



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE METALOPROTEASAS EN
EL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR
S. purpuratus y *L. pictus*

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 :
GISELA GRANADOS GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma. del Carmen Beltrán Nuñez

MEXICO, D.F.

2000



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Identificación de metaloproteasas en el espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus* y *L. pictus*"

realizado por Gisela Granados González

Con número de cuenta 9021852-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis

Propietario	Dra.	María del Carmen	Beltrán Nuñez.	<i>Maria del Carmen Beltran Nuñez</i>
Propietario	Dra.	Alicia Enriqueta	Brechú Franco.	<i>Brechú Franco</i>
Propietario	Biol.	Rebeca María	López Rivas.	<i>Rebeca María López Rivas</i>
Suplente	M en C.	Efraín	Tovar Sánchez.	<i>Efraín Tovar Sánchez</i>
Suplente	Biol.	David	Salinas Torres.	<i>David Salinas Torres</i>

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología.
Dra. Edna María Suárez Díaz.



DEPARTAMENTO
DE BIOLÓGIA

Dedicatorias

Este trabajo esta dedicado a mis padres Irma y Lorenzo, gracias por el enorme esfuerzo que han realizado para darme una educación, por todo su amor y apoyo incondicional, los quiero muchisimo.

A mi hermana Gaby por todos los momentos que hemos compartido juntas. A Julieta que naciste en el momento preciso para cambiar la perspectiva de nuestras vidas. A Jorge por el amor que le tienes a mi hermana.

A Manuel con mucho amor, por compartir la vida juntos y sobre todo por todò tu cariño.

En especial a la memoria de mi abuelito Pedro, gracias por todo tu apoyo y sabios consejos, te extraño mucho.

Agradecimientos

Con mucho cariño a Carmen por su confianza, sus enseñanzas y sobre todo por su gran calidad humana.

Al Dr. Alberto Darszon por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación y por sus valiosos consejos.

A mi familia grande: mi abuelita Inés, Toño, Silvia, Pepe, Claudia, Ale, Marisol, Pedrito, Gaby, Dany, Santy, Lupe, Salvador, Mariana, Areli, Fátima, Humberto, Carlos, Faty, Humber, Pablo, Raquel, Vicente, Paty, Riquis, Talía, Leonardo, Teo, Rita, Rene, Renata, Lalo, Jaime, Yola, Max, Sebastián, Rocío, Jay, Rebeca, Angélica, Enrique y Enri, porque siempre me han brindado su apoyo.

A mis muy queridos amigos: Irene, Adrián, Omar, Rosalina, Daniel, Memo y Estuardo, por esos inolvidables momentos que compartimos durante la licenciatura.

A Yolo y a Toño por su amistad.

A la familia Rivera por todo su cariño.

A mis sinodales: Dra. Alicia Brechú Franco, Biol. Rebeca López Rivas, M en C. Efraín Sánchez Tovar, y Biol. David Salinas Torres por su amistad y valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Blanca, Esme, José Luis, Nachito, Daniel, Takuya, Gabriel, Carlos, Ricardo, Claudia y Yuyu por brindarme su amistad y apoyo académico en todo momento.

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

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo económico otorgado por PROBETEL, UNAM.

Indice

Indice	1
Indice de Figuras y Tablas.....	3
Lista de abreviaturas.....	5
Resumen	6
Introducción.....	8
<i>La fecundación</i>	<i>8</i>
<i>La Reacción Acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar.....</i>	<i>12</i>
<i>El zinc.....</i>	<i>14</i>
<i>Las proteasas.....</i>	<i>16</i>
Antecedentes.....	21
Objetivos.....	22
Materiales y Métodos	23
1 <i>Reactivos</i>	<i>23</i>
2 <i>Obtención de gametos</i>	<i>23</i>
3 <i>Aislamiento de la membrana plasmática del espermatozoide.....</i>	<i>24</i>
4 <i>Aislamiento de vesículas híbridas del espermatozoide.....</i>	<i>28</i>
5 <i>Preparación de un homogenado total de espermatozoides de erizo de mar.....</i>	<i>30</i>
6 <i>Homogenado de cabezas de espermatozoides manteniendo la integridad de sus acrosomas.....</i>	<i>30</i>
7 <i>Obtención del citosol de cabezas de espermatozoides.....</i>	<i>31</i>
8 <i>Preparación de membranas totales de flagelo de espermatozoides.....</i>	<i>31</i>
9 <i>Gradiente de sacarosa.....</i>	<i>31</i>
10 <i>Determinación de proteína, por el método de Bradford.....</i>	<i>33</i>
11 <i>Determinación de Actividad Proteolítica.....</i>	<i>33</i>
12 <i>Detección de proteínas que unen Zn^{2+}, utilizando zinc radioactivo (^{65}Zn).....</i>	<i>35</i>
13 <i>Tinción con Plata.....</i>	<i>35</i>

Resultados	36
1. <i>Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica presente en el espermatozoide de erizo de mar.</i>	36
2. <i>Fraccionamiento de la membrana plasmática y del citosol del espermatozoide de erizo de mar en un gradiente de sacarosa.</i>	40
3. <i>Actividad de metaloproteasa asociada a una proteína en el espermatozoide de erizo de mar.</i>	42
3.a <i>Actividad de metaloproteasa en las cabezas de espermatozoides de Strongylocentrotus purpuratus.</i>	42
3.b <i>Actividad de metaloproteasa en los flagelos de espermatozoides de Strongylocentrotus purpuratus.</i>	44
3.c <i>Actividad de metaloproteasa en las cabezas de espermatozoides de Lytechinus pictus.</i> ..	47
3.d <i>Actividad de metaloproteasa en los flagelos de espermatozoides de Lytechinus pictus.</i> ..	50
4. <i>Proteínas que unen ⁶⁵Zn en el espermatozoide de erizo de mar.</i>	53
Discusión.....	57
Conclusiones.....	64
Perspectivas.....	65
Bibliografía.....	66

Índice de Figuras y Tablas

	Título	Página
FIGURA 1.	El óvulo de erizo de mar.....	9
FIGURA 2.	El espermatozoide de erizo de mar.....	11
FIGURA 3:	La RA en el espermatozoide de erizo de mar.....	13
FIGURA 4.	Estructura química de los agentes de metales pesados O-Phe y EDTA	20
FIGURA 5.	Marcha de preparación de la membrana plasmática de cabezas de espermatozoides de erizo de mar.....	26
FIGURA 6.	Marcha de preparación de la membrana plasmática de flagelos de espermatozoides de erizo de mar.....	27
FIGURA 7.	Marcha de preparación de vesículas híbridas en el espermatozoide de erizo de mar.....	29
FIGURA 8.	Marcha de preparación de la membrana plasmática manteniendo la integridad del acrosoma.....	32
FIGURA 9.	Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica de la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar.....	37
FIGURA 10.	Distribución de proteínas del citosol, de acrosomas, de VH y de flagelos de espermatozoides de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en un gradiente de sacarosa.....	41
FIGURA 11.	Actividad de metaloproteasas en un homogenado de cabezas de espermatozoides de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	45
FIGURA 12.	Actividad de metaloproteasas en un homogenado de flagelos de espermatozoides de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	46
FIGURA 13.	Actividad de metaloproteasas en un homogenado de cabezas de espermatozoides de <i>Lytechinus pictus</i>	48
FIGURA 14.	Actividad de metaloproteasas en un homogenado de flagelos de espermatozoides de <i>Lytechinus pictus</i>	51

FIGURA 15. Proteínas que unen ^{65}Zn radioactivo en un solubilizado total de espermatozoides de <i>Lytechinus pictus</i>	54
FIGURA 16. Esquema de la distribución de las metaloproteasas en el espermatozoide de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y <i>Lytechinus pictus</i>	59
• TABLA I. Familias de enzimas proteolíticas.....	17
• TABLA II. Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica de solubilizados totales y de la MP de cabezas y flagelos de espermatozoides de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y <i>Lytechinus pictus</i>	39
• TABLA III. Proteínas del espermatozoide de erizo de mar con actividad de metaloproteasa en solubilizados totales de cabezas y flagelos de espermatozoides de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y <i>Lytechinus pictus</i>	52
• TABLA IV. Proteínas del espermatozoide de erizo de mar que unen ^{65}Zn en solubilizados totales y en la MP de espermatozoides de <i>Lytechinus pictus</i> y <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	55
• TABLA V. Algunas proteínas reguladas por zinc en diferentes sistemas.....	62

Lista de abreviaturas

AA	Aminoácidos
ATP	Trifosfato de adenosina
AMA	Agua de mar artificial
AMA 1 Ca	Agua de mar artificial 1 mM Ca ²⁺ pH 7.0
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
DIDS	Acido 4,4'-diisotiociano-2,2' disulfónico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
EGTA	Etilenglicol-bis-(β-amino-etileter)N, N'-ácido tetracético
E _m	Potencial de membrana
GMPC	Guanosina 3',5'-monofosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5 trisfosfato
MP	Membrana plasmática
O-Phe	1,10-fenantrolina
PA-SDS	Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
pH _i	pH intracelular
PMFS	Fenil metil sulfonil fluoruro
RA	Reacción Acrosomal
Sol	Solubilizado total
VH	Vesículas Híbridas

Resumen

La Reacción Acrosomal (RA) es un requisito indispensable para que el espermatozoide fecunde al óvulo. En el erizo de mar, éste proceso lo induce un polímero de fucosa sulfatada (Factor) presente en la capa de gelatina del óvulo y consiste en la exocitosis del acrosoma y la formación del túbulo acrosomal. Durante éste proceso hay una entrada de Na^+ y Ca^{2+} y una salida de K^+ y H^+ lo cual genera cambios en el pH intracelular (pH_i), en el potencial de membrana (E_m) y en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$); así como un aumento en las concentraciones de AMPc, GMPc e IP_3 (Clapper, *et al.*, 1985; Darszon, *et al.*, 1999). Durante la RA se activan canales de Ca^{2+} , Cl^- y K^+ cuya participación es esencial ya que su bloqueo inhibe dicha reacción. En el espermatozoide de *Lytechinus pictus* concentraciones micromolares de zinc, inducen la RA (Clapper, *et al.*, 1985) en ausencia del Factor, produciendo los mismos cambios de permeabilidad, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y pH_i (Darszon, *et al.*, resultados no publicados). Aunque en el espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* el zinc produce los mismos cambios, éstos no son suficientes para disparar dicha RA. Es probable que el zinc esté involucrado en la regulación del pH en el espermatozoide de erizo de mar, ya que el EDTA disminuye el pH_i y es el zinc el ion que contrarresta esta acidificación (Clapper, *et al.*, 1985). Farach, *et al.* (1987) reportaron la existencia de una metaloproteasa soluble en el espermatozoide de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, que probablemente participa en la RA. Utilizando un sustrato fluorescente para metaloproteasas (Succinil-Ala-Ala-Phe-AMC), observaron que esta proteasa se inhibía con EDTA y 1,10-fenantrolina (O-Phe) y que la actividad se restablecía con zinc. También observaron que tanto el sustrato como el EDTA y la O-Phe inhibían la RA inducida por gelatina o por el ionóforo A23187 independientemente de la entrada de Ca^{2+} . En este trabajo se identificaron diferentes actividades proteolíticas en espermatozoides de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Aunque se detectaron actividades de aspartil-, cisteínil- y serín-proteasas (~20-34%), la actividad más importante (~90%) corresponde a metaloproteasas. El fraccionamiento de las

diferentes partes del espermatozoide en gradientes de sacarosa y la utilización de zimogramas, nos mostró que las actividades de metaloproteasas se encuentran localizadas principalmente en la cabeza de los espermatozoides de ambas especies (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*). En las cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, se detectaron 3 dobletes de actividad de metaloproteasas (116, 110; 80, 87 y 57, 54 kDa) de las cuales solo una (57 kDa) aparentemente asociada a vesículas híbridas (VH) parece tener sitio de unión a ^{65}Zn . En el solubilizado de cabezas de espermatozoides de *Lytechinus pictus* se detectaron 3 metaloproteasas (116, 110 y 84 kDa) asociadas tanto al citosol (posiblemente a acrosomas) como a la MP. En este caso, aparentemente las metaloproteasas de 116 y 84 kDa podrían tener sitio de unión a ^{65}Zn . No podemos afirmar con certeza que las metaloproteasas mencionadas tienen sitio de unión a zinc, debido a que en los zimogramas las proteínas se separaron en condiciones no reductoras, en tanto que para la determinación de sitios de unión a ^{65}Zn las proteínas se separaron en condiciones reductoras. Desconocemos si la Mr de dichas metaloproteasas cambia con su estado de reducción. Seguimos sin saber cual de las metaloproteasas dependientes de zinc es la que participa en la RA, por lo que es necesario profundizar en su estudio y caracterización lo cual nos dará información acerca del sitio de acción de la metaloproteasa en la cascada de eventos que conducen a la RA.

Introducción

La fecundación.

Para la mayoría de los animales, la vida de un nuevo individuo inicia con la fecundación, que involucra la fusión de dos células germinales: el espermatozoide y el óvulo (Darszon, *et al.*, 1982; 1996; 1999). La fecundación es quizá el evento biológico más importante, ya que permite la generación de un nuevo individuo, aumenta las posibilidades de subsistencia de la especie en el tiempo, y brinda la oportunidad de recombinación genética (Alberts, *et al.*, 1990). La fecundación puede ser interna, en la cual los espermatozoides se eyaculan dentro del tracto genital femenino como es el caso de mamífero, o externa en donde los gametos se liberan al medio ambiente, como en el erizo de mar (Liévano, *et al.*, 1994). Para que se lleve a cabo la fecundación son necesarios al menos tres eventos de fusión de membranas: la reacción acrosomal (RA) en donde se fusiona la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana del gránulo acrosomal, la fusión del túbulo acrosomal con la membrana plasmática del óvulo homólogo, y la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del óvulo (Vacquier, 1986; Roe, *et al.*, 1988).

1.1 El erizo de mar.

El erizo de mar es uno de los modelos más utilizados para el estudio de la fecundación por las ventajas experimentales que presenta: a) es un organismo de fecundación externa lo cual facilita su manipulación (Barnes, 1989), b) tiene sexos separados que permite realizar experimentos de RA *in vitro* y c) produce una gran cantidad de gametos (el macho produce $\sim 10^{10}$ espermatozoides/ml y la hembra 10^6 óvulos) lo que nos permite obtener suficiente material biológico. Por otro lado es relativamente fácil mantenerlos en el laboratorio por un periodo prolongado (Ward y Kopf, 1993).

1.2 El óvulo.

El óvulo de erizo de mar es una célula esférica de 80 μm de diámetro rodeada de una membrana plasmática y de dos capas externas: la capa vitelina (CV) y la capa de gelatina (CG) (fig. 1). Las dos capas son de naturaleza glicoprotéica (SeGall, *et al.*, 1981). La capa vitelina sirve como protección durante el desarrollo embrionario. Se encuentra unida a la superficie externa de la membrana plasmática y entre sus funciones se encuentra la de contener los receptores glicoprotéicos a los que se unen los espermatozoides homólogos. La capa de gelatina (CG), la cual mide aproximadamente 40 μm de grosor, 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). La CG está compuesta de un polímero de fucosa sulfatada (Factor) y por una sialoglicoproteína. El Factor es el responsable de los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el espermatozoide (SeGall, *et al.*, 1979).

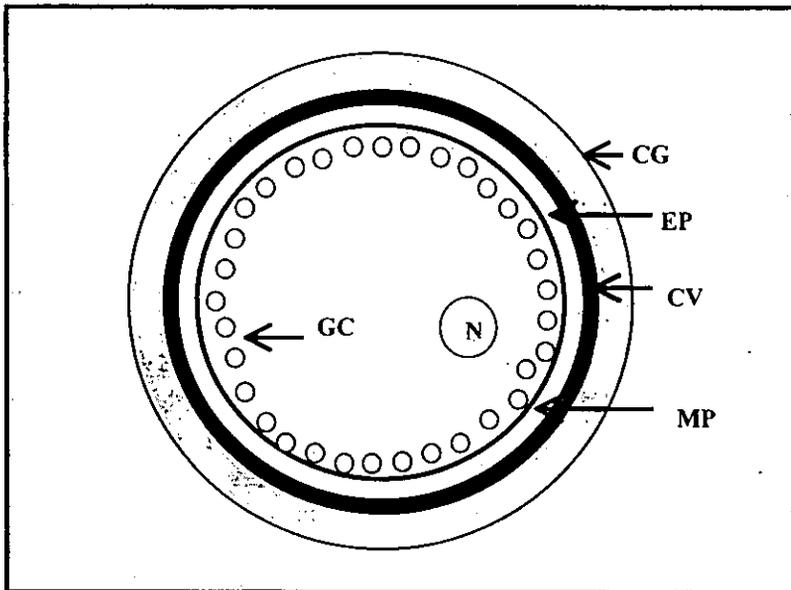


Figura 1. Esquema de un óvulo de erizo de mar, mostrando algunos de sus componentes: núcleo (N), capa de gelatina (CG), capa vitelina (CV), espacio perivitelino (EP), membrana plasmática (MP), gránulos corticales (GC). (Adaptada de Castellano, 1993).

Después de la capa vitelina, encontramos la membrana plasmática (MP) la cual se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide. Por debajo de la membrana plasmática del óvulo, están los gránulos corticales (GC) que se derivan del Aparato de Golgi, éstos gránulos contienen una mezcla de enzimas, proteínas estructurales y mucopolisacáridos sulfatados. El óvulo tiene dos mecanismos para evitar la polispermia, en donde se garantiza que sólo un espermatozoide fecunde al óvulo, de lo contrario 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 a 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 mV a 20 mV, manteniéndose durante un minuto; a esto se le conoce como potencial de fecundación. El otro mecanismo ocurre a nivel de los gránulos corticales, o sea, 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, *et al.*, 1985). Estos mecanismos modifican la envoltura externa del óvulo impidiendo el paso de otros espermatozoides.

1.3 El espermatozoide.

El espermatozoide de erizo de mar es una célula muy pequeña (~ 15 μm) compuesto por tres regiones: la cabeza, la porción media y el flagelo, además de un gránulo acrosomal que es derivado del Aparato de Golgi (Longo, y Anderson, 1969) (fig. 2). En la cabeza está el núcleo, que ocupó la mayor parte de la cabeza por lo que el espacio citoplasmático es muy reducido. El acrosoma se encuentra en el extremo anterior de la cabeza y presenta un alto contenido de enzimas líticas. La naturaleza de los componentes acrosomales son una arilsulfatasa (Hoshi y Moriya, 1980), proteasas semejantes a tripsina y quimiotripsina. Así como una proteína adhesiva, la cual es responsable de la unión del espermatozoide con el óvulo durante la fecundación (Vacquier, y Moy, 1977).

En la porción media se localiza una mitocondria y dos centriolos, el centriolo distal interviene durante la iniciación de la división celular en el óvulo fecundado (Ruíz, 1988), el otro centriolo da origen al flagelo. El flagelo es el responsable de la movilidad del espermatozoide y está formado por nueve pares externos de microtúbulos que rodean dos microtúbulos centrales, todo esto constituye al axonema (Alberts, *et al.* 1990).

Los espermatozoides son células altamente especializadas, pero son incapaces de sintetizar proteínas ya que han perdido sus ribosomas, y dado que el núcleo está totalmente condensado tampoco existe síntesis de RNA. En el caso del erizo de mar los espermatozoides son metabólicamente inactivos en el semen, al ser eyaculados al agua de mar se activa rápidamente su respiración y su movilidad. La gelatina del óvulo libera péptidos quimioattractantes (resaca en *Arbacia punctulata*) al agua de mar, generando por difusión un gradiente de concentración que guía a los espermatozoides (Ward, *et al.*, 1993; Liévano, *et al.*, 1994).

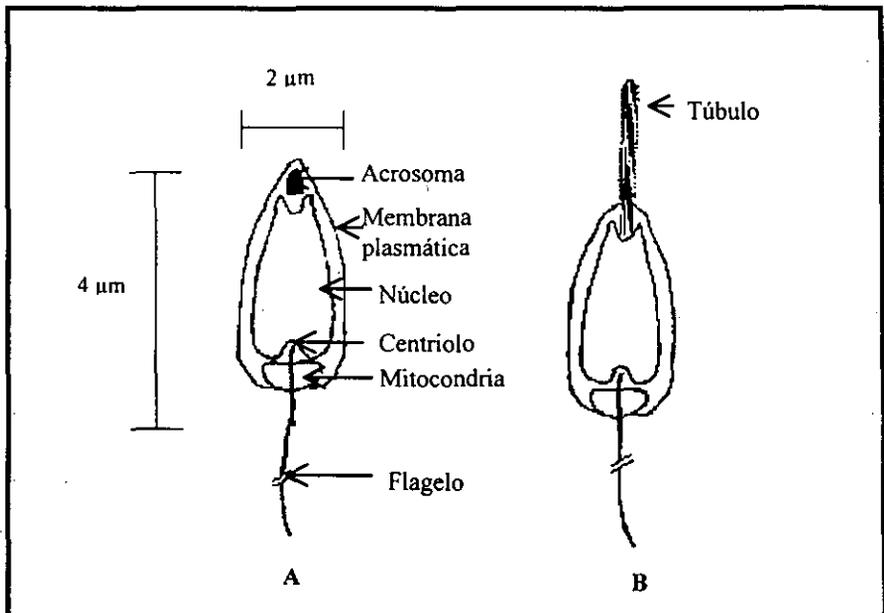


Figura 2. Esquema del espermatozoide de erizo de mar.

A) Espermatozoide sin reaccionar.

B) Espermatozoide reaccionado. (Modificada de Liévano, 1994).

La Reacción Acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar.

La reacción acrosomal (RA) es un requisito indispensable para que el espermatozoide fecunde al óvulo, ésta involucra cambios fisiológicos y morfológicos en el espermatozoide. De manera natural la RA se dispara cuando el Factor, (polímero de fucosa sulfatada), que se encuentra en la capa más externa del óvulo (fig. 1), se une a un receptor de la superficie del espermatozoide. La célula responde con un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, que involucra una entrada de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ y H^+ . Al mismo tiempo se produce una elevación en el pH_i y $[\text{Ca}^{2+}]_i$, así como una hiperpolarización seguida de una depolarización de la membrana plasmática (Darszon, *et al.*, 1996; 1999). Además hay un aumento en las concentraciones de nucleótidos cíclicos como GMPc y AMPc, y se estimula el recambio de inositol 1,4,5 trisfosfato (IP_3), y la actividad de una fosfolipasa D (Vacquier, 1986; Ward, *et al.*, 1993; Foltz, *et al.*, 1993). Durante la RA participan dos tipos de canales de Ca^{2+} , el primero se abre cuando el receptor a la gelatina del óvulo está ocupado, y se bloquea por verapamil, dihidropiridinas y trifluoroperazina y se inactiva. El segundo canal no se bloquea por estos compuestos y es dependiente de pH_i , lo que mantiene elevada la concentración de Ca^{2+} intracelular (fig. 3). Por otro lado antagonistas de canales de K^+ como el tetraetilamonio (TEA^+), inhiben la RA indicando su participación obligada en este proceso (Darszon, *et al.*, 1999), también canales de Cl^- sensibles a DIDS (Acido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico) pueden estar participando en el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana (Contreras, *et al.*, 1996). Dentro de los cambios morfológicos encontramos la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana del gránulo acrosomal liberando su contenido. Posteriormente ocurre la polimerización de actina monomérica que se encuentra en el espacio periacrosomal. De esta manera se forma una nueva estructura llamada túbulo acrosomal que con ayuda de las enzimas líticas, penetra las capas externas del óvulo permitiendo la fusión del espermatozoide con el óvulo (Yanagamichi, 1988). El papel de estas enzimas es degradar las cubiertas extracelulares del óvulo (Sardet, *et al.*, 1970). En el espermatozoide de erizo de mar, la RA también se puede inducir de manera artificial incubando las células a pH 9.0 ó en presencia del ionóforo de Ca^{2+} A23187, tanto en *Strongylocentrotus purpuratus* como en *Lytechinus pictus* (García-Soto y Darszon,

1985). En los espermatozoides de *Lytechinus pictus* la RA además se puede disparar con concentraciones submicromolares de zinc o induciendo una hiperpolarización dependiente de K^+ , seguida de una depolarización (Clapper, *et al.*, 1985; González-Martínez, y Darszon, 1987; González-Martínez, *et al.*, 1992). En espermatozoides de mamíferos la RA ocurre en la superficie de la zona pelúcida del óvulo homólogo (Ward, *et al.*, 1985).

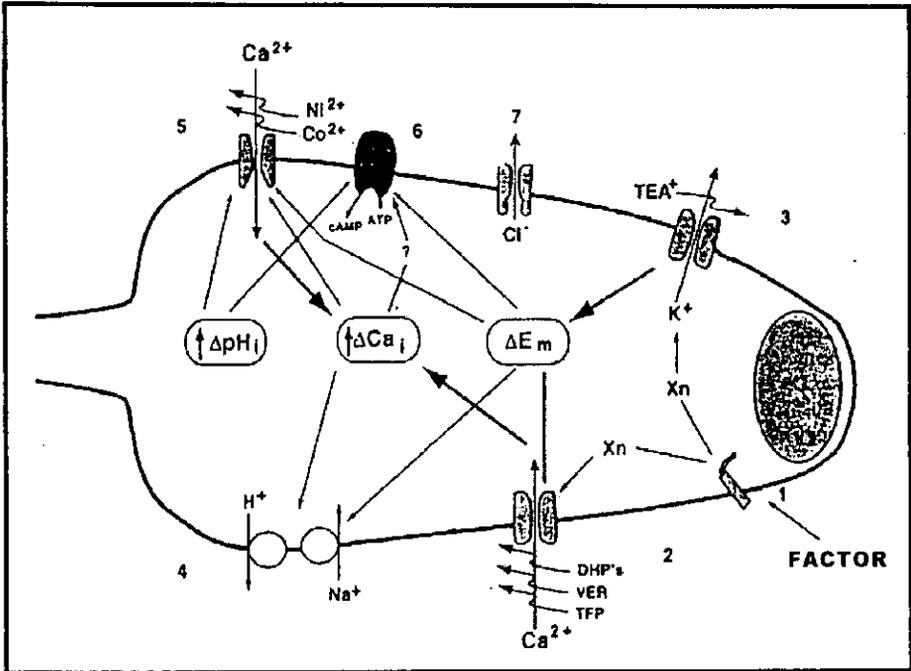


Figura 3. Modelo esquemático de la RA en el espermatozoide de erizo de mar. (1) El Factor del óvulo se une a su receptor en la superficie del espermatozoide, esto provoca que se abra un canal de Ca^{2+} (2) que se inactiva unos segundos después. Este canal de Ca^{2+} inicia un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y es bloqueado por dihidropiridinas (DHP's), verapamil (VER) y trifluoroperazina (TFP). Al mismo tiempo, o inmediatamente después de que se abre el canal de Ca^{2+} , se abre un canal de K^+ (3) que hiperpolariza al espermatozoide de *Lytechinus pictus*. Esta hiperpolarización estimula un intercambio Na^+/H^+ que es dependiente de voltaje (4) elevando el pH_i . Estos cambios de pH_i abren un segundo canal de Ca^{2+} dependiente de pH_i (5), lo que mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ elevada, seguida de una depolarización de la membrana del espermatozoide permitiendo la RA. El factor induce una hiperpolarización e incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ y el pH_i activando a la adenilato ciclasa (6) que se encuentra principalmente en flagelo pero también esta presente en la cabeza del espermatozoide. El incremento de AMP_c puede regular varios canales. También canales de Cl^- (7) sensibles a DIDS pueden estar participando en el potencial de reposo de la membrana E_m (Adaptada de Darszon, *et al.*, 1999).

El zinc

Existen alrededor de 50 tipos diferentes de enzimas que necesitan zinc para su función. El zinc es parte del sitio activo de algunas metaloenzimas, puede estabilizar dominios de proteínas, además de estar implicado en su plegamiento (Higaki, *et al.*, 1992; Berg, *et al.*, 1996).

El zinc es también un cofactor esencial de una gran variedad de procesos celulares tales como: síntesis de DNA, respuestas conductuales, reproducción, formación de huesos, crecimiento, curación de heridas, etc. (Barceloux, 1999).

Se ha observado que el zinc estabiliza las membranas al reaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas de dichas membranas (Chvapil, 1973; Hidiroglou, y Knipfel, 1982; Andrews, *et al.*, 1994, 1995; Pattison, *et al.*, 1998). Existe un gran número de mecanismos homeostáticos por los cuales las células pueden regular la entrada y salida de este metal a través de la membrana plasmática. Un ejemplo es la síntesis de moléculas que tienen sitios de unión a zinc (Palmiter, *et al.*, 1996).

El zinc juega un papel fundamental en la reproducción en diferentes especies. En humanos es necesario para la formación y maduración del espermatozoide, así como para la ovulación y para la fecundación (Barceloux, 1999).

En el caso de mamíferos, sabemos que 10 μM de zinc es capaz de inducir la RA en espermatozoides de cerdo, (Delgado, y *et al.*, 1985). Por otro lado Anouma, *et al.*, (1978) reportaron que el zinc (250 μM) es un inhibidor de la capacitación en espermatozoides de ratón y que en espermatozoides de humano, puede inhibir tanto la movilidad como la capacitación (Sansone *et al.*, 1991). Posiblemente para que el espermatozoide pueda prepararse para sufrir la capacitación y posteriormente la RA, es necesario remover el metal de su superficie celular lo cual origina una desestabilización de la membrana plasmática (Andrews, *et al.*, 1994).

3.1 El zinc y la fecundación.

Espermatozoides de muchas especies marinas como el erizo y la estrella de mar, contienen concentraciones altas de metales pesados (Johnson, *et al.*, 1983). En 1953 Tyler descubrió que algunos aminoácidos (como glicina, cisteína, histidina y glutatión) y quelantes (como el EDTA y el dietilditiocarbamato) pueden prolongar hasta 100 veces la movilidad y la capacidad de fecundación de los espermatozoides de erizo de mar. La manera como funcionan estos compuestos es quelando los metales pesados tóxicos que se encuentran en el agua de mar. Se sabe que concentraciones altas de Zn^{2+} , Cu^{2+} o Hg^{2+} (10^{-4} M) inhiben la movilidad de los espermatozoides, mientras que concentraciones más bajas (10^{-3} M) de dichos iones aumentan su movilidad, lo anterior se puede explicar como consecuencia de prevenir la RA (Young y Nelson, 1974). Aparentemente el zinc también contribuye a la activación de la respiración y de la movilidad del espermatozoide en otros invertebrados marinos como la cacerolita de mar (*Limulus polyphemus*) y la estrella de mar (Morisawa, 1994).

3.2 Participación del zinc en la Reacción Acrosomal del espermatozoide de erizo de mar.

Como mencionamos anteriormente el zinc induce la RA en el espermatozoide de erizo de mar *Lytechinus pictus*, en ausencia del factor, produciendo los mismos cambios de permeabilidad, $[Ca^{2+}]_i$ y pH_i que el inductor natural (Clapper, *et al.*, 1985; Darszon, *et al.*, resultados no publicados). Aunque en el caso de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, el zinc produce los mismos cambios, estos no son suficientes para disparar la RA en esta especie.

Tanto en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus* se mostró que una variedad de quelantes de metales pesados estructuralmente diferentes como: EDTA, dipiridil, cisteína, DTT y O-Phe (0.1-1 mM), retardan el inicio de la movilidad e inhiben la RA inducida por la gelatina. Esta inhibición es prevenida con 0.1 μ M de zinc, misma que también contrarresta la disminución que el EDTA ejerce sobre el pH_i. También tanto la movilidad de los espermatozoides como la RA se regulan parcialmente por el pH_i (Clapper, *et al.*, 1985).

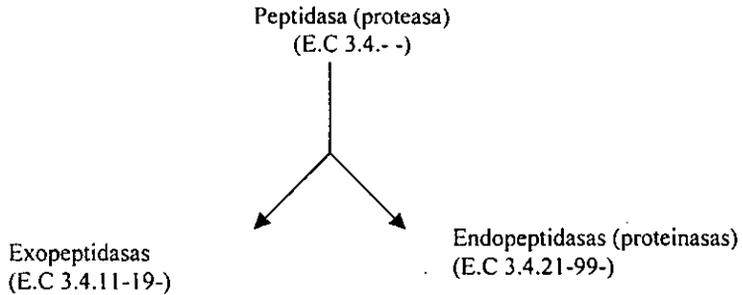
Las proteasas.

Las enzimas proteolíticas están involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos y su acción se puede dividir en dos categorías diferentes:

- a) Proteólisis limitada. En la cual la proteasa rompe solo un número limitado de enlaces peptídicos de una proteína blanco llevando a la activación o maduración de una proteína inicialmente inactiva (Moreau, y Choplin, 1999).
- b) Proteólisis ilimitada. En la que las proteínas se degradan en sus aminoácidos constituyentes. Las proteínas que serán degradadas, generalmente primero se conjugan con múltiples moléculas del polipéptido ubiquitina. Esta modificación las marca para una rápida hidrólisis por el proteosoma en presencia de ATP. Otra vía es compartimentalizar las proteasas en lisosomas, donde sufren una degradación rápida (Moreau, y Choplin, 1999).

En 1984 la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) recomendó el uso del término *peptidasa* para el subgrupo de proteínas que hidrolizan el enlace peptídico (Subclase E.C.3.4.). El término *proteasa* es sinónimo de peptidasa. Las proteasas comprenden dos grupos de enzimas: las endopeptidasas (proteinasas) y las exopeptidasas, las cuales cortan el enlace peptídico en algunos puntos de la proteína y remueven los aminoácidos secuencialmente del N-terminal ó el C-terminal respectivamente (Beynod, y Bond, 1989). El término *proteinasas* es una palabra sinónimo de endopeptidasa y hay cuatro clases mecanísticas de proteinasas que reconoce la IUBMB como se detalla en la Tabla I y con éstas, 6 familias de proteasas son reconocidas (Moreau, y Choplin, 1999).

Cada familia de proteasas tiene ciertas características funcionales dadas por residuos de aminoácidos que están en cierta configuración en el sitio activo. Se cree que los miembros de cada familia provienen de un ancestro común en donde evolucionaron de manera divergente (Beynod, y Bond, 1989). Por lo tanto el esquema moderno de la nomenclatura es:



Las proteinasas se clasifican de acuerdo a su mecanismo catalítico en cuatro clases:

- ◆ Serín proteasas
- ◆ Cisteín proteasas
- ◆ Aspartil proteasas
- ◆ **Metaloproteasas**
- ◆ Proteasas de mecanismo desconocido

TABLA I. FAMILIAS DE ENZIMAS PROTEOLITICAS*

Familia	Proteasa (s) representativa	Residuos característicos del sitio activo+
Serín proteasas I	Quimiotripsina Tripsina Elastasa	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁸⁵ , His ⁵⁷
Serín proteasas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Cisteín proteasas	Papaina Catepsina B y H de hígado de rata	Cys ²³ , His ¹⁵⁰ , Asp ¹⁵⁸
Aspartil proteasas	Penicilopepsina Renina	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metaloproteasas I	Carboxilpeptidasa A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Tyr ²⁴⁸
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ²⁷⁰ , His ²³¹

* Tabla tomada de Beynon, y Bond, 1989.

+ Los números de residuos corresponde a la secuencia de AA de las enzimas de la 2ª columna.

4.1 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son una de las clases más viejas de proteasas y se encuentran en bacterias, hongos y en organismos superiores (Coleman, 1998). Difieren ampliamente en su estructura y secuencia pero la gran mayoría de las enzimas contienen un átomo de zinc, el cual es catalíticamente activo. En algunos casos el zinc puede ser reemplazado por otros metales como, el cobalto o el níquel sin perder la actividad (Huang, 1998). La termolisina bacteriana se ha caracterizado bien y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico. Muchas enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos de histidina para el zinc, mientras que el tercer ligando es un ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasa) ó bien una histidina (astacina). Otras familias presentan un modo diferente de unión del átomo de zinc (Beyond, y Bond, 1989).

4.2 La participación de una metaloproteasa en la Reacción Acrosomal del espermatozoide de erizo de mar.

Con base en el hecho de que el zinc dispara la RA en espermatozoides de *Lytechinus pictus* (Clapper, *et al.*, 1985), y de que metaloproteasas dependientes de metales divalentes están involucradas en eventos de fusión de membranas dependientes de Ca^{2+} en otros sistemas, Farach, *et al.*, (1987) estudiaron la posible participación de una metaloproteasa en la RA. Ellos demostraron de manera indirecta, que existe una metaloproteasa soluble dependiente de zinc y con un pH óptimo de 7.0 involucrada en la RA del espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus*. Esta metaloproteasa se inhibe por O-Phe ó EDTA, pero no por Fosforamidón (otro inhibidor de algunas metaloproteasas). También encontraron, que el sustrato fluorogénico que utilizaron para la metaloproteasa (succ-ala-ala-phe-AMC) bloqueaba la RA inducida por gelatina o por el ionóforo de Ca^{2+} A23187, a pesar de que dicho péptido no bloqueaba la entrada de Ca^{2+} causada por cualquiera de los dos inductores. En la RA del espermatozoide de

Lytechinus pictus no se ha reportado la participación de una metaloproteasa dependiente de zinc.

También es importante mencionar que en el acrosoma del espermatozoide de mamífero están presentes metalo, serín y cisteín-proteasas, que juegan un papel importante en la fusión óvulo-espermatozoide, ya que hidrolizan la zona pelúcida para que el espermatozoide pueda penetrar y fecundar al óvulo (Kohno; *et al.*, 1998 y Rev. en Tulsiani, *et al.*, 1998).

4.3 Efecto de los inhibidores de metaloproteasas en la Reacción Acrosomal.

Se sabe que una variedad de agentes quelantes de metales pesados estructuralmente diferentes como el EDTA, la O-Phe, el dipiridil, la cisteína y el DTT a concentraciones de 0.1 a 1 mM (Prestidge, *et al.*, 1971; Clapper, *et al.*, 1985; Cha, *et al.*, 1996), retardan el inicio de la movilidad e inhiben la RA en espermatozoides de erizo de mar *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus* (Johnson, y Epel, 1983; Clapper, *et al.*, 1985) mediante la disminución del pH_i. La O-Phe además inhibe la fusión de gametos en *Strongylocentrotus purpuratus* (Roe, *et al.*, 1988) lo cual indica que también hay una metaloproteasa involucrada en dicho evento. La inhibición de la RA por EDTA o por O-Phe es reversible con 0.1 μ M de zinc libre, pero concentraciones muy elevadas de este metal también inhiben dicha RA (Clapper, *et al.*, 1985; Farach, *et al.*, 1987; Roe, *et al.*, 1988).

El mecanismo de acción del EDTA y la O-Phe son diferentes debido a sus diferencias estructurales (fig. 4). Dado que el EDTA se coordina con los metales mediante sus grupos carboxilo, el sitio de acción de este quelante parece ser extracelular o en la superficie del espermatozoide, es decir, es impermeable a la membrana plasmática (Jonhson, y Epel, 1983). Por el contrario la O-Phe es una molécula hidrofóbica que tiene átomos de nitrógeno embebidos en sus anillos aromáticos no cargados y puede penetrar a través de la membrana plasmática (Clapper, *et al.*, 1985; Roe, *et al.*, 1988; Kato, *et al.*, 1998). Esta funciona como un inhibidor reversible de metaloproteasas y/o proteasas activadas por metales, quelando el átomo esencial (Togo, 1997; Feitosa, 1998; Moreau, y Choplin, 1999).

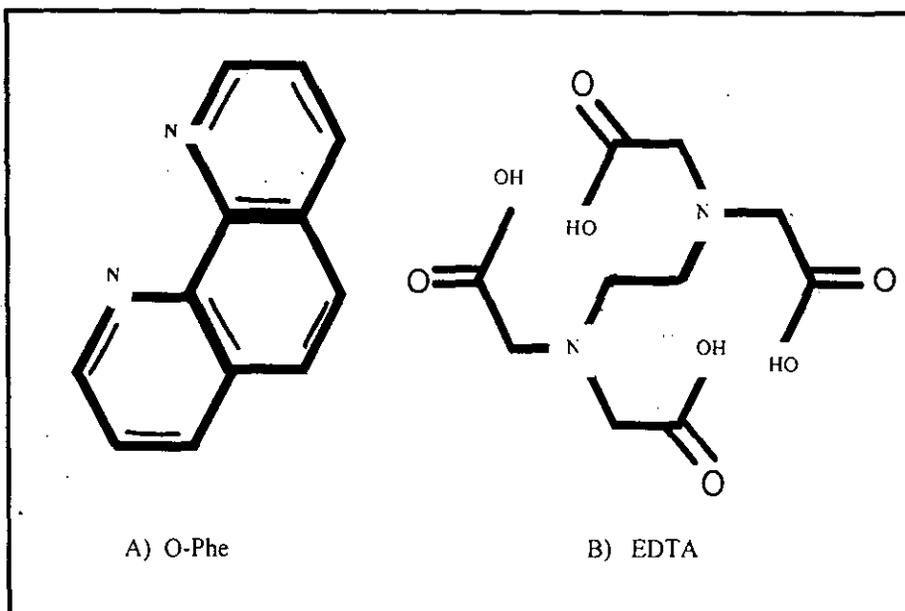


Figura 4. Estructura química de los agentes quelantes de metales pesados (A) O-Phe y (B) EDTA respectivamente (Merck Index, 1989).

Antecedentes

Existen evidencias que sugieren la participación en la RA, de una metaloproteasa soluble que tiene como cofactor el zinc en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* (Farach, *et al.*, 1987). Tanto en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus* se mostró que una gran variedad de quelantes de metales estructuralmente diferentes (0.1-1 mM de EDTA, EGTA, dipiridil, cisteína, ditioneóritol y O-Phe), retardan el inicio de la movilidad al diluir el semen, e inhiben la RA inducida por gelatina. Esta inhibición es prevenida solamente por 0.1 μM de zinc libre. Dicha concentración de zinc libre, también contrarresta la disminución que el EDTA ejerce sobre el pH_i , así como el NH_4Cl y la monensina (ionóforo de Na^+/H^+). Aquí es importante recordar que tanto la movilidad del espermatozoide como la RA se regulan parcialmente por el pH_i . También observaron que los espermatozoides de *Lytechinus pictus* concentran ^{65}Zn del agua de mar y que el EDTA remueve el 50% del ^{65}Zn acumulado en 5 minutos (Clapper, *et al.*, 1985). Posteriormente Farach, *et al.* (1987) demostraron además que un sustrato fluorogénico para la metaloproteasa (Succinil-alanina-alanina-fenilalanina-AMC), bloquea la RA inducida por gelatina o por el ionóforo de Ca^{2+} A23187, a pesar de que dicho péptido no bloquea la entrada de Ca^{2+} causada por cualquiera de los dos inductores.

Sabemos que concentraciones micromolares de Zn^{2+} inician la RA en ausencia del factor en *Lytechinus pictus*, produciendo los mismos cambios de permeabilidad, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y pH_i que el inductor natural. Estos mismos cambios se observan en *Strongylocentrotus purpuratus* pero no son suficientes para inducir la RA (Clapper, *et al.*, 1985; Darszon, *et al.*, Resultados no publicados).

Objetivos

General:

Identificar las metaloproteasas en el espermatozoide de erizo de mar

Particulares :

I. Determinar la localización de las metaloproteasas utilizando diferentes fracciones del espermatozoide.

II. Detectar proteínas que unen zinc en espermatozoides de erizo.

III. Correlacionar las proteínas que unen zinc con la actividad de metaloproteasa.

Materiales y Métodos

1 Reactivos

Los inhibidores de proteasas (Leupeptina, Pepstatina, PMFS y O-Phe), los detergentes (Tritón x-100, Brij 35), Affi-gel, Azul de Coomassie (G-250 y R-250), la heparina y los estándares de PM (SDS-H7) fueron de Sigma Chemical Co. El EDTA fue de J. T. Baker S.A de C.V. La gelatina usada como sustrato par las proteasas fue de la marca comercial Knox Anderson Clayton Co. La leche descremada fue de Svelty ó de Bio-Rad. El ⁶⁵Zn fue de NEN Life Science Products Inc. El resto de los reactivos fueron del más alto grado de pureza.

2 Obtención de gametos

Los erizos *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus* se obtuvieron del Instituto de Investigaciones Oceanográficas de Ensenada Baja California y de Marinus, INC. CA. USA. Los animales se mantuvieron a 14°C en un acuario con agua de mar artificial (AMA: NaCl 486 mM, MgCl 26 mM, MgSO₄ 30 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 10 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, EDTA 0.1 mM, HEPES 10 mM, 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 secos se colectaron con una pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo Eppendorf en hielo.

3 Aislamiento de la membrana plasmática del espermatozoide

3.1 Separación de cabezas y flagelos

El aislamiento de la membrana plasmática se hizo a 4°C, como está reportado por García-Soto, *et al.*, (1988), y se describe a continuación: Se resuspendió 1 ml de espermatozoides secos en 14 ml de AMA en la que se disminuyó el Ca^{2+} a 1 mM y el pH a 7.0 (AMA 1 Ca) y se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos. Este paso se repitió tres veces para eliminar los celomocitos que son bolsitas de proteasas (Vacquier., comunicación personal). Para lavar los espermatozoides la suspensión de éstos se transfirió a otro tubo y se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Los espermatozoides se resuspendieron en 10 ml de AMA 1 Ca más inhibidores: Leupeptina 10 μM , Pepstatina 1 μM , Aprotinina 1 $\mu\text{g/ml}$, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml) y se pasaron 20 veces por una aguja hipodérmica del #21 para desprender las cabezas de los espermatozoides. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 2000 xg por 2 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.

3.2 Aislamiento de membranas de cabeza

Todo el procedimiento se realiza a 4°C. Las cabezas obtenidas en el precipitado del punto anterior (3.1), se resuspendieron en 2 ml de AMA 1 Ca y se transfirieron a un tubo con 1 ml de Affi-Gel (50 mg/ml de AMA 1 Ca), y se incubaron durante 15 minutos con agitación suave. Se agregaron lentamente por la pared del tubo 11 ml de Heparina (40 U/ml de AMA 1 Ca) y se siguió incubando durante 15 minutos más. Las cabezas unidas a las microesferas de Affi-gel se bajaron centrifugándose a 500 xg durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM,

MgCl₂ 1 mM, EGTA 0.1 mM, Leupeptina 10 μM, Pepstatina 1 μM, PMFS 0.1 mM, DNAsa I Tipo IV 2 μg/ml, pH 8.0) para romper las cabezas.

Para separar el citosol de las membranas de la cabeza del espermatozoide unidas al Affi-Gel, se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y el precipitado se lavó dos veces con 10 ml de solución de lisis sin Leupeptina, Pepstatina, ni DNAsa. Para preparar las membranas del affigel el precipitado se diluyó en 1 ml de AMA 1 Ca y se sonicó tres veces durante 2 minutos en un sonicador de baño (la muestra se puso a 0°C/1 min en cada intervalo), para despegar la membrana plasmática. La separación se hizo por centrifugación a 10,000 xg durante 10 min. El sobrenadante conteniendo las membranas, se centrifugó a 200,000 xg por 30 min. Las membranas presentes en el precipitado se resuspendieron en 150 μl de AMA 1 Ca²⁺ y se alicuotaron al igual que el citosol para almacenarse (fig. 5).

3.3 Aislamiento de membranas de flagelo

Todo el procedimiento es a 4°C. Los flagelos presentes en el último sobrenadante del punto 3.1 se recuperaron por centrifugación a 35,000 xg 40 min. El precipitado que contenía los flagelos se resuspendió por homogenización en 10 ml de la solución hipotónica Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, DTT 0.1 mM, Leupeptina 10 μM, Pepstatina 1 μM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Inhibidor de tripsina 1mg/ml pH 8.0, para romperlos. Se colocaron 5 ml de éste homogenado sobre 10 ml de un colchón de sacarosa (Tris-HCl 10 mM, Sacarosa 40%, CaCl₂ 1 mM, DTT 0.1 mM, pH 8.0), en un tubo Corex de 15 ml, y se centrifugaron a 20,000 xg durante 75 minutos en un rotor de columpio. Al final de la centrifugación, se obtuvo un gradiente con una banda en la interfase con la solución de sacarosa (membranas Mid), la parte superior de la banda son las membranas Top (ver fig. 6). Ambas membranas se lavaron por centrifugación a 200,000 xg 30 min. Las membranas presentes en el precipitado se resuspendieron en el mínimo volumen de solución hipotónica y se guardaron en alícuotas a -70°C hasta su uso.

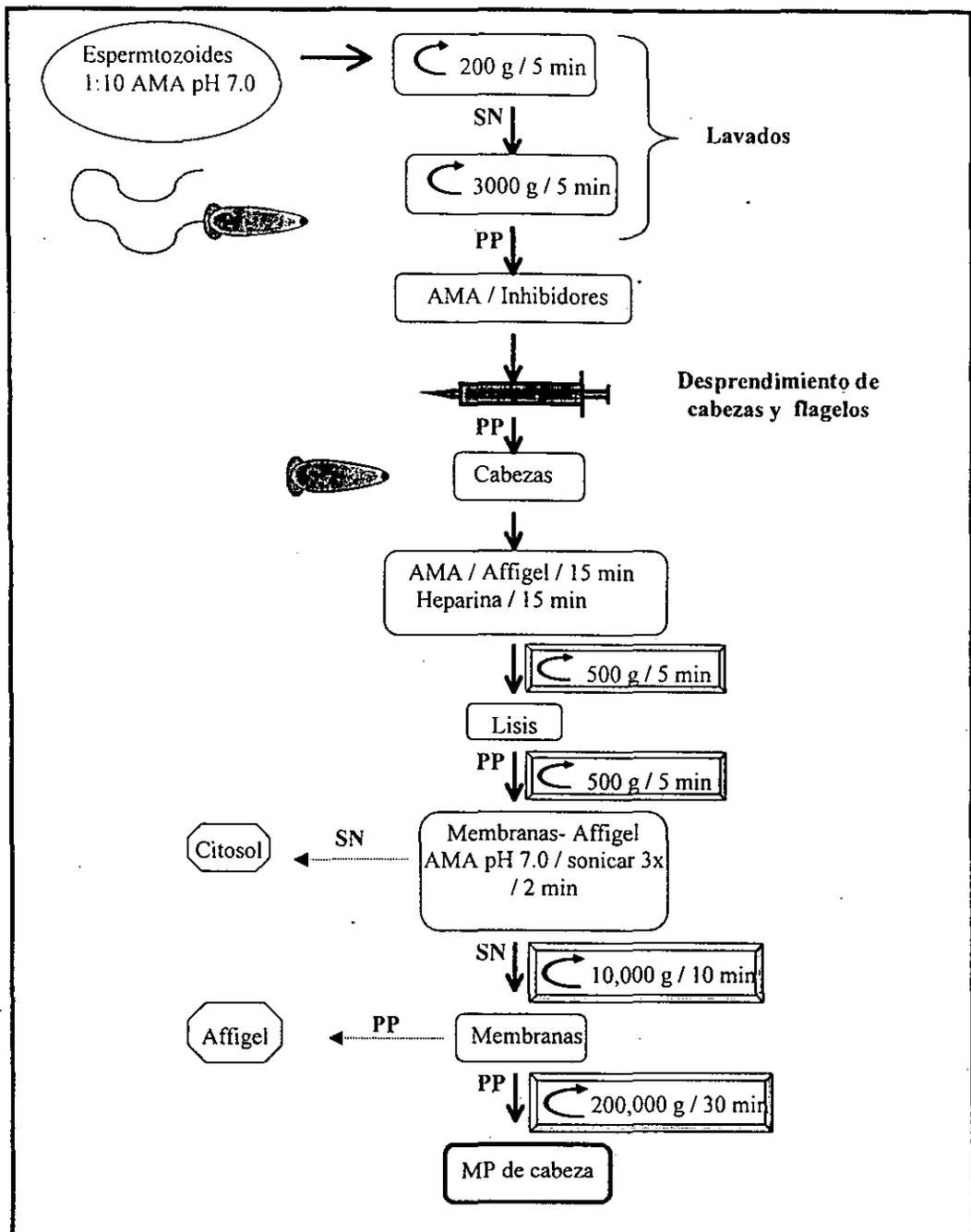


Figura 5. Marcha de preparación de la membrana plasmática de cabeza (García-Soto y *et al.*, 1988).

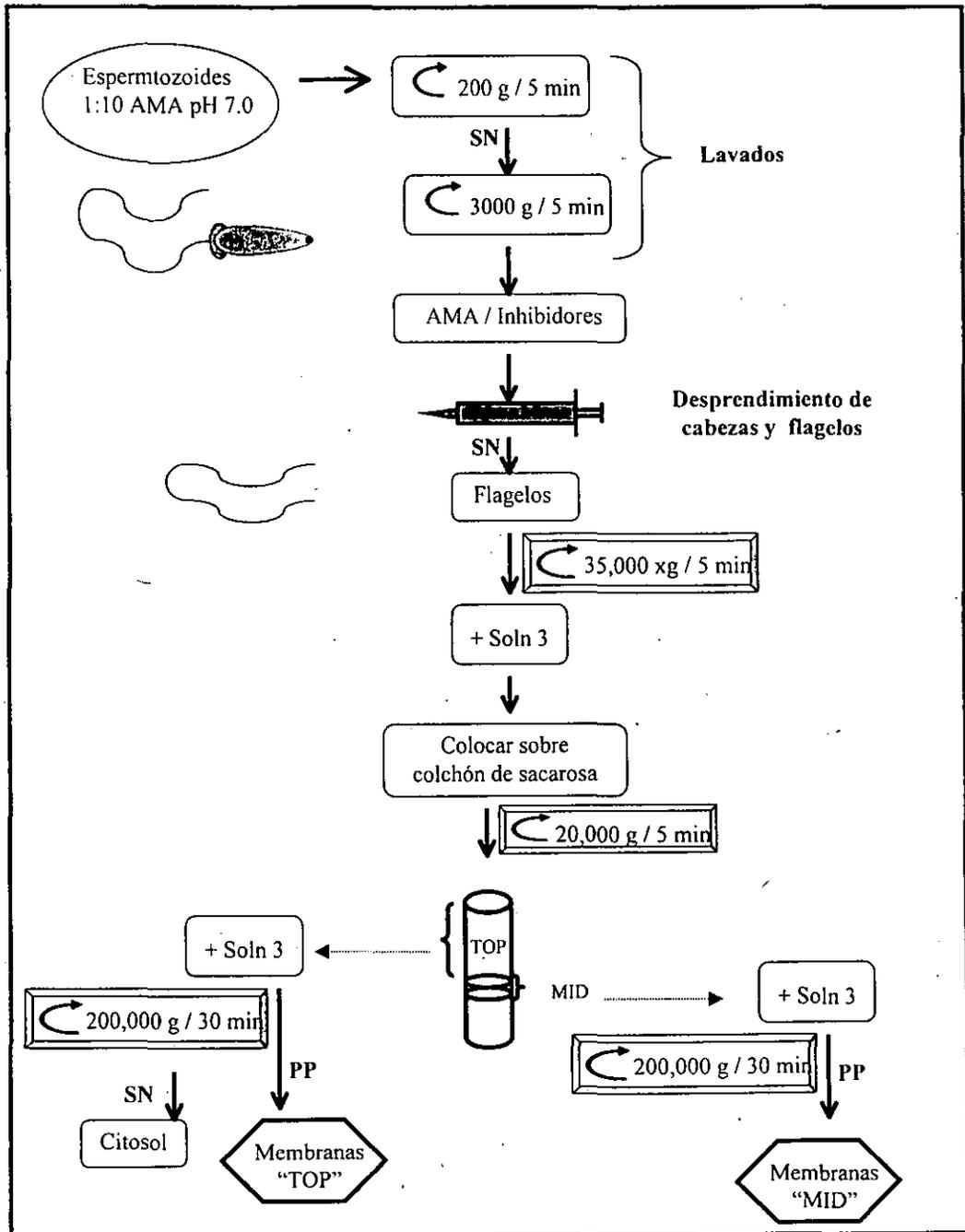


Figura 6. Marcha de preparación de membrana plasmática de flagelo "Mid y "Top" (García-Soto y *et al.*, 1988).

Soluciones utilizadas en la preparación de membrana plasmática de cabezas y flagelos de espermatozoides de erizo de mar.

AMA 1 Ca (Agua de Mar Artificial): NaCl 486 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 26 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 30 mM, Hepes 10 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.0.

Inhibidores de proteasas: Leupeptina 10 μM, Pepstatina 1 μM, DTT 0.1 mM, Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml, pH 7.0.

Solución Lisis: Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0.1 mM, Leupeptina 10 μM, Pepstatina 1 μM, PMFS 0.1 mM, DNasa 1 tipo IV 2 μg/μl, pH 8.0.

Solución hipotónica: Tris 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, DTT 0.1 mM, pH 8.0.

Solución de sacarosa: Tris 10 mM, Sacarosa 40%, CaCl₂ 1 mM, DTT 0.1 mM, pH 8.0.

4 Aislamiento de vesículas híbridas del espermatozoide.

El aislamiento de las vesículas híbridas (VH) se hizo a 4°C, como está reportado por Schulz *et al* (1999) y se describe a continuación. Se resuspendió 1 ml de espermatozoides secos en 14 ml de AMA 1 Ca y se centrifugó tres veces a 300 xg durante 5 minutos para eliminar los celomocitos. Para esta preparación podemos utilizar ya sea cabezas ó espermatozoides completos (sección 3.1). Para inducir la RA el precipitado (cabezas ó espermatozoides) se resuspendió (1:200) en AMA pH 9.0 ó en AMA conteniendo A23187 15 μM y se incubó a 16°C durante 15 min. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 3000 xg durante 5 min y después a 10,000 xg durante 10 minutos para eliminar las cabezas o los espermatozoides reaccionados en el precipitado. Las VH se concentraron por centrifugación a 200,000 xg por 45 min (ver fig. 7), se resuspendieron en el mínimo volumen de solución hipotónica, y se alicuotaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

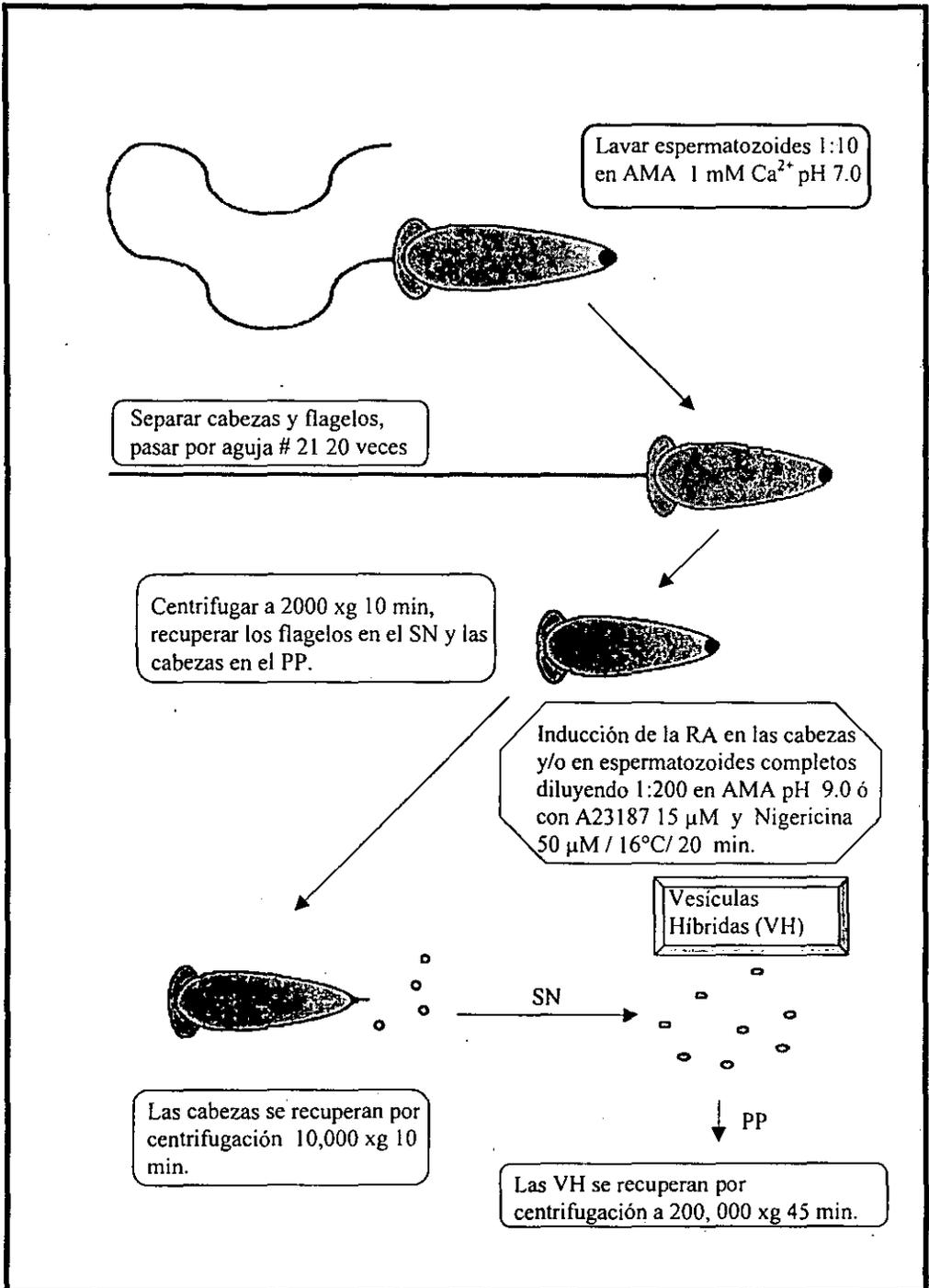


Figura 7. Marcha de preparación de vesículas híbridas (VH) de espermatozoides de erizo de mar como esta reportado en Schulz y *et al.*, 1999.

5 *Preparación de un homogenado total de espermatozoides de erizo de mar.*

Todo el procedimiento se realiza a 4°C. Se resuspendió 1 ml de espermatozoides secos en 20 ml de AMA 1 Ca y se centrifugaron tres veces a 300 xg durante 5 minutos para eliminar los celomocitos. La suspensión de espermatozoides se centrifugó a 3,000 xg durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. Los espermatozoides lavados, se resuspendieron en amortiguador de lisis (Hepes 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Tritón X-100 1%), además de los siguientes inhibidores de proteasas: Leupeptina 10 µM, Pepstatina 1 µM y PMFS 0.1 mM. Esta suspensión se agitó en vortex durante 2 min, se pasó 20 veces por una aguja hipodérmica #21 y se sonicó durante 5 min para romper el DNA. La mezcla de espermatozoides rotos se centrifugó a 16,000 xg 15 min para eliminar células no rotas. El solubilizado total se obtuvo en el sobrenadante, el cual se alicuotó y se guardó a -70°C hasta su uso.

6 *Homogenado de cabezas de espermatozoides manteniendo la integridad de sus acrosomas.*

Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4°C. Para esto se partió de cabezas de espermatozoides aisladas como se describe en el punto 3.1. 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., resultados no publicados). Las cabezas de dichos espermatozoides se resuspendieron en 2 ml de glicerol 2 M, Hepes 10 mM pH 7.0, Leupeptina 10 µM, Pepstatina 1 µM, Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml, EDTA 0.1 mM y DNAsa I tipo IV 2 µg/ml y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se homogenizaron 20 veces (Homogenizador Dounce de vidrio con émbolo A-“Tight”), y se le agregó DTT 1 mM y EGTA 0.1 mM. A la suspensión así obtenida, se le agregó sacarosa para tener una concentración final de 10%, la cual se utilizó para, preparar el gradiente de sacarosa de 10-60% (fig. 8).

7 Obtención del citosol de cabezas de espermatozoides.

Para la obtención del citosol, partimos de cabezas obtenidas como se describió en el punto 3.1, las cuales se rompieron por homogenización en el medio de lisis / inhibidores utilizado preparado en el punto 5 solo que carente del detergente Tritón X-100. El homogenado se centrifugó a 12,000 xg por 10 min, para eliminar el precipitado que contiene cabezas no rotas y núcleos. El sobrenadante que contiene citosol y las membranas se centrifugó a 200,000 xg por 45 min, para recuperar en el sobrenadante el citosol y en el precipitado las membranas.

8 Preparación de membranas totales de flagelo de espermatozoides.

Los flagelos presentes en el último sobrenadante del punto 3.1, se recuperaron por centrifugación a 35,000 xg 40 min. El precipitado que contenía los flagelos (íntactos), se resuspendió por homogenización en 10 ml de solución hipotónica / Inhibidores de proteasas (punto 3. 3), para romperlos. La suspensión de flagelos se ajustó a una concentración final de 10% de sacarosa en Hepes 10 mM / inhibidores de proteasas (punto 3. 3) la cual utilizó para formar un gradiente de 10-60% de sacarosa.

9 Gradiente de sacarosa.

El gradiente de sacarosa se preparó en tubos de 12 ml (para el rotor SW 40) en forma manual a partir de soluciones de sacarosa al 10 y al 60% en Hepes 10 mM pH 7.0 conteniendo inhibidores de proteasas (punto 3. 3). El gradiente se centrifugó a 100,000 xg durante 15-18 horas y al final de la centrifugación se colectaron fracciones de 1 ml de menor a mayor concentración (10%-60%) y se guardaron a - 70°C hasta su uso.

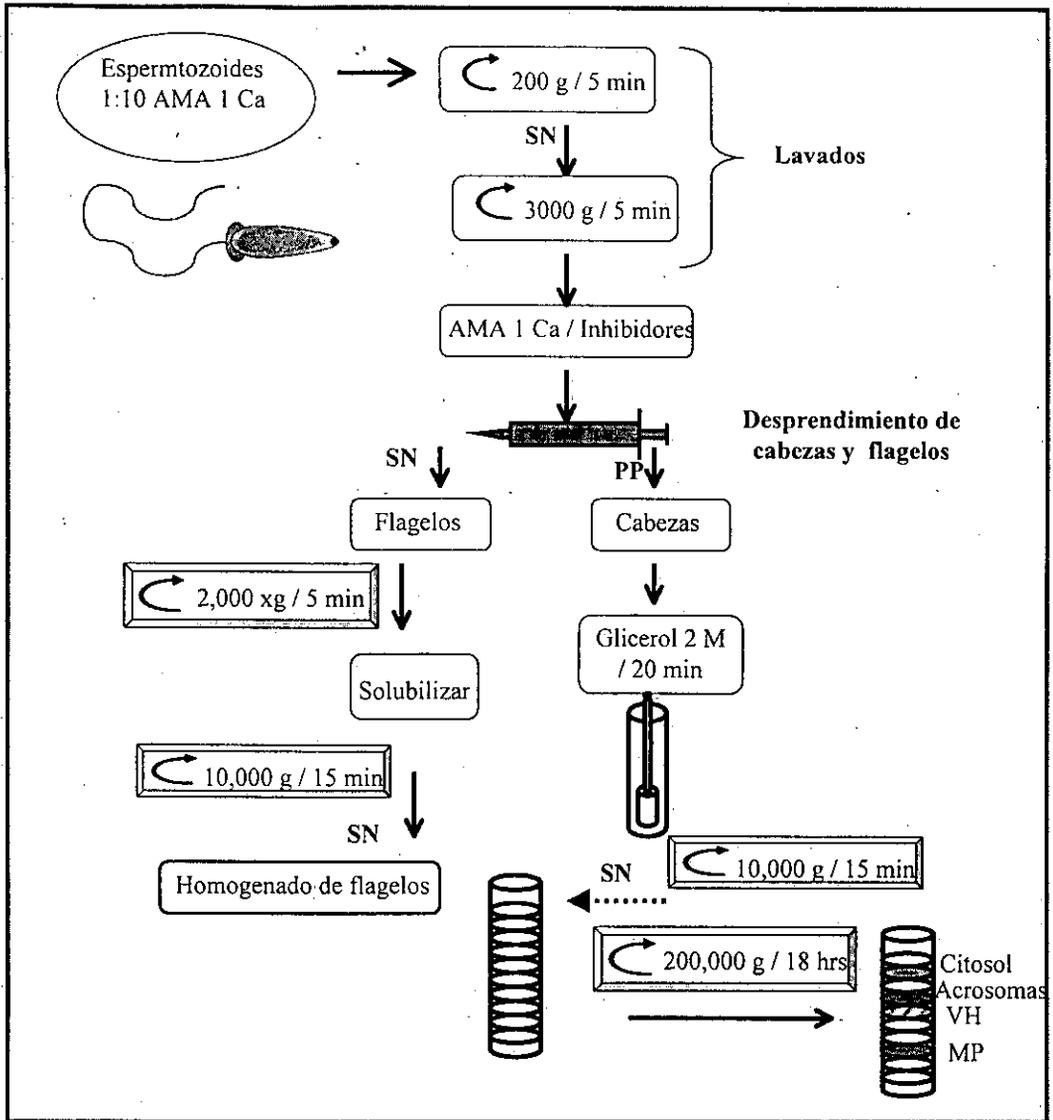


Figura 8. Marcha de preparación de membranas de cabeza, manteniendo la integridad del acrosoma.

AMA (Agua de Mar Artificial): NaCl 486 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 26 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 30 mM, HEPES 10 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.0.

Solución con glicerol: 2 ml de glicerol 2M, HEPES 10 mM pH 7.0, Leupeptina 10 µM,

Pepstatina 1 µM, Inhibidor de Tripsina 1 mg/ml, EDTA 0.1 mM y DNasa I tipo IV 2 µg/ml

Solución para solubilizar: HEPES 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Tritón X-100 1%, Leupeptina 10 µM, Pepstatina 1 µM y PMFS 0.1 mM.

10 Determinación de proteína, por el método de Bradford.

Este método descrito por Bradford (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 que cambia su absorción del rojo a 465 nm al azul con una absorción a 595 nm. Por su parte Compton y Jones (1985) 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%. Se hizo una curva estandar con 1-10 µg de albúmina bovina (BSA) aforados a 20 µl con agua. Al igual que con las muestras problema, se les adicionó 1 ml de dicho reactivo 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 proteínas membranales, las membranas se solubilizaron incubando con el detergente N-hexil-β-D-glucopiranosido al 4% durante 5 minutos (Fanger, 1987) y se continuó con el procedimiento normal descrito arriba.

11 Determinación de Actividad Proteolítica.

11.1 En placas de Leche/Agarosa.

Preparación de las placas:

Se disolvieron 4 gr de leche descremada en polvo (Svelty) en 25 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y se calentó en baño maría a 50° C por 30 min. Se centrifugó a 200 xg por 10 min para eliminar la leche no disuelta y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso. Por otro lado se preparó agarosa al 1% (A- 3643 tipo IV Sigma) en Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Las placas se prepararon mezclando a 50°C, 12 ml de agarosa al 1% con 4

ml de leche al 16% y 8 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0. La mezcla se transfirió a cajas petri para tener aproximadamente 2 mm de espesor y se dejaron solidificar. Posteriormente se hicieron pozos de 5 mm de diámetro y se agregaron de 5-20 μ l de muestra de espermatozoides. La actividad proteolítica se observó como un halo transparente, después de incubar a 37° C durante 12 horas. Los porcentajes de actividad se calcularon midiendo el diámetro del halo transparente formado alrededor del pozo que contenía la muestra.

11.2 En zimogramas (Kleiner *et al.*, 1994).

La zimografía es una técnica electroforética para identificar proteínas con actividad proteolítica. Consiste en separar las proteínas en un gel de poliacrilamida (PA) desnaturante en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), que 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 β -mercaptoetanol. Una ventaja de ésta técnica es que la electroforésis separa específicamente las enzimas, de posibles inhibidores endógenos (Kleiner, *et al.*, 1992; 1994). 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 repliegado de las proteínas a su estado nativo. Se sabe que algunas metaloproteasas se sintetizan como precursores inactivos o zimógenos y se activan por el proceso de desnaturación-renaturalización. Esta característica permite la detección tanto de la forma latente como de la forma activa de picogramos de metaloproteasas ya que ambas migran de manera diferente (Stetler-Stevenson, *et al.*, 1989; Springman, *et al.*, 1990). Posteriormente se incuban en el amortiguador conveniente para la actividad de las proteasas que se están estudiando. En este trabajo las proteínas de diferentes fracciones del espermatozoide se separaron en geles de PA-SDS al 7.5% o al 10% conteniendo gelatina al 0.1 % como sustrato para las proteasas. Al final de la corrida, el gel se incubó con agitación a temperatura ambiente en presencia de Tritón X-100 al 2.5 % durante 60 minutos. Posteriormente dicho gel se transfirió a Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM y Brij 35 al 0.02 % en ausencia o presencia de 10 mM de los inhibidores de metaloproteasas (EDTA, O-

Phe) y se incubó a 37°C por 18 hrs. Al final de la incubación el gel se tiñó con Azul de Comassie R-250 al 0.5% en Metanol 30%, Ac. acético 10 % y se destiñó incubando en la misma solución sin colorante para hacer evidente la actividad proteolítica como bandas no teñidas.

12 Detección de proteínas que unen Zn^{2+} , utilizando zinc radioactivo ($^{65}Zn^{2+}$).

La detección de las proteínas que unen ^{65}Zn en membranas de nitrocelulosa se efectuó según Mazen *et al.*, 1988. Los solubilizados totales y/o diferentes fracciones del espermatozoide, se separaron en un gel de PA-SDS al 7.5%. AL final de la corrida, 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 β -mercaptoetanol. Las proteínas reducidas se transfirieron eléctricamente a una membrana de nitrocelulosa (NC) a 0.5 amp durante 20 min a temperatura ambiente (Towin *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 NC se incubó en 5 ml de amortiguador B (Tris-HCl 10 mM, KCl 0.1 M pH 7.5) conteniendo 1 μ Ci de $^{65}Zn^{2+}$ por 15 min. Al final de la incubación la membrana se lavó dos veces con el mismo amortiguador B por 15 min. La nitrocelulosa se expuso en el cassette del Fosforimager durante 2 días.

13 Tinción con Plata.

La tinción con nitrato de plata se hizo como esta reportado en Cheng, *et al.*, en 1994 y se describe a continuación. Esta técnica es más sensible que la tinción con Azul de Coomassie, ya que nos permite detectar pg de proteína. Después de la electroforésis el gel se incubó secuencialmente en diferentes soluciones para eliminar el SDS: isopropanol al 30% / ac. Acético al 10% durante 60 minutos, isopropanol al 10% por 10 min y 10 minutos más en isopropanol al 5%. Al final de estos lavados el gel se trata con DTT 40 μ M por 30 minutos. Posteriormente el gel se incubó en $AgNO_3$ 0.1% / 30 min, se enjuaga con agua y se revela hasta tinción adecuada (2-5 min) con 100 ml solución reveladora (formaldehído al 0.0185 % / carbonato de sodio al 3%). La reacción se para con Ac. acético al 1%, y para almacenar el gel se enjuaga con agua y se seca entre dos hojas de papel celofán.

Resultados

1. Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica presente en el espermatozoide de erizo de mar.

Sabemos que en el espermatozoide de erizo de mar, la RA involucra la fusión de la membrana plasmática (MP) de la célula con la membrana del gránulo acrosomal, y que algunas metaloproteasas están relacionadas con eventos de fusión de membranas en diferentes sistemas biológicos. En el espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* está descrito que existe una metaloproteasa soluble que tiene como cofactor el zinc, que probablemente participa en la RA (Farach, *et al.*, 1987). En estas células además, existen pequeñas proteínas ricas en cisteína que contienen diversos iones metálicos tales como Zn^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} , llamadas metalotioninas MT (Mr 6 kDa). En otros sistemas las MT's están involucradas en una gran variedad de procesos biológicos; por ejemplo, juegan un papel muy importante en el metabolismo del zinc y del cobre, y protegen a las células del daño causado por los metales tóxicos y los radicales libres (Riek, *et al.*, 1999; Woo, *et al.*, 2000).

Resultados preliminares del laboratorio (Beltrán., comunicación personal), mostraron la presencia de actividad proteolítica a pH 8.0 en la MP de cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pictus*. Dicha actividad fue sensible parcialmente a Pepstatina A (inhibidor de algunas aspartil-proteasas) y PMFS (inhibidor de serín-proteasas), y totalmente a O-Phe (inhibidor de metaloproteasas). El hecho de que la actividad proteolítica sea más sensible a la O-Phe, sugiere que la actividad principal a pH 8.0, se debe a una (s) metaloproteasa (s).

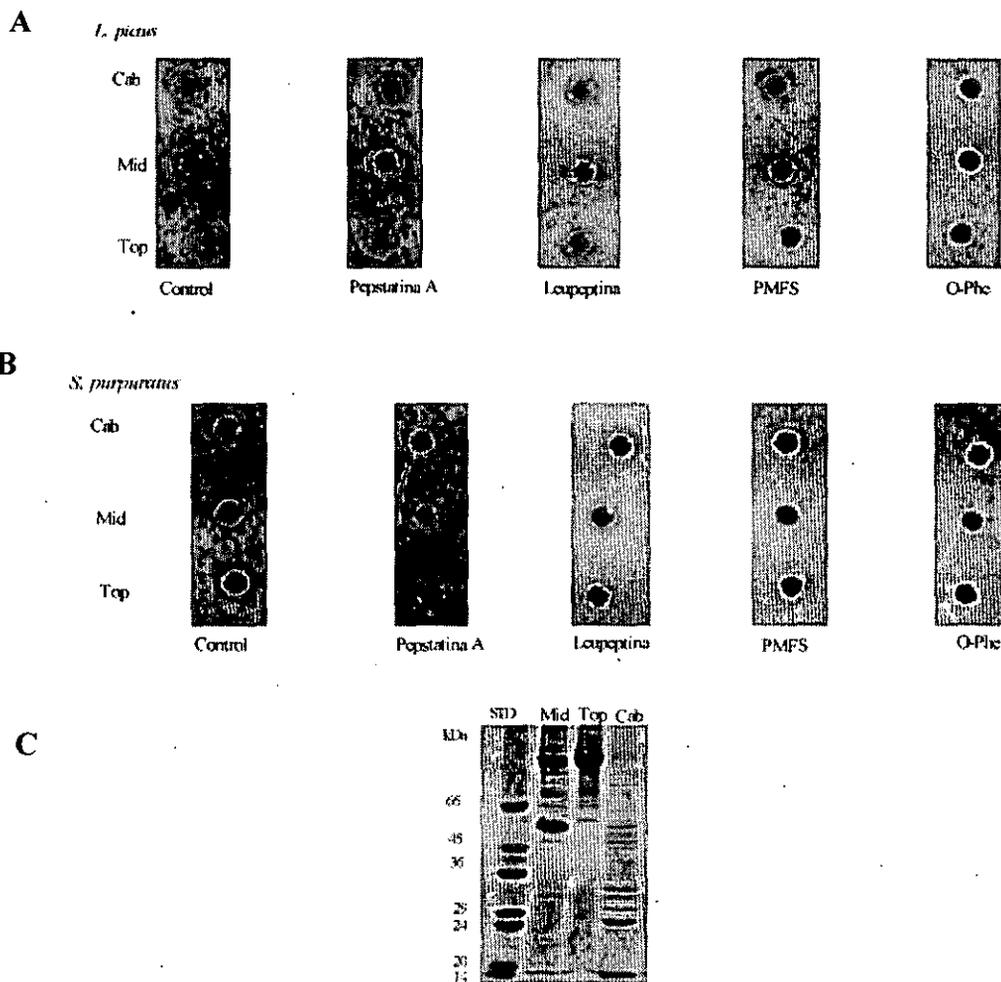


Figura 9. Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica de la membrana plasmática (MP) del espermatozoide de erizo de mar. A) Actividad proteolítica en caja (ver métodos) en la MP del espermatozoide de *Lytechinus pictus* en ausencia o en presencia de inhibidores (Pepstatina A 2 μ M, Leupeptina 100 μ M, PMFS 100 μ M y de O-Phe 1 mM). La actividad se observa como un halo negro que rodea al pozo en el cual se cargaron 20 μ l de muestra (\sim 10 μ g de proteína). B) Actividad proteolítica en MP del espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* en ausencia ó presencia de los diferentes inhibidores de proteasas a las mismas concentraciones que en A. C) Gel de PA-SDS al 10% teñido con Azul de Coomassie. MP de flagelos, Mid y Top (15 μ g de proteína), MP de cabezas (cab 7.4 μ g de proteína) de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y estándares de peso molecular SDS 7-H (Sigma): albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y α -lactoalbúmina (14.2 kDa).

Aunque la posible participación de una metaloproteasa en la RA se encontró en el espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus*, en este trabajo utilizamos como sistema de estudio espermatozoides tanto de *Lytechinus pictus* como de *Strongylocentrotus purpuratus*. Esto es con la idea de hacer un estudio comparativo y detectar alguna posible diferencia especie-específica, además de que cada especie está en su periodo reproductivo sólo durante la mitad del año.

Como un paso inicial para la identificación y localización de las metaloproteasas del espermatozoide de erizo de mar, decidimos investigar la presencia de diferentes tipos de proteasas en solubilizados totales (Sol.) y en la MP de espermatozoides. Con este fin, utilizamos un ensayo de actividad proteolítica en cajas de agarosa con leche como sustrato a pH 8.0. al cual los espermatozoides sufren la RA.

La fig. 9 muestra que la MP de espermatozoides de erizo de mar de ambas especies (*Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus*), tiene asociadas diferentes actividades proteolíticas que se hacen evidentes al exponerlas a distintos inhibidores específicos.

En el caso de espermatozoides de *Lytechinus pictus* (fig. 9 A), se observa que la actividad proteolítica de las membranas tanto de cabeza como de flagelo (Mid y Top), es sensible parcialmente a inhibidores de aspartil-proteasas (Pepstatina A), cisteinil-proteasas (Leupeptina) y serin-proteasas (PMFS), y totalmente a la O-Phe inhibidor de metaloproteasas. La determinación de la actividad proteolítica de membranas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, muestra resultados similares (fig. 9 B), sin embargo en este caso, la actividad es menor comparada con la observada en membranas de espermatozoides de *Lytechinus pictus*. En ambos casos es evidente que la actividad proteolítica más importante es la de metaloproteasa (fig. 9 A y B, O-Phe), confirmando las observaciones preliminares.

El patrón electroforético de las proteínas de la membrana plasmática de flagelos (Mid y Top) y de cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* utilizadas para el ensayo de actividad proteolítica se muestran en la fig. 9 C. La membrana plasmática de espermatozoides de *Lytechinus pictus* presenta un patrón similar (no se muestra).

La Tabla II resume los porcentajes de inhibición logrados por diferentes inhibidores de proteasas en solubilizados totales y en la MP de espermatozoides de *Lytechinus pictus* y de *Strongylocentrotus purpuratus*. Como podemos ver, en solubilizados totales de espermatozoides de ambas especies, existe una sensibilidad parcial a Pepstatina A, Leupeptina y a PMFS, al igual que en el caso de la MP de cabezas y flagelos (fig. 9 y tabla II). Por el contrario, la O-Phe inhibió ~90% la actividad proteolítica, en los solubilizados totales de espermatozoides de las dos especies, en tanto que la inhibición fue total en las diferentes membranas. En general nuestros resultados indican que tanto en la MP del espermatozoide como en el solubilizado total del mismo que incluye todos los componentes intracelulares, la principal actividad se debe a una metaloproteasa.

Tabla II. Efecto de inhibidores de proteasas en la actividad proteolítica de solubilizados totales y de la MP de cabezas (CAB) y flagelos (MID y TOP) de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*.

Fracción	% de Inhibición				
	Control	Pepstatina A n= 4	Leupeptina n= 3	PMFS n= 4	O-Phe n= 3
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>					
Sol. TOTAL	0	34 ± 0.20	26 ± 0.46	32 ± 0.36	90 ± 1.03
CAB	0	25 ± 0.10	30 ± 0.05	34 ± 0.15	100
MID	0	13 ± 0.25	20 ± 0.05	23 ± 0.25	100
TOP	0	30 ± 0.05	23 ± 0.25	30 ± 0.05	100
<i>Lytechinus pictus</i>					
Sol. TOTAL	0	31 ± 0.05	32 ± 0.26	33 ± 0.30	89 ± 1.04
CAB	0	21 ± 0.17	21 ± 0.23	35 ± 0.25	100
MID	0	32 ± 0.26	31 ± 0.25	32 ± 0.25	100
TOP	0	31 ± 0.28	31 ± 0.26	36 ± 0.17	100

Las concentraciones de los diferentes inhibidores son: Pepstatina A 2 µM, Leupeptina 100 µM, PMFS 100 µM y O-Phe 1 mM. Los números representan los porcentajes de inhibición calculados a partir del diámetro del halo formado en cada pozo ± la desviación estandar.

2. Fraccionamiento de la membrana plasmática y del citosol del espermatozoide de erizo de mar en un gradiente de sacarosa.

Una manera de saber a que parte del espermatozoide (membrana plasmática ó citosol, de cabezas ó flagelos) están asociadas las actividades proteolíticas que encontramos, es purificándolas, o bien separando las diferentes fracciones de dichos espermatozoides, en gradientes de sacarosa. En este trabajo purificamos la MP, vesículas híbridas (VH), acrosomas, y el citosol de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, y los fraccionamos en un gradiente de sacarosa de 10-60%. Esto es con la idea de conocer el patrón de distribución de las proteínas de las diferentes partes del espermatozoide, en el gradiente de sacarosa, y por tanto, identificar en experimentos posteriores la localización de la(s) actividad(es) de metaloproteasa (s) detectada en la sección anterior. La figura 10 muestra que aunque las proteínas de las diferentes porciones del espermatozoide están distribuidas en diferentes fracciones del gradiente, cada una de ellas presenta un máximo de proteína en una fracción característica. Así tenemos que el pico de proteína del citosol se localiza en la fracción # 2 (fig. 10 A), de los acrosomas en la fracción # 4 (fig. 10 B), de las VH en la fracción # 5 (fig. 10 C) y de la MP en las fracciones # 6, 7 (fig. 10 D). El mismo patrón de migración se obtiene cuando las vesículas de la MP obtenidas a partir de espermatozoides intactos de ratón marcadas por bitinización, se fraccionaron en un gradiente igual (10-60%), de sacarosa (Beltrán., resultados no publicados).

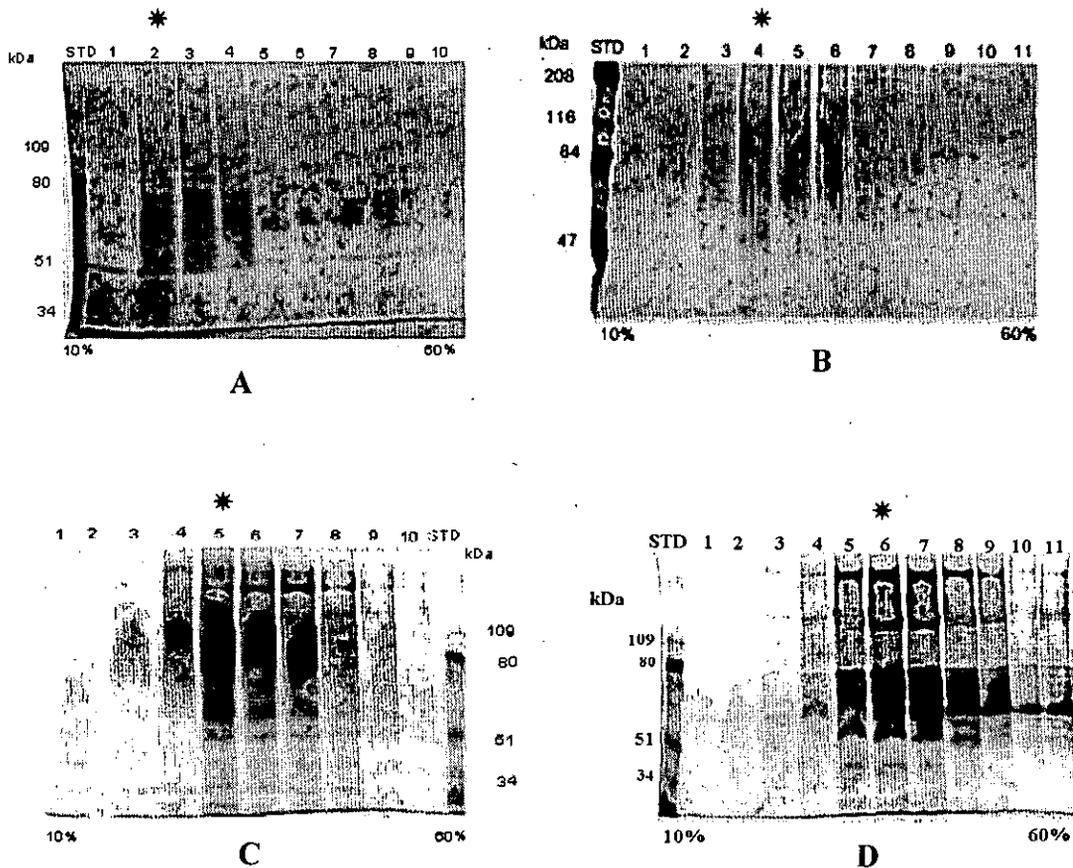


Fig. 10. Distribución de proteínas del citosol, de acrosomas, de VH y de flagelos (Mid) de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* en un gradiente de sacarosa. A) Proteínas del citosol de cabezas, B) Proteínas de acrosomas, C) Proteínas de las VH, D) Proteínas de la MP de flagelos (Mid), fraccionadas en un gradiente de sacarosa 10-60% (indicado en la parte inferior de los geles de PA-SDS al 7.5% teñidos con plata (ver métodos). El gradiente se cargó con 400 μ g de proteínas del citosol (A), 1.023 mg de VH (C) y 1.362 mg de MP de flagelos (Mid, D). En los carriles de los geles se separaron 23 μ l de cada fracción del gradiente (1-11). Las fracciones (*) indican el pico de proteína en el gradiente.

3. *Actividad de metaloproteasa asociada a una proteína en el espermatozoide de erizo de mar.*

Con la idea de determinar si la actividad de metaloproteasa observada en la MP y en los solubilizados totales de espermatozoides está asociada a una o varias proteínas, determinamos la actividad proteolítica de las muestras de espermatozoides en zimogramas.

En este trabajo se purificaron los diferentes componentes del espermatozoide (acrosomas, vesículas híbridas y membrana plasmática ver figs. 6.7 y 8); y los fraccionamos en un gradiente de 10-60% de sacarosa (fig. 10). El patrón de distribución de dichos componentes en el gradiente, servirá como base para saber a que porción del espermatozoide esta asociada una actividad proteolítica detectada en homogenados de cabezas ó de flagelos de dichas células fraccionados en gradientes similares.

3.a *Actividad de metaloproteasa en las cabezas de espermatozoides de Strongylocentrotus purpuratus.*

Como ya mencionamos anteriormente, los espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, contienen una metaloproteasa soluble que tiene como cofactor el Zn^{2+} , que participa en la RA (Farach, *et al.*, 1987). En nuestra sección anterior demostramos que los espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pictus*, poseen diferentes actividades proteolíticas, pero que la más importante es la actividad de metaloproteasas (fig. 9 y Tabla II). Con el fin de identificar a que proteína(s), está asociada(s) la(s) actividad de metaloproteasa detectada en cabezas de espermatozoide, se realizó un zimograma de las fracciones de un gradiente de sacarosa, en el cual se separó un homogenado de cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*. El homogenado de cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, se obtuvo en condiciones que mantienen la integridad del acrosoma del espermatozoide de erizo de mar (fig. 8). La fig. 11 A muestra la distribución de las proteínas de dicho homogenado. En este

caso observamos que el pico principal de proteína se encuentra en las fracciones 2-4 del gradiente.

El zimograma de las fracciones del homogenado de cabeza de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* presenta 2 dobletes principales de actividad (fig. 11 BI) con Mr de ~116, 110 kDa y 80, 77 kDa y un tercer doblete con menos actividad (Mr ~57, 54 kDa); todas ellas se inhiben tanto con O-Phe 10 mM (fig. 11 BII) como con EDTA 10 mM (fig. 11 BIII), lo cual indica que se trata de metaloproteasas. El doblete de actividad de mayor tamaño, tiene el pico principal en las fracciones 2-4 correspondientes al citosol (fracción 2 de fig. 10 A) y a las fracciones enriquecidas en acrosomas (fracciones 3 y 4 de figs. 10 B y 13 A) respectivamente. Por el contrario el doblete de tamaño intermedio (88, 77 kDa), tiene el pico de actividad en las fracciones 6-7 (fig. 11 B) correspondiente al lugar donde migran las vesículas de MP del espermatozoide (fig. 10 D). El doblete de actividad con Mr más pequeña y en menor proporción cuyo máximo vemos en la fracción 4, posiblemente se encuentra asociada a vesículas híbridas (VH). Estas normalmente se forman entre la MP y la membrana acrosomal al inducir la RA en los espermatozoides, y migran en el gradiente de sacarosa (fig. 10 C) en una fracción intermedia entre la fracción enriquecida en acrosomas (fracciones 3, 4; figs. 10 B y 13 A) y el máximo de las vesículas de la MP de dicha célula (fracciones 6-7; figs. 10 D, 12 A y 13 B).

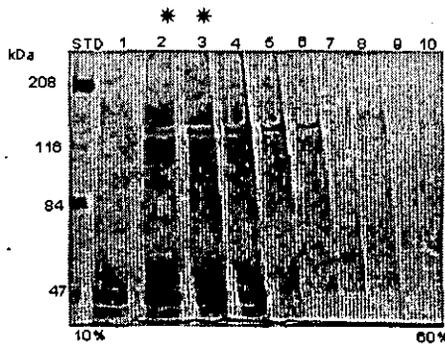
Cabe la posibilidad de que las actividades de metaloproteasa de menor tamaño en los dobletes, sean el producto de la proteólisis parcial de las actividades de mayor tamaño en los mismos, ya que el aumento de actividad de las bandas con menor peso molecular en los dobletes, coincide con el pico de actividad de la banda de mayor Mr en cada doblete. A pesar de que la MP de cabezas de espermatozoides presenta actividad de aspartil-, cisteinil-, y serín-proteasas (fig. 9 y tabla II), éstas no se observan en los zimogramas.

3.b Actividad de metaloproteasa en los flagelos de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*.

De la misma manera se fraccionó un homogenado de flagelos de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* en un gradiente de sacarosa (fig. 12 A). En éste caso podemos ver claramente tres picos principales de proteína. El primero en las fracciones 2,3 que presentan una banda principal a la altura de ~54 kDa muy posiblemente tubulina que se sabe se encuentra en los flagelos; el segundo pico en las fracciones 6,7 del gradiente que corresponde a la MP de flagelo (fig. 10 D), y por último el pico formado por las fracciones 10-12 correspondientes a la base del tubo con la mayor concentración de sacarosa (60%), y que contiene los flagelos no rotos. Los zimogramas de las fracciones de dicho gradiente muestran 4 bandas principales de baja actividad (2 dobletes) con Mr de: 116, 110 y 57, 54 kDa. En este caso la actividad de las dos bandas de mayor peso molecular, se encuentran en las fracciones 3, 4 en una zona donde prácticamente no hay proteína detectable por Azul de Coomassie (fig. 12 A), que corresponde a la zona donde migran los acrosomas del espermatozoide (figs. 10 B y 13 A). El otro par de proteasas con menor Mr (57 y 54 kDa), presentan el pico de actividad en la fracción 5 justamente una fracción más ligera que las fracciones que contienen las vesículas de MP en este gel (fig. 12 A), lo cual sugiere que podrían estar asociadas a las VH (fig. 10 C y 12 BI).

También en este caso el máximo de actividad lo encontramos en una zona donde no hay proteína detectable por Azul de Coomassie. Es importante hacer notar el patrón de distribución de las metaloproteasas del homogenado de flagelos en el gradiente de sacarosa (fig. 12 BI), es muy parecido al que presenta el homogenado de cabezas de espermatozoides de la misma especie (fig. 11 BI). Todas las bandas de actividad corresponden a metaloproteasas ya que son sensibles tanto a O-Phe (fig. 12 BII) como a EDTA (fig. 12 BIII). Como podemos ver, a diferencia de lo que encontramos en la cabeza del espermatozoide, el doblete de actividad proteolítica con Mr de 80 y 77 kDa, no está presente en el flagelo.

A



B

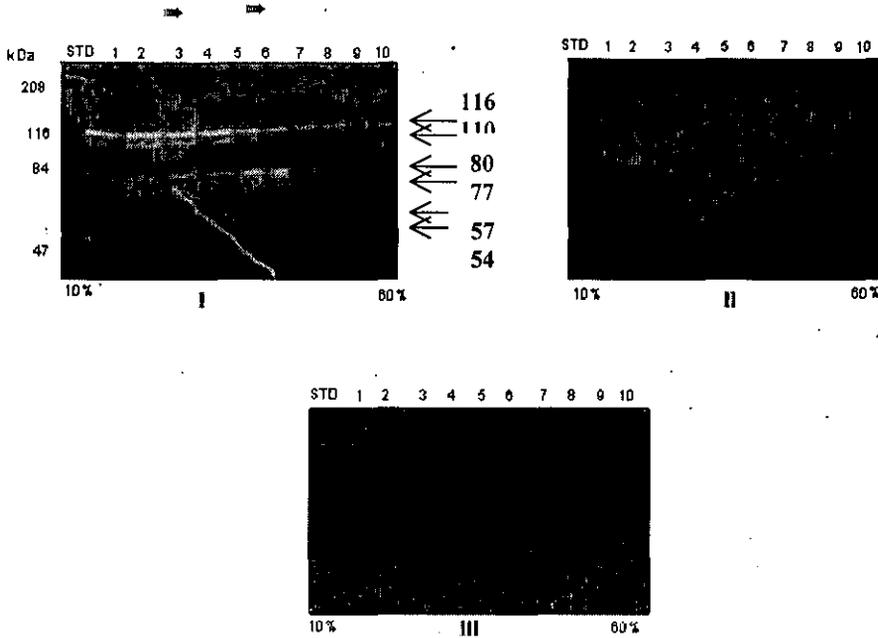
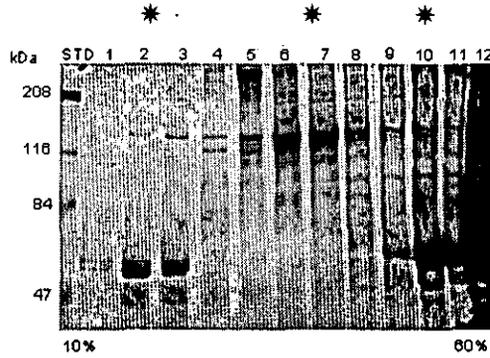


Figura 11. Actividad de metaloproteasas de un homogenado de cabezas de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* separado en un gradiente de sacarosa. Las muestras (23 μ l) de las diferentes fracciones (1-10) del gradiente se corrieron en un gel de PA-SDS al 7.5% conteniendo gelatina como sustrato (B) o no (A). Al final de la corrida (A) ó del desarrollo de la actividad proteolítica (B) los geles se tiñeron con Azul de Coomassie. (B) Desarrollo de actividad proteolítica (ver métodos) en ausencia (I) o en presencia de inhibidores de metaloproteasas (II O-Phe 10 mM ó III EDTA 10 Mm). Los porcentajes indicados en la parte inferior de los geles representan la menor (10%) y mayor (60%) concentración de sacarosa en el gradiente, respectivamente. El homogenado se hizo partiendo de 1.4 ml de espermatozoides. Las fracciones (*) indican el pico de proteína y las flechas, la actividad proteolítica y el pico de actividad proteolítica respectivamente (\rightarrow , \Rightarrow).

A



B

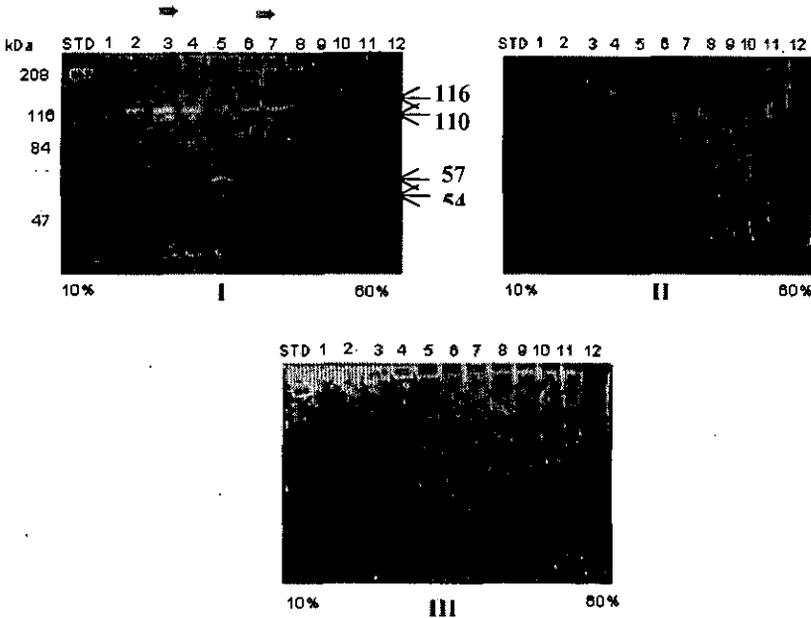


Figura 12. Actividad de metaloproteasas de un homogenado de flagelos de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* fraccionadas en gradiente de sacarosa y separadas en un gel de PA-SDS al 7.5%. A) Distribución de proteínas del flagelo B) Actividad proteolítica en ausencia (I) ó presencia (II O-Phe 10 mM y III EDTA 10 mM) de inhibidores de metaloproteasas. Las condiciones son iguales a las descritas en la fig. 10. Las fracciones (*) indican el pico de proteína y las flechas, la actividad proteolítica y el pico de actividad proteolítica respectivamente (→, ▶).

3.c Actividad de metaloproteasa en las cabezas de espermatozoides de *Lytechinus pictus*.

Aunque la participación de la metaloproteasa dependiente de zinc en la RA se demostró en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, en este trabajo también detectamos actividad de metaloproteasa en espermatozoides de *Lytechinus pictus*. Con la idea de investigar la localización de la actividad de metaloproteasas en espermatozoides de *Lytechinus pictus* (fig. 9 A y Tabla II), al igual que en la otra especie se preparó un homogenado de cabezas en condiciones que mantienen la integridad del acrosoma. El patrón electroforético de las fracciones del gradiente en el cual se separó dicho homogenado, muestra dos picos de proteína (fig. 13 A). El pico principal se encuentra en la fracción No 3, es decir, en una fracción más densa comparada con el lugar donde se obtiene el pico de proteína del citosol de las cabezas de espermatozoides, libre de membranas (fig. 10 A), y corresponde a una fracción enriquecida en acrosomas. El segundo pico con menor concentración de proteína (fracción 7) contiene a la MP (fig. 10 D).

El ensayo de actividad proteolítica en zimogramas (fig. 13 B), muestra 3 bandas que se observan como áreas no teñidas. Una con Mr de ~116 kDa cuyo máximo está en las fracciones 6, 7 y otras dos mayores de 220 kDa con máximos de actividad en las fracciones 2 y 7,8 respectivamente. La incubación del zimograma con quelantes de metales pesados e inhibidores de metaloproteasas como O-Phe (fig. 13 BII) y el EDTA (fig. 13 BIII), mostraron que solo la banda de ~116 kDa, corresponde a una metaloproteasa ya que desaparece incubando con dichos inhibidores.

Aunque la actividad de metaloproteasa se encuentra distribuida a lo largo del gradiente (fig. 13 BI), el pico de actividad se encuentra en las fracciones 6-7 que corresponde al lugar donde migran las vesículas purificadas de membrana plasmática (fig. 10 D). Lo cual sugiere que la metaloproteasa de ~116 kDa, está asociada principalmente a la MP de la cabeza del espermatozoide, aunque también se observa actividad en la fracción 3, enriquecida en acrosomas. Estos resultados indican que la metaloproteasa podría estar interactuando también con la membrana acrosomal del espermatozoide.

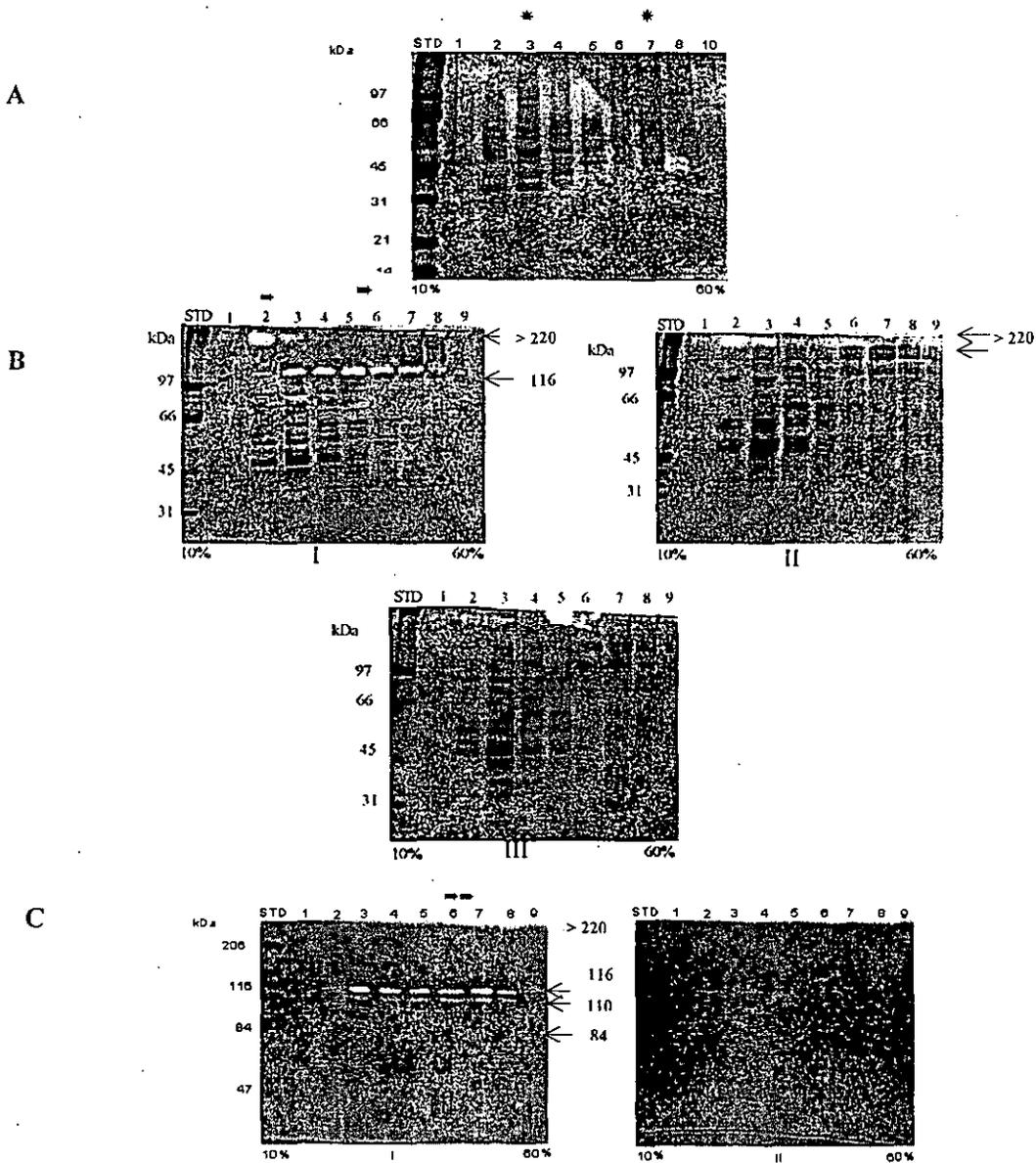


Figura 13. Actividad de metaloproteasas de un homogenado de cabezas de espermatozoides de *Lytechinus pictus* fraccionadas en un gradiente de sacarosa y separadas en un gel de PA-SDS al 10% (A, B). A) Gel teñido con Azul de Coomassie, mostrando la distribución de proteínas de la cabeza del espermatozoide en el gradiente. B) Actividad proteolítica en ausencia (I) ó en presencia de inhibidores de metaloproteasas. (II O-Phe 10 Mm ó III EDTA 10 mM). C) Actividad proteolítica en ausencia (I) y presencia (II) de EDTA 10 mM, de las fracciones del gradiente separadas en geles de PA-SDS al 7.5 %. El homogenado se hizo partiendo de 0.2 ml de espermatozoides y los carriles de los geles se cargaron con 46 μ l de cada fracción del gradiente (1-9). Las fracciones (*) indican los picos de proteína en el gradiente correspondientes a acrosomas (fracc. 3) y a MP (fracc. 7), y las flechas la actividad proteolítica y el pico de actividad de metaloproteasa respectivamente (\leftarrow , \Rightarrow).

Cuando las fracciones del homogenado de cabezas de espermatozoide se separaron en un gel de 7.5% más abierto (fig. 13 CI), se hizo evidente que la actividad de metaloproteasa que en el gel de 10% de PA-SDS (fig. 13 B), se observa como una banda de ~116 kDa, contiene un doblete con Mr de ~116 y 110 kDa. El hecho de que la distribución de la actividad con Mr de ~110 kDa en el gradiente de sacarosa y su sensibilidad a EDTA (fig. 13 CII), sean iguales a la de la actividad de ~ 116 kDa, así como la menor concentración de la primera, sugiere que posiblemente la banda más pequeña (110 kDa) corresponde a una isoforma producida por proteólisis parcial de la metaloproteasa de 116 kDa. En este segundo gel también observamos una tercera banda con muy baja actividad de metaloproteasa con Mr de ~84 kDa distribuida en las fracciones 3-8 (fig. 13 CI), lo cual sugiere que también podría provenir de la actividad de ~116 kDa (fig. 13 BI). La presencia de actividades insensibles a los inhibidores de metaloproteasas (Mr >220 kDa) (fig. 13 B II y III), confirma nuestra observación inicial de serín-, cisteinil- y aspartil-proteasas en condiciones no desnaturalizantes, tanto en el solubilizado total como en la MP de espermatozoides de *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus* (fig. 9 y Tabla II).

El hecho de que en los ensayos de actividad proteolítica en caja no se observara actividad insensible a inhibidores de metaloproteasas en la MP de espermatozoides de ambas especies (fig. 9 y Tabla II), podría deberse a varias razones, entre otras: 1) Que las proteasas se separen de un posible inhibidor endógeno en el zimograma, de tal forma que la actividad de las proteasas diferentes de metaloproteasas se pueda manifestar y 2) Que la zimografía es una técnica muy potente capaz de detectar de 10-120 pg de enzima, lo cual permite evidenciar actividades no detectables por la técnica de determinación de actividad en placa.

3.d Actividad de metaloproteasa en los flagelos de espermatozoides de *Lytechinus pictus*.

Cuando investigamos la localización de las metaloproteasas en los flagelos de espermatozoides de *Lytechinus pictus* (fig. 14 BI), observamos solo una banda con actividad proteolítica con Mr de ~116 kDa. Esta se encuentra principalmente en las fracciones 5-6, lo cual indica que posiblemente está asociada a VH y a MP (fig. 10 C y D y 12 A). También se trata de una metaloproteasa, ya que su actividad se inhibe por los quelantes de metales O-Phe (fig. 14 BII) y EDTA (fig. 14 BIII). Lo anterior sugiere que podría tratarse de la misma metaloproteasa encontrada en las cabezas de espermatozoides de la misma especie que se distribuye a lo largo de la MP. La ausencia de proteína detectable por Azul de Coomassie en la zona de la metaloproteasa así como la poca actividad, nos indica que no se puede descartar la posibilidad de que ésta se deba a contaminación por espermatozoides intactos. La actividad que se observa en la fracción 10 del gradiente (base del tubo), se encuentra asociada a flagelos no rotos. Es importante hacer notar que en este caso no se observa el doblete de actividad que presentan las cabezas de los espermatozoides, posiblemente debido a la poca cantidad de muestra fraccionada en el gradiente.

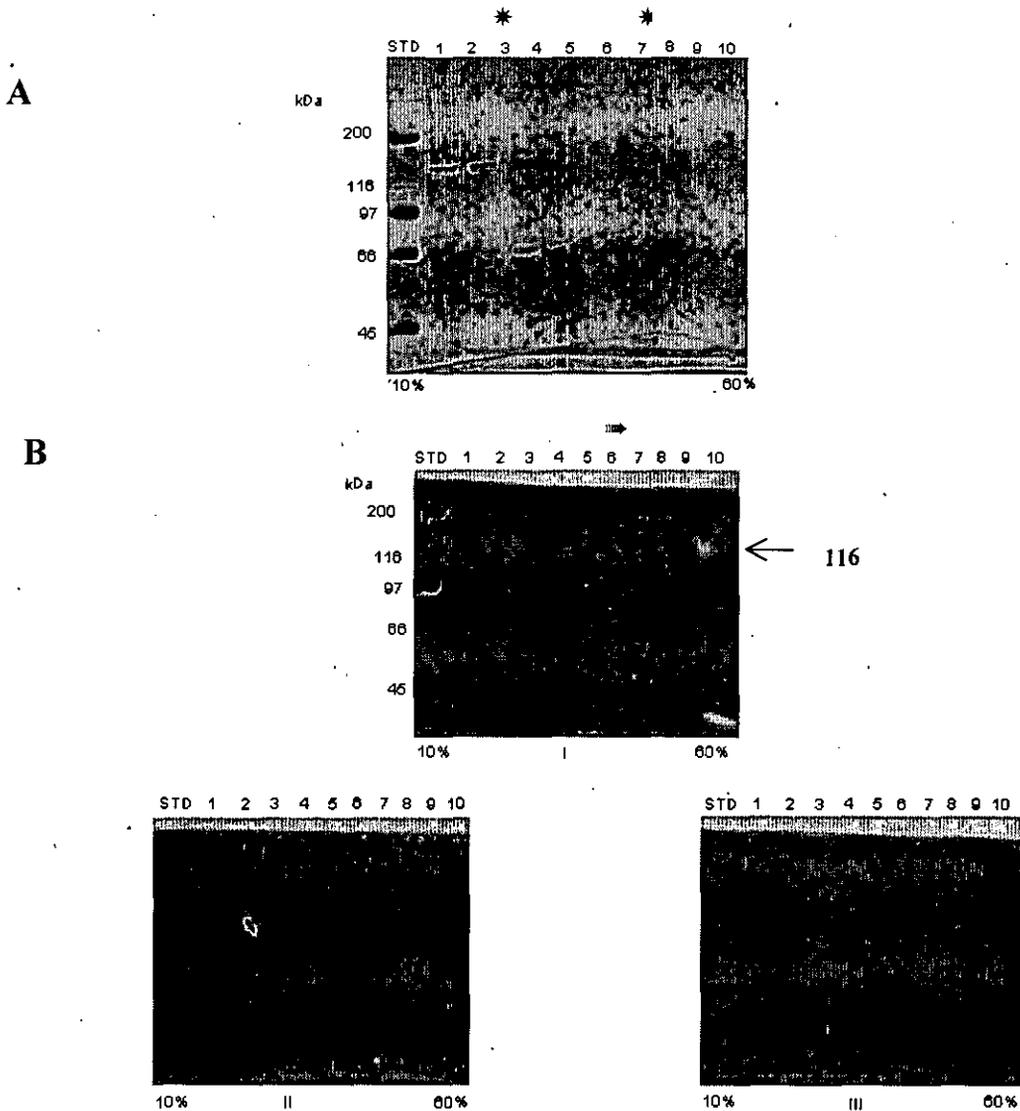


Figura 14. Actividad de metaloproteasas de un homogenado de flagelos de espermatozoides de *Lytechinus pictus* fraccionado en gradiente de sacarosa y separado en un gel de PA-SDS al 7.5%. A) Distribución de proteínas del flagelo (gel teñido con Azul de Coomassie). B) Actividad proteolítica en ausencia (I) ó presencia (II O-Phe 10 mM y III EDTA 10 mM) de inhibidores de metaloproteasas. Las condiciones del gradiente son iguales a las de la fig. 10. Las fracciones (*) indican el pico de proteína y las flechas, la actividad proteolítica y el pico de actividad proteolítica respectivamente (→, ⇨).

La tabla III resume los resultados de los experimentos de actividad de metaloproteasas utilizando zimogramas. Como podemos ver, la distribución de metaloproteasas de las fracciones del homogenado de flagelos del espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* en el zimograma (fig. 12 BI), es igual a la que se obtiene cuando se fracciona un homogenado de cabezas de espermatozoides de la misma especie (fig. 11 BI). Esto junto con el hecho de que la actividad que se obtuvo en flagelos es mucho menor comparada con la que se observa en cabezas (comparar fig. 11 y 12), sugiere que no podemos descartar la posibilidad que la actividad que observamos en flagelos se deba a contaminación por cabezas.

Tabla III. Proteínas del espermatozoide de erizo de mar con actividad de metaloproteasa en solubilizados (Sol.) de cabezas y flagelos de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*.

Fracción del espermatozoide	Proteínas con actividad de metaloproteasa	# de fracción con actividad máxima	Localización	Figura
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>				
Sol. de cabezas	116, 110	2, 3	Citosol (¿acrosomas?)	11
	80, 77	2, 3	Citosol (¿acrosomas?)	11
	57*, 54	5, 6	MP	11
		4	¿VH?	11
Sol. de flagelos	116, 110	3	Citosol (¿acrosomas?)	12
	57*, 54	5, 6	MP (¿VH?)	12
<i>Lytechinus pictus</i>				
Sol. de cabezas	116*, 110, 84*	3	Citosol (¿acrosomas?)	13
		6, 7	MP	13
Sol. de flagelos	116*	5, 6	VH y MP	14

Las proteínas marcadas en ★negritas posiblemente tengan sitio de unión a ⁶⁵Zn (ver tabla IV).

Los resultados en este trabajo muestran que existe actividad de metaloproteasa en el citosol (Mr de 116, 110, 80, 77 kDa) y asociada a la MP (Mr de 80, 87 y 57, 54 kDa) en espermatozoides tanto de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus* y que esta actividad se debe a varias proteínas. En esta última especie aunque la Mr del doblete con actividad de metaloproteasa (116, 110 kDa) es igual a uno de los detectados en *Strongylocentrotus purpuratus*, su distribución se extiende también a la MP además del citosol. Una de estas metaloproteasas podría ser la involucrada en la RA (Farach *et al.*, 1987). Una manera de identificar a cual de las diferentes metaloproteasas corresponde la ya reportada, sería separar las diferentes fracciones del espermatozoide en zimogramas que contengan el sustrato fluorescente que inhibe la RA en los espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*.

4. Proteínas que unen ^{65}Zn en el espermatozoide de erizo de mar.

En 1985 Clapper *et al.*, demostraron que aunque los metales pesados tales como: el Cu^{2+} , el Ni^{2+} y/o el Zn^{2+} pueden estar involucrados en la regulación de la movilidad y de la RA del espermatozoide de erizo de mar, el zinc es el ion que está participando en estos eventos. Ellos encontraron que $0.1 \mu\text{M}$ de zinc induce la RA en espermatozoides de *Lytechinus pictus* en ausencia del factor, que es el inductor natural de dicha RA (Clapper, *et al.*, 1985) aunque en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* el zinc induce los mismos cambios de pH y de permeabilidad, no se logra el disparo de dicha RA (Darszon, *et al.*, resultados no publicados). Lo anterior junto con el hecho de que en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* parece estar participando una metaloproteasa dependiente de zinc en la RA (Farach, *et al.*, 1987), llevó a investigar que proteínas unen zinc en los espermatozoides de ambas especies (*Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus*). Esto es con la idea final de identificar si alguna de las proteínas con actividad de metaloproteasas, presentan sitios de unión a zinc. Como un paso inicial para este fin se determinaron las proteínas que unen ^{65}Zn radioactivo (ver métodos), en solubilizados totales y en la membrana plasmática de espermatozoides. El solubilizado total de espermatozoides de *Lytechinus pictus* (fig. 15 A), muestra 6 proteínas con Mr de 126, 63, 56, 49, 35 y 28 kDa que tienen sitio de unión para ^{65}Zn (fig. 15 B y tabla IV), de las cuales aparentemente dos (Mr de 56 y 49 kDa), se encuentran en la MP de cabezas de las células de ambas especies (Tabla IV).

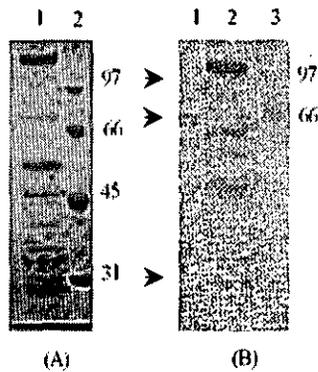


Figura 15. Proteínas que unen ^{65}Zn radioactivo, en un solubilizado total de espermatozoides de *Lytechinus pictus* (ver métodos). A) Gel de PA-SDS al 10% teñido con Azul de Coomassie. 2. Estándares de peso molecular: fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21 kDa). B) 2. Señal de las proteínas que unen zinc en un solubilizado total de espermatozoides. 1 y 3. Estándares de peso molecular (Bio-Rad) que unen zinc (♦): Fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa).

En la MP del flagelo de espermatozoides de erizo de mar de ambas especies detectamos 5 proteínas (tabla IV) que unen ^{65}Zn con igual Mr (200, 140, 130, 115 y 82 kDa), y una sexta con diferente Mr, 61 kDa en el caso de la MP de *Lytechinus pictus* y 56 kDa en el caso de *Strongylocentrotus purpuratus*. La proteína con Mr de ~61 kDa en espermatozoides de *Lytechinus pictus* podría ser la de ~63 kDa detectada en el solubilizado total de espermatozoides de la misma especie.

Tabla IV. Proteínas del espermatozoide de erizo de mar que unen ^{65}Zn en solubilizados totales y en la MP de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pictus*.

Fracción del espermatozoide	Mr de proteínas que unen ^{65}Zn (n=3) en kDa
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	
MP de cabezas	56 y 49
MP flagelos	>200, 140, 130, 115, 82, 56
<i>Lytechinus pictus</i>	
Sol de espermatozoides	126, 63, 56, 49, 35 y 28
MP cabezas	56 y 49
MP flagelos	>200, 140, 130, 115, 82, 61

Las proteínas marcadas en negritas posiblemente correspondan a las identificadas con actividad de metaloproteasa (ver Tabla III).

El análisis de los resultados resumidos en las tablas III y IV, nos muestran que en el caso de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus*, al menos una de las proteínas con actividad de metaloproteasa ($M_r \sim 57$ kDa) podría tener sitio de unión a ^{65}Zn . En los espermatozoides de *Lytechinus pictus*, encontramos dos metaloproteasas (116 y 84 kDa) que podrían tener sitio de unión a zinc. Aunque los solubilizados totales tanto de cabeza como de flagelo de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* presentan actividad de metaloproteasas con M_r iguales desconocemos si estas proteínas también tienen sitio de unión para ^{65}Zn . Posiblemente una de las dos metaloproteasas con sitio de unión para zinc (116, 84 kDa) detectadas en el citosol de *Lytechinus pictus* (fig. 13 y Tabla III), corresponda a la que participa en la RA (Farach, *et al.*, 1987). Los estudios comparativos entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados de ambas especies (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*) nos darán información sobre la posible participación de éstas proteínas en la RA. Dado que las proteínas de las diferentes muestras del espermatozoide se separaron en condiciones no reductoras para los zimogramas, y reductoras para detectar los sitios de unión a ^{65}Zn , no podemos hacer una correlación estricta entre la actividad de metaloproteasa y las proteínas que unen zinc. En este sentido, se realizarán experimentos en los cuales se determinará la unión a zinc en las bandas con actividad de metaloproteasa.

Discusión

El zinc a concentraciones micromolares inicia la RA en ausencia del factor en espermatozoides de *Lytechinus pictus*, produciendo los mismos cambios de permeabilidad, $[Ca^{2+}]_i$ y pH_i que el inductor natural. En espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* ocurren los mismos cambios pero no son suficientes para inducir dicha RA, mediante un mecanismo desconocido (Clapper *et al.*, 1985; Darszon y *et al.*, resultados no publicados). Farach *et al.* (1987) encontraron que un sustrato fluorescente para una metaloproteasa soluble dependiente de zinc, inhibía la RA de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* independientemente de la entrada de Ca^{2+} .

Dado que la RA es un requisito indispensable para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo, consideramos que es importante saber a que nivel de la cascada de eventos que conducen a la RA, está participando dicha metaloproteasa.

Aunque en la RA de espermatozoides de *Lytechinus pictus*, no se ha demostrado la participación de una metaloproteasa, sabemos que en ésta especie el zinc también juega un papel muy importante en el disparo de dicha RA (Clapper *et al.*, 1985).

En este trabajo el ensayo de actividad proteolítica en placa (ver métodos) permitió detectar actividad en solubilizados totales y en la MP de cabezas y flagelos de espermatozoides tanto de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus*. En el caso de *Strongylocentrotus purpuratus* la actividad fue sensible aproximadamente un 20-30% a inhibidores de serín- cistenil- y aspartil- proteasas tanto en solubilizados totales como en la MP de cabezas y flagelos de los espermatozoides. En cambio la sensibilidad al quelante de metales O-Phe fue de 90% en los solubilizados totales y de 100% en la MP del espermatozoide (fig. 9 y Tabla II). Los resultados en espermatozoides de *Lytechinus pictus* fueron similares. Lo anterior indica, que la actividad proteolítica predominante en espermatozoides de erizo de mar corresponde a metaloproteasas. Cuando se realizaron zimogramas para identificar a que proteínas están asociadas las actividades en el homogenado de cabezas y flagelos de *Strongylocentrotus purpuratus*, se encontró solo actividad

sensible a O-Phe y a EDTA, lo cual confirma la predominancia de metaloproteasas. Posiblemente las actividades de aspartil-, serín- y cistenil-proteasas observadas en la MP y en solubilizados totales de los espermatozoides, son más sensibles a las condiciones desnaturalizantes del gel de PA-SDS que se utiliza para el zimograma.

En el caso del homogenado de cabezas de *Lytechinus pictus* (fig. 13), además de las actividades de metaloproteasa detectamos 2 actividades proteolíticas con Mr > 200 kDa que fueron insensibles a los quelantes de metales pesados utilizados en estos ensayos, lo cual corrobora la existencia de otras actividades proteolíticas además de las metaloproteasas.

En espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* detectamos tres dobletes de actividad de metaloproteasa con Mr de: 116, 110; 80, 77 y 57, 54 kDa (ver esquema en fig. 16), todos ellos se encuentran principalmente en la cabeza del espermatozoide (figs. 10, 11 y Tabla III). La distribución de actividades en las fracciones de un gradiente de sacarosa nos muestran que el doblete con las actividades de mayor tamaño (Mr de 116 y 110 kDa) está presente en el citosol. El hecho de que el máximo de actividad de ese doblete se encuentre en las dos fracciones siguientes a la más ligera, sugiere que lo más probable es que dichas actividades estén asociadas a los acrosomas (figs. 11, 12 y Tabla III). El segundo doblete de actividad (Mr de 80, 77 kDa), se encuentra interactuando tanto con los acrosomas como con la MP de la cabeza del espermatozoide. Este doblete de actividades no lo detectamos en flagelo. El doblete de actividad más pequeño (Mr de 57, 54 kDa), lo encontramos asociado a membranas posiblemente de VH formadas por la MP y la membrana acrosomal ya que el pico principal de este doblete de actividades migra justo antes (fracción 4-6 de fig. 11, 12 y Tabla III) de las fracciones que contienen la MP purificada (fig. 10).

En espermatozoides de *Lytechinus pictus* se encontró solo un doblete de actividad de metaloproteasa con Mr de 116 y 110 kDa (esquema en fig. 16), y una tercera metaloproteasa con Mr de 84 kDa. Las tres actividades se encuentran asociadas tanto a acrosomas como a la MP de la cabeza de dicha célula (figs. 12, 13 y Tabla III). El hecho de encontrar el mismo patrón de distribución para las tres metaloproteasas (Mr de 116, 110 y 84 kDa), sugiere que posiblemente las dos más pequeñas son productos de procesamientos de la metaloproteasa más grande (116 kDa).

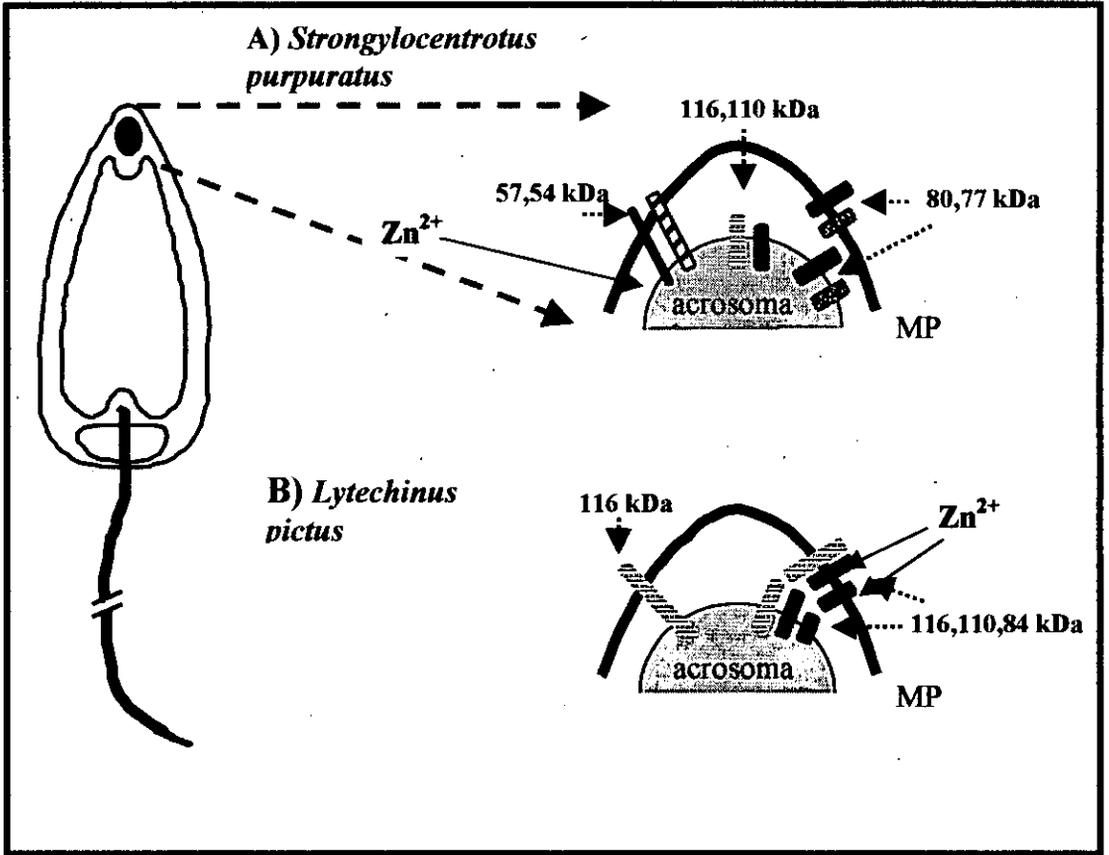


Figura 16. Esquema de la distribución de las metaloproteasas en el espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* (A) y *Lytechinus pictus* (B).

Al fraccionar un homogenado de flagelos en el gradiente de sacarosa, también se encontró la metaloproteasa con Mr de 116 kDa, pero en muy baja concentración comparada con la actividad observada en cabezas. Este hecho junto con el patrón de migración de la metaloproteasa en el gradiente de sacarosa, sugiere que dicha metaloproteasa proviene de las VH de espermatozoides intactos contaminantes en la fracción de flagelos.

Es importante hacer notar que tanto en *Strongylocentrotus purpuratus* como en *Lytechinus pictus* las metaloproteasas identificadas se encuentran en la cabeza del espermatozoide y tienen Mr's idénticas (116 y 110 kDa) ó muy parecidas (80 y 84 kDa en espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pictus* respectivamente). Su purificación y secuenciación nos dirá si se trata de las mismas proteínas y su caracterización nos indicará si estas desempeñan funciones similares en las dos especies.

Dado que la metaloproteasa soluble que participa en la RA de espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* es dependiente de zinc (Farach, *et al.*, 1987), se decidió identificar las proteínas que unen zinc en el espermatozoide de erizo de mar. Los resultados de experimentos de unión a zinc radioactivo mostraron la presencia de diferentes proteínas (Mr de 35 a 200 kDa; ver tabla IV) que unen zinc en los espermatozoides tanto de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus*. De las proteínas que unen zinc, llama la atención una con Mr de 56 kDa (Tabla IV) que podría ser la metaloproteasa con Mr de 57 kDa (Tabla III) detectada en la fracción del gradiente donde migran las VH. Posiblemente está proteína corresponda a la metaloproteasa soluble que participa en la RA (Farach, *et al.*, 1987). Es importante aclarar que dicha metaloproteasa se detectó en el sobrenadante de 100,000 xg de un homogenado de cabezas de espermatozoides almacenado previamente a -80 °C (Farach, *et al.*, 1987), de tal manera que si la metaloproteasa se encuentra débilmente unida a alguna membrana (plasmática ó acrosomal), la pudieron detectar como una proteína soluble. Los estudios de especificidad para el zinc, así como el efecto que el sustrato fluorescente de la metaloproteasa que inhibe la RA (Farach, *et al.*, 1987), ejerza sobre la metaloproteasa de 57 kDa detectada en este trabajo, nos dirán si se trata de la misma.

Las metaloproteasas de 116 y 84 kDa detectadas principalmente en el citosol (posiblemente en los acrosomas) de las cabezas de espermatozoides de *Lytechinus pictus* (Tabla III), que parecen tener sitio de unión a zinc (proteínas de 115 y 82 kDa. Tabla IV), son otros dos candidatos para representar a la metaloproteasa que participa en la RA.

Desafortunadamente no podemos hacer una correlación estricta entre las proteínas con actividad de metaloproteasa y las proteínas que unen zinc, ya que las condiciones experimentales son diferentes. Al realizar los zimogramas nosotros separamos a las proteínas en condiciones no reductoras, mientras que para los experimentos de unión a ^{65}Zn las proteínas se separan en condiciones reductoras. Esto hace que la Mr de algunas proteínas sea diferente.

Es importante saber si las metaloproteasas que identificamos en este trabajo cambian su Mr al separarlas en condiciones no reductoras en los geles desnaturizantes que se utilizaron para los zimogramas, lo cual nos dirá si tienen el mismo tamaño que las proteínas identificadas con sitio de unión a zinc. El estudio de la especificidad de las metaloproteasas a zinc incubando previamente los zimogramas con O-Phe o con EDTA, en presencia de diferentes metales divalentes y analizando cual de ellos es capaz de revertir el efecto de los inhibidores nos ayudará a identificar la(s) metaloproteasa(s) dependientes de zinc. La incubación del zimograma en presencia del sustrato fluorescente que inhibe la RA, será decisivo en la identificación de la metaloproteasa dependiente de zinc que participa en la RA. Los estudios comparativos entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados en las dos especies (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*) nos darán información acerca de si en la RA de *Lytechinus pictus* también participa una metaloproteasa dependiente de zinc. La purificación y secuenciación de estas proteínas nos dará la respuesta definitiva y nos dirá si las metaloproteasas de mayor tamaño en los dobletes, son las precursoras de las más pequeñas que comigran con ellas en el gradiente de sacarosa. Aunque en la RA de los espermatozoides de *Lytechinus pictus* no se ha demostrado la participación de una metaloproteasa dependiente de zinc, es importante recordar que en esta especie dicho metal dispara la RA induciendo los mismos cambios que el inductor natural (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 que conducen a la RA, ya sea activando la metaloproteasa o directamente sobre alguna de las proteínas que participan en el disparo de dicha reacción. La tabla V muestra algunas proteínas presentes en el espermatozoide de erizo de mar, que en otros sistemas son reguladas por zinc. Un blanco para la

metaloproteasa dependiente de zinc puede ser el canal de K^+ sensible a TEA responsable de la hiperpolarización inicial que conduce a la RA (fig. 3). Se sabe que en *Paramecium* la remoción de un dominio inhibitorio de un canal de K^+ mediante proteólisis conduce a una hiperpolarización de la MP (Kubalaski, *et al.*, 1989). Otra posibilidad podría ser la adenilil ciclasa (AC), ya que sabemos que la inducción de la RA tanto natural como de manera artificial ya sea en cabezas o en espermatozoides intactos de erizo de mar, aumenta los niveles de AMPc. Podría ser que como se ha sugerido para la AC de testículo de rata, con la cual comparte varias propiedades, su activación este regulada por una actividad proteolítica (Buck *et al.*, 1999).

Tabla V. Algunas proteínas reguladas por zinc en diferentes sistemas.

Enzima	Sistema	Tipo de modulación
● Adenilil ciclasa	Células del neuroblastoma	Activación
*ATPasa Ca^{2+}	Eritrocitos	Inhibición
♦ATPasa Na^+ / K^+	Organo eléctrico de <i>Electrophorus electricus</i>	Inhibición
▲ Calmodulina	Eritrocitos	Inhibición
□ Canales de K^+	Neuronas de rata	Inactivación
*Guanilil ciclasa	Factor natriuretico atrial	Activación

*Misono S, 1988 ; ● Kumar S, 1975; ♦ Gettelfinger *et al.*, 1978; ▲ Brewer *et al.*, 1979; ⊕ Betteger, W y O'Donell, B., 1981; □ Easaw, J *et al.*, 1999. Las proteínas marcadas en negritas son las que participan de manera importante en la RA del espermatozoide de erizo de mar.

Finalmente no podemos descartar la modulación directa del zinc, sobre algún componente esencial en el disparo de la RA, como: El canal de K^+ sensible a TEA, la AC, la CaM, ó bien el intercambiador Na^+/H^+ (Tabla V). Con respecto a este último ejemplo, sabemos que el zinc induce los mismos cambios de $[Na^+]_i$ y pH_i producidos por el factor y que tanto el EDTA como la O-Phe, inhiben dichos cambios (Rodríguez y Darszon, resultados no publicados).

Como podemos ver es necesario profundizar en el estudio de la metaloproteasa dependiente de zinc que participa en la RA, lo cual aportará aspectos interesantes de la fisiología de esta célula.

Conclusiones

- ❖ En los espermatozoide de erizo de mar de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pictus*:
 - las actividades proteolíticas predominantes son de metaloproteasas y se localizan principalmente en la cabeza.
 - Algunas proteínas unen ^{65}Zn .

- ❖ En el espermatozoide de *Strongylocentrotus purpuratus* detectamos 3 dobletes de actividad de metaloproteasas citosólicas (116-110, 80-87 y 57-54 kDa) posiblemente presentes en acrosomas, y 2 dobletes de actividades unidas a la membrana que pueden estar asociadas a las VH (80-87 y 57-54 kDa). En esta misma especie detectamos 7 proteínas que unen ^{65}Zn , dos de las cuales las encontramos en la cabeza (56 y 47 kDa) y seis en flagelo (200, 140, 130, 115, 82 y 56 kDa). La metaloproteasa que posiblemente es dependiente de zinc tiene una Mr de 57 kDa.

- ❖ En el espermatozoide de *Lytechinus pictus* encontramos 3 proteínas con actividad de metaloproteasa (116, 110 y 84 kDa) tanto unidas a la membrana como también asociadas a acrosomas. También detectamos 8 proteínas que unen ^{65}Zn , seis se encuentran en el flagelo (200, 140, 130, 115, 82, 61 kDa) y dos en la cabeza (56 y 49 kDa). Las metaloproteasas que pueden ser dependientes de zinc son: 116 y 84 kDa.

Perspectivas

I. Dilucidar el mecanismo de la inducción de la RA por Zn^{2+} .

A) Caracterizar las metaloproteasas detectadas en este trabajo.

- ◆ Estudiar su dependencia a iones divalentes, pH y sensibilidad a otros inhibidores.
- ◆ Investigar si la banda de menor Mr en los dobletes de actividad de metaloproteasa en los zimogramas, es un producto de proteólisis parcial de la actividad con mayor Mr.

B) Comparar la(s) actividad(es) de metaloproteasa(s) dependiente(s) de zinc entre espermatozoides reaccionados y control tanto de *Lytechinus pictus* como de *Strongylocentrotus purpuratus* (en los que el Zn^{2+} no dispara la RA).

C) Investigar a qué nivel actúa la proteasa que participa en la RA.

D) Determinar si el Zn^{2+} está actuando en otro sitio, además de sobre una proteasa, para inducir los cambios de permeabilidad que produce.

II. ¿Existe una relación entre la activación de una metaloproteasa y los aumentos en los niveles de AMPc durante la RA?

Bibliografía

- Alberts, B., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts. y J. Watson. 1990. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Nueva York. USA.
- Andrews, J. C., P. J. Nolan, H. R. Hammerstedt, y D. B. Bavister. 1994. Role of Zinc Hamster Sperm Capacitation. *Biol of Reprod.* 51: 1238-1247.
- Andrews, J. C., P. J. Nolan, H. R., Hammerstedt, D. B. Bavister. 1995. Characterization of N-(6-Methoxy-8-Quinoly)-p-Toluenesulfonamide for the detection of zinc in living sperm cells. *Cytometry.* 21: 153-159.
- Aonuma, S., M. Okabe, y M. Kawaguchi. 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.* 37:279-292.
- Barnes, R.D. 1989. *Zoología de los Invertebrados*. Nueva Editorial Interamericana. México. 957 p
- Berg, J. y Y. Shi. 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science.* 271: 1081-1085.
- Bettger, W.J. y B.L. O'Donell. 1981. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 28: 1425.
- Beynon, R.J. y J.S. Bond.,1981. *Proteolytic enzymes a practical approach*. IRL PRESS at Oxford University Press. England.
- 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: 248-54.
- Brewer, G.J., J.C. Aster, C..A. Knutsen, y W.C. Kruckeberg. 1979. Zinc inhibition of calmodulin: A proposed molecular mechanism of zinc action on cellular functions. *Am J Hematol.* 7: 53-60.
- Buck, J., M. L. Sinclair., L. Schapal., M. J. Cann y L. R. Levin. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 79-84.
- Castellano, L.E. 1993. Inducción de la reacción acrosomal del espermatozoide de erizo de mar mediante un sistema de célula permeabilizada. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato, Facultad de Ciencias Bioquímicas. México. 72 pp.

- Cha, J., M.V. Pedersen, y D.S. Auld. 1996. Metal and pH dependence of Heptapeptide Catalysis by Human Matrilysin. *Biochemistry*. **35**: 15831-15838.
- Cheng, A., T. Lee, M. Palacios, L. H. Bookbinder, P. M. Wassarman, F. Suzuki, y J. D. Bleil. 1994. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56 a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol*. **125**:867-878.
- Chvapil, M. 1973. New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci*. **13**: 1041-1049.
- Clapper, D., J. Davis, P. Lamothe, C. Patton, y D. Epel. 1985. Involvement of zinc in the regulation of pHi motility, and acrosome reaction in sea urchin sperm. *J Cell Biology*. **100**: 1817 - 1824.
- Coleman, J.E. 1998. Zinc Enzymes. *Curr Opinion in Cheml Biol*. **2**: 222 - 234.
- Compton, S. J. y C. G. Jones. 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. México. 75 pp.
- Darszon, A. y M. Gould-Somero. 1982. Fecundación. *Ciencia*. **33**: 17- 27.
- Darszon, A., P. Labarca, C. Beltrán, J. García-Soto y A. Liévano. 1994. Sea urchin sperm: an ion channel reconstitution study case. *Methods*. **6**: 37-50.
- Darszon, A., A.Liévano, y C. Beltrán. 1996. Ion Channels: Key Elements in Gamete Signaling. *Curr Topics Dev Biol*. **34**: 117 -165.
- Darszon, A., P. Labarca, T. Nishigaki y F. Espinosa. 1999. Ion Channels In Sperm Physiology. *Physiol Rev*. **79**: 481-510.
- Delgado, N.M., A. Carranco, H. Merchant y R. Reyes. 1985. Effect of divalent ions in acrosome reraction induced by glycosamineglycans in porcine spermatozoa. *Arch Androl*. **14**: 193-198.
- Easaw, J.C., B.S. Jassar, K.H. Harris y J.H. Jhamandas. 1999. Zinc modulation of ionic currents in the horizontal limb of the diagonal band of Broca. *Neuroscience*. **94**: 785-795.
- Fanger, B.O. 1987. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal. Biochem*. **162**: 11-17.
- Farach, H. A. jr., D. I. Mundry, W. J. Strittmatter y W. J. Lennarz. 1987. Evidence for the Involvement of Metalloproteases in the Acrosome Reaction in Sea Urchin Sperm. *J Biol Chem*. **262**: 5483 - 5487.

- Favier, A. E. 1992. The role of zinc in reproduction. *Biol Trace Elem Res.* **32**:363-382.
- Feitosa, L., W. Gremski, 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.
- García-Soto, J., M. Y Darszon, A. 1985. High pH-induce acrosome reaction an Ca^{2+} uptake in sea urchin sperm suspended in Na^+ -free seawater. *Dev Biol.* **110**: 338-345.
- García-Soto, J., M. Mourelle, I. Vargas, L. de la Torre, E. Ramírez, A.M. López-Colomé y A. Darszon. 1988. Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced in Ca^{2+} and Na^+ uptake. *Biochim. Biophys Acta.* **944**: 1-12.
- García-Soto, J., L.M. Araiza, M. Barrios, A. Darszon y J.P. Luna-Arias. 1991. Endogenous activity of cyclic nucleotide-dependent protein kinase in plasma membranes isolated from *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* **180**: 1436 - 45.
- Gettelfinger, D.M y G.J. Siegel. 1978. Irreversible zinc ion inhibition of (Na^+ - K^+)-adenosinetriphosphatase, Na^+ -phosphorilation and K^+ -p-nitrophenylphosphatase of *Electrophorus electricus* electroplax. *J Neurochem.* **31**: 1231-1237.
- González-Martínez, M.T. y A.Darszon. 1987. A fast hyperpolarization occurs during the sea urchin acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Let.* **218**: 247-250.
- González-Martínez, M.T., A. Guerrero, E. Morales, L. De la Torre y A. Darszon. 1992. A depolarization can trigger Ca^{2+} uptake and acrosome reaction when proceded by hiperpolarization in *Lytechinus pictus* sea urchin sperm. *Dev Biol.* **150**: 193-202.
- Graham, J. M. 1993. Isolation of mitochondria, mitochondrial membranes, lysosomes, peroxisomes, and Golgi membranes from rat liver. *Methods Mol Biol.* **19**:29-40
- Harris, E.L.V. y S. Angal. 1989. *Protein Purification methods.* IRL PRESS at Oxford University Press. England. 232 - 235.
- Hidiroglou, M. y J.E. Knipfel. 1982. Zinc in Mammalian Sperm: a Review. *J. Dairy. Sci.* **68**: 1147- 1156.
- Higaki, J.N., R.J. Fletterick y C.S. Craik. 1992. Engineered metalloregulation in enzymes. *TIBS.* **17**: 100-104.

- Hoshi, M y T. Moriya. 1980. Arylsulfatasa of sea urchin sperm. 2. Arylsulfatasa as a lysin of sea urchins. *Dev. Biol.* 74: 343-350.
- Huang, F.T. 1998. What have snakes taught us about integrins?. *Cell. Mol. Life. Sci.* 54: 527-540.
- 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 a 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 D. Epel. 1983. Heavy Metal Chelators Prolong Motility and Viability of Sea Urchin Sperm by Inhibiting Spontaneous Acrosome Reactions. *J Exp Zool.* 226: 431-440.
- Khan, A.R. y M.N.G. James. 1998. Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Prot Sci.* 7: 815-836.
- Kay, E. y B. Shapiro. 1985. The formation membrane of sea urchin egg. *Biol. Fert.* 56-79.
- Kleiner, D.E. y W. Stetler-Stevenson. 1994. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Anal Biochem.* 218: 325 - 329.
- Kleiner, D.E., E.J. Unsworth, H.C. Krutzsch y W. Stetler-Stevenson. 1992. Higer-order complex formation between the 72-kilodalton type IV collagenase and tissue inhibitor of metaloproteinases-2. *Biochemistry.* 31: 1665-1672.
- Kohno, N., K. Yamagata, S. Yamada, S. Kashiwabara, Y. Sakai y T. Baba. 1998. Two novel testicular serine proteases, *tesp1* y *tesp2*, are present in the mouse sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 245: 658-665.
- Kubalaski, A., B. Martinac y Y. Saimi. 1989. Proteolytic activation of a hyperpolarization- and calcium-dependent potassium channel in Paramecium. *J Membr Biol.* 112: 91-6.
- Kumar, S., G. Becker, y K.N. Prasad. 1975. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate phosphodiesterase activity in malignant and cyclic 3'5'-monophosphate-induced "diferentiated" neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 35: 82-87.
- Laemmli, M. K. 1970. *Nature.* 227: 680 - 685.
- Lee, H.C.H., C. Johnson y D. Epel. 1983. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol.* 95: 31-45.

- Liévano, A., E.C.Vega-Saenz de Miera y A. Darszon. 1990. Ca²⁺ channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95: 273-296.
- Liévano, A., C. Beltrán y A. Darszon. 1994. El espermatozoide como célula excitable. *Ciencia y Desarrollo.* 50-57.
- Longo, F. y E. Anderson. 1969. Sperm differentiation in the sea urchin *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Ultrastruct. Res.* 27:486 - 509.
- Martin, A.W., C. Lutwak-Mann, E.A. McIntosh, y T. Mann. 1973. Zinc in the spermatozoa of giant octopus *Octopus dofleini martini*. *Comp Biochem Physiol.* 45. 227-233.
- Mazen, A., G. Gradwohl, y G. De Murcia, 1988. Zinc - Binding Proteins Detected by Protein Blotting. *Anal. Biochem.* 172: 39 - 42.
- Meizel, S. 1985. Molecules that initiate or help stimulate mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174: 285-302.
- Misono, K.S. 1988. Acidic pH-and metal ion (Zn⁺⁺ or Mn⁺⁺)-dependent proteolysis of 140 kDa atrial natriuretic factor receptor in bovine adrenal cortex plasma membranes: evidence for membrane-bound acidic metalloendopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 152: 658-667.
- Moreau, T. y H. Choplin. 1999. *Prolysis*. Laboratory of Enzymology and Protein Chemistry, University of Francois Rebelais, Tours. Francia.
- Morisawa, M. 1994. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool Sci.* 11: 647-662.
- 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: 41-46.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. y Ullrich, A. 1999. EGF-receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 402: 883-887.
- Prestidge, L., Gage, V. y Spizizen, J. 1971. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 107: 815-823.
- Riek, R., Prêcheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Güntert, P., Aizhuo, L., Kägi, J. H. R. y Wüthrich, K. 1999. NMR structure of sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol.* 291:417-28.

- Rodríguez, E. 1996. Inhibición de la Reacción Acrosomal por el rojo de rutenio en el espermatozoide de erizo de mar. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 43 pp.
- Rodríguez, E. y Darszon A. Resultados no publicados.
- Roe, J.L., Farach, A., Strittmatter, W., Lennarz, W.J. 1988. Evidence for Involvement of Metalloendoproteases in a Step in Sea Urchin Gamete Fusion. *J Cell Biol.* **107**: 539-544.
- Ruiz, D. M. F. 1988. Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. *Universidad Nacional Autónoma de México.* 370.
- Sansone, G., Martino, M. y Abrescia, P. 1991. Binding of free and protein associated zinc to rat spermatozoa. *Comp. 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.
- Schackman, R.W., Eddy, E.M. y Shapiro, B.M. 1978. The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirements and movements. *Dev. Biol.* **65**: 483-495.
- SeGall, G. y Lennarz, W. 1977. Chemical characterization of component of jelly coat from sea urchin egg responsible for the induction of acrosome reaction. *Dev. Biol.* **71**: 33-48.
- SeGall, G. y Lennarz, W. 1981. Jelly coat and induction of acrosome reaction in echinoid sperm. *Dev. Biol.* **86**: 87-93.
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H. y Van Wart, H.E. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys⁷³ active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 364-368.
- Stetler-Stevenson, W.G., Krutzsch, H.C., Wachter, M.P., Margulies, I.M.K. y Liotta, L.A. 1989. The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem.* **264**: 1353-1356.
- Schulz, J. R., Sasaki, J. D y Vacquier, V. D. 1999. 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.
- Taylor, A. 1953. Prolongation of life span of sea urchin spermatozoa, and improvement of the fertilization reaction, by treatment of spermatozoa and eggs with metal chelating agents. *Biol Bull.* **104**: 224-239.

- Togo, T. y Morisawa, M. 1997. Aminopeptidase-like protease released from oocytes affects oocyte surfaces and suppresses the acrosome reaction in establishment of polyspermy block in oocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Biol.* **182**: 219-227.
- Toulsiani, 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., Staehelin, 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.
- Trimmer, J.S. Trowbridge, I. y Vacquier, V. 1985. Monoclonal antibody to a membrane glycoprotein inhibits the acrosome reaction and associated Ca^{2+} and H^+ fluxes of sea urchin sperm. *Cell.* **40**: 697 - 703.
- Vacquier, V.D. y Moy, G.W. 1977. Isolation of binding: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 2456 - 2460.
- Vacquier, V.D. 1986. Activation of sea urchin spermatozoa during fertilization. *TIBS.* **11**: 77-81.
- Vallee, B.L. y Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**: 79-117.
- 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. USA.* **80**: 5578-5582.
- Ward CR, Storey BT. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* **104**: 287-96.
- Ward, C.R. y Kopf, G. 1993. Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* **158**: 9-34.
- Woo, E. S., Dellapiazza, D., Wang, A. S y Lazo, J. S. 2000. Energy-dependent nuclear binding dictates metallotionein localization. *J Cell Physiol.* **182**: 69-76.
- Yanagamichi, R. 1988. *Mammalian fertilization, en the Physiology of Reproduction.* Raven Press N.Y. 135-185.
- Young, L. G y Nelson, L. 1974. Calcium ions and control of the motility of sea urchin spermatozoa. *J Reprod Fertil.* **41**: 371-378.