

FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



CARACTERIZACION DE TRES PROTEINAS
PROVENIENTES DEL TESTICULO Y
ESPERMATOZOIDES DEL COBAYO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ANA LILIA ROA ESPITIA

DIRECTORES DE TESIS:

M. EN C. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ G.
DRA. ADELA MUJICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS LA DEDICO:

Especialmente para ti

donde quiera que te encuentres...

A mi madre: A quien dedico este trabajo con mucho cariño, ya que fué, es y será la base sólida por la cual camino por la vida, gracias por tu amor, confianza y ayuda.

A mi padre: Gracias por tu ayuda y comprensión.

A mi esposo: Enrique, a quien agradezco su paciencia, comprensión, cariño y su asesoría en la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amor.

A mis hermanos: A quienes amo y espero que ni la distancia, ni las circunstancias y mucho menos el tiempo nos separen, porque hay que recordar que hay alguien que siempre nos mantendrá unidos, nuestra madre.

A mis sobrinos: Por su cariño.

A mis amigos: Alejandro, Carlos, Elsa, Elena y Angeles, por su ayuda en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Adela Mújica con mucho cariño gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y dedicarme su valioso tiempo y experiencia en la realización de este trabajo, los cuales considero muy importantes en mi formación.

A mis compañeros de laboratorio: Jaime, Juan, Lulú, Martha y Alba. Víctor por su colaboración en el trabajo de laboratorio.

Al personal de la unidad de microscopía electrónica, por su asesoría y apoyo en el uso del microscopio de fluorescencia.

El presente trabajo se desarrollo en el Departamento de Biología Celular del CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio que esta a cargo de la Dra. Adela Mújica de Hernández.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
<i>El espermatozoide.....</i>	<i>1</i>
<i>La capacitación.....</i>	<i>1</i>
<i>La reacción acrosomal.....</i>	<i>4</i>
<i>Significado funcional de la reacción acrosomal.....</i>	<i>5</i>
<i>Inductores de la reacción acrosomal.....</i>	<i>6</i>
<i>Mecanismos de la excitosis y la reacción acrosomal.....</i>	<i>7</i>
<i>Anexinas.....</i>	<i>12</i>
<i>Anexinas en el espermatozoide.....</i>	<i>15</i>
<i>Nomenclatura de las anexinas.....</i>	<i>16</i>
JUSTIFICACION.....	17
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	19
<i>Purificación de anexinas.....</i>	<i>19</i>
<i>Electroforesis.....</i>	<i>20</i>
<i>Obtención de espermatozoides.....</i>	<i>21</i>
<i>Purificación de espermatozoides.....</i>	<i>21</i>
<i>Obtención de membrana plasmática total del espermatozoide del cuyo.....</i>	<i>21</i>
<i>Obtención de la membrana plasmática de la región acrosomal del espermatozoide del cobayo.....</i>	<i>22</i>

<i>Obtención de membranas de eritrocitos.....</i>	<i>23</i>
<i>Unión de proteínas testiculares tipo anexinas, a membranas de eritrocitos.....</i>	<i>23</i>
<i>Unión de proteínas espermáticas de la fracción soluble, a la membrana plasmática de espermatozoides del cobayo.....</i>	<i>24</i>
RESULTADOS.....	25
<i>Proteínas tipo anexinas obtenidas del testículo del cobayo.....</i>	<i>25</i>
<i>Identificación de las proteínas inmunoreactivas en los extractos de testículo y de los espermatozoides al anticuerpo anti-p31/33.....</i>	<i>25</i>
<i>Determinación de la presencia y de la habilidad de asociación de sp42 a la membrana acrosomal externa del espermatozoide del cobayo.....</i>	<i>29</i>
<i>Valoración de la capacidad de unión de las proteínas testiculares p31/33 y p50 a biomembranas.....</i>	<i>32</i>
<i>Valoración de la capacidad de unión de las proteínas sp42 a la membrana plasmática del espermatozoide del cobayo.....</i>	<i>35</i>
<i>Inmunoreactividad de anticuerpos comerciales a las proteínas p31/33, p50 y sp42.....</i>	<i>35</i>
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	43
APENDICE.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	48

ABREVIATURAS

Ca²⁺	<i>Calcio</i>
kDa	<i>kilodaltones</i>
Mrs	<i>Pesos moleculares</i>
sp42	<i>proteína espermática de 42 kDa</i>
sp66	<i>proteína espermática de 66 kDa</i>
RA	<i>Reaccion Arosomal</i>
GAG	<i>Glicosaminglicanos</i>
ZP3	<i>Glicoproteína de matriz extracelular del ovocito</i>
CA	<i>Cápsula Arosomal</i>
MAI	<i>Membrana Acrosomal Interna</i>
MAE	<i>Membrana Acrosomal Externa</i>
MP	<i>Membrana Plasmática</i>
RE	<i>Reticulo Endoplásmico</i>
PKC	<i>Proteína Cinasa C</i>
IP	<i>Fosfatidilinositol</i>
PLC	<i>Fosfolipasa C</i>
InP3	<i>Inositoltrifosfato</i>
DAG	<i>Diacilglicerol</i>
IP2	<i>Inositolbifosfato</i>
IP4	<i>Inositoltetrafosfato</i>
CaM	<i>Calmodulina</i>
PLA₂	<i>Fosfolipasa A₂</i>
AMPC	<i>Adenosinmonofosfato ciclico</i>
VRA	<i>Vesículas de reacción acrosomal</i>
PMSF	<i>Fenilmetilsulfonilfluoruro</i>
p-HMB	<i>p-hidroximercuribenzoato</i>
p-ABA	<i>p-aminobenzamida</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
PAGE	<i>Geles de poliacrilamida</i>
PBS	<i>Amortiguador salino de fosfatos</i>
MNC	<i>Membranas de nitocelulosa</i>
MES	<i>2(N-morfolino) sal etanosulfónica</i>
EGTA	<i>Acido etilendiamidotetracético</i>
EDTA	<i>Acido etilenglicol-ω-(β-aminoetil éter)</i>
IFI	<i>N',N',N',N'-tetracético Inmunofluorescencia indirecta</i>

RESUMEN

Las anexinas son una familia de proteínas que se asocian a membranas biológicas y a bicapas lipídicas de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} , que han sido relacionadas en varios tipos celulares con el proceso de exocitosis (Pollard y col., 1987; Papahadjopoulos y Duzgunes, 1990; Glenney y Tack 1985). En los espermatozoides de los mamíferos han sido detectadas algunas anexinas, cuya función se desconoce; en el proceso denominado reacción acrosomal (RA), su participación específica no ha sido estudiada. En este trabajo, se aislaron dos proteínas del testículo del cobayo (Mrs: 50 kDa y un doblete de 31/33 kDa), que presentaron la capacidad de unirse a las membranas del eritrocito de manera dependiente a la concentración intracelular de Ca^{2+} ; es decir, mostraron la propiedad que caracteriza a las anexinas. Por otra parte, se caracterizaron dos proteínas características del espermatozoide del cobayo con Mrs: 42 kDa y 66 kDa); la primera tuvo un comportamiento típico de anexina ya que, se unió a las membranas plasmática y acrosomal externa de manera dependiente a la concentración de calcio, la segunda, de 66 kDa, aunque fue reconocida por un anticuerpo monoclonal específico para la anexina VI, no presentó la propiedad de unirse a las membranas de manera dependiente a la concentración de calcio. Esta última se encontró asociada a la membrana plasmática del espermatozoide y no se separó de ella por tratamiento con EGTA. Se confirmó la localización de la proteína sp42 en la región acrosomal, y se determinó que aparentemente se encuentra entre la membrana acrosomal externa y la plasmática. Además, se realizó la detección de la proteína sp66, la cual fue localizada en el acrosoma y en el flagelo. Las proteínas p31/33, p50 y sp42 no mostraron reacción positiva a los anticuerpos monoclonales (comerciales) anti-anexinas I, II, IV y VI. La proteína sp66 mostró reacción cruzada solamente contra el anticuerpo anti-

anexina VI. Nuestros resultados sugieren, que sp42 puede estar involucrada en la reacción acrosomal por su localización en la región acrosomal y su capacidad de unirse, de manera dependiente a la concentración de calcio, a las membranas plasmática y acrosomal externa, permaneciendo aún por establecerse, si sp42 es realmente un miembro de la familia de las anexinas. Por otra parte, la proteína espermática de 66 kDa, aunque fue reconocida por el anticuerpo específico para la anexina VI, tuvo un comportamiento atípico, y su función no fue abordada en este trabajo.

INTRODUCCION

El espermatozoide o gameto masculino es una célula altamente diferenciada en estructura y función y es el producto de la gametogénesis, proceso que ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos del macho sexualmente maduro (Eddy, 1988).

Morfológicamente, el espermatozoide es una célula alargada que mide hasta 60 micrómetros de longitud (Fouquet, 1992), estructuralmente está organizado en cabeza y cola o flagelo, unidas entre sí por el cuello. La célula está cubierta por la membrana plasmática (Alberts y col, 1989). A su vez la cabeza se divide en dos regiones: la región acrosomal con su segmento ecuatorial y la región postacrosomal, mientras que el flagelo se divide en: pieza media, pieza principal y pieza final (Fig. 1). La cabeza del espermatozoide del hombre mide de 4 a 5 micrómetros de longitud y de 3 a 4 micrómetros de ancho, la forma y el tamaño de la cabeza es característica de la especie (Fouquet, 1992). La cabeza del espermatozoide está constituida por el núcleo que contiene al material genético altamente condensado, el acrosoma que cubre los dos tercios anteriores del núcleo, citoplasma y componentes del citoesqueleto (Eddy, 1988; Austin, 1982)

Capacitación

Inicialmente cuando el espermatozoide es liberado o eyaculado, no pueden fertilizar al óvulo, sin embargo cuando pasan por el tracto reproductor de la hembra adquieren la capacidad de fertilizar, a este proceso se le denomina capacitación (Austin, 1981). Durante este proceso le ocurren una serie de cambios estructurales, subcelulares y moleculares que habilitan al gameto como espermatozoide fertilizante (Yanaginachi, 1988); dentro de estos cambios incluyen modificación, redistribución o pérdida de

FALLA DE ORIGEN

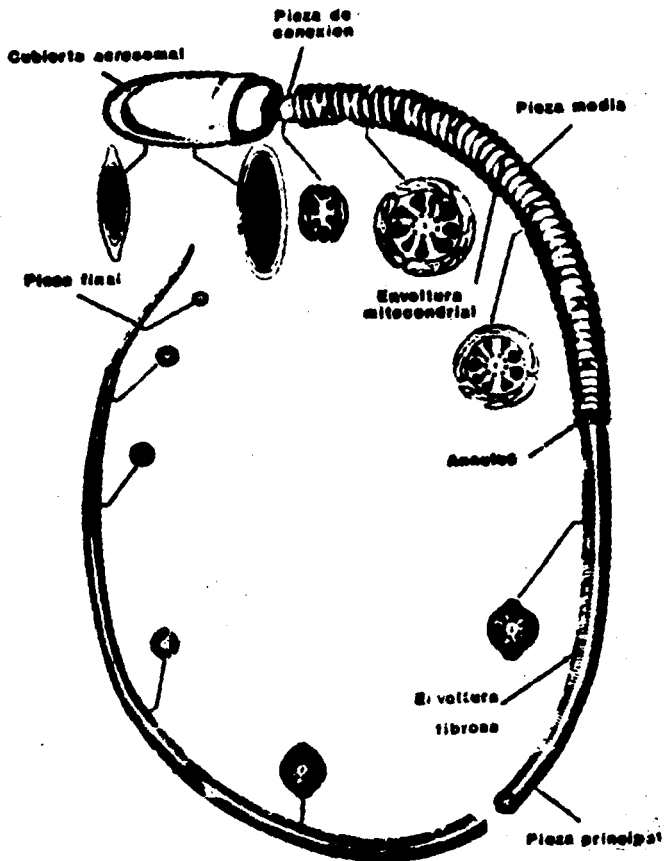


Figura 1. Morfología general del espermatozoide de mamífero mostrando las diferentes estructuras que los constituyen (Fawcett, 1975).

proteínas del plasma epididimal y seminal que ocurren en la superficie del espermatozoide eyaculado. Las evidencias que apoyan lo anterior son el reconocimiento negativo por anticuerpos anti-plasma seminal en los espermatozoides capacitados, en comparación con los eyaculados. De igual manera se observa la pérdida de glicoproteínas epididimales. En estudios con lectinas, se ha llegado también a la conclusión de que la membrana plasmática del espermatozoide se altera durante la capacitación (O'Rand, 1982; Langlais, 1985). Otro cambio importante a nivel de membrana, que ha sido, relacionado con la capacitación es relativo a un intercambio de lípidos, tales como la fosfatidil colina y el colesterol; lo cual induce la desestabilización de la membrana y una permeabilidad incrementada al calcio, que a su vez promueve la fusión y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1988).

Tanto el metabolismo energético oxidativo como el glicolítico, se ha descrito que se incrementan con la capacitación. Así mismo, el movimiento del espermatozoide se vuelve más enérgico y de características singulares, al cual se le denomina movimiento hiperactivado, que se sugiere ayuda al espermatozoide a vencer las barreras físicas que el óvulo presenta como cubierta más interna, la zona pelúcida. (Yanagimachi, 1981). Una vez que el espermatozoide ha sido capacitado esta listo para sufrir el siguiente proceso; la exocitosis acrosomal esto es en respuesta a moléculas que se asocian al óvulo, penetrando la zona pelúcida, y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo. Aunque estos eventos ocurren usualmente en el tracto reproductor de la hembra, el desarrollo de sistemas que promueven la capacitación "in vitro" no se hizo esperar, la manipulación "in vitro" la cual ha hecho posible el análisis más cuidadoso de los requerimientos del espermatozoide para desarrollar la habilidad para fertilizar al óvulo.

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

Aparentemente en la capacitación del espermatozoide participan todas las regiones del tracto reproductor femenino. En el útero de la coneja se han capacitado espermatozoides de diferentes especies. Esto lleva a dos consideraciones: que no existe una especificidad de especie y que el útero podría ser el sitio de la capacidad natural. Se ha determinado que tanto el moco cervical, como las secreciones del oviducto coadyuvan en la capacitación del espermatozoide; y para algunos autores este último órgano puede ser el principal sitio de capacitación (Bedford, 1983).

Reacción acrosomal

El acrosoma es una estructura en forma de saco, que se encuentra delimitado por sus membranas, la acrosomal externa (adyacente a la membrana plasmática) y la acrosomal interna (cercana a la envoltura nuclear); su contenido o matriz se compone principalmente de enzimas de naturaleza hidrolítica, las principales son la hialuronidasa, la acrosina, las fosfolipasas A y C, catepsina D, la acetilglucosaminidasa y otras más que participan en la degradación de las envolturas del óvulo durante la fertilización (Eddy,

1988; Austin, 1982; Yanagimachi, 1988). Estas enzimas son liberadas cuando espermatozoide se encuentra muy cerca del óvulo, mediante un proceso llamado reacción acrosomal (RA), en el cual la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, formando vesículas híbridas, que se pierden, quedando expuesta la membrana acrosomal interna sobre el núcleo (Spungin y col., 1992; Glander y Hausten, 1987). La parte posterior del acrosoma, llamada segmento ecuatorial y la región postacrosomal, quedan intactas después de la reacción acrosomal (Fawcett, 1975)(Fig 2). Funcionalmente estas regiones son importantes, porque son consideradas como los sitios principalmente reconocidos por la membrana plasmática del óvulo para llevar a cabo la fertilización (Glander y Hausten, 1987).

Significado funcional de la reacción acrosomal

La reacción acrosomal tiene dos funciones principales: 1) ayudar al espermatozoide a pasar a través de las envolturas del óvulo, mediante la liberación de enzimas hidrolíticas y 2) reorganizar la membrana plasmática a nivel de la región ecuatorial, permitiendo la exposición de sitios receptores que reconocen a la membrana plasmática del óvulo, para fusionarse con ella (Yanagimachi, 1988; Talartzis y col., 1993).

Inductores de la reacción acrosomal

Se considera que el ámpula del oviducto es el sitio donde se lleva a cabo la fertilización y además el sitio principal donde el espermatozoide sufre la RA. Entre los inductores naturales de la RA se encuentran el fluido folicular y el cummulus oophorus

FALLA DE ORIGEN

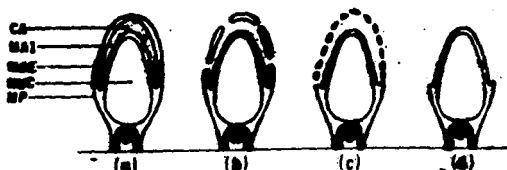


Figura 2. Cabeza del espermatozoide mostrando los diferentes pasos de la reacción acrosomal. Cápsula acrosomal (CA), membrana acrosomal interna (MAI), membrana acrosomal externa (MAE), núcleo (NUC) y membrana plasmática (MP), a) cabeza del espermatozoide intacto, b) fusión de la MAE y la MP en diferentes puntos, e inicio de la dispersión del contenido acrosomal, c) formación de las vesículas mixtas y la total dispersión del contenido acrosomal, d) cabeza del espermatozoide después de la RA, parte de la MAE perteneciente al segmento ecuatorial permanece después de la RA (tomado de Fawcett, 1975).

que induce la RA in vitro, en los espermatozoides de varias especies (Lui y Meizel, 1977; Suarez y col., 1985; Sidhu y Guaraya, 1988; Siiteri y col., 1988).

Al parecer son los glicosaminoglicanos (GAG) presentes en el cummulus los que estimulan la RA en espermatozoides (Lenz y col., 1983; Peterson y col., 1978). También, la heparina y el condroitín sulfato, componentes del cummulus son efectivos para inducir la RA (Delgado y col., 1976); para la heparina existe un receptor espermático sobre la membrana plasmática del espermatozoide y la unión es dependiente de Ca^{2+} , pH y temperatura. El mecanismo de acción propuesto, para los glicosaminoglicanos en la RA es el de la estimulación de las enzimas de la superficie espermática requeridas para la RA (Peterson y col., 1978; Lenz y col., 1983).

Por otra parte, de la zona pelúcida se purificó una proteína de 80 kDa denominada ZP3; ésta es una glicoproteína de matriz que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento (Bleil y Wassarman, 1980, 1986 y 1988). ZP3 juega un papel muy importante durante la fertilización, ya que ha sido reconocida como un inductor de la RA, de los espermatozoides del ratón (Bleil y Wassarman, 1980).

Mecanismos de la exocitosis y de la reacción acrosomal

La exocitosis es un proceso de secreción, en el cual el contenido de los gránulos secretorios es liberado. Durante el proceso, la membrana del gránulo se fusiona con la membrana plasmática, seguida por la descarga del contenido granular hacia el espacio extracelular (Zaks y Creutz, 1990). La exocitosis ocurre en una variedad de tipos celulares, que incluye desde organismos primitivos como los protozoarios, hasta células altamente diferenciadas como son las células endocrinas y las neuronas (Sontag, y col.,

1991).

El mecanismo de la exocitosis ha sido muy bien definido y comienza con la síntesis de las proteínas de secreción en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) (Butcher, 1978). Las proteínas entran al lumen del retículo endoplásmico y son transportadas hacia el aparato de Golgi por derivaciones del RE (Kelly, 1985).

En el aparato de Golgi las proteínas son modificadas, concentradas y empaquetadas dentro de vesículas membranales, y liberadas como brotes del complejo de Golgi, quedando listas para sufrir exocitosis (Pollard y col., 1985). La vía básica de secreción es similar en muchos tipos celulares. Sin embargo, puede variar en distintas etapas específicas. Es por ello, que la secreción se ha definido como de dos tipos: una llamada secreción constitutiva y otra regulada (Kelly, 1985).

La secreción constitutiva se caracteriza por que no necesita de un estímulo extracelular para que ocurra y porque se da sin la intervención de etapas, como el empaquetamiento o almacenamiento del material de secreción, además de que el transporte ocurre en un periodo corto. En contraste en la secreción regulada, las células secretoras (de glándulas exocrinas y endocrinas) requieren de un inductor externo, por ejemplo una hormona o un neurotransmisor, para liberar su contenido en un periodo breve. Las células que tienen secreción regulada presentan vesículas, cuya cubierta es característicamente electrodensa y en su interior almacenan el material de secreción. Una vez llevada a cabo la secreción, estas células sintetizan y almacenan nuevamente productos secretorios en vesículas, cuya vida media es larga (de varios días) (Kelly, 1985).

La secreción ocurre solamente cuando el nivel de uno o varios segundos mensajeros intracelulares es alterado; por ejemplo, un incremento del calcio libre

intracitoplásmico, el cual es considerado como la principal señal para que se lleve a cabo la exocitosis. Se ha visto que la exocitosis puede ser directamente activada en células permeabilizadas mediante un incremento de calcio intracelular; sin embargo otros factores, tales como la proteína cinasa C y la liberación de ácido araquidónico pueden también activarla (Burgoyne y col., 1991; Burgoyne y Morgan, 1992).

Durante la exocitosis regulada hay una serie de eventos mediados por la presencia de transductores como la proteína G y canales de calcio. La proteína G participa en las señales transmembranales que se llevan a cabo en la superficie de la membrana, esto a través del sistema agonista/receptor-proteína G la cual activa a un efector ya sea enzima o canal (Linder y col. 1992). La fase inicial del proceso (señal extracelular) hace que el receptor esté listo para desorganizar a la membrana, esto es a través de la activación de la fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol (IP) contenido en la membrana plasmática a dos productos menores: el inositoltrifosfato (InP3) y diacilglicerol (DAG) en cantidades equimolares, incrementándose así la concentración de estas dos moléculas, las cuales en turno activan dos ramas de esta vía, el metabolismo del inositoltrifosfato y el del 1,2 DAG (Mate y Rodger, 1993). Estos componentes actúan como segundos mensajeros; por un lado el IP3 puede ser fosforilado por una cinasa específica y convertirlo en IP4, el cual es biológicamente activo o puede ser desfosforilado a IP2 (1,4 bifosfato), que no es biológicamente activo. Por otro lado el IP3 libera exclusivamente calcio secuestrado en reservorios intracelulares; como resultado de lo anterior, se produce un incremento del catión en el citoplasma, el cual se une a proteínas citosólicas, principalmente a calmodulina formando así el complejo calcio-calmodulina, que activa a proteínas cinasas para llevar a cabo la fosforilación

de otras proteínas. La fosforilación puede iniciar una respuesta celular, como es el caso de la secreción de aldosterona (Rasmussen, 1989).

En el caso del DAG, éste activa a la proteína cinasa C (PKC), y ser fosforilado y convertirse a ácido fosfatídico, que es un importante intermediario en la síntesis de fosfatidilinositol difosfato; o puede ser desacidado por una lipasa, la cual libera a su vez ácido araquidónico, que es un precursor de eicosanoides (agentes altamente fusogénicos). Por otro lado se ha sugerido que en ausencia de PKC la función del DAG en la exocitosis acrosomal en los espermatozoides (Harrison y Roldan, 1990; Roldan y Harrison, 1990a; Roldan y Mollinedo, 1991), es 1) la de provocar la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que a su vez hidroliza los fosfátidos contenidos en la membrana, y 2) la liberación de agentes fusogénicos como son los lisofosfolípidos y el ácido araquidónico, que son altamente fusogénicos, e iniciar la fusión de las membranas durante la exocitosis (Burgoyne y col., 1991).

Como resultado de la cascada señalada de eventos, se lleva a cabo la fusión de las membranas; sin embargo se ha considerado indispensable, que previamente ocurra la desorganización (ruptura) de filamentos de actina que forman parte de una red subcortical para permitir la fusión de las membranas (Burgoyne y Cheek, 1987), este paso pudiera estar regulado por otros factores como una proteína denominada escindérina (Viale y col., 1991) y el AMPc (Perin y col., 1992).

En la RA, los mecanismos por los cuales se da el incremento de calcio en el citosol no son aún bien conocidos. Se manejan dos teorías: 1) que la entrada del catión a través de la membrana es la consecuencia de un cambio en la relación colesterol/lisofosfolípidos. Debido a la pérdida de colesterol, cambio que sí ocurre durante la

capacitación del espermatozoide, se produce una mayor permeabilidad de la membrana al calcio (Yanagimachi, 1988; Florman y col. 1989) y 2) actualmente, se sugiere la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana del espermatozoide, que pudieran ser activados por la proteína ZP3 (Florman y col., 1992).

Durante el proceso de la RA, en los espermatozoides se han encontrado tres segundos mensajeros: InP_3 , AMPc y DAG (Tash y Means, 1983; Roldan y Harrison, 1988; Harrison y col., 1990). Sólo para el DAG se ha sugerido función, la de activar a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Harrison y Roldan, 1990; Roldan y Harrison, 1990a; Roldan y Mollinedo, 1991). Otro factor relacionado con la exocitosis es la proteína cinasa C (PKC), aunque su presencia en los espermatozoides de los mamíferos no es clara, ya que la enzima sólo ha sido encontrada en espermatozoides del ser humano y del camero (Rotem y col., 1990), pero no en el de otras especies (hámster y cerdo) (Roldan y Harrison, 1988, 1990a). Así mismo, el análisis de la actividad de PKC, ha mostrado que es muy baja en los espermatozoides de las especies que la presentan. A pesar de esto, la enzima ha sido relacionada con los procesos de RA y la motilidad flagelar, en los espermatozoides de los seres humanos (Rotem y col., 1990), donde la PKC ha sido localizada en ambas regiones, en la región acrosomal y en la flagelar, y en los espermatozoides de los bovinos, donde ha sido localizada sólo en las regiones acrosomal y postacrosomal (Breitbart y col., 1992). Además el hecho de que activadores de la PKC, como los ésteres de forbol y el DAG, incrementen el inicio de la reacción acrosomal, apoya la participación de la PKC en ambos procesos (Lee y col., 1987).

Entre las proteínas que modulan las acciones del calcio y que han sido relacionadas con la exocitosis regulada, se encuentran la calmodulina (CaM)

(Kopeikina-Tsiboukidou y Deliconstantinos, 1989; Hernández y col., 1994) y las anexinas (Zaks y Creutz, 1990). La función sugerida para estas últimas proteínas es su participación en la agregación y fusión de las membranas (Creutz, 1992; Lydan y O'Day, 1993).

Anexinas

Las anexinas son un grupo de 13 proteínas (tabla 1) con una estructura altamente conservada, poseen 4 a 8 dominios altamente conservados (8 en el caso de la anexina VI) (Fig. 3), y poseen de 60 a 80 aminoácidos repetidos esenciales para la unión de la proteína a los fosfolípidos aniónicos de manera dependiente de Ca^{2+} (Geisow y Walker, 1986). Sus pesos moleculares varían entre los 30 y 70 kDa (Kuijpers, y col., 1992), y su característica común es la de poseer la habilidad de asociarse de manera reversible, a los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana celular, dependiendo de 2 factores principalmente: 1) de la concentración de calcio libre intracelular y 2) de la composición fosfolipídica de la membrana (Pollard y col., 1987; Papahadjopoulos y col., 1990).

La primer anexina descubierta fue la sinexina (anexina VII) por Creutz y col. (1978), quienes la observaron en las células cromafines de la médula adrenal. Esta anexina promueve la agregación y fusión "in vitro" de los gránulos secretorios de las células cromafines, y los eventos parecen ser similares a los que ocurren durante el proceso de secreción normal (Zaks y Creutz, 1990). Los miembros de la familia de la anexinas poseen una estructura formada por 2 regiones esenciales: un tallo con sitios de fosforilación y un núcleo que contiene los sitios de unión al calcio, fosfolípidos y

elementos del citoesqueleto (Glenney, 1985 y 1986; Johnsson, 1986).

Las anexinas se encuentran ampliamente distribuidas, y han sido aisladas de varios tejidos y tipos celulares de varias especies animales. Se han aislado de la médula adrenal, cerebro, hígado, células epiteliales intestinales, células epiteliales de la glándula mamaria, aorta, músculo esquelético, corazón, linfocitos, neutrófilos, placenta, bazo, pulmón, paratiroides y testículos (Zaks y Creutz, 1990). Para este grupo de proteínas se ha propuesto que desempeñan un papel muy importante en una variedad de procesos celulares tales como: el crecimiento celular, acción antiinflamatoria, organización de los dominios lipídicos y del citoesqueleto y en la regulación de la exocitosis (Zaks y Creutz, 1990; Creutz, 1992).

Se ha observado que algunas anexinas se encuentran localizadas en el citoplasma de la célula así como en la membrana plasmática y algunas veces asociadas al citoesqueleto (Geisow y Walker, 1986; Gerke y Weber, 1984; Edwards y Booth, 1987 y Glenney y col., 1987). Por su localización en la célula y su capacidad de unir calcio se ha sugerido que las anexinas pueden estar involucradas en la regulación del tráfico de membrana durante la endo y la exocitosis en interacción con los componentes del citoesqueleto (Gerke y Weber, 1984; Geisow y Walker, 1986; Fava y Cohen, 1984; Drust y Creutz, 1988 y Nakata y Hirokawa, 1990). Aunque la presencia de la anexina VII y otras anexinas es relevante en fracciones celulares, o en la vecindad del aparato secretorio, ésto sólo nos provee una evidencia circunstancial de su posible participación en la exocitosis, proceso dependiente de calcio.

Se han realizado algunos estudios con liposomas y se ha observado que por ejemplo la calpactina I es hábil para agregar los fosfolípidos contenidos en los liposomas

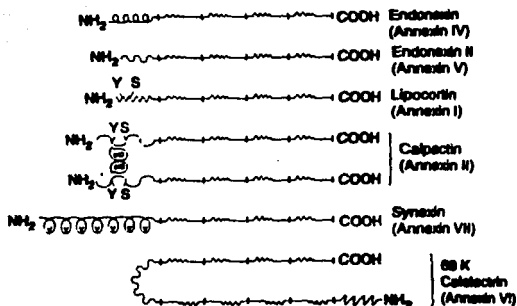


Figura 3. Estructura primaria de 6 anexinas. La estructura de las anexinas está caracterizada por la presencia de 4 a 8 dominios altamente conservados representados por las líneas onduladas. La estructura cercana al amino terminal (NH₂) es única. La Y (tirosina) y la S (serina) representan los sitios de fosforilación en el tallo de la calpactina y la lipocortina. La calpactina (anexina II) es un tetrámero que muestra la asociación de la región amino terminal de la cadena pesada con la cadena ligera (dímero p10) (tomado de Creutz, 1992).

de manera dependiente de calcio. Estudios recientes comprueban que el complejo calpactina I (complejo que contiene dos cadenas pesadas de 36 KDa y dos cadenas ligeras de 11 KDa (Erikson y col., 1984; Gerke y Weber, 1984; Glenney y Tack, 1985) puede promover la fusión de los gránulos secretorios entre sí, a concentraciones micromolares de calcio, en presencia de ácido araquidónico (Drust y Creutz, 1988).

Anexinas en espermatozoides

Son pocos los estudios que se han realizado en relación a la presencia y localización de las anexinas en los espermatozoides. En estos estudios se mostró que las espermátidas del carnero poseen tres tipos de anexinas: las denominadas tipo I, II y VI (Feinberg y col. 1991). En los espermatozoides maduros de hámster, del ser humano y del carnero también se observó la presencia de las tres anexinas antes mencionadas (Moore y Dedman, 1982; Bernuti, 1988; Feinberg y col., 1991), los cuales fueron localizadas en las regiones postacrosomal y flagelar, mientras que en el espermatozoide del bovino se han encontrado sólo dos anexinas: una de 3.5 kDa (conocida como calelectrina de 32.5 kDa) que fue localizada en la región acrosomal y una anexina de 67 kDa (anexina VI o calelectrina de 67 kDa), que fue localizada tanto en la región acrosomal como en la flagelar. Los autores antes mencionados sugirieron la posible participación de estas proteínas en procesos tales como la motilidad flagelar, la fertilización y la RA, todos ellos procesos dependientes de calcio. Sin embargo, por su localización celular, sólo en los espermatozoides del bovino podrían estas anexinas estar relacionadas con el proceso de la RA.

TABLA 1. NOMENCLATURA DE LAS ANEXINAS

<i>Anexina</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Localización</i>
<i>Anexina I</i>	<i>Lipocortina</i>	<i>Citosol (Zaks y Creutz, 1990)</i>
<i>Anexina II</i>	<i>Calpactina</i>	<i>Suble, asociada a la MP y a los gránulos cromafines (Zaks y Creutz, 1990).</i>
<i>Anexina III</i>	<i>Lipocortina III</i>	<i>Citosol (Crompton y Dedman, 1990).</i>
<i>Anexina IV</i>	<i>32.5 kDa Calclectrina</i>	<i>RE, en fibroblastos y en la región cromosomal de espermatozoides (Südho, 1984).</i>
<i>Anexina V</i>	<i>Endoanexina II</i>	<i>Citosol (Zaks y Creutz, 1990).</i>
<i>Anexina VI</i>	<i>67-kDa Calclectrina</i>	<i>Difusas en la cara interna de la membrana plasmática de fibroblastos y linfocitos en el acrosoma y el flagelo, de espermatozoides del bovino (Südho, 1984) y solubles en el citosol.</i>
<i>Anexina VII</i>	<i>Sinexina</i>	<i>Células cromafines de la médula adrenal (Creutz y col. 1978)</i>
<i>Anexina VIII</i>	<i>VAC-β</i>	
<i>Anexina XI</i>	<i>p50</i>	<i>Núcleo de fibroblastos de embriones de rata (Mizutani y col. 1992).</i>
<i>Anexina XIII</i>		<i>Anexina específica de intestino, asociada a la MP de la células de las criptas (Wice y Gordon, 1992)</i>

Justificación

Cruz Trejo en 1994, mostró que el espermatozoide del cobayo posee dos proteínas semejantes a las anexinas y las denominó sp42 y sp66, ambas fueron detectadas en el extracto de proteínas totales de espermatozoides y en las vesículas de la reacción acrosomal (VRA). Sin embargo, por inmunofluorescencia en espermatozoides recién obtenidos y en los capacitados se detectó a sp42 específicamente en la región apical del acrosoma, mientras que la proteína de 66 kDa no pudo ser detectada en la célula. Por su localización, se sugirió que sp42 podría estar relacionada con la RA, lo que se vio apoyado por los cambios que ocurrieron en la localización de la proteína, de la parte apical del acrosoma a todo el organelo (acrosoma), poco antes de la RA; además, por el hecho de que sp42 fue liberada durante la RA en las vesículas correspondientes.

Con base en los trabajos realizados en varios tipos celulares, en los que se muestra la participación de las anexinas en el proceso de exocitosis, consideramos que por su localización ambas proteínas sp42 y sp66 (posibles anexinas) de los espermatozoides del cobayo, podrían estar participando durante la RA. Por lo anteriormente señalado, este trabajo fue enfocado hacia la caracterización de ambas proteínas, específicamente a investigar si éstas presentan características que las pudieran catalogar como anexinas y su posible relación con la RA.

HIPOTESIS

Si las proteínas sp42 y sp66 tienen características similares a las anexinas, por su localización en la región del acrosoma, consideramos que podrían estar jugando un papel muy importante en la regulación del proceso de la reacción acrosomal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las proteínas del espermatozoide (sp42 kDa y sp66 kDa) y la p31/33 kDa del testículo del cobayo tienen la capacidad de unirse a biomembranas de manera dependiente de calcio, la característica principal de las anexinas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A) Purificación de la proteína tipo anexina p31/33 kDa del testículo del cobayo.*
- B) Inmunodetección de las proteínas (sp42 y sp66) en espermatozoides desmembrados.*
- C) Determinación de la capacidad de unión de las proteínas, p31/33 testicular, sp42 y sp66 espermática, a biomembranas.*
- D) Caracterización de las proteínas p31/33, sp42 y sp66, mediante anticuerpos monoclonales comerciales contra las anexinas I, II, IV y VI.*

MATERIAL Y METODOS

Purificación de anaxinas.

La purificación de las proteínas p31/33, p42 y p66 se hizo a partir de los testículos del cobayo, como lo describen Bandorowicz y colaboradores (1992) para hígado de cerdo. Los testículos (100 g) fueron homogeneizados en 200 ml de solución A (ver apéndice) en frío (4°C), adicionada de dos diferentes mezclas de inhibidores de proteasas. Primeramente con la mezcla I el los testículos fueron homogeneizados, posteriormente este homogenado fue filtrado y centrifugado dos veces consecutivas, primero a 15,000 x g por 15 minutos e inmediatamente después, el sobrenadante a 39,000 x g por 30 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación fue recuperado y suplementado con CaCl₂ 6.5 mM e incubado a 0°C, durante 30 minutos. Las proteínas precipitadas por el calcio fueron recuperadas por centrifugación a 39,000 x g por 30 minutos. La pastilla fue resuspendida en la solución A en la que el EGTA fue reemplazado por 1 mM de CaCl₂, la suspensión se centrifugó a 30,000 x g por 60 minutos y se desechó el residuo. Inmediatamente después el sobrenadante fue dializado contra el amortiguador A (ver apéndice).

La purificación de las anaxinas se realizó por medio de una cromatografía de intercambio iónico en una columna que contenía resina mono Q; la columna fue equilibrada con el amortiguador B. Se tomaron 10 ml de muestra y se pasaron por la columna. Las proteínas unidas a mono Q fueron eluidas con un gradiente discontinuo de NaCl (100 a 500 mM) y fueron posteriormente analizadas por SDS-PAGE (10%).

Electroforesis.

Para determinar la pureza de las anexinas y los patrones proteicos de las diferentes fracciones a usar, se realizaron geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% aplicando la muestra en condiciones reductoras y siguiendo la técnica de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con plata, siguiendo el método de Morrissey (1981).

Inmunodetección de anexinas (Western blot).

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (MNC) como lo describe Towbin (1979). Las tiras de MNC, fueron previamente bloqueadas durante 1h a 37°C con la solución bloqueadora. Después del bloqueo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 h, con los anticuerpos anti-anexina diluidos en la solución de bloqueo. Para ser usados, el anticuerpo policlonal anti-p31/33 se diluyó en una proporción 1:200 y los anticuerpos monoclonales contra las anexinas I, II, IV y VI en una proporción 1:5000. El anticuerpo fue detectado a su vez, con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, (IgG de chivo anti-IgG de conejo o IgG de conejo anti-IgG de ratón, respectivamente). Los segundos anticuerpos fueron diluidos en la solución de bloqueo (1:10,000), e incubados con las muestras por 1 hr a 37°C. La reacción de los anticuerpos fue revelada adicionando el sustrato (diaminobenzamidina) para la peroxidasa, siguiendo el método de De Blass y Cherwinski (1983).

Obtención de espermatozoides.

Los gametos se colectaron por perfusión de los conductos deferentes de cobayos

adultos, aplicando una solución de NaCl 0.154 M, e inmediatamente las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación-resuspensión (500 x g por 4 minutos), en la solución de NaCl. La concentración de espermatozoides fue cuantificada en una cámara de Neubauer.

Purificación de espermatozoides.

La purificación de espermatozoides se hizo en un gradiente de Percoll del 15 al 100% (Moreno Fierros y col., 1992). Inicialmente se preparó una solución stock de Percoll (ver métodos) y después sobre el gradiente se le adicionó la suspensión (1 ml) de espermatozoides en NaCl (200-250 x 10⁶ cel/ml), el gradiente se centrifugó a 5,000 x g a 4°C durante 30 minutos. Una vez centrifugados, se recuperó el anillo formado entre la interfase de 75 y 100% el cual contenía a los espermatozoides puros. El exceso de Percoll fue eliminado lavando a los espermatozoides 3 veces en NaCl 0.154 M, por centrifugación-resuspensión.

Obtención de membrana plasmática total de espermatozoides del cuyo.

Para la obtención de la membrana plasmática se siguió el método descrito por Stojanoff y col. (1988). Los espermatozoides previamente purificados por Percoll y lavados, se resuspendieron en el medio A, en el mismo medio se agregó la mezcla I de inhibidores. La suspensión celular fue ajustada a 20 millones de espermatozoides por ml, homogeneizada en un homogeneizador Teckmar, 30 segundos a baja velocidad (800 load/min) y 15 segundos a mayor velocidad 9500 load/min). Enseguida la suspensión fue centrifugada a 2000 x g por 30 min a 4°C, para colectar a los espermatozoides

desmembrados.

El sobrenadante se dividió en dos partes: La primera fue ultracentrifugada a 100,000 x g por 2 horas y se obtuvo el sobrenadante o la fracción soluble. La pastilla (membranas) obtenida fue lavada con amortiguador C, solubilizada con SDS al 1% y separada en PAGE-SDS. La segunda fracción inicial (membranas en suspensión) se mantuvo a 4°C para posteriores ensayos de unión de p42 a la membrana del espermatozoide.

Obtención de membrana plasmática de la región acrosomal (MPRA) de espermatozoides del cobayo.

La obtención de la membrana plasmática de la región acrosomal se realizó siguiendo el método descrito por Stojanoff y col. (1988), el cual fue muy semejante al anteriormente descrito para la membrana total, la modificación consiste en que en lugar de utilizar medio A se utilizó el medio AH. En este caso, los espermatozoides sin membrana plasmática de la región acrosomal fueron colectados por centrifugación a 2,000 x g por 30 minutos y fijados para análisis inmunocitoquímico con los anticuerpos anti-p31/33 y anti p66. Mientras que las membranas fueron colectadas por ultracentrifugación (100,000 x g, por 2 hrs), lavadas dos veces con amortiguador C y solubilizadas con SDS al 1% (concentración final) y analizadas por Western blot.

Obtención de membranas de eritrocitos.

Las membranas de eritrocitos fueron obtenidas siguiendo el método de Vann

Bennes (1984). Se colectó sangre fresca de seres humanos en la solución B y se le adicionó amortiguador de sedimentación y se le dejó incubando por 1 h a 4°C. La sangre fue centrifugada a 20,000 x g por 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se procedió a extraer de las células la hemoglobina mediante un tratamiento hipotónico. Para ello, a los eritrocitos se les adicionaron 10 volúmenes de amortiguador de lisis frío ver apéndice. Se realizaron varios lavados con este amortiguador hasta que se eliminó por completo la hemoglobina. Una vez que las células ya no contenían hemoglobina fueron inmediatamente centrifugadas a 37,000 x g por 10 min a 2°C. Las membranas de eritrocitos se utilizaron para hacer el ensayo de unión a biomembranas, de las proteínas tipo anexinas obtenidas del testículo (p31/33 y p50).

Unión de las proteínas testiculares, tipo anexinas, a membranas de eritrocitos.

Este ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Bandorowicz y col. (1992). A fantasmas de eritrocitos recién obtenidos (130 µg) y previamente lavados en el amortiguador B, se les incubó con 10 µg de las proteínas (puras) p31/33 y p50 en amortiguador D, por 20 minutos a temperatura ambiente en presencia de 0.5 mM de CaCl₂ o de 2 mM de EGTA (ausencia de calcio). En seguida fueron lavados por centrifugación a 10,000 x g por 10 min, tres veces en el mismo amortiguador. La proteína unida a los fantasmas fue eluida incubándolos por 30 min en amortiguador E. Los fantasmas fueron retirados por centrifugación (10,000 x g por 10 min) y los sobrenadantes obtenidos fueron analizados por SDS-PAGE.

Unión de proteínas espermáticas de la fracción soluble, a membrana plasmática de espermatozoides del cobayo.

En este caso se usó la suspensión de membranas totales, que se obtuvieron por el método descrito por Stojanoff y col. (1988) utilizando el medio A de homogeneización. A una parte de la suspensión de membranas se les adicionó 1.5 mM de CaCl_2 y la otra parte fue mantenida con el EDTA 1 mM presente en el medio. Ambas muestras fueron incubadas a 4°C por 1 h, después de lo cual fueron centrifugadas a $100,000 \times g$ por 2 hrs. La pastilla fue lavada 3 veces con amortiguador C y las membranas fueron solubilizadas en SDS al 1% (concentración final). Las proteínas de la membrana fueron corridas por PAGE-SDS y analizadas por Western blot.

RESULTADOS

Proteínas tipo anexinas obtenidas de testículo del cobayo.

En presencia de dos diferentes mezclas de inhibidores de proteasas (ver métodos), se obtuvieron proteínas del testículo del cobayo, de acuerdo con el método descrito por Bandorowicz y col. (1992), para la purificación de anexinas. De la cromatografía de intercambio iónico (mono Q), cuando se usó la mezcla I de inhibidores de proteasas se eluyó (con la solución de NaCl 200 mM) de la columna un doblete de proteínas, con pesos moleculares de 31 y 33 kDa (Fig. 4C), respectivamente. Cuando la mezcla II de inhibidores de proteasas estuvo presente durante la purificación, se eluyó de la columna (mono Q) una proteína de peso molecular de 50 kDa (Fig. 4D), al utilizar una solución de NaCl 500 mM. La pureza del doblete y de la proteína de 50 kDa fue muy alta como se observa en la electroforesis (Fig. 4 C y D, respectivamente), donde no se reveló ninguna otra proteína, a pesar de que el método de tinción con plata utilizado es altamente sensible (detecta hasta 1 ng de proteína).

A partir de 100 g de tejido inicial se obtuvieron: 1 mg de la proteína 31/33 y 0.5 mg de p50.

Identificación de proteínas inmunoreactivas, en los extractos de testículo y de espermatozoides, al anticuerpo anti-p31/33

Las proteínas de los extractos de testículos del cobayo fueron separadas por PAGE-SDS y transferidas a MNC, donde se analizaron mediante el anticuerpo anti-p31/33. En el patrón proteico del extracto obtenido en presencia de la mezcla I de inhibidores de proteasas, el anticuerpo anti-p31/33 reconoció exclusivamente a un doblete

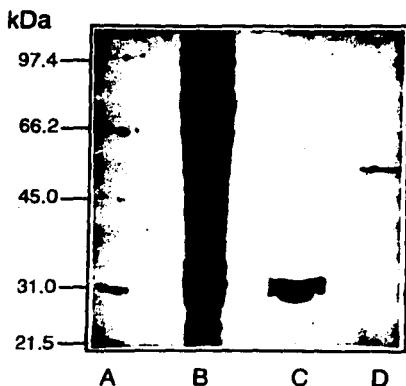


Figura 4. Proteínas tipo anexinas purificadas de testículo del cobayo. Los eluatos de la cromatografía en mono Q fueron analizados en geles de PAGE-SDS de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970). El resultado típico observado en los experimentos es mostrado. A: Estándares de peso molecular, B: Proteínas del tejido testicular (del sobrenadante de 39,000 x g; Bandorowicz y col. 1992), C: Doblete proteico Mrs 31/33 kDa en el eluato de mono Q. El homogeneizado fue preparado con la mezcla I de inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, PHMB 2mM, p-AB 2mM y benzamidina 2mM), D: Proteína de Mr 50 kDa en el eluato de mono Q. El homogeneizado fue preparado con la mezcla II de inhibidores de proteasas (los cuatro inhibidores mencionados arriba más pepstatina 1 μ M, aproptinina 1 μ M y leupeptina 1 μ M). Las proteínas fueron reveladas por el sistema de tinción con plata de Morrissey (1981).

de 31/33 kDa (Fig. 5C). Mientras que cuando se usó la mezcla II de inhibidores durante la homogeneización del tejido, en el patrón proteico del extracto, el anticuerpo anti-p31/33 reconoció solamente a una proteína de 50 kDa (Fig. 5E). Además, cuando el anticuerpo anti-p31/33 fue preadsorbido con un exceso (5 veces) de proteína p50, no dio reacción con el doblete p31/33 (Fig. 5G).

Previamente había sido comunicada la presencia de dos proteínas (66 kDa y 42 kDa) tipo anexinas en el espermatozoide del cobayo (Cruz, 1994). Por inmunoblot, la de peso de 66 kDa fue reconocida por Cruz, utilizando un anticuerpo producido contra una proteína testicular de 66 kDa, obtenida por el método de Mathew y col. (1986), para la purificación de anexinas. Sin embargo, la localización en el espermatozoide de la proteína de 66 kDa no había sido posible, aunque se contaba en el laboratorio con este anticuerpo. Por otra parte, la proteína de 42 kDa, había sido reconocida por el anticuerpo contra el doblete proteico p31/33 (obtenido del testículo) e identificada su localización en el espermatozoide, en la región apical del acrosoma. Adicionalmente, en el trabajo de Cruz (1994) se había mostrado que tanto p66 como p42 eran liberadas en las vesículas de reacción acrosomal (VRA).

Nosotros quisimos identificar específicamente, si estas proteínas estaban asociadas a la membrana plasmática de la región acrosomal y/o a la membrana acrosomal externa o si se encontraban solubles en la fracción comprendida entre ambas membranas. Para responder a estas preguntas se trabajó con espermatozoides carentes de membrana plasmática de la región acrosomal, que se obtuvieron por el método descrito por Stojanoff y col. (1988). Por inmunofluorescencia indirecta (IFI), el anticuerpo anti-p66 dio reacción positiva en los espermatozoides resuspendidos en el medio AH antes de

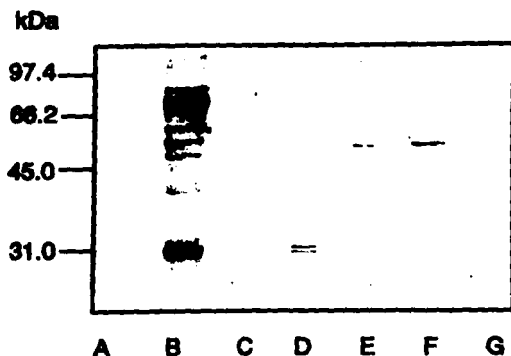


Figura 5. Proteínas inmunoreactivas de testículo del cobayo al anticuerpo anti-p31/33. Los sobrenadantes de 39,000 x g (Bandorowicz y col. 1992) de los homogeneizados del testículo obtenidos en presencia de las mezclas I y II de los inhibidores de proteasas (Fig.3) fueron resueltos en PAGE-SDS (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron transferidas a MNC (Towbin y col. 1979). A: Estándares de peso molecular, B: Patrón proteico del homogeneizado testicular. A y B fueron teñidos con 0.1 % (p/v) de negro amido en ácido acético al 10%. De C a G representan los inmunoblots revelados con el anticuerpo anti-p31/33, C: Proteínas del tejido testicular (homogeneizado preparado con la mezcla I de inhibidores de proteasas), D: La proteína p31/33 pura obtenida del testículo, E: Proteínas del tejido testicular (homogenado preparado con la mezcla II de inhibidores de proteasas), F: Proteína p50 purificada de testículo y G: Proteína p31/33 pura revelada con anti-p31/33 preadsorbido con un exceso (5 veces) de proteína pura.

haber sido homogenizados para retirarles la membrana, es decir, en los espermatozoides control. La marca fluorescente se observó en la región apical del acrosoma, así como una fluorescencia pálida en el flagelo (Fig. 6b). Sin embargo, cuando se eliminó a la membrana plasmática de la región acrosomal por homogenización, ninguna marca fluorescente pudo observarse en los espermatozoides (Fig. 6d), usando el mismo anticuerpo. No se hizo microscopía electrónica de la muestra.

Determinación de la presencia y de la habilidad de asociación de sp42 a la membrana acrosomal externa del espermatozoide del cobayo

Aquí se planteó el conocer, si sp42 (que es reconocida por el anticuerpo anti-p31/33) se encontraba en la membrana plasmática o si era capaz de asociarse a la membrana plasmática y/o a la membrana acrosomal externa. Para saber si sp42 podía asociarse a la membrana acrosomal externa (MAE) se utilizó el modelo de espermatozoides desmembrados en el medio A, (Stojanoff, 1988). En estos espermatozoides desmembrados anti-p31/33 dio reacción negativa. Por otra parte, cuando los espermatozoides desmembrados fueron incubados con la fracción espermática soluble de 100,000 x g en presencia y en ausencia de Ca^{2+} , el anticuerpo anti-p31/33 dio reacción positiva sólo en el primer caso, en el cual fue observada marca fluorescente en la región apical del acrosoma (Fig. 7b), mientras que cuando se realizó la incubación en ausencia de Ca^{2+} ninguna marca fluorescente fue observada en los espermatozoides (Fig. 7d).

Para determinar si sp42 y sp66 estaban presentes en la membrana plasmática de la región acrosomal, se aisló específicamente la fracción de membrana plasmática

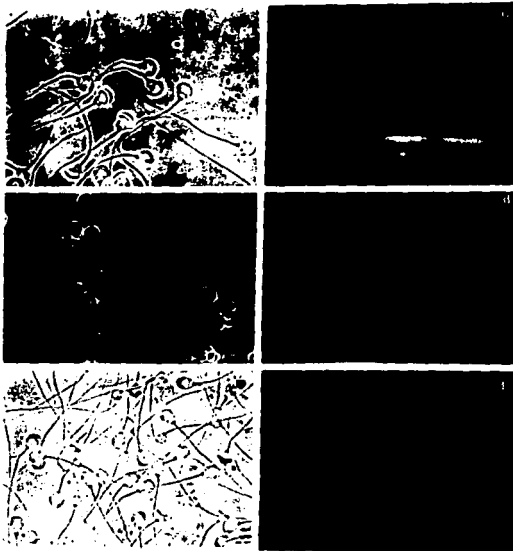


Figura 6. Localización de la proteína p66 en los espermatozoides sin membrana plasmática de la región acrosomal. Los espermatozoides fueron incubados en el medio AH y fijados antes y después de ser homogeneizados para retirarles la membrana plasmática por el método de Stojanoff y col. (1988). sp66 fue localizada por IFI usando el anticuerpo anti-p66 y una IgG anti-ratón marcada con fluoresceína. A, C y E imágenes de contraste de fases de B, D y F respectivamente. B. Inmunolocalización de p66 en espermatozoides tratados con el medio AH. Se observa fluorescencia en la región del acrosoma y fluorescencia pálida en el flagelo, D: Inmunolocalización de p66 en espermatozoides sin membrana plasmática. Los espermatozoides no muestran fluorescencia en ninguna región, y F: Imagen representativa de los controles negativos realizados ya sea en ausencia del primer anticuerpo o un anticuerpo inespecífico.

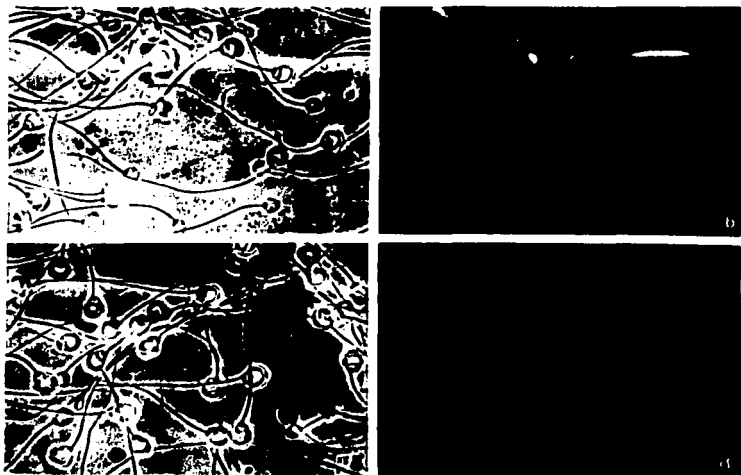


Figura 7. Detección de la proteína sp42 en espermatozoides carentes de membrana plasmática. Los espermatozoides fueron desmembrados por el método de Stojanoff y col. (1988) e incubados con el sobrenadante de 100,000 x g en presencia de Ca^{2+} (b) y en ausencia de Ca^{2+} (d). La mayor fluorescencia fue observada en la región del acrosoma y una muy ligeramente en el flagelo, en los espermatozoides después de la incubación del sobrenadante en presencia de Ca^{2+} . No se observa fluorescencia en espermatozoides incubados en ausencia de Ca^{2+} .

correspondiente a dicha región (Stojanoff, 1988). El medio en el que se suspendieron y homogeneizaron los espermatozoides contenía EDTA 1 mM y Hg. La inmunodetección con anti-p66 y anti-p31/33 (se muestra en la figura 8 C y D), respectivamente. En el patrón proteico de la membrana plasmática de la región acrosomal sólo se detectó la proteína de 66 kDa.

Valoración de la capacidad de unión de las proteínas testiculares p31/33 and p50, a biomembranas

La principal característica de las anexinas es su capacidad de unión a biomembranas de manera dependiente de calcio. Para caracterizar a las proteínas purificadas del testículo (p31/33 y p50) se ensayó su habilidad de unirse a las membranas de eritrocitos. Para ello, las proteínas se incubaron con los fantasmas de eritrocitos tanto en presencia como en ausencia de calcio. Ambas proteínas p50 y p31/33, se unieron a las membranas en presencia de calcio, ya que durante los lavados co-sedimentaron con las membranas. Además, ambas proteínas fueron separadas de las membranas al quelar el calcio con EGTA (Fig. 9 B y D, respectivamente). Cuando las proteínas fueron incubadas con los fantasmas en ausencia de calcio (EGTA 2 mM) no se unieron a las biomembranas, ya que no co-sedimentaron de ellas, y de las membranas, el tratamiento adicional con EGTA no extrajo a ninguna de ellas (Fig. 9 C y E, respectivamente).

FALLA DE ORIGEN

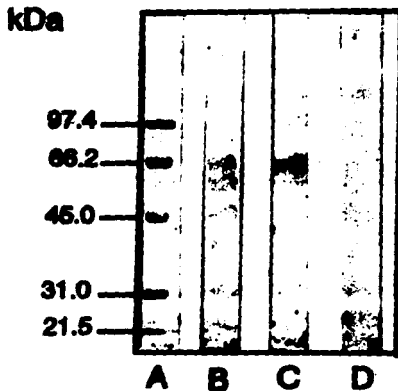


Figura 8. Detección de la proteína sp42 y sp66 en la membrana plasmática de la región acrosomal que fue retirada por método de Stojanoff y col. (1988). A: Estándares de peso molecular, B: Proteínas de la membrana plasmática de la región acrosomal (A y B fueron teñidas con negro amido, Fig. 4), C y D inmunoblots revelados con los anticuerpos anti-p66 y anti p31/33 respectivamente. Anti-p66 reveló una banda de 66 kDa y dos bandas de menor peso molecular. Anti-p31/33 no reveló ninguna banda.

FALLA DE ORIGEN

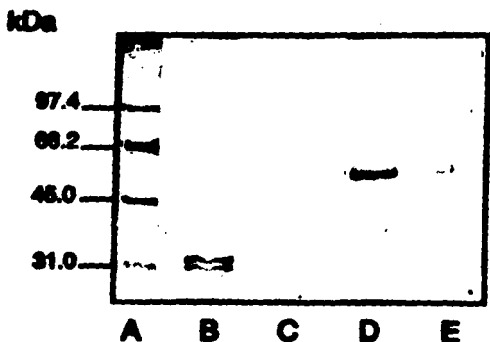


Figura 9. Unión de las proteínas p31/33 y p50 purificadas del testículo a fantasmas de eritrocitos (130 $\mu\text{g/ml}$). Estos fueron incubadas por 20 minutos con las proteínas testiculares puras p31/33 o p50 (10 μg de cada una) en presencia de Ca^{2+} 0.5 mM y lavadas exhaustivamente. Después de 20 minutos en EGTA, los fantasmas fueron centrifugados y los sobrenadantes analizados en PAGE-SDS. Las proteínas fueron reveladas por tinción con plata (Morrisey, 1981). A: Estándares de peso molecular, B y C: Proteínas separadas por el tratamiento con EGTA de las membranas de eritrocitos, incubadas con p31/33 en presencia y ausencia de Ca^{2+} respectivamente, D y E: Proteínas separadas por el tratamiento con EGTA de las membranas de eritrocitos previamente incubadas con p50 en presencia y ausencia de Ca^{2+} , respectivamente.

Valoración de la capacidad de unión de la proteína sp42 a la membrana plasmática del espermatozoide del cobayo

Para conocer si la proteína se unía a la membrana plasmática del espermatozoide del cobayo en presencia de calcio, la membrana plasmática de espermatozoides se incubó con la fracción espermática soluble (sobrenadante de 100,000 x g) tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} (EGTA 2 mM). En el patrón proteico de las membranas incubadas en presencia de calcio, el anticuerpo anti-p31/33 reveló por inmunoblot, la presencia de una proteína mayoritaria de 42 kDa y de dos proteínas más escasas, una de 50 kDa y un doblete de 31/33 kDa (Fig. 10 C). En las membranas incubadas en ausencia de calcio, por inmunoblot el anticuerpo anti-p31/33 no detectó ninguna proteína (Fig. 10 D), a pesar de que p42 estuvo presente en la fracción soluble (Fig. 10 E).

Inmunoreactividad de anticuerpos comerciales (preparados contra las anexinas I,II,IV y VI) a las proteínas p31/33, p50 y sp42

Para identificar si las proteínas estudiadas en este trabajo correspondían a alguna de las anexinas conocidas, se determinó su inmunoreactividad contra 4 anticuerpos monoclonales anti-anexinas (I, II, IV y VI), obtenidos de casas comerciales. Estos anticuerpos no reconocieron a ninguna de las tres proteínas puras (p31/33, p50 y sp42). Tampoco dieron reacción positiva con las proteínas de los extractos totales de testículo, entre las que se encuentran, p31/33 y p50. Tampoco la sp42 del extracto de espermatozoides fue reconocida por los monoclonales señalados.

Por otra parte, la proteína pura p66 si tuvo reacción cruzada con el monoclonal

contra la anexina VI; asimismo, fue reconocida por el anticuerpo policlonal preparado contra la proteína de 66 kDa del testículo, concordando con los datos de Cruz (1994). Además, ambos anticuerpos reconocieron en los patrones proteicos del extracto total del testículo y del espermatozoide a una proteína de 66 kDa (Fig. 11).

FALTA DE ORIGEN

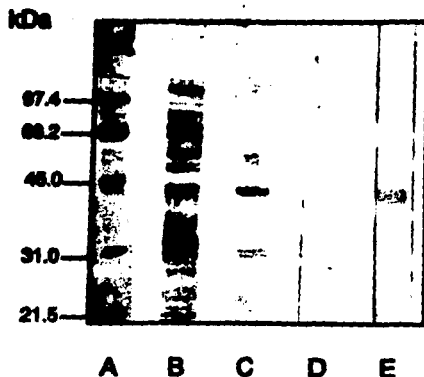


Figura 10. Unión de la proteína espermática sp42 a la membrana plasmática del espermatozoide. Los espermatozoides fueron homogeneizados en medio A (Stojanoff y col. 1988) y la muestra centrifugada (600 x g por 30 min). Al sobrenadante, conteniendo a las membranas plasmáticas y a las proteínas solubles, se le añadió Ca^{2+} (1 mM) o EGTA (2 mM) y se incubó 1 h a 4°C . Las membranas fueron precipitadas a 100,000 x g y solubilizadas en SDS, separadas por PAGE-SDS y transferidas a MNC. A: Estándares de peso molecular, B: proteína de la membrana plasmática, A y B fueron teñidos con negro amido, C, D y E son inmunoblots utilizando el anticuerpo anti-p31/33, C y D la membrana plasmática tratada con el sobrenadante de 100,000 x g en presencia y en ausencia de Ca^{2+} respectivamente y E: sobrenadante de (100,000 x g) de la suspensión de membranas incubadas sin Ca^{2+} .

FAJLA DE ORIGEN

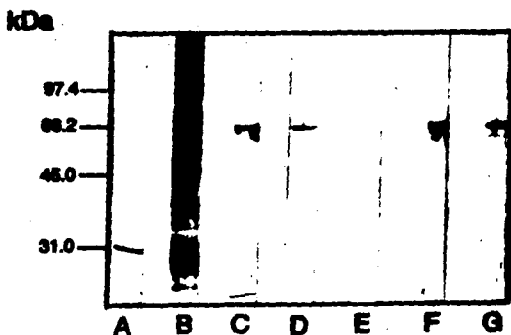


Figura 11. Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-anexina VI y del policlonal anti-p66 a la proteína testicular de 66 kDa y proteínas del espermatozoide. La proteína de 66 kDa purificada del testículo y el extracto total del espermatozoide del cobayo fueron corridas en PAGE-SDS y transferidas a MNC y reveladas con el anticuerpo monoclonal anti-anexina VI y el policlonal anti-p66. A: estándares de peso molecular, B: proteínas del espermatozoide, C: la proteína de 66 kDa pura. A, B y C fueron teñidos con negro amido; D, E, F y G son inmunoblots. D: proteína de 66 kDa revelada con el anticuerpo policlonal anti-p66, E: proteína de 66 kDa revelada con el anticuerpo monoclonal anti-anexina VI, F: Proteínas de espermatozoide revelada con el policlonal anti-p66 y G: proteínas del espermatozoide reveladas con el anticuerpo monoclonal anti-anexina VI.

DISCUSION

En este trabajo se purificaron dos proteínas de diferente peso molecular, un dolete de 31/33 kDa y una de 50 kDa apartir de los testículos del cobayo, siguyendo una metodología similar a la usada por Bandorowicz y col. (1992) y usando diferentes dos mezclas de inhibidores de proteasas (ver métodos). De esto se obtuvieron resultados nos permüen suponer que el dolete p31/33 sea un producto de la degradación de p50, lo anterior se ve apoyado por la fuerte reactividad de p50 al anticuerpo anti-p31/33. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Glenney (1986) y Glenney y col. (1987), quienes durante la purificación de anexina II (36 kDa) encontraron un producto de su degradación (33 kDa).

Para catalogar a las proteínas p31/33 y p50, purificadas del testículo, como posibles anexinas se valoró en ellas su capacidad de unirse a biomembranas de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} principal característica que presentan las anexinas (Creutz y Sterer, 1983; Scott y col., 1985; Glenney, 1986). Aunque las proteínas purificadas en este trabajo no mostraron reactividad cruzada contra los anticuerpos monoclonales anti-anexinas I, II, IV y VI, ensayados no se descarta la posibilidad de que se trate de anexinas, debido a que estas presentan características y comportamientos muy similares a los que presentan las anexinas cuando hay calcio en el medio. Recientemente una anexina de 50 kDa (anexina XI) fue purificada de los pulmones del bovino y ha sido detectada en varios tejidos, incluyendo al testículo (Mizutani y col., 1992), la proteína que fue purificada en el presente trabajo, podría corresponder a la anexina XI; por la similitud en cuanto a sus pesos moleculares (50 kDa).

Se ha señalado anteriormente que la proteína sp66 (presente entre las proteínas

espermáticas) no había podido ser localizada en la célula completa, por IFI (Trejo, 1994). Cuando los espermatozoides fueron incubados en medio AH (para retirarles la membrana plásmatica y antes de realizar este proceso), y se trataron con anti-sp66, el anticuerpo reconoció a la proteína, con una reacción positiva en el acrosoma y en el flagelo. Se ha considerado que la presencia de Hg^{2+} en el medio pudo alterar a las membranas, permitiendo que sp66 quedara expuesta a los anticuerpos. También se podría explicar lo anterior si consideramos, que el mercurio establece a la proteína en la membrana y evite la pérdida de ella, la cual podría ocurrir durante la permeabilización del espermatozoide por acetona. La detección de sp66 no puede considerarse como un artefacto provocado por la presencia del Hg^{2+} , ya que cuando se usaron controles con un anticuerpo inespecífico o sólo el segundo anticuerpo, no se observó marca de fluorescencia en los espermatozoides incubados en medio AH; estos resultados concuerdan con los descritos por Südhof (1984), quien mostró la presencia de la calelectrina de 67 kDa (anexina VI) en las regiones acrosomal y flagelar de espermatozoides del bovino.

La concierización de sp66 usando los modelos de espermatozoides sin membrana plasmática o sólo sin la membrana plasmática de la región acrosomal mostró que sp66 no sigue el patrón descrito para las anexinas; es decir, una unión a biomembranas de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} , ya que en presencia del agente quelante de Ca^{2+} (EDTA), sp66 no se separó de la membrana plasmática de la región acrosomal, como lo muestra el análisis de esta membrana por inmunodetección (ver Fig. 8). Sin embargo, no se puede descartar que sp66 sea una anexina, debido a que cruzó fuertemente con el anticuerpo monoclonal anti-anexina VI. Los resultados sugieren la

posibilidad de que sp66 sea una anexina que esta fuertemente asociada o que pueda estar más íntimamente asociada a la membrana plasmática que otro tipo de anexinas. Por otro lado, el hecho de que sp66 no fue encontrada en el espermatozoide sin membrana plasmática indica, que sp66 sólo se encuentra en la membrana plasmática de los espermatozoides del cobayo.

Los resultados mostraron que en ausencia de Ca^{2+} sp42 no está presente en la fracción soluble, del sobrenadante de 100,000 x g (Fig. 10 D) y que además no se asocia a la MP ni a la MAE del espermatozoide. Sin embargo, sp42 es capaz de asociarse tanto a ambas membranas de los espermatozoides en presencia de calcio (de manera reversible y dependiente de Ca^{2+}), como lo mostró la incubación tanto de MP de región acrosomal como de los espermatozoides sin MP con la fracción soluble lo que no sucedió cuando dicha incubación se realizó en ausencia de Ca^{2+} , (ver Fig. 10 C). Lo anterior sugiere que sp42 es una proteína citoplasmática que se encuentra entre la MP y la MAE, y que se asocia a ellas en presencia de Ca^{2+} . Las anteriores características sugieren que sp42 puede participar en la RA, asociándose a las membranas plasmática y a la acrosomal externa, cuando los niveles de Ca^{2+} se incrementan durante este proceso (Fraser y col., 1995).

Por otro lado, sp42 no fue la única proteína que se asoció a la MP en presencia de Ca^{2+} ; otras dos proteínas de 50 y 31/33 kDa, fueron detectadas por el anticuerpo anti-p31/33, lo que sugiere la posibilidad de que la proteína de 50 kDa sea la proteína nativa de los espermatozoides del cobayo y que sp42 y p31/33 kDa sean productos de degradación, al igual que sucede en el testículo. Lo anterior se ve apoyado por resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, donde usando una metodología diferente

a la usada por Trejo (1994) para solubilizar a los espermatozoides se detectaron en membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-p31/33, dos proteínas de pesos moleculares de 50 y 42 kDa, tanto en los espermatozoides de los conductos deferentes como de diferentes regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) (Hernández y col., 1995 en prensa).

La presencia de dos proteínas similares a anexinas p50 y sp66, en la región acrosomal en espermatozoides del cobayo, y con las características mostradas por ellas nos sugiere que éstas puedan participar en el proceso de la RA, permaneciendo por establecer el mecanismo por el cual ellas intervengan en dicho proceso, así como las características moleculares de p50 y sp66.

CONCLUSIONES

1.- Las dos proteínas (31/33 kDa y 50 kDa) aisladas del testículo del cobayo, mediante una metodología específica para anexinas, podrían catalogarse como anexinas; con base en que presentaron la propiedad que caracteriza a estas proteínas: la de unirse a membranas biológicas de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} .

2.- La proteína de 42 kDa, inmunolocalizada en el espermatozoide del cobayo podría también catalogarse como anexina, debido a su capacidad para unirse a las membranas plasmática y acrosomal externa, de manera reversible y dependiente de calcio.

3.- Decimos que p31/33 podría ser un producto de degradación de p50, debido a la forma en que se purificó a la proteína de p50 kDa, donde fue determinante la presencia de siete inhibidores de proteasas, ya que con menos inhibidores, se purificaba era la de 31/33 kDa. Esta consideración es apoyada por la fuerte reacción cruzada, que p50 presenta al anticuerpo contra p31/33.

4.- La proteína de 66 kDa de la membrana plasmática del espermatozoide del cobayo, también podría catalogarse como una anexina, ya que fue reconocida por el anticuerpo específico contra la anexina VI. Sin embargo, debido a que su unión a la membrana no fue dependiente de calcio, es posible que se trate de un anexina que se encuentra fuertemente unida a la membrana plasmática. Exclusivamente, por su localización en la región del acrosoma, la proteína de 66 kDa podría estar participando en la reacción acrosomal.

5.- La proteína de 42 kDa, tanto por su localización en el acrosoma como por su capacidad de unirse a las membranas, involucrada en el proceso de la reacción acrosomal, de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} , podría ciertamente participar en el mecanismo de la reacción acrosomal.

APENDICE

Solución A: Tris-HCl 20 mM pH 7.5

NaCl 100 mM

EGTA 5 mM

Solución B: ácido cítrico-dextrosa en proporción 1:7 (v/v)

Solución bloqueadora: Leche descremada al 5%

suero normal del cuyo

en proporción 1:10 en

PBS-Triton X100 al 1%

Solución stock de percoll: Percoll 95 volúmenes

5 volúmenes de NaCl

0.154 M 20X

Amortiguador A: Tris-HCl 20 mM pH 7.5

NaCl 10 mM

Amortiguador B: Tris-HCl 20 mM pH 7.5

Amortiguador C: Tris-HCl 50 mM pH 7.5

Amortiguador C: Tris-HCl 50 mM pH 7.5

Amortiguador D: Tris-HCl 20 mM pH 7.5

NaCl 100 mM

Amortiguador E: Tris-HCl 20 mM pH 7.4

NaCl 100 mM

EGTA 2 mM

Amortiguador de sedimentación: NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 5 mM

Dextran al 0.75 % (p/v)

en proporción 1:4 (v/v)

Amortiguador de lisis: Na₂PO₄ 7.5 mM

EDTA 1 mM pH 7.4

Medio A: KH₂PO₄ 70 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 100 mM

MgSO₄ 2 mM, 2-(N-morfolino), sal etanosulfónica (MES) a pH 6.2 ajustado con NaOH

Medio AH: KH₂PO₄ 70 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 90 mM

MgSO₄ 2 mM, 2-(N-morfolino), sal etanosulfónica (MES) a pH 6.2 ajustado con NaOH y HgCl 10

Buffer salino de phosphatos (PBS): NaCl 0.14 M

KCl 2.7 mM

KH_2PO_4 1.5 mM

Na_2HPO_4

Mezcla II de inhibidores: PMSF 2 mM

p-HMB 2 mM

p-ABA 2 mM

benzamidina 2 mM

Mezcla I de inhibidores: PMSF 2 mM

p-HMB 2 mM

p-ABA 2 mM

pepstatina 1 μ M

benzamidina 2 mM

leupeptina 1 μ M

BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Watson, J.D. (1989). *Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix.* En *Molecular Biology of the cell*. 2a. ed. New York & London; Garland Publishing ENC pp 802-823.

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

Bandorowicz, J. Pikula, S. y Sobota, A. (1992). *Anexins IV (p32) and VI (p68) interact with erythrocyte membrana in a calcium-dependent manner.* *Biochem Biophys Acta.* 1105: 201-206.

Bennet, V. (1983). *Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: Spectrin, ankyrin, and band 3.* *Methods enzymology.* 96:313-324.

Berruti, G. (1988). *Calpactin-like proteins in human spermatozoa.* *Experimental cell Research.* 179: 374-384.

Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980). *Mammalian sperm and egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zone pellucida possessing receptor activity for sperm.* *Cell* 20:873-882.

Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1986). *Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm.* *J. Cell Biol.* 102, 1363-1371.

Bleil, J.D. Y Wassarman, P.M. (1988). *Galactose of the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zone pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoproteins sperm receptor activity.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6778-6782.

Breübart, H., Lax, J., Rotem, R. y Naor, Z. (1992). *Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.* *J.Biochem.* 281: 473-476

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

Burgoyne, R.D. Handel, S.E. Morgan, A. Rennison, M.E. Turner, M.D. y Wilde, C.J. (1991). *Calcium the cytoskeleton and calpactin (annexin II) in exocytosis secretion from adrenal chromaffin and mammary epithelial cell.* *Biochem Society Transactions.* 19: 1085-1089.

Burgoyne, R.D. y Morgan, A. (1992). *Phospholipid-binding proteins in calcium-dependent exocytosis.* *Biochemical Society Transactions.* 20: 834-836.

Butcher, F.R. (1978). *Regulation of exocytosis,* In: *Biochemical actions of hormones* Litwack, G., (ed.), Academic Press, New York, vol. 5, chapter 2, pp. 53-99.

Creutz, C.E., Pazoles, C.J., y Pollard, H.B. (1978). Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 253: 2858-2866.

Creutz, C.E. y Sterer, D.C. (1983). Calcium dependence of the binding of synexin to isolated chromaffin granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:335-364.

Creutz, E.C. (1992). The annexins and exocytosis. *Science.* 258: 924-930.

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

Cruz, T. J. (1994). Identificación y localización de anexinas en el espermatozoide de cuyo. FES Zaragoza-UNAM. Iztapalapa D.F. México, pp 62.

De Blass, A.L. y Cherwinski, H.M. (1983). Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 133: 214-219.

Delgado, N.M., Lui, H., Pancardo, R.M., Merchant, H. y Rosado, A. (1976). Changes in the protein conformation of human spermatozoal membranes after treatment with cyclic adenosine 3': 5' monophosphate and human follicular fluid. *Fertil. Steril.* 27: 413-420.

Drust, D.S. y Creutz, C.E. (1988). Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature.* 331: 88-91.

Eddy, E.M. (1988). The Spermatozoon. En: *The Physiology of Reproduction. Vol.1.* E. Knobil y J.D. Neill (eds). New York; Raven Press, pp 33-34.

Edwards, H.C. y Booth, A.G. (1987). Calcium-sensitive, lipid-binding cytoskeletal proteins of the human placental microvillar region. *J. Cell Biol.* 105: 303-311.

Erikson, E., H.G., Tomaszewicz, y R.L. Erikson. (1984). Biochemical characterization of 34-kilodalton normal cellular substrate for pp60src and an associated 6-kilodalton protein. *Mol. Cell Biol.* 4: 77-85.

Fava, R.A. y Cohen, S. (1984). Isolation of a calcium-dependent 35-kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor/kinase from A-431 cells. *J. Biol. Chem.* 259: 2636-26345.

Fawcett, D.W., (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* 44:394-396.

Feinberg, J.M. Rainteau, D.P. Kaetzel, M.A. Dacheux Jean-Louis. Dedman, J.R. y Weinman, S.J. (1991). Differential localization of annexins in ram gem cell: A biochemical and immunocytochemical study. *J. Histochem and Cytochem.* 39: 955-963.

Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L., y Babcock, D.F. (1989). An adhesion