993). Durante la RA participan dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes, el primero se activa cuando el receptor a la gelatina del óvulo está ocupado, y se inhibe por verapamil, dihidropiridinas y trifluoroperazina. El segundo canal es insensible a estos compuestos pero es dependiente del  $\text{pH}_i$ , lo que mantiene elevada la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Por otro lado, los antagonistas de los canales de  $\text{K}^+$  como el tetraetilamonio ( $\text{TEA}^+$ ), inhiben la RA indicando su participación en este proceso (Liévano, *et al.*, 1990; Darszon, *et al.*, 2001). Por último, se sabe también que existen canales de  $\text{Cl}^-$  sensibles a DIDS (Acido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico) que pueden estar participando en el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana (Contreras, *et al.*, 1996) e influenciando de manera indirecta el desarrollo de la RA. Tanto en *S. purpuratus* como en *L. pictus*, la RA del espermatozoide también se puede inducir de manera artificial incubando las células a pH 9.0 ó en presencia del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187. En *L. pictus* la RA además se puede disparar con concentraciones submicromolares de zinc o induciendo una hiperpolarización dependiente de  $\text{K}^+$ , seguida de una depolarización (Clapper, *et al.*, 1985; González-Martínez, y Darszon, 1987; González-Martínez, *et al.*, 1992).

## EL ÓVULO

El óvulo del erizo de mar es una célula esférica de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro rodeada de una membrana plasmática y de dos capas externas: la capa de gelatina (CG) y la capa vitelina (CV) (fig. 4).

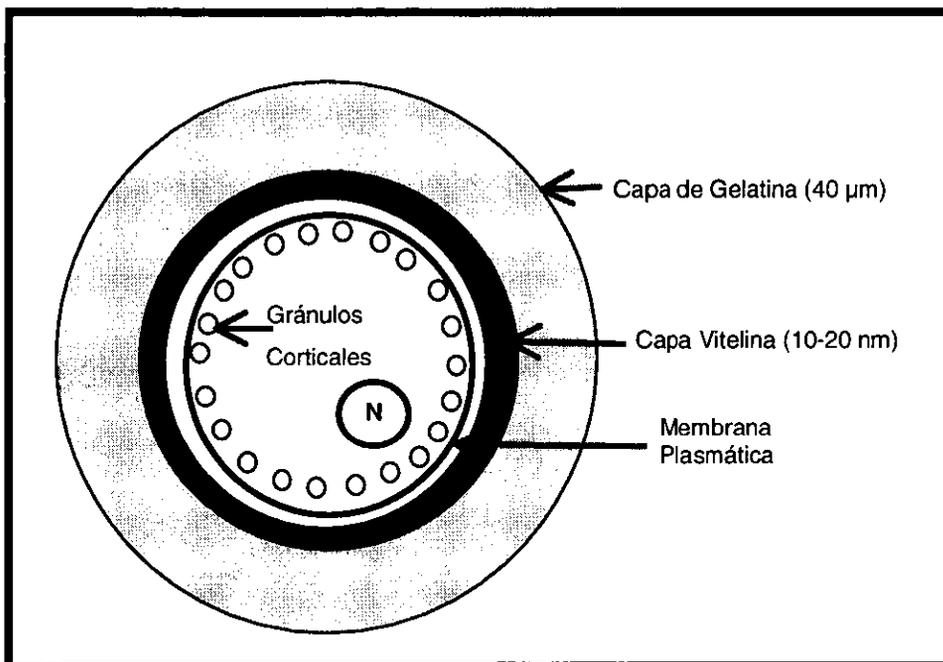


Figura 4. Esquema del óvulo del erizo de mar mostrando sus componentes principales.

Las dos capas son de naturaleza glicoprotéica (SeGall, y Lennarz, 1981). La más externa es la capa de gelatina (CG), que mide  $\sim 40 \mu\text{m}$  de grosor y está compuesta de un polímero de fucosa sulfatada (factor) y por una sialoglucoproteína. El factor es el responsable de los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el espermatozoide (SeGall, y Lennarz, 1979; Vacquier y Moy, 1997). La CG es importante en la interacción óvulo-espermatozoide, ya que es la primera capa con la que el espermatozoide entra en contacto (Ward, *et al.*,

1983). Esta capa también contiene pequeños péptidos que tienen efectos muy importantes en la fisiología del espermatozoide ya que lo preparan y guían hacia el óvulo (Garbers, 1989). Los péptidos más estudiados son el speract, un decapeptido aislado de la gelatina del óvulo de las especies de erizo de mar *S. purpuratus* (Hansbrough y Garbers, 1981 a) y de *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki, *et al.*, 1981) y el resact, un péptido similar al speract, obtenido de los óvulos de la especie de erizo de mar *Arbacia punctulata*.

La capa vitelina que se encuentra unida a la superficie externa de la membrana plasmática, sirve como protección durante el desarrollo embrionario y contiene los receptores glucoprotéicos a los que se unen los espermatozoides homólogos. Después de la capa vitelina, encontramos la membrana plasmática (MP) la cual se fusiona con la MP del espermatozoide. Por debajo de la MP del óvulo, están los gránulos corticales (GC) que se derivan del Aparato de Golgi y tienen una función importante en la fecundación. Los gránulos corticales contienen una mezcla de enzimas, proteínas estructurales y materiales coloidales como mucopolisacáridos sulfatados (Carroll, 1976).

El óvulo tiene dos mecanismos para evitar la polispermia, en donde se garantiza que sólo un espermatozoide fecunde al óvulo. De no ser así, existiría un exceso de cromosomas lo que representaría un desbalance genético y la subsecuente muerte del embrión (Alberts, *et al.*, 1990). El primer mecanismo ocurre al nivel de la membrana plasmática, ya que cuando el espermatozoide entra en contacto con el óvulo produce una depolarización que lleva a la célula de un potencial de reposo de -70 a 20 mV, manteniéndose durante un minuto; a esto se le conoce como potencial de fecundación. El otro mecanismo es la reacción cortical que consiste en la fusión de los gránulos corticales con la membrana plasmática del óvulo creando una abertura donde el material del gránulo cortical pasa al espacio perivitelino (Kay, y Shapiro, 1985). Estos mecanismos modifican la envoltura externa del óvulo impidiendo el paso de otros espermatozoides.

## EL ZINC

El zinc es un cofactor esencial en una gran variedad de procesos celulares que incluyen la síntesis de DNA, la reproducción, la formación de huesos y el crecimiento. Además es un componente integral de numerosas proteínas y enzimas que participan en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. Sus propiedades físicas y químicas involucran una asociación estable con macromoléculas (Chvapil, 1973; Palmiter, *et al.*, 1996; Valle, 1993; Pattison, *et al.*, 1998; Barceloux, 1999).

Se sabe que el zinc se asocia con fosfolípidos, lipoproteínas y metaloenzimas unidas a la membrana, y que puede estabilizar membranas al reaccionar con los grupos sulfhídrido de las proteínas para formar mercapéptidos estables (Bettger, 1981; Berg, y Shi., 1996).

### El zinc y la fecundación

El zinc estabiliza la membrana de células somáticas y el DNA, inhibe la respiración del espermatozoide de hámster y está presente en altas concentraciones en el tracto reproductor masculino (Aonuma, *et al.*, 1978; Andrews, *et al.*, 1994). Dado que los niveles altos de zinc estabilizan la membrana del espermatozoide, éste se mantiene en un estado metabólicamente inactivo durante su almacenamiento en el epidídimo o durante la eyaculación (Andrews, *et al.*, 1994).

En el humano, el zinc es necesario para la formación y maduración del espermatozoide, así como para la ovulación y fecundación (Magnus, *et al.*, 1990; Favier, 1992). También puede inhibir la movilidad y la capacitación del espermatozoide (Sansone *et al.*, 1991; Riffo, *et al.*, 1992; Henkel, *et al.*, 1999).

En espermatozoides de cerdo, concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de zinc inducen la RA (Delgado, *et al.*, 1985). En contraste, en otras especies de mamíferos es necesario remover el metal de la superficie del espermatozoide para que pueda capacitarse y posteriormente llevar a

cabo la RA (Andrews, 1994; 1995). Los espermatozoides de muchas especies marinas contienen concentraciones altas de metales pesados tales como: zinc, cobre o mercurio, lo que inhibe su movilidad. Mientras que concentraciones más bajas de éstos iones pueden aumentar la movilidad del espermatozoide. (Young y Nelson, 1974; Hidiroglou, y Knipfel, 1982; Johnson, y Epel, 1983). Aparentemente el zinc también contribuye a la activación de la respiración y de la movilidad del espermatozoide en la cacerolita (*Limulus polyphemus*) y en la estrella de mar (Martin, *et al.*, 1973; Morisawa, 1994).

De manera interesante y tal como se mencionó, concentraciones micromolares de zinc inician la RA en ausencia del factor en *L. pictus*, produciendo cambios de permeabilidad a  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Na^+]_i$  y  $pH_i$  de manera similar a lo observado en presencia del inductor natural. Estos mismos cambios se observan en *S. purpuratus* pero a diferencia de lo que ocurre en *L. pictus* no son suficientes para inducir la RA (Clapper, *et al.*, 1985; Darszon, *et al.*, Resultados no publicados).

## **METALOPROTEASAS**

Las metaloproteasas son una de las familias de proteasas fisiológicamente importantes que procesan proteínas en procariotes y eucariotes. Podemos encontrar metaloproteasas en algunos compartimentos celulares y en el citoplasma de algunas células implicadas en eventos de exocitosis como neuronas y células cromafines de la glándula suprarrenal. Las metaloproteasas también se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso y en la mitocondria, en donde su función radica en eliminar la secuencia señal de las proteínas durante su síntesis, inserción o paso a través de estos organelos celulares (Lennarz y Strittmatter, 1991).

Algunos miembros de esta superfamilia están involucrados en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, la formación de huesos, la reproducción, el cáncer y la artritis (Lennarz y Strittmatter, 1991).

La actividad de las metaloproteasas también determina diversos eventos de fusión. Así, los inhibidores específicos de estas enzimas interfieren con la fusión de los mioblastos (Couch y Strittmatter, 1983), la transmisión sináptica en las uniones neuromusculares de los mamíferos (Baxter *et al*, 1983), la liberación de neurotransmisores en la retina de *Xenopus laevis* (Frederick, *et al*, 1984) y finalmente en la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines (Munday y Strittmatter, 1985).

Las metaloproteasas hidrolizan las uniones peptídicas de proteínas y requieren un ion metálico unido para ser catalíticamente activas. Los metales que más comúnmente encontramos en estas metaloproteasas son los de transición como el zinc, el cobre y el hierro, que típicamente tienen un número de coordinación entre 4 y 6 (Higaki, *et al*, 1992; Coleman, 1992). También otros metales divalentes como el cobalto pueden reconstituir la actividad de la enzima inactiva (Lennarz y Strittmatter, 1991).

Este grupo de enzimas no forma intermediarios covalentes y al menos la mitad de ellas contienen la secuencia conservada HEXXH, los residuos de histidina son los que ligan el zinc. La topología de los centros activos sugiere que el grupo carboxilo del ácido glutámico se coordina con una molécula de agua, promoviendo el ataque nucleofílico en el carbono carbonilo del péptido proteolizado (Beynon y Bond, 1989; Valle, y Auld, 1990; Hooper, 1994; Coleman, 1998; Christianson, y Cox, 1999).

En 1994, Hooper presentó un esquema de estas proteasas basado en el sitio de unión al zinc, lo que ha mejorado la clasificación de las metaloproteasas dependientes de zinc en distintas familias (Hooper, 1994; Fushimi, *et al*, 1999). Otros autores dividen a las metaloproteasas en cinco grupos basados en los determinantes estructurales de la unión al metal (Valle, y Auld, 1990; Rawling y Barrett, 1995; Fushimi, *et al*, 1999).

## **Metaloproteasas y fecundación**

La fecundación es uno de los muchos procesos fisiológicos que requiere uno o más eventos de fusión de membrana (Yanagimachi, 1981). Se sabe además que la fusión de los gametos requiere la participación de una metaloproteasa espermática (Farach *et al.*, 1987; Roe *et al.*, 1988). Así, se ha observado que hay actividad de metaloproteasa en el tracto reproductor masculino de algunos mamíferos, como es el caso del testículo de la rata (Koren *et al.*, 1975), el líquido seminal del bovino (Gottlieb y Meizel, 1987), así como en los espermatozoides del conejo, bovino, cerdo, hámster y humano (Díaz-Pérez *et al.*, 1988; Kohno, *et al.*, 1998 y Rev. en Tulusiani, *et al.*, 1998).

Otro punto importante es que la actividad de metaloproteasa está involucrada en la RA del espermatozoide de erizo de mar (Couch y Strittmatter, 1983; Baxter *et al.*, 1983; Mundy y Strittmatter, 1985; Farach *et al.*, 1987). En 1987 Farach *et al.* mostraron, que existe una metaloproteasa soluble dependiente de zinc y de pH involucrada en la RA del espermatozoide de *S. purpuratus*. Esta metaloproteasa se inhibe por O-fen o EDTA, pero no por fosforamidón (otro inhibidor de algunas metaloproteasas). Además encontraron, que el substrato fluorescente SAAF que utilizaron para la metaloproteasa bloqueaba la RA inducida por la gelatina del óvulo o por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187, a pesar de que dicho péptido no bloqueaba la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por cualquiera de los dos inductores.

Existen reportes de que la jaspisina (metabolito aislado de esponjas marinas), un inhibidor específico de las metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y de algunas metaloproteasas dependientes de zinc, no inhibe la RA pero sí la fusión del espermatozoide de erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus* con el óvulo homólogo (Ikegami, *et al.*, 1994; Kato, *et al.*, 1998).

## INHIBIDORES DE METALOPROTEASAS

Las enzimas proteolíticas en su ambiente natural, necesitan regularse cuidadosamente. Normalmente el control se realiza modulando la expresión, la secreción y/o la activación de las proteasas (Bode y Huber, 2000). Existen diferentes formas de inhibidores de proteasas los cuales se han agrupado con base en su mecanismo de reacción, origen o estructura.

Al intentar entender la actividad proteolítica en procesos biológicos debemos considerar que hay inhibidores de proteasas naturales que regulan su actividad, además de los inhibidores sintéticos que se usan en su caracterización, y de los cuales se han identificado más de 100. Los inhibidores de serín-proteasas son los más estudiados y actualmente hay grandes avances en el conocimiento de inhibidores naturales de cisteinil-proteasas. En contraste, el conocimiento de inhibidores de aspartil y metaloproteasas es muy limitado.

Muchos de los inhibidores específicos de las metaloproteasas actúan en la unión al sitio catalítico donde se encuentra el ion metálico (es decir, son quelantes). Para intentar designar a la mayoría de estos inhibidores de metaloproteasas se han utilizado enzimas bacterianas como blanco, éstas se utilizan porque están mejor caracterizadas y su disponibilidad es mayor en comparación con las metaloproteasas de mamíferos. Sin embargo, el limitado conocimiento de su especificidad y mecanismos catalíticos ha dificultado catalogar adecuadamente la selectividad de los inhibidores de metaloproteasas (Beynon y Bond, 1989). Un ejemplo es el fosforamidón (fig. 5) un potente inhibidor de la endopeptidasa-24.11 de mamífero, así como otras metaloproteasas (Frederick, *et al.*, 1984; Bond y Butler, 1987; Roques y Beaumont, 1990; Hooper, 1994; Beynon y Bond, 1989).

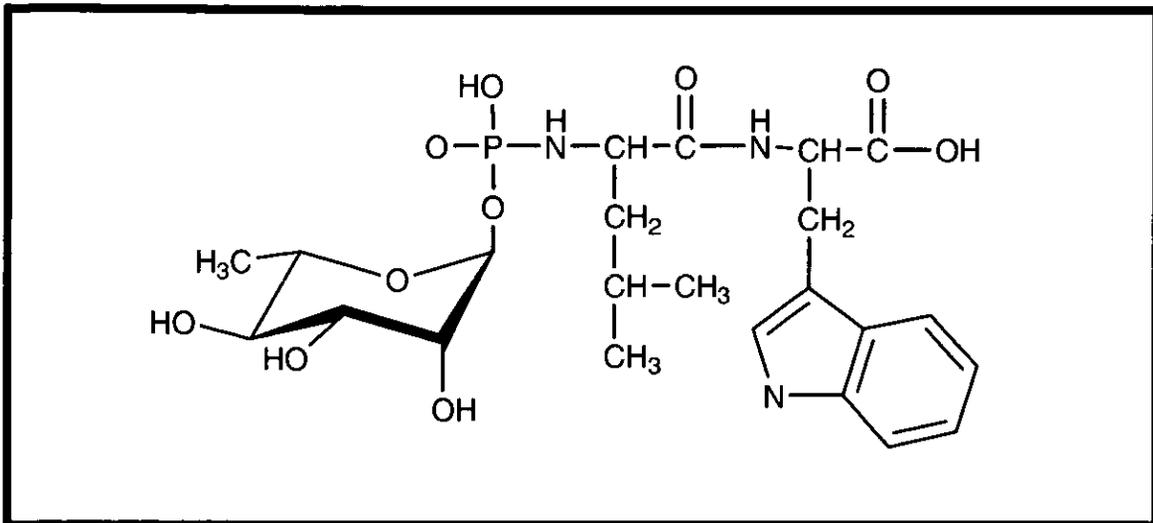


Figura 5. Estructura química del fosforamidón (Tomada de Index Merck, 1989).

### Quelantes de metales

La base para clasificar las metaloproteasas es la presencia de un ion metálico que participa en la catálisis. Esta clase de proteasas se pueden inactivar por quelantes como el EDTA (fig. 6 B).

La 1,10-fenantrolina (O-fen- fig. 6 A) es un inhibidor de metaloproteasas que presenta una constante de afinidad más alta para el zinc ( $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) que para el calcio ( $3.2 \text{ M}^{-1}$ ), de tal manera que 1 mM de O-fen puede inactivar metaloproteasas aún en presencia de 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin remover el calcio unido a la proteína. (Beynon y Bond, 1989).

Dado que el EDTA es impermeable a la membrana plasmática, posiblemente actúa en la superficie del espermatozoide, coordinándose con los metales mediante sus grupos carboxilo, (Johnson y Epel, 1983). Por el contrario O-fen es una molécula hidrofóbica que tiene átomos de nitrógeno embebidos en sus anillos aromáticos no cargados lo que sugiere que puede penetrar a través de la membrana plasmática.

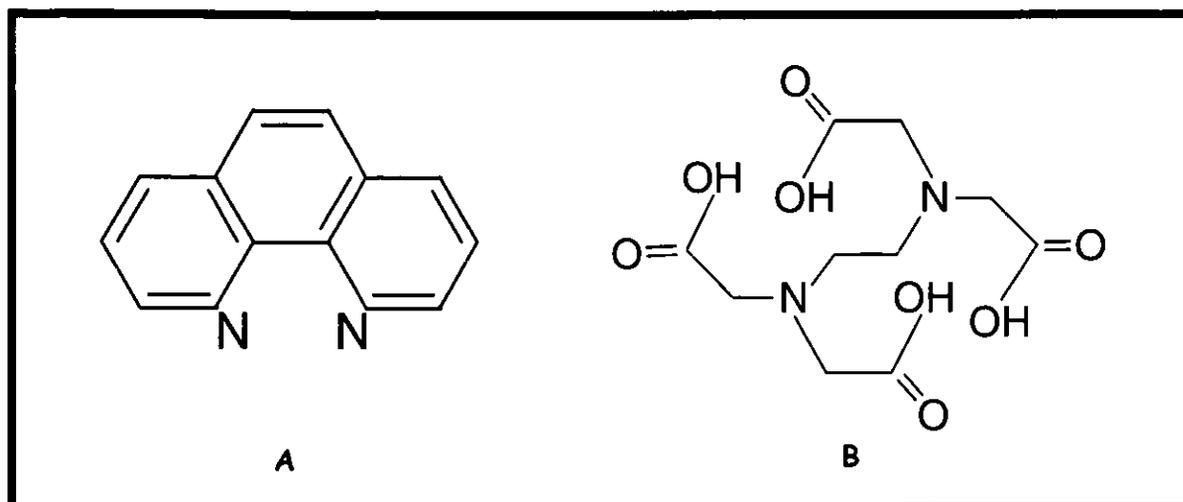


Figura 6. Estructura de los quelantes de metales pesados. A) 1,10 fenantrolina y B) EDTA (Tomada de Index Merck, 1989).

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar la localización de la(s) metaloproteasa(s) que unen zinc y estudiar su posible participación en la RA, haciendo un estudio comparativo entre espermatozoides de *S. purpuratus* y *L. pictus*.

### PARTICULARES

- I. Estudiar el efecto de inhibidores de metaloproteasas en la RA del espermatozoide del erizo de mar.
- II. Determinar la actividad de metaloproteasas en las diferentes fracciones del espermatozoide de erizo de mar.
- III. Identificar las proteínas que unen zinc en las diferentes fracciones del espermatozoide.
- IV. Investigar si alguna de las proteínas que unen zinc tiene actividad de metaloproteasa y si existe alguna diferencia entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados.

## METODOLOGÍA

### I. Obtención de espermatozoides

Los erizos de mar de las especies *L. pictus* y *S. purpuratus* se obtuvieron del Instituto de Investigaciones Oceanográficas de Ensenada Baja California (México) y de Marinus, INC. San Diego CA. E.U.A. Los animales se mantuvieron a 14°C en un acuario con agua de mar artificial (AMA) compuesta por (en mM): NaCl 486, MgCl 26, MgSO<sub>4</sub> 30, CaCl<sub>2</sub> 10, KCl 10, NaHCO<sub>3</sub> 2.5, EDTA 0.1, HEPES 10, pH 8.0). Los gametos se obtuvieron inyectando de 0.5 a 1 ml de KCl (0.5 M) en la cavidad intracelómica del erizo. Los espermatozoides no diluidos (secos) se colectaron con una pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo Eppendorf en hielo. Los óvulos se recolectaron en AMA en un vaso de precipitados.

### II. Reactivos

Los inhibidores de proteasas (Leupeptina, Pepstatina, Aprotinina, PMFS y 1,10-fenantrolina y Fosforamidón), los detergentes (Tritón x-100, Brij 35), el Azul de Coomassie (G-250 y R-250), el EDTA y el sustrato para metaloproteasas (succinil-ala-ala-phe7-amido-4-metilcoumarina) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO. EUA). Los estándares de PM de amplio (Broad) rango se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA., EUA). La gelatina usada como sustrato para las proteasas fue de la marca comercial Knox Anderson Clayton Co. (México, D.F). El zinc radiactivo (<sup>65</sup>Zn) fue de NEN Life Science Products Inc. (Boston, MA., EUA). El resto de los reactivos fueron del más alto grado de pureza disponible.

### III. Ensayos de Reacción Acrosomal

Los espermatozoides diluidos (1:200 en AMA) se preincubaron durante 5 min a 16 °C, en ausencia o en presencia de quelantes de metales pesados, o del sustrato fluorescente para metaloproteasas, SAAF. Posteriormente se indujo la RA con  $ZnCl_2$  10  $\mu M$  (*L. pictus*) o con factor (*S. purpuratus*) incubando a 16°C durante 2 min. Al final de la incubación, los espermatozoides se fijaron con formaldehído al 6% para observar la RA contando por lo menos 100 células bajo un microscopio de contraste de fases.

### IV. Preparación de gelatina

La gelatina es la capa más externa del óvulo del erizo de mar y contiene el Factor que induce la RA en el espermatozoide. La gelatina se aisló de acuerdo con reportado por Darszon, *et al.* (1984), tal y como se describe a continuación. Los óvulos se colectaron en AMA (pH 8.0), se ajustó el pH a 5.5 con HCl (1 N) incubándose por 2-3 minutos y posteriormente se subió el pH a 8.0 con NaOH (1 N) para remover la capa de gelatina. Los óvulos se dejaron sedimentar a 4°C y se separaron por centrifugación a 12,000 xg durante 10 minutos. La gelatina se colectó en el sobrenadante y se mantuvo en congelación hasta su uso.

### V. Preparación del factor

La purificación del factor se realizó según lo reportado por Garbers, *et al.* (1983), con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. Para cada purificación se partió de un volumen de 200 a 400 ml de gelatina. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C.

La gelatina se pasó por una columna de carbón activado, pre-equilibrada con agua bidestilada, el eluido se precipitó con etanol a una concentración final de 70% y se centrifugó a 3500 xg durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en agua

bidestilada, y se dializó en una membrana de diálisis con un límite de corte de 12,000 a 14,000 Da de peso molecular. La diálisis se realizó en agua bidestilada durante 2 días haciendo por lo menos 2 cambios de agua al día. El dializado se liofilizó, congelándolo previamente con hielo seco. La gelatina liofilizada se resuspendió en cloruro de guanidina 6M (pH 7.9), manteniendo una relación de 300 mg (peso seco) del liofilizado en 100 ml de cloruro de guanidina. La solución se homogeneizó en agua bidestilada y se centrifugó a 272 xg durante 15 minutos. El precipitado se homogeneizó con agua bidestilada y se dializó durante 3 días, a este material se le llamó precipitado del factor y también se utiliza como inductor de la RA.

Ocho ml del sobrenadante se colocaron sobre 13 ml de CsCl al 60% en tubos de policarbonato de 30 ml de capacidad. Estos se centrifugaron a 178,000 xg durante 16 horas. Al final de la corrida en el fondo de los tubos se observó un precipitado turbio y gelatinoso que es el factor. Este se resuspendió y homogeneizó en agua bidestilada. Posteriormente se dializó contra agua durante 3 días haciendo por lo menos 2 cambios durante el día. Pasado ese tiempo tanto el factor como el precipitado se alicuotaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **VI. Obtención de las diferentes partes del espermatozoide**

(Todos los procedimientos se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ )

### **VI.a Lavado de espermatozoides**

Sé diluyó 1 ml de espermatozoides secos en 14 ml de AMA en la que se disminuyó el  $\text{Ca}^{2+}$  a 1 mM y el pH a 7.0 (AMA 1 Ca ver punto I) y se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos. Este paso se repitió tres veces para eliminar en el precipitado los celomocitos que tienen un alto contenido de proteasas (Vacquier, comunicación personal). Para lavar los espermatozoides la suspensión de éstos se transfirió a otro tubo y se centrifugó a 2000 xg durante 20 minutos, descartando el sobrenadante. Los espermatozoides precipitados se

resuspendieron en 10 ml de AMA 1  $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo inhibidores de proteasas (Leupeptina 10  $\mu\text{M}$ , Pepstatina 1  $\mu\text{M}$ , Aprotinina 1  $\mu\text{g/ml}$ , EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml). El lavado se repitió dos veces para evitar cualquier contaminación con proteasas extracelulares y se utilizaron inmediatamente.

### **VI.b Separación de cabezas y flagelos de espermatozoides**

La suspensión de espermatozoides (VI a), se pasó 20 veces a través de una aguja hipodérmica (#21), para desprender las cabezas de los espermatozoides. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 2000  $\text{xg}$  por 5 minutos, para recuperar los flagelos en el sobrenadante y las cabezas en el precipitado. Se repitió el paso por la jeringa resuspendiendo el último precipitado con la idea de tener la menor contaminación posible en las fracciones correspondientes y un mayor rendimiento.

### **VI.c Aislamiento de membranas totales y citosol de cabezas de espermatozoides**

Las cabezas obtenidas en el precipitado del punto anterior (VI b), se homogenizaron 20 veces (Homogenizador Dounce de vidrio con émbolo A-“Tight”) con diez volúmenes de Hepes 10 mM (pH 7.5) conteniendo los inhibidores de proteasas antes mencionados (VI a). El homogenado se centrifugó a 12,000  $\text{xg}$  por 10 min, para eliminar el precipitado que contiene cabezas no rotas y núcleos. El sobrenadante que contiene el citosol y las membranas se centrifugó a 200,000  $\text{xg}$  por 45 min, para recuperar en el sobrenadante el citosol y en el precipitado las membranas las cuales se resuspendieron en Hepes 10 mM (pH 7.5) conteniendo inhibidores de proteasas y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (fig. 7). Normalmente el citosol se concentró 5 veces en una membrana de diálisis de corte de 1000 a 3500 de peso molecular. Posteriormente esta membrana se puso en

contacto con polietilenglicol durante 30 min, pasado este tiempo el citosol se utilizó para determinar inmediatamente la actividad proteolítica mediante zimogramas.

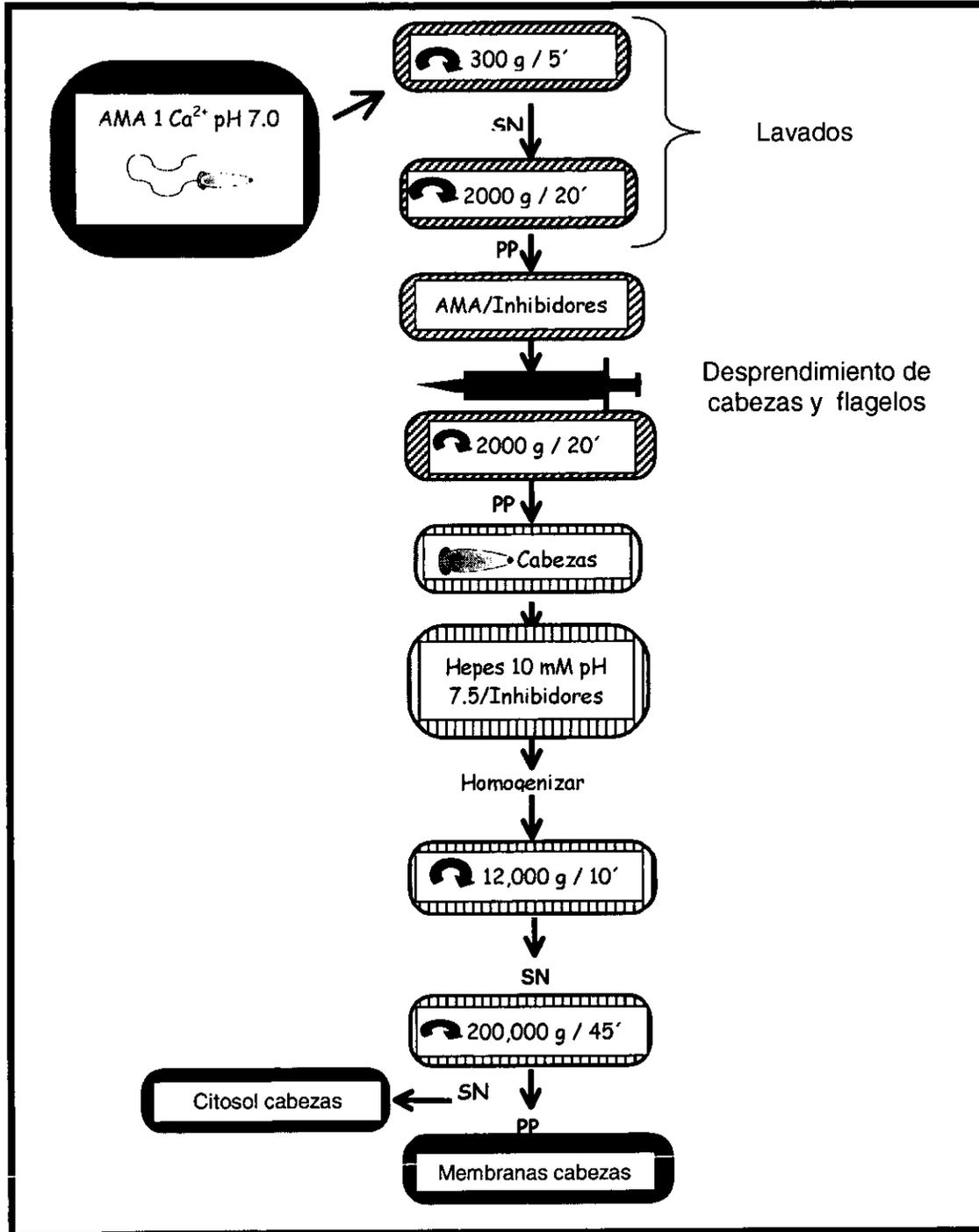


Figura 7. Preparación de membranas totales y citosol de cabezas de espermatozoides de erizo de mar. Sobrenadante (SN), precipitado (PP), Centrifugación .

#### **VI.d Aislamiento de acrosomas**

Para esto se partió de cabezas de espermatozoides (VI b). El rompimiento de las cabezas se hizo en condiciones en las cuales se mantiene la integridad de los lisosomas (Graham, 1993) y de los acrosomas de los espermatozoides (Beltrán y Darszon, resultados no publicados). Es importante mencionar que el acrosoma es un organelo proveniente del aparato de Golgi con características similares a los lisosomas (Graham, 1993). Las cabezas de dichos espermatozoides se resuspendieron en 2 ml de glicerol 2 M, Hepes 10 mM (pH 7.0), Leupeptina 10  $\mu$ M, Pepstatina 1  $\mu$ M, Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml, EDTA 0.1 mM y 2  $\mu$ g/ml de DNasa I tipo IV y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se homogenizaron 20 veces (Homogenizador Dounce), y se le agregó DTT 1 mM y EGTA 0.1 mM. La suspensión de cabezas se centrifugó a 6,000 xg por 10 minutos, para eliminar el precipitado que contiene cabezas no rotas, núcleos y mitocondrias. El sobrenadante se centrifugó a 200,000 xg durante 45 minutos. Finalmente los acrosomas se recuperaron resuspendiendo el precipitado en Hepes 10 mM (pH 7.0) conteniendo los inhibidores de proteasas (VI a). Se alicuotaron y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (fig. 8).

#### **VI.e Aislamiento de vesículas híbridas**

Se lavaron 1 ml de espermatozoides como se indica en el punto VI a, solo que en éste caso la centrifugación final se hizo a 1000 xg. Esto es con el objeto de que los espermatozoides estén en las mejores condiciones para inducirles la RA. Las células se diluyeron (1:200) en AMC (pH 9.0), conteniendo 15  $\mu$ M del ionóforo de calcio A23187. La RA se indujo incubando a  $16^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. La suspensión de espermatozoides o cabezas se centrifugó a 1000 xg por 20 min para recuperar los espermatozoides

reaccionados en el precipitado. El sobrenadante se centrifugó a 10,000 xg por 10 min para eliminar núcleos y mitocondrias en el precipitado. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 200,000xg por 45 min. para recuperar las vesículas híbridas (VH) en el precipitado, las cuales se resuspendieron en Hepes 25 Mm, EGTA 0.1 mM, EDTA 0.1 mM y PMFS 0.1 mM, se alicuotaron y guardaron a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso (fig. 9).

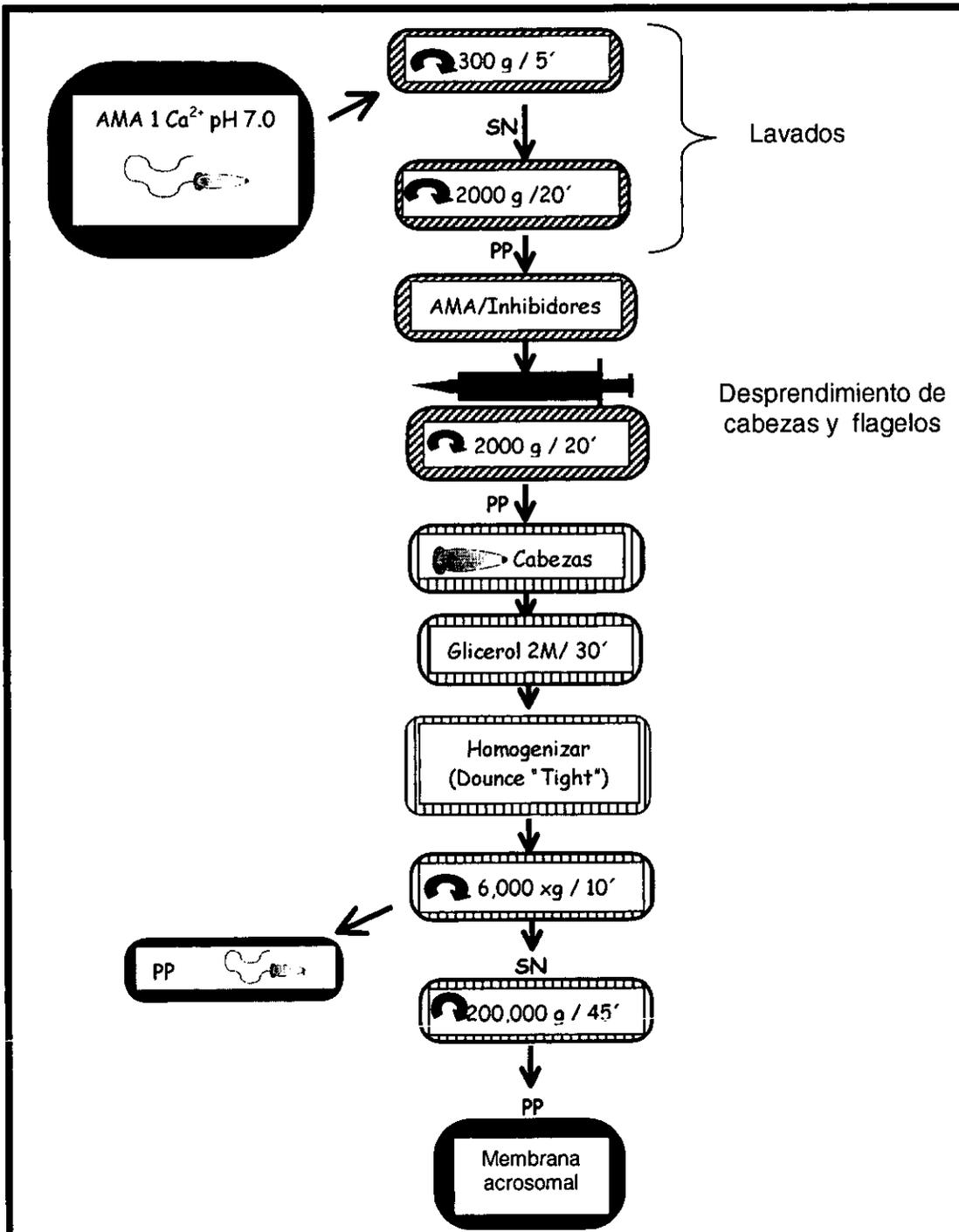


Figura 8. Preparación de membrana acrosomal de espermatozoides de erizo de mar. Las abreviaturas y flechas están definidas en la figura anterior.

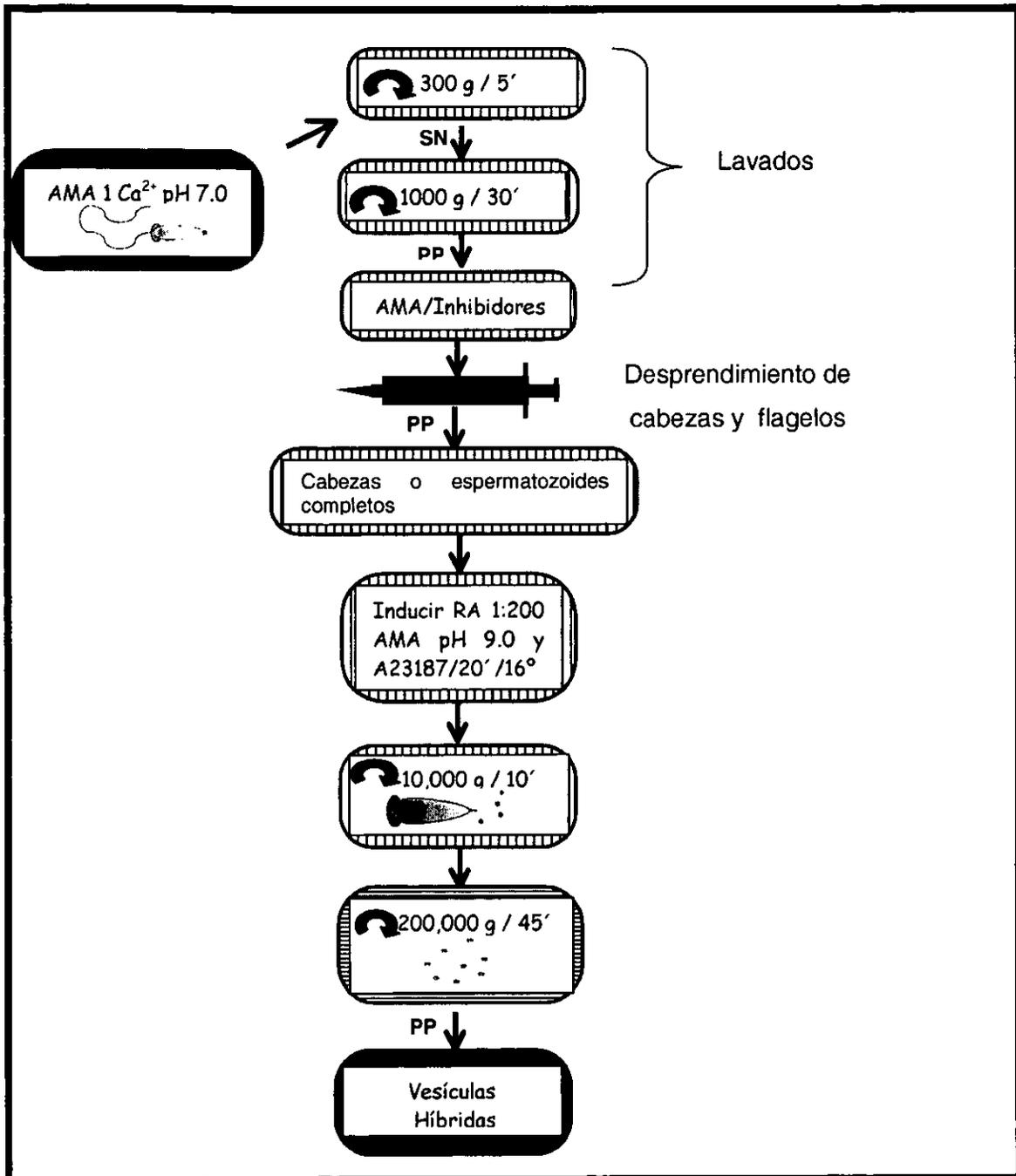


Figura 9. Preparación de vesículas híbridas (VH) de espermatozoides de erizo de mar como esta reportado en Schulz, *et al.*, 1998. Las abreviaturas y flechas están definidas en la figura 7.

## VII. Determinación de proteína por el método de Bradford

Este método descrito por Marion M. Bradford en 1976, se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 a las proteínas. La unión origina un cambio en el máximo de absorción del colorante del rojo a 465 nm al azul con una absorción a 595 nm. En 1985 Compton y Jones encontraron que de las tres formas del colorante: aniónica, catiónica y neutra, que existen en la solución, es la aniónica la que forma los complejos con las proteínas, principalmente con aquellas que poseen residuos de arginina. Este complejo es el que produce el máximo de absorción del colorante a 595 nm y es la base de la determinación colorimétrica por éste método. El reactivo de Bradford se preparó con el colorante Azul de Coomassie G-250 a una concentración final de 0.01% en solución con etanol al 4.75% y ácido fosfórico al 8.5%.

La determinación de la concentración de las muestras se hace en paralelo con una curva de calibración de albúmina bovina (1-10 µg aforados a 20 µl con agua). Al igual que a las muestras problema, se les adicionó 1 ml de reactivo de Bradford y se mezcló inmediatamente incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, se leyó la absorbancia a 595 nm, contra un blanco preparado con el mismo reactivo sin muestra.

En el caso de muestras de membranas éstas se solubilizaron previamente incubándolas con el detergente N-hexil-β-D-glucopiranosido al 4% durante 5 minutos (Bradford, 1987) y se continuó con el procedimiento normal descrito arriba.

## VIII. Zimogramas

La zimografía es una técnica electroforética para identificar proteínas con actividad proteolítica (Kleiner, y Stetler-Stevenson, 1994). Consiste en separar las proteínas en un gel desnaturizante de poliacrilamida que contiene el detergente dodecil sulfato de sodio (PA-SDS; Laemmli, 1970), el cual se copolimeriza con gelatina como sustrato para las proteasas. En este caso la separación se hace en condiciones no reductoras, es decir, la mezcla digestora de las muestras carece de  $\beta$ -mercaptoetanol. Al final de la corrida el gel se incuba en presencia de un detergente no iónico (generalmente Tritón X-100), que sustituirá el SDS y favorecerá el replegado de las proteínas a su estado nativo. Posteriormente se incuban en el amortiguador conveniente para la actividad de las proteasas que se están estudiando (Kleiner, y Stetler-Stevenson, 1994; Khan, y James, 1998).

En éste trabajo las proteínas de diferentes fracciones del espermatozoide se solubilizaron en una mezcla que contenía; SDS al 10%, glicerol 50% v/v, 1  $\mu$ g/ml de azul de Bromofenol y Trizma base 0.5 M Ph 6.8 y se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% conteniendo gelatina al 0.1 %, al final de la separación el gel se incubó con Tritón X-100 al 2.5 % a temperatura ambiente durante 60 minutos para renaturalizar las proteínas. Posteriormente el gel se transfirió a Tris-HCl 50 Mm, NaCl 200 Mm,  $\text{CaCl}_2$  5 Mm y Brij 35 al 0.02 % (pH 8.0) en ausencia o presencia de los inhibidores de metaloproteasas (EDTA, O-fen ó fosforamidón) y se incubó 37° C/ 24 hrs. El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 al 0.5% en metanol al 30%, ácido acético al 10 % y se destiñó incubando en la misma solución sin colorante, para hacer evidente la actividad proteolítica que se observa como bandas no teñidas.

## IX. Ensayos de unión específica al $^{65}\text{Zn}$

La detección de las proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}$  en membranas de nitrocelulosa se efectuó como ha sido descrito previamente (Mazen *et al.*, 1988). Las diferentes fracciones del espermatozoide, se solubilizaron en una mezcla que contenía; SDS al 10%, glicerol 50% v/v, EDTA 8 mM, Trizma base 0.5 M (pH 6.8) y 1  $\mu\text{g/ml}$  de azul de Bromofenol y se separaron en un gel de PA-SDS al 7.5%. Posteriormente el gel se incubó 1 hr en amortiguador de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 160 mM, SDS 0.2%, pH 8.3) conteniendo 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las proteínas reducidas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) a 500 mAmps durante 45 min (Towbin *et al.*, 1979). La membrana de NC con las proteínas separadas se equilibró por una hora en amortiguador A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5). Posteriormente dicha membrana se incubó por 15 min en 5 ml de amortiguador B (Tris-HCl 10 mM, KCl 0.1 M, pH 7.5) conteniendo 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{65}\text{Zn}$ . Finalmente la membrana se lavó dos veces con el mismo amortiguador B durante 15 min. La nitrocelulosa se expuso en el cassette del "Posphorimager" durante 2 días, para detectar las proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}^{2+}$ .

## RESULTADOS

### ***Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA de espermatozoides de erizo de mar***

Se ha reportado que una gran variedad de quelantes de metales estructuralmente diferentes (EDTA y O-fen), retardan el inicio de la movilidad espermática al diluir el semen, e inhiben hasta en un 80% la RA inducida por la gelatina del óvulo en espermatozoides de erizo de mar (Clapper, *et al.*, 1985). En 1987 Farach, *et al.* estudiaron la posible participación de una metaloproteasa en la RA de espermatozoides de erizo de mar. Ellos mostraron, que existe una metaloproteasa soluble dependiente de zinc involucrada en la RA del espermatozoide de *S. purpuratus*. Esta metaloproteasa se inhibía por O-fen o EDTA, pero no por fosforamidón.

En el presente trabajo de tesis decidimos examinar el efecto de los mismos compuestos sobre la RA de espermatozoides de *S. purpuratus* con la idea de demostrar, la participación de metaloproteasas en la RA. La figura 10 muestra que tanto la O-fen como el EDTA inhiben la RA en espermatozoides de *S. purpuratus*, en tanto que el fosforamidón tiene muy poco efecto de acuerdo con lo reportado con el grupo del Dr. Lennarz (Farach, *et al.* 1987). Estos autores también observaron que la RA se inhibía en un 80% con 300  $\mu\text{M}$  de O-fen, mientras que nosotros observamos que a esta concentración de quelante solo se obtiene un 25% de RA. En la misma figura 10 vemos que el EDTA tiene un efecto similar a la O-fen, ya que a concentraciones de 500  $\mu\text{M}$  sólo el 20% de los espermatozoides desarrollan RA.

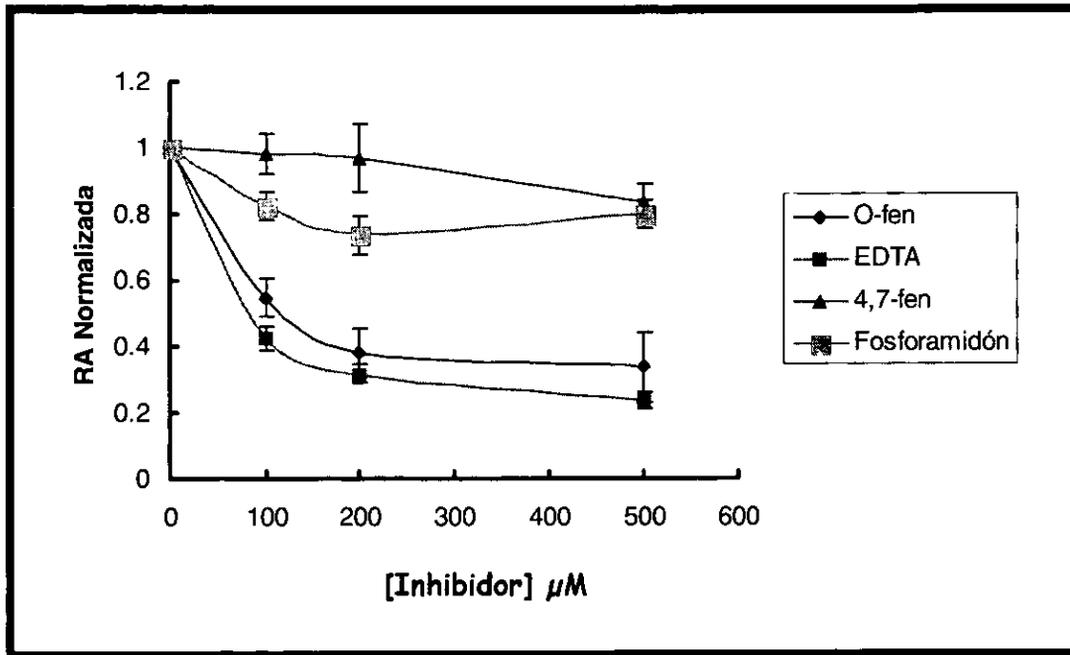


Figura 10. Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA en espermatozoides de *S. purpuratus*. Se incubaron 25  $\mu\text{l}$  de espermatozoides (diluidos 1:200 en AMA, pH 8.0) conteniendo diferentes concentraciones de inhibidores por 5 minutos a 16°C. Al tiempo señalado se indujo la RA con factor (ver métodos). Después de 2 minutos se fijaron las células con igual volumen de formaldehído al 12% para determinar la RA. Los símbolos representan el promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado y las barras indican el error estándar. La RA promedio fue de  $87 \pm 6\%$ .

Aunque está descrito que la inhibición de la actividad de metaloproteasas por O-fen se debe a su función como quelante, existe la posibilidad de que siendo un compuesto hidrofóbico la O-fen este actuando de manera inespecífica intercalándose en la membrana plasmática y causando un cambio en la organización de los lípidos, (Correa, *et al*, 2000). Con la idea de aclarar éste punto decidimos probar el efecto de la 4,7-fenantrolina (4,7-fen, ver fig. 11) un análogo de O-fen que no es quelante de metales pesados. En la figura 10 observamos que la RA del espermatozoide de *S. purpuratus* no se inhibe con la 4,7-fen.

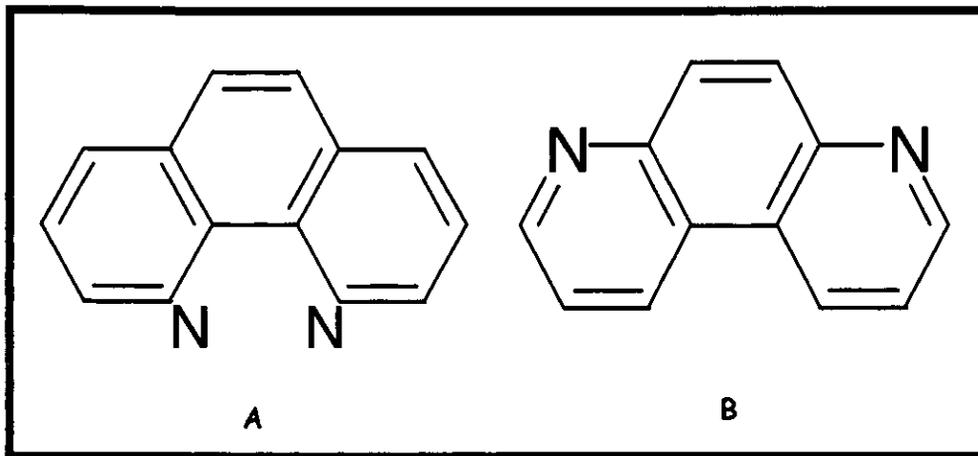


Figura 11. A) Estructura de O-fen y B) Estructura de 4,7-fen. (Tomadas de Index Merck, 1989).

Estos resultados sugieren que el efecto que la O-fen ejerce sobre la RA se debe a que dicho compuesto remueve el ion metálico del sitio activo de la metaloproteasa y no a un efecto inespecífico en la membrana debido a la hidrofobicidad del compuesto. A su vez, esta actividad proteolítica podría participar de manera importante en la cascada de eventos que desencadenan la RA.

Como mencionamos anteriormente, Farach, *et al.*, (1987) mostraron que con 10  $\mu\text{M}$  de fosforamidón no se inhibía la actividad de metaloproteasa soluble detectada en el homogenado total de espermatozoides de *S. purpuratus*. Debido a lo anterior se decidió estudiar el efecto de este inhibidor sobre la RA en espermatozoides de dos especies distintas de erizos de mar: *S. purpuratus* y *L. pictus*. En la figura 10 se observa que el fosforamidón aún a concentraciones de 10 a 50 veces mayores (100-500  $\mu\text{M}$ ), tiene poco efecto (~20% de inhibición) sobre la RA en espermatozoides de *S. purpuratus*.

Sin embargo, actualmente se desconoce si en espermatozoides de *L. pictus* participa una metaloproteasas en cascada de eventos que llevan a la RA. Por lo tanto con la idea de saber si esto es así, se investigó el efecto de los inhibidores de metaloproteasas sobre la RA en espermatozoides de *L. pictus*. En la figura 12 A se aprecia que O-fen a

concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  inhibe en ~70% la RA inducida con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Este efecto es dependiente de la concentración ya que con 500  $\mu\text{M}$  se inhibe más del 90% de dicha RA. El EDTA también inhibe la RA pero a concentraciones más altas 5 mM (no se muestra).

Al igual que en el caso de espermatozoides de *S. purpuratus* se observó que tanto el fosforamidón, y la 4,7-fen (fig. 12 A ) tienen muy poco efecto (~20% de inhibición) sobre la RA de espermatozoides en *L. pictus* inducida con  $\text{Zn}^{2+}$ . Estos resultados sugieren fuertemente que al igual que en *S. purpuratus* los espermatozoides de *L. pictus* también poseen una metaloproteasa que puede participar en la RA.

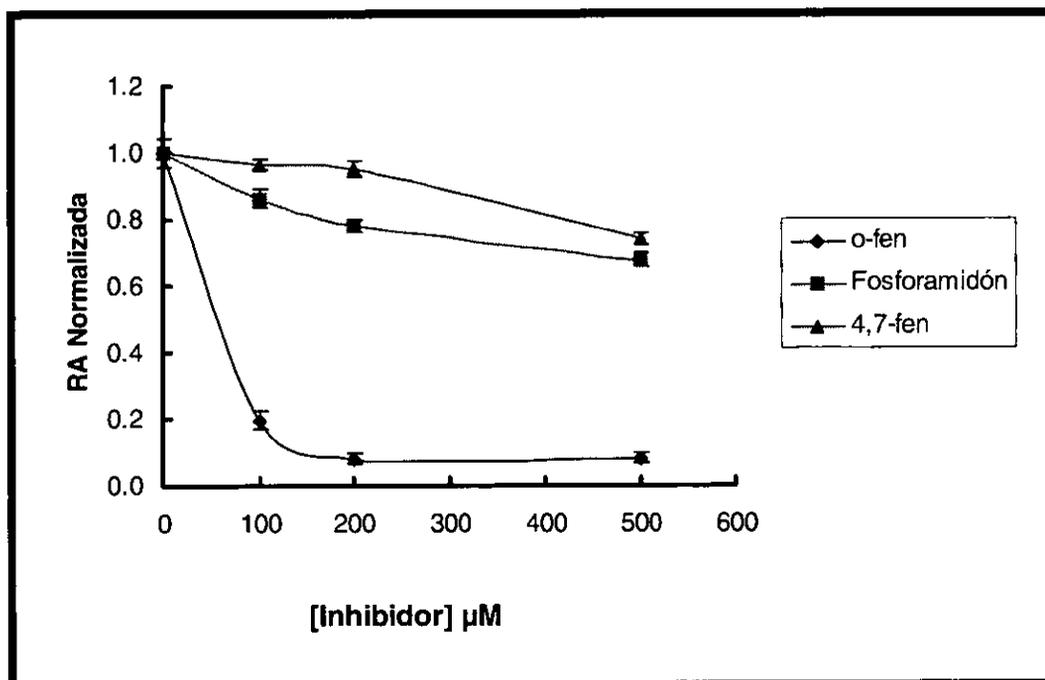


Figura 12 A. Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA en espermatozoides de *L. pictus*. Se incubaron 25  $\mu\text{l}$  de espermatozoides (diluidos 1:200 en AMA, pH 8.0) conteniendo diferentes concentraciones de inhibidores por 5 minutos a 16°C. Al tiempo señalado se indujo la RA con  $\text{ZnCl}_2$ . Después de 2 minutos se fijaron las células con igual volumen de formaldehído al 12% para determinar la RA. Los símbolos representan el promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado y las barras indican el error estándar. La RA promedio fue de  $84 \pm 8$  %.

En la figura 12 B se aprecia que O-fen inhibe la RA inducida con factor  $\sim 70\%$ , desde concentraciones de  $100 \mu\text{M}$ , de manera similar a lo observado en la figura anterior. El efecto del EDTA sobre la RA inducida con factor en espermatozoides de *L. pictus* ya estaba reportado, donde,  $0.1 \text{ mM}$  inhibían  $\sim 80\%$  de dicha RA (Clapper, *et al.*, 1985).

Al igual que en el caso de la RA inducida con  $\text{ZnCl}_2$  se observó que tanto el fosforamidón, y la 4,7-fen tienen muy poco efecto sobre la RA de espermatozoides en *L. pictus* inducida con factor (fig. 12 B).

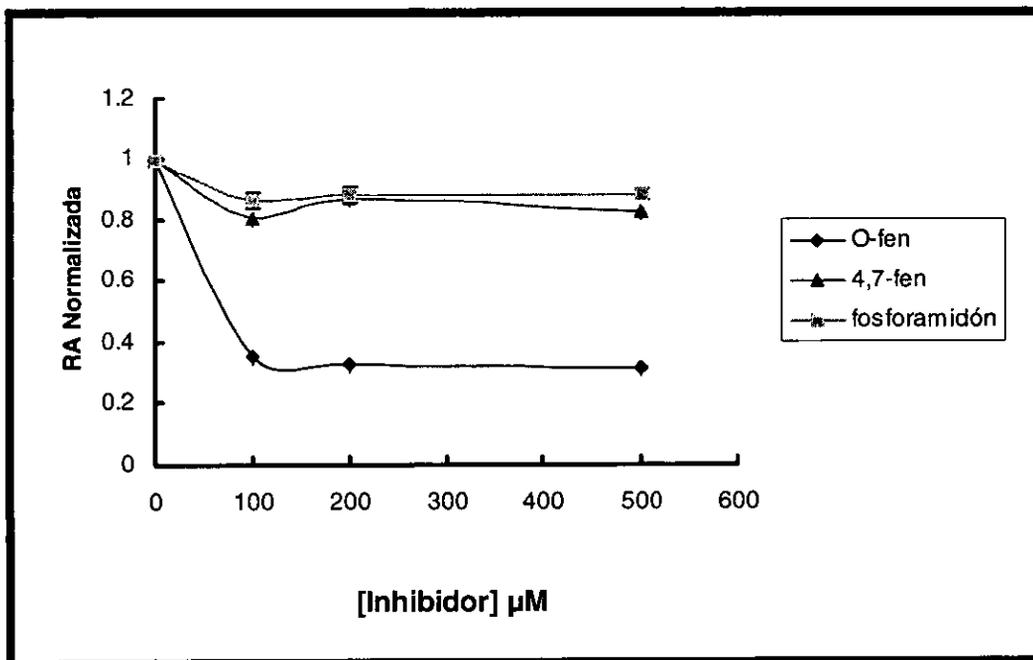


Figura 12 B. Efecto de inhibidores de metaloproteasas sobre la RA en espermatozoides de *L. pictus*. Se incubaron  $25 \mu\text{l}$  de espermatozoides (diluidos 1:200 en AMA, pH 8.0) conteniendo diferentes concentraciones de inhibidores por 5 minutos a  $16^\circ\text{C}$ . Al tiempo señalado se indujo la RA con factor (ver métodos). Después de 2 minutos se fijaron las células con igual volumen de formaldehído al 12% para determinar la RA. Los símbolos representan el promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado y las barras indican el error estándar. La RA promedio fue de  $78 \pm 4 \%$ .

**Efecto de un sustrato fluorescente para metaloproteasas sobre la RA en espermatozoides de erizo de mar.**

Farach et al, (1987) también reportaron que la RA del espermatozoide de *S. purpuratus* se inhibía en presencia de 2 mM de SAAF un sustrato fluorescente de las metaloproteasas (fig. 13).

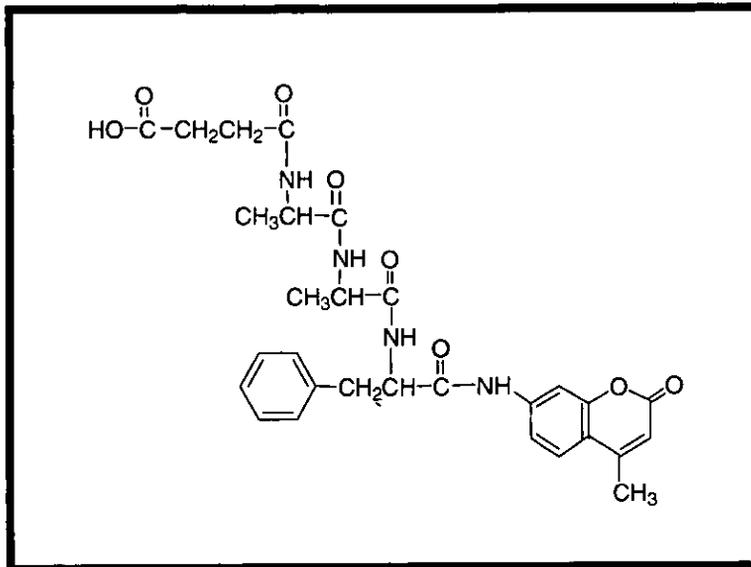


Figura 13. Estructura de succinil-alanina-alanina-fenilalanina-4-amido-7-metilcoumarina (SAAF).

Con el objeto de examinar si esto ocurría también en espermatozoides de *L. pictus*, se ensayaron diferentes concentraciones de dicho sustrato en la RA en espermatozoides de ambas especies. La figura 14 muestra que en *S. purpuratus* 2 mM de SAAF inhibe la RA en un 70% y que al aumentar la concentración a 10 mM, el grado de inhibición se no varía. Cuando los espermatozoides de *L. pictus* (fig. 14) se preincubaron en presencia del sustrato para metaloproteasas a una concentración de 10 mM observamos que la RA se ve afectada de manera importante (~90% de inhibición), y a diferencia de lo que se observa en los espermatozoides de *S. purpuratus*, 5 mM del compuesto solo inhiben la RA en un 15%. Más aún, a concentraciones de 2 mM ya no se observa inhibición de la

RA. Sin embargo, al medir el pH del agua de mar en presencia del sustrato, se pudo documentar que el péptido producía una acidificación cercana a dos unidades de pH (de 8.0 a 6.0), por lo que no puede descartarse que la inhibición de la RA se deba a un acción directa del cambio en el pH o por un efecto combinado resultado de la interacción del sustrato con la metaloproteasa y la acidificación del medio.

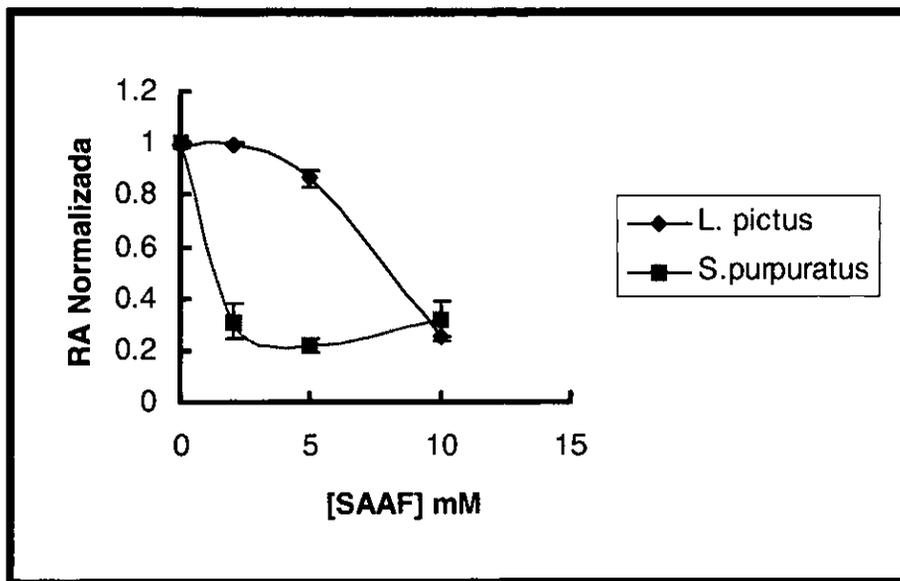


Figura 14. El sustrato fluorescente para metaloproteasas (SAAF) inhibe la RA en el espermatozoide de erizo de mar. Se incubaron 25  $\mu$ l de espermatozoides (diluidos 1:200 en AMA, pH 8.0) conteniendo diferentes concentraciones de SAAF por 5 minutos a 16°C. Al tiempo señalado se indujo la RA con factor en *S. purpuratus* (n=3) y con  $ZnCl_2$  en *L. pictus*. Los símbolos representan el promedio de 4 experimentos independientes por triplicado y las barras indican el error estándar. Después de 2 minutos se fijaron las células con igual volumen de formaldehído al 12% para determinar la RA.

### **Actividad de metaloproteasa en el espermatozoide de erizo de mar**

Las metaloproteasas dependientes de zinc son necesarias en algunos eventos de fusión en diversos tipos celulares (por ejemplo en mioblastos, en células cromafines de la

glándula suprarrenal, etc). Esto es importante ya que durante la fecundación del óvulo por el espermatozoide de erizo de mar, ocurren al menos tres pasos que involucra la fusión de membranas. El primer evento es la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana del gránulo acrosomal (SeGall y Lennarz, 1979), el segundo ocurre cuando el espermatozoide que ha sufrido la RA, se une con la membrana plasmática del óvulo (Epel y Vacquier, 1978), y finalmente el tercer evento de fusión inicia cuando los gránulos corticales que se encuentran en el óvulo, se fusionan con la membrana plasmática de éste liberando su contenido y evitando así la polispermia (Shapiro, *et al*, 1981). Además, como se ha venido mencionando existen evidencias que sugieren la participación de una metaloproteasa soluble dependiente de zinc en la RA, en espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Farach, *et al.*, 1987).

También sabemos que los espermatozoides de erizo de mar tanto de *L. pictus* como de *S. purpuratus* poseen diferentes actividades proteolíticas y que la actividad principal corresponde a metaloproteasas (Granados, 2000). Recientemente fraccionando homogenados de cabezas y flagelos de espermatozoides en gradientes de sacarosa y mediante la utilización de zimogramas, se ha mostrado que las actividades de metaloproteasas se encuentran localizadas principalmente en la cabeza de dichos espermatozoides (*S. purpuratus* y *L. pictus*). Debido a lo anterior y a que la RA se efectúa en la cabeza de los espermatozoides, decidimos purificar diferentes fracciones de la cabeza de los espermatozoides (membranas de cabeza, citosol, acrosomas y vesículas híbridas - ver métodos), con el objeto de determinar a que parte de la cabeza estaba asociada la actividad de metaloproteasas identificada anteriormente (Granados, 2000).

Como se mencionó con anterioridad Farach, *et al.*, (1987) mostraron que la actividad de metaloproteasa soluble detectada en un homogenado total de espermatozoides de *S. purpuratus* es sensible a O-fen y a EDTA e insensible a 10  $\mu$ M de fosforamidón. En el caso de espermatozoides de *S. purpuratus*, en nuestro laboratorio se han detectado 3

dobletes de actividad de metaloproteasas (Granados, 2000). Por lo tanto se decidió probar las diferentes partes de la cabeza de dichos espermatozoides en zimogramas para detectar a cual de ellas estaba asociada la actividad de metaloproteasas. La detección de la actividad de metaloproteasas en las diferentes regiones del espermatozoide de *S. purpuratus* mostró varias bandas de actividad asociadas a diferentes partes de la cabeza (ver fig. 15). También se determinó el efecto de diferentes inhibidores de metaloproteasas sobre esta actividad. La figura 15 muestra que las bandas de actividad de los solubilizados totales y membranas de cabezas de espermatozoides tanto reaccionados como no reaccionados, fueron sensibles a O-fen (fig. 15 A) y a EDTA (fig. 15 A). Por otro lado, la misma 15 B se muestra que dicha actividad fue insensible tanto a 100  $\mu$ M de fosforamidón (fig. 15 B) como a 5 mM de 4,7-fen (fig. 15 B). Además se observa actividad insensible a inhibidores de metaloproteasas lo que corrobora resultados anteriores, que muestran que en el espermatozoide de erizo de mar existen diferentes actividades proteolíticas, pero la actividad predominante corresponde a metaloproteasas (Granados, 2000).

En el zimograma de las diferentes partes de la cabeza de espermatozoides de *L. pictus*, se observó un doblete de actividad (115,109 kDa) en el citosol de las cabezas reaccionadas así como en la condición control (fig. 16). La actividad proteolítica se inhibió con O-fen 5 mM (fig. 16 y 17 A), lo que indica que se trata de metaloproteasas.

Por lo tanto a continuación se decidió estudiar el efecto de otros inhibidores de metaloproteasas sobre dicha actividad. La figura 17 A muestra que el doblete de actividad de metaloproteasas en el citosol de cabezas reaccionadas y control de espermatozoides de *L. pictus*, es sensible a EDTA 5 mM (fig. 17 A). Por el contrario esta actividad fue insensible a fosformidón 100  $\mu$ M y a 4,7-fen 5 mM (fig. 17 B).

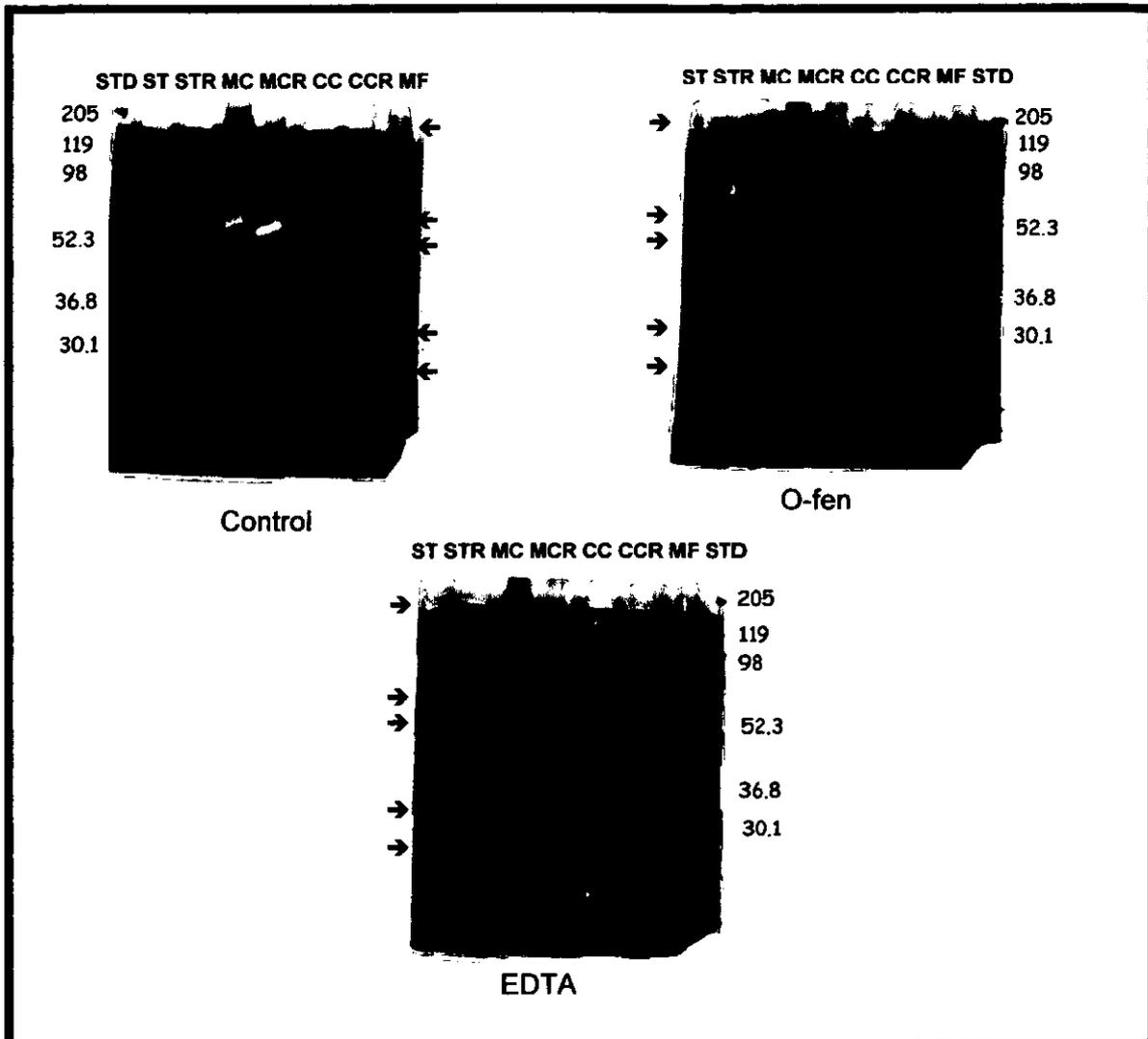


Figura 15 A. La actividad de metaloproteasa en las diferentes regiones de la cabeza de espermatozoides de *S. purpuratus* es sensible a o-fen y a EDTA. Las muestras de solubilizado total (ST), solubilizado total reaccionado (STR), membrana de cabeza (MC), membrana de cabeza reaccionada (MCR), citosol cabezas (CC), citosol cabezas reaccionadas (CCR) y membrana de flagelo (MF) se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% con gelatina al 0.1% como sustrato. Los distintos carriles muestran el desarrollo de la actividad de metaloproteasas en ausencia (control) ó en presencia de O-fen 5 mM y EDTA 5 mM. Los marcadores de PM (STD) son una mezcla de Bio-Rad (Broad-Range). Este es un experimento representativo de 3. Las flechas indican la actividad de metaloproteasas.

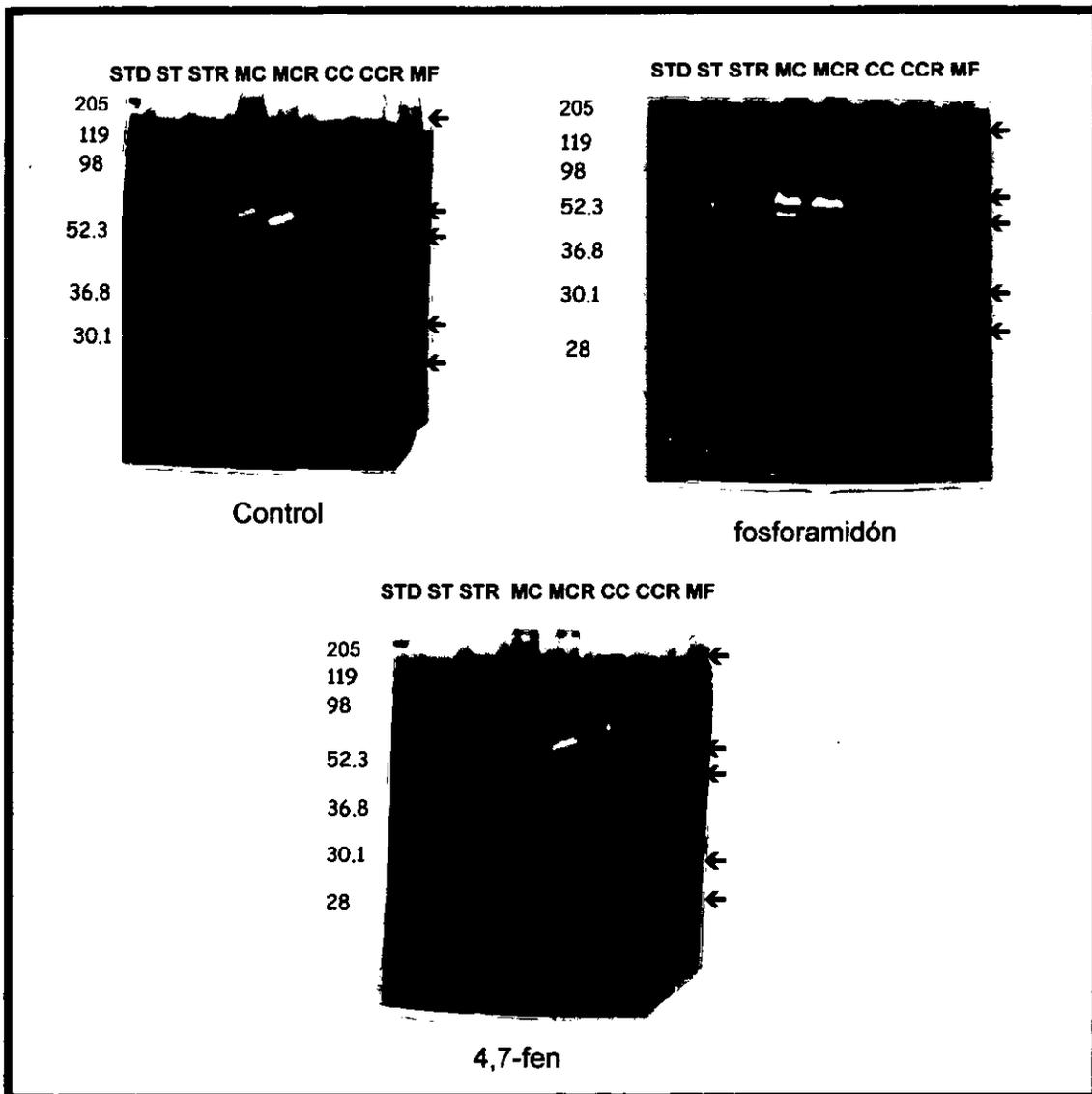


Figura 15 B. La actividad de metaloproteasa en las diferentes regiones de la cabeza de espermatozoides de *S. purpuratus* es insensible a fosforamidón. Las muestras de solubilizado total (ST), solubilizado total reaccionado (STR), membrana de cabeza (MC), membrana de cabeza reaccionada (MCR), citosol cabezas (CC), citosol cabezas reaccionadas (CCR) y membrana de flagelo (MF) se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% con gelatina al 0.1% como sustrato. Los distintos carriles muestran el desarrollo de la actividad de metaloproteasas en ausencia (control) ó en presencia de fosforamidón 100  $\mu$ M y 4,7-fen 5 mM. Los marcadores de PM (STD) son una mezcla de Bio-Rad (Broad-Range). Este es un experimento representativo de 3. Las flechas indican la actividad de metaloproteasas.

El zimograma en presencia de 4,7-fen 5 mM (fig. 17 B) muestra que la actividad de metaloproteasas fue insensible a dicho análogo. Lo anterior apoya la idea de que O-fen inhibe esta actividad al quelar el átomo esencial que la enzima necesita para ser activa.

Los resultados en este trabajo muestran que hay actividad de metaloproteasas en el citosol de cabezas de espermatozoides de *L. pictus* asociada tanto al citosol como a la membrana en las cabezas de espermatozoides de *S. purpuratus*. De esta manera, resulta razonable proponer que una de estas metaloproteasas sea la que participe en la RA (Farach, *et al.*, 1987).

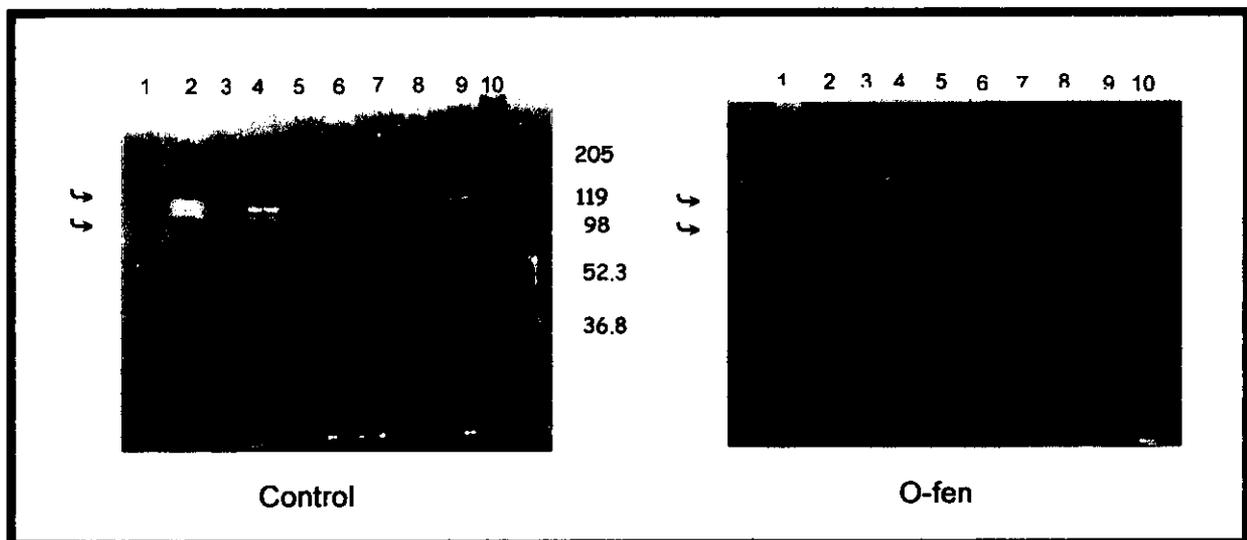


Figura 16. Actividad de metaloproteasas en el citosol de cabezas de espermatozoides de *L. pictus*. Las muestras de las diferentes fracciones de la cabeza de espermatozoides: (1) membrana cabezas, (2) citosol cabezas, (3) membrana de cabezas reaccionadas, (4) citosol cabezas reaccionadas, (5) vesículas híbridas, (6) acrosomas, (7) membrana cabezas sin acrosomas y (8) citosol cabezas sin acrosomas, se corrieron en un gel de PA-SDS al 7.5%. Zimogramas (geles conteniendo gelatina como sustrato), mostrando la actividad proteolítica en ausencia (control) o presencia del quelante de metales pesados (o-fen 5 mM). Experimento representativo de 2. Los marcadores de peso molecular (STD) son una mezcla de Bio-Rad (Broad-Range). Las flechas indican la actividad de metaloproteasas.

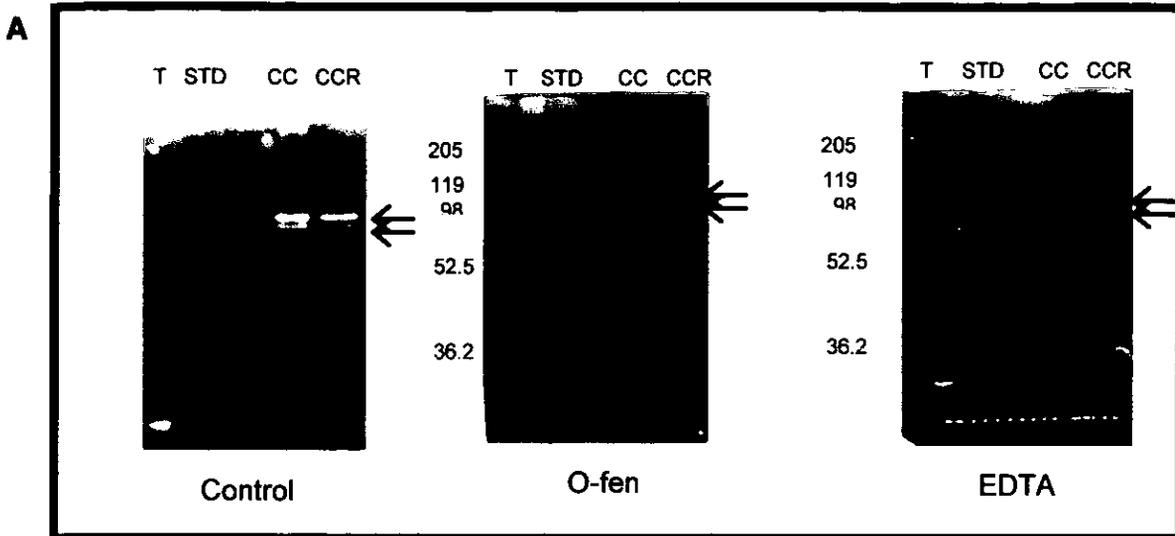


Figura 17 A. La actividad de metaloproteasa en el citosol de cabezas de *L. pictus* es sensible a o-fen y a EDTA. Las muestras citosol cabezas (CC), citosol cabezas reaccionadas (CCR) y tripsina (T) se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% con gelatina al 0.1% como sustrato. El desarrollo de la actividad de metaloproteasas se estudió en ausencia o en presencia de O-fen 5 mM, EDTA 5 mM. Los marcadores de PM (STD) son una mezcla de Bio-Rad (Broad-Range). Experimento representativo de 3. Las flechas indican actividad de metaloproteasas.

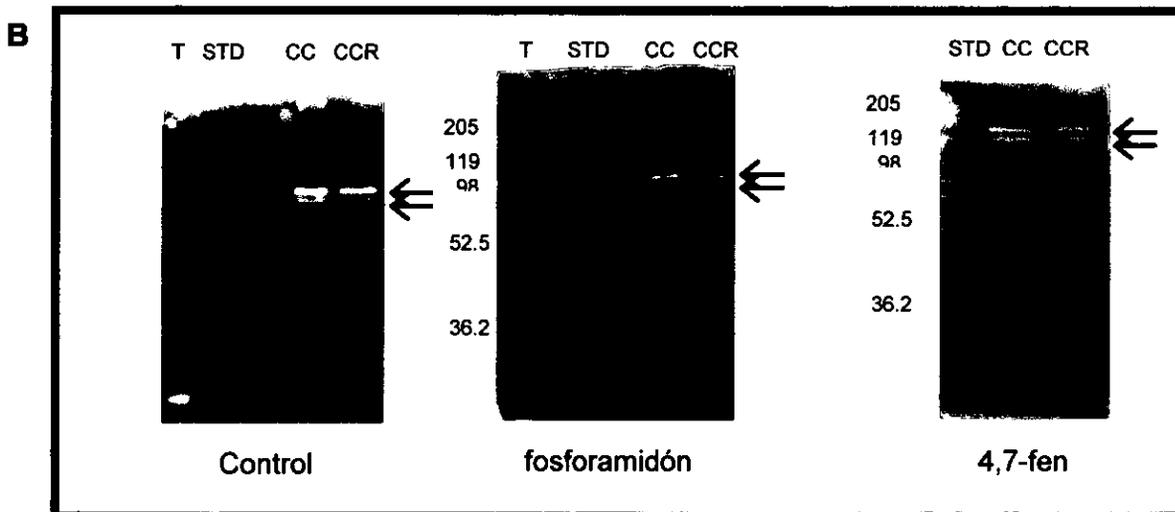


Figura 17 B. La actividad de metaloproteasa en el citosol de cabezas de *L. pictus* es insensible a fosforamidón. Las muestras citosol cabezas (CC), citosol cabezas reaccionadas (CCR) y tripsina (T) se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% con gelatina al 0.1% como sustrato. El desarrollo de la actividad de metaloproteasas se estudió en ausencia o en presencia de fosforamidón 100  $\mu$ M y 4,7-fen 5 mM. Los marcadores de PM (STD) son una mezcla de Bio-Rad (Broad-Range). Experimento representativo de 3. Las flechas indican actividad de metaloproteasas.

**Proteínas que unen zinc en el espermatozoide de erizo de mar**

Sabemos que concentraciones micromolares de  $Zn^{2+}$  inician la RA en ausencia del factor en *L. pictus*, produciendo cambios en el  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Na^+]_i$  y pH, similares a los observados en presencia del factor. Estos mismos cambios se observan en *S. purpuratus* pero no son suficientes para inducir la RA (Clapper, *et al.*, 1985; Darszon, *et al.*, Resultados no publicados).

Dado que las proteínas de las diferentes muestras del espermatozoide se separaron en condiciones no reductoras para los zimogramas, fue necesario utilizar esta condición y también separar las proteínas en condiciones reductoras para detectar los sitios de unión a zinc, utilizando  $^{65}Zn^{2+}$  (ver métodos). Esto se hizo con la idea de identificar si alguna de las proteínas con actividad de metaloproteasas presenta sitio(s) de unión a zinc.

En el caso del espermatozoide de *S. purpuratus*, se encontró que existen diferentes proteínas que unen  $^{65}Zn^{2+}$  (fig. 18 B). Las proteínas que tienen sitio de unión a  $Zn^{2+}$  y presentan actividad de metaloproteasas, en la membrana de cabezas de dichos espermatozoides, tienen un peso aproximado de 94 y 77 kDa (Tabla 1). Por otro lado, en el citosol hay dos metaloproteasas que unen  $Zn^{2+}$  (Mr 115 y 109 kDa). Asimismo, en las cabezas reaccionadas se encontró una proteína de 109 kDa que une  $Zn^{2+}$  y que tiene actividad de metaloproteasa. Cuando se hizo el control de especificidad utilizando 1 mM de  $ZnCl_2$ , se observó que se borró la señal en todas las bandas que dieron señal positiva de unión a  $^{65}Zn^{2+}$  (fig. 18 C).

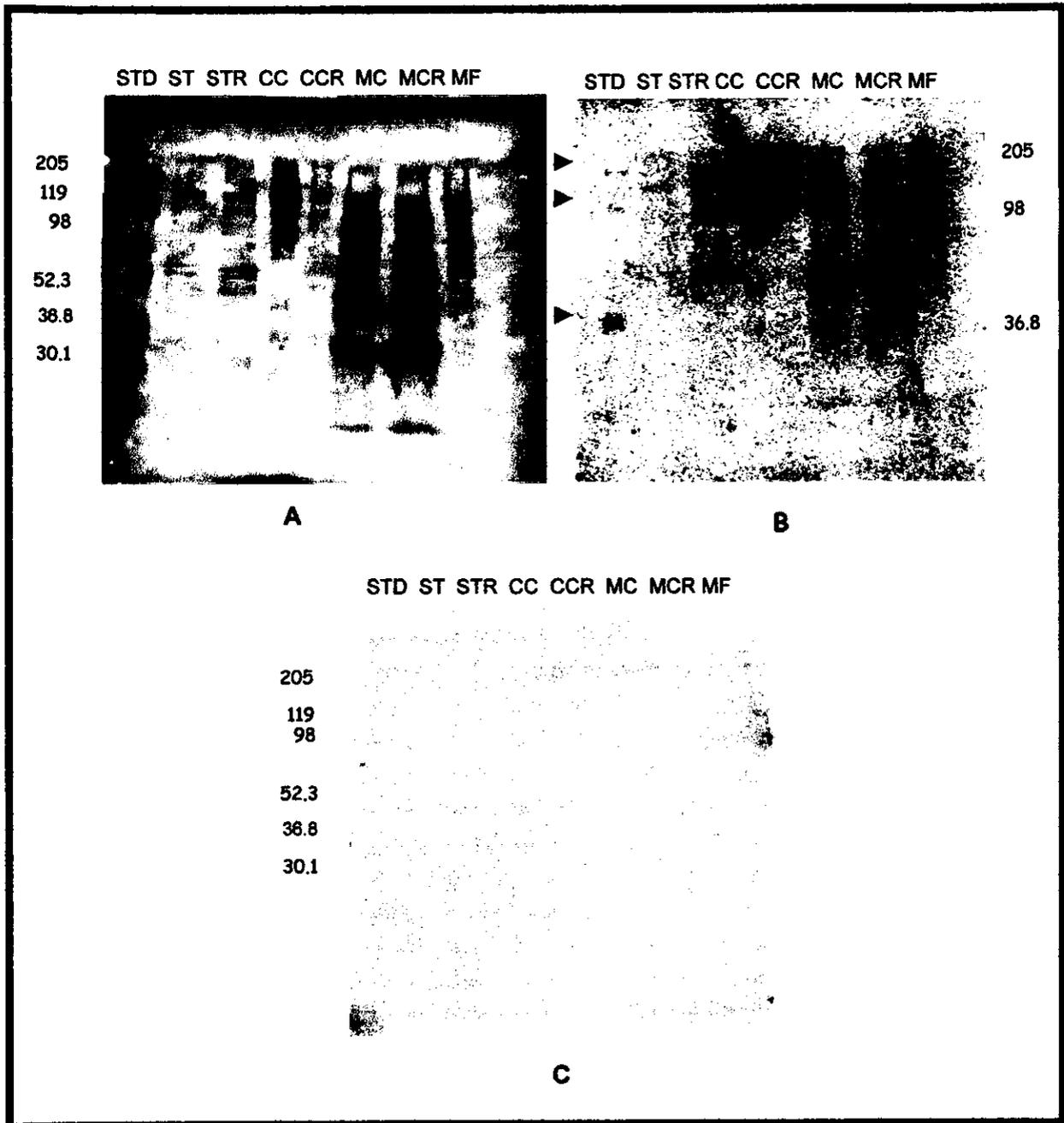


Figura 18. Proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}$  en el espermatozoide de *S. purpuratus*. Proteínas electrotransferidas de un gel PA-SDS al 10% a una membrana de nitrocelulosa y teñida con Ponceau S al 1%. La señal de las proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}$  se muestra en (B). La membrana de nitrocelulosa se incubó con  $1\mu\text{Ci}$  de  $^{65}\text{Zn}$  como se indica en métodos. (C) membrana de nitrocelulosa incubada con  $1\mu\text{Ci}$  de  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  y  $1\text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$  como control de especificidad. Estándares de peso molecular: miosina (205 kDa▶),  $\beta$ -galactosidasa (119 kDa), albúmina bovina (98 kDa▶), ovoalbúmina (52.3 kDa), anhidrasa carbónica (36.8 kDa▶), inhibidor de tripsina (30.1 kDa), lisozima (22 kDa) y aprotinina (7.6 kDa). ▶ Estándares de peso molecular que tienen sitio de unión a  $\text{Zn}^{2+}$ . Este es un experimento representativo de 3.

En la figura 19 B se muestran las proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  en el espermatozoide de *L. pictus*. Al igual que lo observado en *S. purpuratus* el control de especificidad mostró que las bandas que unieron  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  se borran en presencia de 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$  (fig. 19 C). Con base en estos resultados se puede proponer que las proteínas que unen zinc detectadas en el citosol de cabezas de *L. pictus* con Mr ~ 120 y 103 kDa (Tabla 1), corresponden al doblete de actividad de metaloproteasas detectado en la misma muestra (con Mr de ~ 115 y 109 kDa, respectivamente).

Tabla 1. Proteínas con actividad de metaloproteasas y con sitio de unión a  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  en el espermatozoide de *S. purpuratus* y de *L. pictus*.

	Proteínas con actividad de metaloproteasa y sitio de unión a $^{65}\text{Zn}^{2+}$ .
<b><i>S. purpuratus</i></b>	
MC	94 y 77 kDa
Citosol	115 y 109 kDa
<b><i>L. pictus</i></b>	
Citosol	120, 103 kDa

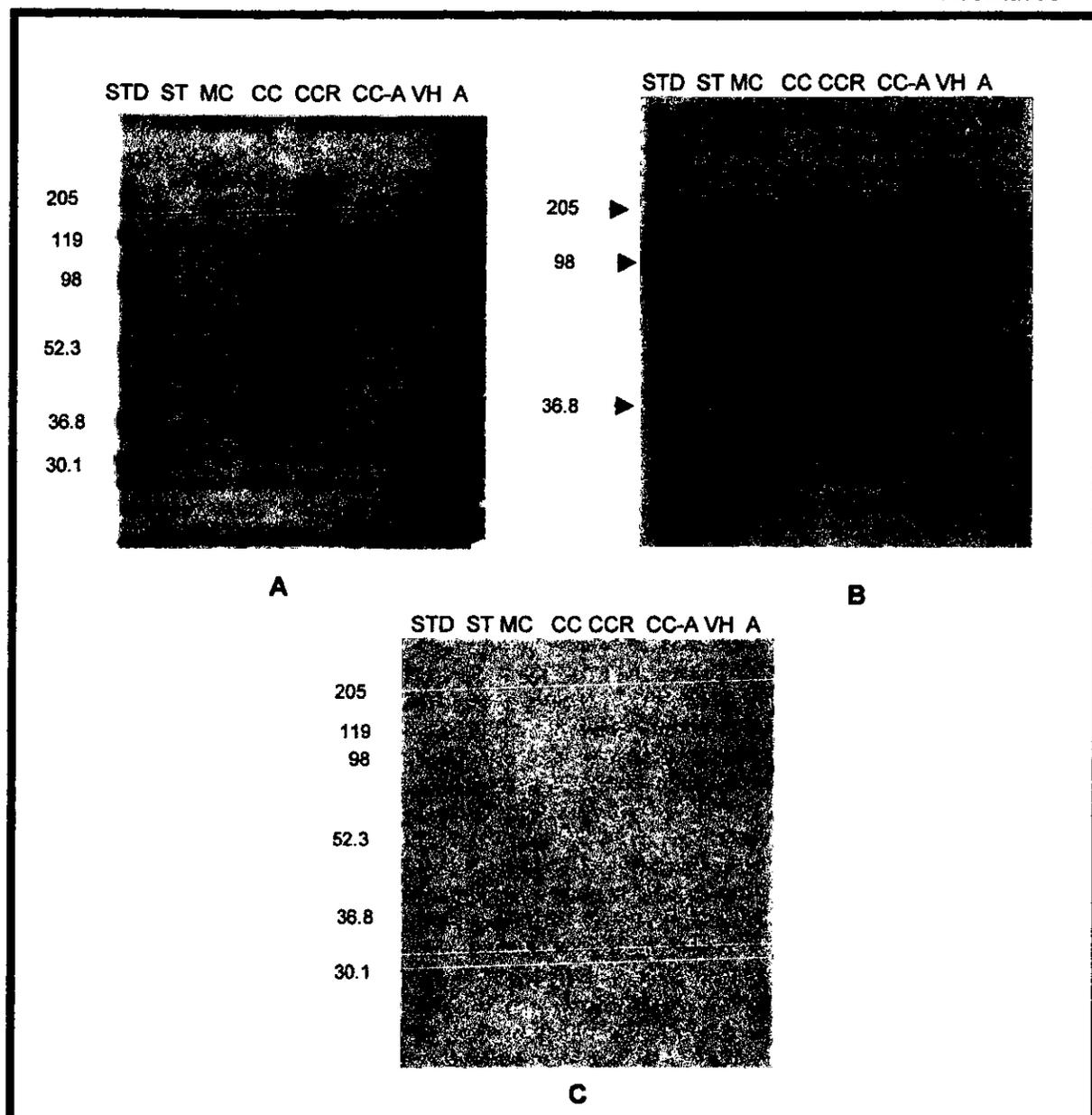


Figura 19. Proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}$  en el espermatozoide de *L. pictus*. A) Proteínas electrotransferidas de un gel PA-SDS al 10% a una membrana de nitrocelulosa y teñida con Ponceau S al 1%. B) Señal de las proteínas que unen  $^{65}\text{Zn}$ . La membrana de nitrocelulosa se incubó con  $1\mu\text{Ci}$  de  $^{65}\text{Zn}$  como se indica en métodos. (C) membrana de nitrocelulosa incubada con  $1\mu\text{Ci}$  de  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  y  $1\text{ mM ZnCl}_2$  como control de especificidad. Estándares de peso molecular: miosina (205 kDa▶),  $\beta$ -galactosidasa (119 kDa), albúmina bovina (98 kDa▶), ovoalbúmina (52.3 kDa), anhidrasa carbónica (36.8 kDa), inhibidor de tripsina (30.1 kDa), lisozima (22 kDa) y aprotinina (7.6 kDa). ▶ Estándares de peso molecular que tienen sitio de unión a  $\text{Zn}^{2+}$ . Este es un experimento representativo de 3.

## DISCUSION

Estudios previos indican que a concentraciones micromolares el zinc es capaz de iniciar la RA en ausencia del Factor en espermatozoides de *L. pictus*, produciendo cambios en el  $[Ca^{2+}]_i$  y el pH<sub>i</sub> similares a los que se observan en presencia del Factor. Sin embargo, en espermatozoides de *S. purpuratus* a pesar de producir los mismos cambios fisiológicos, el zinc es incapaz de inducir la RA (Clapper *et al.*, 1985; Darszon *et al.*, resultados no publicados). Esta aparente paradoja podría ser explicada con base en los datos obtenidos por Farach y sus colaboradores, quienes en 1987 reportaron que un sustrato fluorescente para una metaloproteasa soluble dependiente de zinc, inhibía la RA en espermatozoides de *S. purpuratus* y que este efecto era independiente de la entrada de  $Ca^{2+}$ .

Con base en estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de los inhibidores de proteasas EDTA, O-fen, fosforamidón y 4,7-fen sobre la RA inducida con gelatina del óvulo en espermatozoides del erizo de mar *S. purpuratus*. Los resultados de estos experimentos mostraron que efectivamente el EDTA y la O-fen inhiben significativamente la RA en esta especie de una manera dependiente de la concentración. En contraste, tanto el fosforamidón como la 4,7-fen tienen poco efecto sobre la RA en *S. purpuratus* (fig. 10). Estos resultados apoyan fuertemente la existencia de una metaloproteasa dependiente de zinc que participa en la RA en *S. purpuratus* (Farach, *et al.*, 1987).

Cuando se ensayaron los mismos inhibidores de metaloproteasas en la RA de espermatozoides de *L. pictus*, se encontró que también la O-fen (fig. 12 A y B) y el EDTA inhiben la RA inducida con  $Zn^{2+}$  y con factor en esta especie (Clapper, *et al.*, 1985). Sin embargo, con el fosforamidón y la 4,7-fen no se observó inhibición de la RA con ambos inductores (fig.12 A y B). De cualquier manera los resultados sugieren que en al igual

que en *S. purpuratus* los espermatozoides de *L. pictus* también poseen una metaloproteasa que participa en la RA.

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que los espermatozoides de erizo de mar tanto de *L. pictus* como de *S. purpuratus* poseen diferentes actividades proteolíticas y que la actividad principal corresponde a metaloproteasas (Granados, 2000). Cuando se realizó el fraccionamiento de homogenados de cabezas y flagelos de espermatozoides en gradientes de sacarosa y se sometió a análisis en zimogramas, se observó que la actividad de metaloproteasas se encontraba localizada principalmente en la cabeza de los espermatozoides en ambas especies (*S. purpuratus* y *L. pictus*). El comparar espermatozoides no reaccionados (control) y reaccionados permitió investigar si existían diferencias entre ambas condiciones y si dichos cambios pudieran tener algún papel importante durante la RA en el espermatozoide de erizo de mar. De esta manera, el análisis comparativo en las diferentes regiones de la cabeza en espermatozoides control y reaccionados en *S. purpuratus*, mostró que no hay diferencias en la actividad de metaloproteasas en ambas condiciones experimentales. Asimismo, al realizar los zimogramas para identificar las metaloproteasas presentes en las diferentes regiones de la cabeza fue posible observar actividad sensible a O-fen y a EDTA, e insensible a fosforamidón y a 4,7-fen (fig. 15 A y B). En particular, esta actividad se encontró asociada al citosol y a la membrana de las cabezas de los espermatozoides.

A diferencia de lo reportado por Farach, *et al.* (1987), aquí se muestra la presencia de una metaloproteasa citosólica que también se encuentra asociada a la membrana de la cabeza del espermatozoide. Esta discrepancia podría ser explicada si la metaloproteasa se encontrara débilmente unida a la membrana (plasmática o acrosomal), y pudiera desprenderse durante la preparación de la muestra. Esta idea podría verse apoyada por el hecho de que Farach, *et al.* (1987) detectaran la metaloproteasa en el sobrenadante de un homogenado de cabezas de espermatozoides almacenado previamente a -80°C. Es

importante mencionar que también se encontraron otras actividades proteolíticas que fueron insensibles a EDTA y O-fen (fig. 16 y 17 A), lo que corrobora observaciones previas de la presencia de actividades de serín, aspartil y cisteín-proteasas en el espermatozoide del erizo de mar (Granados, 2000).

Al comparar espermatozoides control y reaccionados de *L. pictus* encontramos solo un doblete de actividad de metaloproteasa con peso molecular de 120 y 113 kDa (figs. 16 y 17 A). Dicho doblete fue insensible a fosforamidón y a 4,7-fen (fig. 17 B). Lo anterior sugiere que al igual que en *S. purpuratus* los espermatozoides de *L. pictus* también poseen una metaloproteasa que participa en la RA. Aunque en la RA en espermatozoides de *L. pictus* no se ha demostrado la participación de una metaloproteasa, generalmente se acepta que en esta especie el zinc también juega un papel muy importante en el inicio de dicho evento. Es importante recordar que en *L. pictus* el zinc desencadena la RA induciendo cambios importantes en la permeabilidad de la membrana plasmática a diversos iones (Clapper *et al.*, 1985; Darszon *et al.*, Resultados no publicados). Esto sugiere que el zinc podría estar actuando al inicio de la cascada de eventos intracelulares que conducen a la RA, ya sea activando una metaloproteasa o directamente sobre alguna de las proteínas que participan en el desarrollo de dicha reacción.

Dado que la metaloproteasa soluble que participa en la RA de espermatozoides de *S. purpuratus* es dependiente de zinc (Farach, *et al.*, 1987), se decidió entonces identificar las proteínas con sitios de unión a zinc en el espermatozoide de ambas especies (*S. purpuratus* y *L. pictus*). Los experimentos de unión específica al radioligando  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  mostraron la presencia de diferentes proteínas que unen a este catión. Cabe señalar aquí, que al realizar los zimogramas las proteínas se separan en condiciones no reductoras, mientras que para los experimentos de unión específica a  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  las proteínas deben separarse en condiciones reductoras. Por lo anterior resultó imperativo saber si las metaloproteasas identificadas en este trabajo cambiaban su Mr al separarlas en las

condiciones no reductoras que se utilizaron para los zimogramas. Esto nos indicaría si las proteínas identificadas con sitio de unión a zinc tenían el mismo tamaño que las que presentaban actividad de metaloproteasas. Los resultados de los experimentos de unión específica a  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  mostraron la presencia de diferentes proteínas (Mr de 34 a 163 kDa) que unen zinc en los espermatozoides tanto de *S. purpuratus* (fig. 18) como de *L. pictus* (fig. 19). En las cabezas de los espermatozoides no reaccionados de *S. purpuratus* (fig. 18) se encontraron cuatro metaloproteasas que unen zinc, dos en la MC (Mr 94 y 77 kDa-ver tabla 1) y dos en el citosol (Mr 115 y 109 kDa). En contraste, sólo una metaloproteasa de 109 kDa estuvo presente en la membrana de cabezas de los espermatozoides reaccionados. Es altamente posible que alguna de estas proteínas corresponda a la metaloproteasa soluble que participa en la RA reportada por Farach, *et al.* (1987). Por otro lado, en la fracción citosólica de cabezas de espermatozoides no reaccionados de *L. pictus* se identificaron dos metaloproteasas que unen zinc con Mr de 120 y 103 kDa (fig. 19-ver tabla 1). Estas metaloproteasas son también fuertes candidatos de proteínas reguladoras de la RA.

Actualmente se desconoce a que nivel está actuando la metaloproteasa dependiente de zinc sobre la RA. Una posibilidad podría ser sobre el canal de  $\text{K}^+$  modulado por GMPc que participa en la cascada de eventos inducidos por el Speract, un decapeptido presente en la gelatina del huevo que estimula la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  de la célula, y que además es capaz de aumentar los niveles de nucleótidos cíclicos como GMPc y AMPc (Garbers, 1989; Ward and Kopf, 1996;). Estos cambios iónicos promueven un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y pH (pHi) intracelular (Darszon *et al.*, 2001; Galindo, *et al.*, 2000). Una posibilidad alternativa pudiera ser la remoción de un dominio inhibitorio del canal de  $\text{K}^+$  mediante proteólisis y que conduce a una hiperpolarización de la membrana plasmática tal y como sido reportado para el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en *Paramecium* (Kubalaski, *et al.*, 1989). Por último, otra

posibilidad sería un efecto a nivel de la enzima adenilato ciclasa (AC), ya que la inducción tanto natural como de manera artificial de la RA en los espermatozoides de erizo de mar, aumenta los niveles de AMPc. Así, podría ser que como se ha sugerido para la AC del testículo de rata, con la cual comparte varias propiedades, la activación de la AC en el espermatozoide del erizo de mar este regulada por una actividad proteolítica (Buck, *et al*, 1999).

Por otro lado, es probable que las metaloproteasas participen de manera importante en la exocitosis que se lleva a cabo durante la RA. Con anterioridad se ha reportado que las metaloproteasas se requieren en eventos de exocitosis en células adrenales cromafines en un paso posterior a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mundy y Strittmatter, 1985). Aunque el papel de las metaloproteasas en exocitosis no se conoce en detalle, es probable que se requiera de proteólisis de proteínas de membrana para que se lleve a cabo la fusión de las vesículas secretorias o que la proteasa se necesite para generar péptidos “fusogénicos”, como en el caso de la fusión del mixovirus con la célula huésped (White, *et al.*, 1983). Otra posibilidad es que la proteasa se necesite en un paso anterior a la fusión aunque los mecanismos de regulación y sustratos endógenos todavía no se conocen.

Alternativamente, cabe también la posibilidad de una modulación directa del zinc sobre algún otro componente esencial en la fisiología del espermatozoide. Como se ha sugerido para las células HT29-CI (línea celular de cáncer de colon humano), en donde existe un receptor específico para zinc que al activarse permite la liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  de las pozas intracelulares. Este receptor une zinc extracelular y activa diversas vías de transducción de señales (Hershinkel, *et al.*, 2001).

## CONCLUSIONES

- ❖ De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en este trabajo la RA en el espermatozoide de *S. purpuratus* y *L. pictus* se atenúa significativamente con algunos inhibidores de metaloproteasas como la O-fen y el EDTA. En contraste, otros inhibidores como el fosforamidón y la 4,7-fenantrolina no alteran la RA en los espermatozoides del erizo de mar.
- ❖ Al igual que en *S. purpuratus*, los espermatozoides de *L. pictus* también poseen una metaloproteasa que puede participar en la RA. Esta actividad de metaloproteasas se encuentra en el citosol de cabezas de espermatozoides de *L. pictus*, mientras que en *S. purpuratus* la actividad de metaloproteasas se encuentra asociada a la membrana de cabezas y al citosol de las cabezas.
- ❖ En las cabezas de los espermatozoides de *S. purpuratus* se encuentran cuatro metaloproteasas dependientes de  $Zn^{2+}$ : dos en la MC (Mr 94 y 77 kDa) y dos en el citosol (115 y 109 kDa). Por su parte, en *L. pictus* fue posible identificar dos metaloproteasas dependientes de  $Zn^{2+}$  (120 y 103 kDa).
- ❖ El efecto que la O-fen ejerce sobre la RA se debe a que dicho compuesto remueve el ion metálico del sitio activo de la metaloproteasa y no a un efecto inespecífico en la membrana debido a la hidrofobicidad del compuesto. La proteasa sensible a O-fen podría participar de manera importante en la cascada de eventos que desencadenan la RA.

## **PERSPECTIVAS**

- Estudiar la dependencia de estas metaloproteasas a los iones divalentes y de pH en las metaloproteasas dependientes de zinc encontradas en este trabajo.
- Investigar a que nivel actúan las metaloproteasas que participan en la RA, haciendo anticuerpos contra metaloproteasas después de purificarlas y secuenciarlas.
- Con esta información se podrían descubrir secuencias homólogas en las bases de datos disponibles (genomas y proteomas) a fin de conocer mas acerca del origen de las proteínas involucradas en el mecanismo de la RA.

## REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. (1990). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. Nueva York. USA.
- Andrews, J.C., Nolan, P.J., Hammerstedt, H.R. y Bavister, D.B. (1994). Role of Zinc in Hamster Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. **51**: 1238-1247.
- Andrews, J.C., Nolan, P.J., Hammerstedt, H.R., Bavister, D.B. (1995). Characterization of N-(6-Methoxy-8-Quinolyl)-p-Toluenesulfonamide for the detection of zinc in living sperm cells. *Cytometry*. **21**: 153-159.
- Aonuma, S., Okabe, M. y Kawaguchi, M. (1978). The effect of zinc ions on fertilization of mouse ova in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **53**: 179-183.
- Barceloux, D. G. (1999). Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37** (2):279-292.
- Baxter, D.A., Johnston, D, y Strittmatter, W.J. (1983). Protesase inhibitors implicate metalloendoprotease in synaptic transmission at the mammalian neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci.* **80**: 4174-4178.
- Berg, J. y Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. **271** :1081-1085.
- Bettger, W.J. y O'Donell B.L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* **28**: 1425.
- Boder W. y Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.* **1477**(1-2):241-52.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72** (7): 248-54.
- Bradford, O.F. (1987). *Anal Biochem.* **162**: 11-17.
- Beynon, R.J y Bond, J.S. (1986). "Proteolytic enzymes. A Practical Approach". Oxford Univ Press, New York.
- Bond, J.S y Butler, P.E. (1987). Intracelular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:333-364.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M. J y Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(1):79-84.

- Carroll, E.J. Jr. (1976). Cortical granule proteases from sea urchin eggs. *Methods Enzymol.* **45**:343-53.
- Clapper, D.L., Davis, J.A., Lamothe, P.J., Patton, C., y Epel, D. (1985). Involvement of zinc in the regulation of  $pH_i$ , motility and acrosome reactions in sea urchin sperm. *J. Cell Biol.* **100**:1817-1824.
- Coleman, J.E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. *Annu Rev Biochem.* **61**: 897-946.
- Coleman, J.E. (1998). Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol.* **2**: 222-234.
- Compton, S.J. y Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**: 369-374.
- Contreras Ochoa, C.O. (1996). Mecanismo de inhibición de la Reacción Acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar por los estilbenos DIDS y SITS. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Correa, L.M., Cho, Ch., Myles, D.G y Primakoff, P. (2000). A role for a TIMP-3-sensitive,  $Zn^{2+}$ -dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. *Dev Biol.* **225**:124-134.
- Couch, C.B. y Strittmatter, W. J. (1983). Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell.* **32**: 257-265.
- Christianson, D.W. y Cox, J.D. (1999). Catalysis by metal activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annu Rev Biochem.* **68**: 33-57.
- Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences.* **13**: 1041-1049.
- Darszon A, Gould M, De De La Torre L, Vargas I. (1984). Response of isolated sperm plasma membranes from sea urchin to egg jelly. *Eur J Biochem.* **144**(3):515-22
- Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., y Treviño, C. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* In press.
- Delgado, N.M., Carranco, A., Merchant, H y Reyes, R. (1985). Effect of divalent ions in acrosome reaction induced by glycosamineglycans in porcine spermatozoa. *Archives of Andrology.* **14**: 193-198.
- Díaz-Pérez, E, Thomas, P. y Meizel, S. (1988). Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. *J Exp Zool.* **248**: 213-221.
- Epel, D y Vacquier, V. (1978) in Membrane Fusion (Poste, G y Nicholson, G.L., eds), Elsevier/North-Holland, New York, 1-63 pp.

- Farach, H., Mundy, D., Strittmatter, W. y Lennarz, W. (1987). Evidence for the involvement of metalloendoproteases in the acrosome reaction in sea urchin sperm. *J Biol Chem.* **262**: 5483-5487.
- Favier, A. E. (1992). The role of zinc in reproduction. *Biological Trace Element Research.* **32**:363-382.
- Feitosa, L., W. Gremiski, S. Veiga, C. Elias, E. Graner, O. Mangili y R. Brentani. (1998). Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon.* **36**: 1039-1051.
- Foltz, K.R., J.S. Partin y W.J. Lennarz. (1993). Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. *Science.* **259**: 1421-1425.
- Frederick, J.M., Hollyfield, J.G. y Strittmatter, W.J. (1984). Inhibitors of metalloendoprotease activity prevent K-stimulated neurotransmitter release from the retina of *Xenopus laevis*. *J Neurosci.* **4**: 3112-3119.
- Fushimi, N., Ewe-Ee, Ch., Nakajima, T. y Ichishima, E. (1999). Aspzincin, a family of metalloendopeptidase with a new zinc-binding motif. *J Biol Chem.* **274**(34): 24195-24201.
- Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, E. J. Y Darszon, A. (2000). Participation of a K<sup>+</sup> channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev. Biol.* **221**: 285-294.
- Garbers, D.L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu.Rev.Biochem.* **58**: 719-742.
- Garbers, D.L., Kopf, G.S. Tubb, D.J. y Olson, G. (1983). Elevation of sperm adenosine 3'5'-monophosphate concentrations by a fucose-sulfate rich complex associated with eggs: I structural characterization. *Biol. Reprod.* **29**: 1211-1220.
- González-Martínez, M., y Darszon, A. (1987). A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBBS Lett.* **218**: 247-250.
- González-Martínez, M., A. Guerrero, E. Morales, L. de la Torre y Darszon, A. (1992). A depolarization can trigger Ca<sup>2+</sup> uptake and acrosome reaction when preceded by hyperpolarization in *Lytechinus pictus* sea urchin sperm. *Dev Biol.* **150**: 193-202.
- Gottlieb, W. y Meizel, S. (1987). Biochemical studies of metalloendoprotease activity in the spermatozoa of three mammalian species. *J Androl.* **8**: 14-24.
- Graham, J.M. (1993). Isolation of mitochondria, mitochondrial membranes, lysosomes, peroxisomes and Golgi membranes from rat liver. *Methods Mol Biol.* **19**:29-40.
- Granados, G.G. (2000). Identificación de actividad proteolítica en el espermatozoide de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Hansbrough, J. R., y Garbers, D. L. (1981 a). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **256**: 1447-1452.
- Henkel, R., Bittner, J, Weber, R., Hüther, F y Miska, W. (1999). Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and Sterility.* **71**(6): 1138-1143.
- Hershinkel, M., Moran, A., Grossman, N. y Sekler, I. (2001). A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular  $Ca^{2+}$  and regulates ion transport. *PNAS.* **98**(20): 11749-11754.
- Hidiroglou, M. y Knipfel, J.E. (1982). Zinc in Mammalian Sperm: a Review. *J.Dairy.Sci.* **68**: 1147- 1156.
- Higaki, J.N, Fletterick, R.J. y Craik, Charles. (1992). Engineered metalloregulation in enzymes. *TIBS.* **17**: 100- 104.
- Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**: 1-6.
- Ikegami, S., H. Kobayashi, Y. Myotoishi, S. Ohta y K.H. Kato. (1994). Selective inhibition of exoplasmic membrane fusion in echinoderm gametes with jaspisin a novel antihatching substance isolated from marine sponge. *J Biol Chem.* **267**: 23262-23267.
- Index Merck. (1989). An enciclopedia of chemicals, drugs and biologicals. *Merck & CO., Inc.* Eleventh edition. USA. 7168-7169.
- Johnson, H.C. y Epel, D. (1983). Heavy metal chelators prolong motility and viability of sea urchin sperm by inhibiting spontaneous acrosome reactions. *J. Exp Zoology.* **226**: 431-440.
- Kato, K.H., Takemoto, K., Kato, E., Miyazaki, K., Kobayashi, H y Ikegami, S. (1998). Inhibition of sea urchin fertilization by jaspisin, a specific inhibitor of matrix metalloendoproteinase. *Develop Growth Differ.* **40**: 221-230.
- Kay, E. y B. Shapiro. (1985). The formation membrane of sea urchin egg. *Biol Fert.* 56-79.
- Khan, A.R. y James, M.N.G. (1998). Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science.* **7**: 815-836.
- Kleiner, D.E. y Stetler-Stevenson, W. (1994). Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry.* **218**: 325 - 329.
- Kohno, N., K. Yamagata., S. Yamada., S. Kashiwabara., Y. Sakai y T Baba. (1998). Two novel testicular serin proteases, *tesp1* y *tesp2*, are present in the mouse sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun.* **245**: 658-665.

- Koren, E., Schon, E. y Lukac, J. (1975). The coagulation of insoluble and basic proteins from rat seminal vesicles secretion with vesiculase: Influence of collagenase-like peptidase from rat testis. *J Reprod Fertil.* **42**: 491-495.
- Kubalaski, A., Martinac, B. y Saimi Y. (1989). Proteolytic activation of a hyperpolarization- and calcium-dependent potassium channel in Paramecium. *J Membr Biol.* Nov; **112**(1):91-6.
- Laemmli, M. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680 - 685.
- Lee, H.C.H., Johnson, C. y Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol.* **95**: 31-45.
- Lennarz, W. y Strittmatter, W.J. (1991). Cellular functions of metalloendoproteinases. *Biochem Biophys Acta.* **1071**: 149-158.
- Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E.C. y Darszon, A. (1990). Ca<sup>2+</sup> channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **95**: 273-296.
- Magnus, O., Brekke, I., Abyholm, T y Purvis, K. (1990). Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm. *Arch Androl.* **24**:159-166.
- Martin, A.W., Lutwak-Mann, C., McIntosh, J.E y Mann, T. (1973). Zinc in the spermatozoa of giant octopus *Octopus dolpheni martini*. *Comp. Biochem. Physiol.* **45 A**: 227-233.
- Mazen, A., Gradwohl, G. y De Murcia, G. (1988). Zinc - Binding Proteins Detected by Protein Blotting. *Anal. Biochem.* **172**: 39 - 42.
- Morisawa, M. (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool Sci.* **11**:647-662.
- Mundy, D.I. y Strittmatter, W.J. (1985). Requirement for metalloendoprotease in exocytosis: evidence in mast cells and adrenal chromaffin cells. *Cell.* **40**: 646-656.
- Palmiter, R., Cole, B. y Findley, D. (1996). ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *The EMBO.* **15**: 1784 - 1791.
- Pattison, S.E., Telles, S., Friar, S., Stowell, C. y Beckley, R. (1998). Zinc diffusion through lipid bilayers. *Arch Biochem Biophys.* **351** (1): 41-46.
- Patton, C., Epel, D., Kibak., H. y Miller, P. (2001). Leland Stanford Junior University.
- Rawlings, N.D. y Barrett, A.J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**: 183-228.

- Roe, J., Farach, H, Strittmatter, W. y Lennarz, W. (1988). Evidence for involvement of metalloendoproteases in a step in sea urchin gamete fusion. *J Cell Biol.* **107**: 639-544.
- Riffo, M., Leiva, S y Astudillo, J. (1992). Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int. J. Andrology.* **15**:229-237.
- Roques, B.P y Beaumont, A. (1990). Neutral endopeptidases 24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol. Sci.* **11**:245-249.
- Sansone, G., Martino, M y Abrescia, P. (1991). Binding of free and protein associated zinc to rat spermatozoa. *Com Biochem Physiol.* **99**: 113-117.
- Sardet, D y Tilney, L. (1970). Origin of the acrosoma process is actin complexed with membrane precursors?. *Cell Biol Int Rep.* **1**: 193-200.
- Schulz, J. R., Sasaki, J. D y Vacquier, V. D. (1998). Increased association of synaptosome-associated protein of 25 kDa with syntaxin and vesicle-associated membrane protein following acrosomal exocytosis of sea urchin sperm. *J Biol Chem.* **273**: 24355-24359.
- SeGall, G. K. y Lennarz, W.J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev. Biol.* **71**: 33-48.
- SeGall, G. K. Y Lennarz, W.J. (1981). Jelly coat and induction of the acrosome reaction in echinoid sperm. *Dev. Biol.* **86**: 87-93.
- Shapiro, B.M., Schackmann, R.W y Gabel, C.A. (1981). Molecular approaches to the study of fertilization. *Annu Rev Biochem.* **50**: 815-843.
- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H. y Isaka, S. (1981). Purification and primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**: 1238-1244.
- Togo, T y Morisawa, M. (1997). Aminopeptidase-like protease released from oocytes affects oocyte surfaces and supresses the acrosome reaction in establishment of polyspermy block in oocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Biol.* **182**: 219-227.
- Tolusiani, D.R.P., Abou-Haila, A., Loeser, C y Pereira, B.M.(1998). The biological and functional significance of sperm acrosome and acrosome enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res.* **249**: 151-164.
- Towbin, H., Slachelin, T y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* **76**: 4350-4354.
- Valle, B.L. y Auld, D.S. (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* **29**(24):5647-5659.

- Valle, B.L. y Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* **73**:79-117.
- Vacquier, V.D. (1986). Activation of sea urchin spermatozoa during fertilization. *TIBS.* **11**: 77-81.
- Vacquier, V. D. y Moy, G. W. (1997). The fucose sulfate polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **192**: 125-135.
- Ward, C.R y Vacquier, V.D. (1983). Dephosphorilation of a major sperm membrane protein is induced by egg jelly during sea urchin fertilization. *Proc Natl Acad Sci.* **80**: 5578-5582.
- Ward, C.R y Kopf, G. (1993). Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol.* **158**: 9-34.
- White, J., Helenius, A. y Gething, M.J. (1983). Hemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. *Nature.* **300**: 658-659.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroianni L Jr, Briggers, J.D, eds. Fertilization and embryonic development in vitro. New York: Plenum Press, 81-82.
- Young, L.G y Nelson, L. (1974). The effects of heavy metals ions on the motility of sea urchin spermatozoa. *Biol. Bull.* **147**: 236-246.