

UCH-FC  
MAG-B  
R586

**PARTICIPACION DE ENZIMAS DEL ESPERMATOZOIDE DE**  
*Rhynchocinetes typus*  
**EN LA FECUNDACION**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas  
con mención en Biología Celular

Facultad de Ciencias

por

**Marina Judith Ríos Bravo**

Director de Tesis: Dr. Claudio Barros

Septiembre, 1993

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por la candidata:

MARINA JUDITH RIOS BRAVO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular.

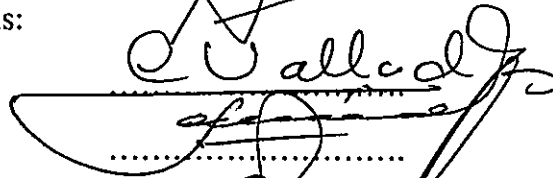
Tutor:

Dr. Claudio Barros

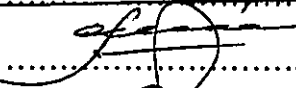


Comisión Informante de Tesis:

Dr. Luis Valladares



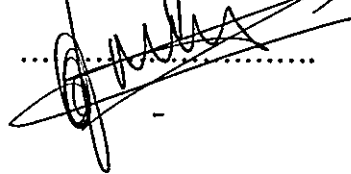
Dr. Juan Fernández



Dr. Eduardo Bustos



Dr. Miguel Llanos



Esta Tesis fue realizada en el  
Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

*A mis papás,  
de quienes aprendí a  
amar.*

*El Señor es mi Pastor;*

*nada me faltará.*

*(Salmo 23).*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. Claudio Barros quien me permitió trabajar en su laboratorio y de quien recibí no sólo ayuda para esta Tesis sino fundamentalmente grandes enseñanzas para mi formación profesional y humana.

Deseo expresar mi eterna gratitud a mis queridos papás y hermanos, en cuyo amor siempre he encontrado valor y comprensión. Quiero agradecer a Fabián y a nuestro pequeño Fabito Andrés el constituir mi cálido y amado refugio y el lugar al cual siempre ansío llegar. Deseo también expresar mis agradecimientos a todas las personas que generosamente colaboraron con la realización de esta Tesis, particularmente:

A Martha Valdivia por su valiosísima ayuda y apoyo.

A mis amigos del Laboratorio de Embriología: Patricia González, Jaime Meléndez, Javier A. Crosby, Enrique Dupré, Claudio Pérez y Don Pedro Cortés por su desinteresada contribución.

Al Dr. Alfredo De Ioannes y a mis amigas del Laboratorio de Inmunología: Jacqueline Cortés, Teresa Sillerico y Andrea Giacaman por su ayuda técnica y sus oportunos consejos.

Al Dr. Patricio Morales y a su grupo de trabajo por su valiosa cooperación.

Al Dr. Jorge Arrau y a los miembros del Laboratorio de Embriología de la Universidad de Valparaíso por colaborar en la recolección de las muestras y permitirme el uso de su laboratorio.

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile y fue financiada por el Proyecto 749-91 de FONDECYT, el Proyecto de la Fundación Rockefeller GA PS 92/32 y la Beca DIUC, que agradezco especialmente.

## INDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	i
SALMO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE MATERIAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	9
MATERIALES Y METODOS	10
RESULTADOS	16
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	29
FIGURAS	30
TABLA	42
REFERENCIAS	44



## Resumen

El espermatozoide del Crustáceo Decápodo *Rhynchocinetes typus* es atípico ya que carece de cabeza y cola y además es inmóvil. Presenta un cuerpo y un proceso acicular rígido y no se ha reconocido un acrosoma. Durante la interacción gamética no se ha observado figuras excitóticas que pudieran asociarse con una reacción acrosómica. El espermatozoide ejerce, sin embargo, un efecto lítico sobre las cubiertas extracelulares del ovocito formando un canal a través de ellas. La aparente contradicción entre la ausencia de acrosoma y la existencia de un efecto lítico de las cubiertas ovocitarias por parte del espermatozoide, nos ha motivado a estudiar la posible existencia de enzimas de origen espermático vinculadas a la fecundación de esta especie de crustáceo.

En este estudio se encontró que la fecundación *in vitro* de ovocitos maduros se inhibió al preincubar los espermatozoides con los inhibidores de tripsina SBTI (inhibidor de la tripsina del poroto de soya), PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro) o pAB (p-aminobenzamidina).

Al analizar extractos crudos de espermatozoides en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina se observó una actividad proteásica que se inhibió con SBTI y pAB. Estos resultados apoyan la hipótesis que durante la fecundación del crustáceo decápodo *R. typus*, la penetración del espermatozoide por las cubiertas ovocitarias es mediada por una enzima tipo-tripsina de origen espermático.

## Abstract

The spermatozoon of the Decapod Crustacean *Rhynchocinetes typus* is atypical as it is non motile, lacking head and tail. The sperm has a body and a rigid spike. Neither a structure like the acrosome nor morphological changes during gamete interaction which could be interpreted as an acrosome reaction have been recognized in this species. Nonetheless, the spermatozoon exerts a lytic effect on the egg extracellular coats and in this way it penetrates the oocyte surface forming a channel through the egg coats. The apparent contradiction between absence of acrosome and lytic effect on the egg coats by the spermatozoon is our motivation for studying the presence of sperm enzymes in *R. typus*.

In this study we found that *in vitro* fertilization was inhibited by spermatozoon preincubation with the trypsin inhibitors SBTI (soybean trypsin inhibitor), PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride) or pAB (p-aminobenzamidine).

Analysis of crude spermatozoa extracts in polyacrylamide-gelatine gels revealed proteasic activity completely inhibited with SBTI and pAB. These results support the hypothesis that during fertilization in the Decapod Crustacean *R. typus* sperm penetration through the egg coats is aided by a sperm trypsin like enzyme.

## INTRODUCCION

El paso de los espermatozoides a través de las cubiertas extracelulares de los ovocitos es una etapa importante de la fecundación; el primer espermatozoide que completa este proceso y establece contacto con la membrana plasmática del ovocito corresponde al espermatozoide fecundador. El mecanismo de entrada de los espermatozoides por las cubiertas ovocitarias está asociado a la actividad de enzimas de origen espermático que degradan localmente los componentes de éstas. Dichas enzimas están contenidas en el acrosoma, una vesícula localizada en la cabeza del espermatozoide, y son liberadas como resultado de la exocitosis acrosomal en un proceso que se conoce como reacción del acrosoma (Austin & Bishop, 1958 a,b; Barros y cols., 1967; Levine y cols., 1978; Barros y cols., 1992). La reacción acrosómica es un requisito para la fecundación en todas aquellas especies cuyos espermatozoides poseen acrosoma. Tanto en los espermatozoides de mamíferos, como en los de equinodermos, la reacción acrosómica es gatillada por el contacto del espermatozoide con alguna cubierta ovocitaria: la zona pelúcida en mamíferos (Franklin y cols., 1970; Bleil & Wassarman, 1983) y la cubierta de gelatina en equinodermos (SeGall & Lennarz, 1979).

Después que se ha producido la reacción acrosómica, las enzimas acrosomales liberadas ejercerían su acción lítica sobre las cubiertas ovocitarias permitiendo la entrada del espermatozoide. En los espermatozoides de mamíferos, el principal componente acrosomal es la enzima tipo-tripsina denominada acrosina. La participación de acrosina en la fecundación se ha propuesto en base a que una variedad de inhibidores para tripsina es capaz de inhibir la fecundación de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Stambaugh y

cols., 1969; Zaneveld y cols., 1971; Miyamoto & Chang, 1973; Battacharyya y cols., 1979; De Ioannes y cols., 1990). La hipótesis de la directa asociación de acrosina con este proceso se reforzaría con el hallazgo de la significativa inhibición de la fecundación *in vitro* que se obtiene al inseminar ovocitos de hamster con espermatozoides pretratados con anticuerpos monoclonales anti-acrosina (De Ioannes y cols., 1990). Debido a que la zona pelúcida es el sustrato natural de acrosina (Urch y cols., 1985), se ha sugerido que la penetración del espermatozoide por esta cubierta ovocitaria estaría asociada a su degradación por causa de la actividad enzimática de la acrosina.

La posible participación de acrosina en la penetración del espermatozoide de mamífero por la zona pelúcida es apoyada por el conjunto de evidencias aportadas por Kuzan y cols. (1984) y por Valdivia y cols. (1993). Los primeros autores han mostrado que los espermatozoides perivitelinos de conejo tienen la capacidad de refecundar ovocitos frescos (Kuzan y cols., 1984), y Valdivia y cols. (1993) han encontrado acrosina en un 25% de ellos. Esta detección de acrosina utilizando la técnica inmunocitoquímica del oro coloidal amplificado con plata, ha sugerido que la acrosina podría determinar la capacidad refecundante en estos espermatozoides. Esta idea sería reforzada por la ausencia de acrosina en espermatozoides perivitelinos de hamster, los cuales no poseen la capacidad de refecundar ovocitos frescos (Yunes y cols., 1992).

La investigación de enzimas de origen espermático también se extiende a los invertebrados marinos; históricamente, fue en ellos en quienes primeramente se observó el efecto lítico de extractos espermáticos sobre cubiertas ovocitarias (Tyler, 1939). Actualmente, tales actividades enzimáticas están caracterizadas para los espermatozoides de ascidias, moluscos y equinodermos y no sólo comprenden enzimas tipo-tripsina, sino también tipo-quimotripsina y tipo-arilsulfatasa (Heller & Raftery, 1973; Levine y cols., 1978; Hoshi y cols., 1979; Hoshi & Moriya, 1980; Green & Summers, 1980; Yamada &

Aketa, 1981; Hoshi y cols., 1981; Pinto y cols., 1990; Matsumura & Aketa, 1991; Sousa y cols., 1992; Marino y cols., 1992).

La literatura relacionada con el estudio de enzimas de origen espermático en invertebrados marinos está enfocada, al igual que en mamíferos, no sólo a caracterizar tales actividades sino fundamentalmente a determinar su compromiso con la fecundación. Paralelamente, se ha intentado establecer comparaciones entre los mecanismos que operan en la fecundación de los distintos grupos taxonómicos.

En los espermatozoides de ascidias no se ha observado acrosoma; sin embargo, de los gametos masculinos de *Halocynthia roretzi* se ha purificado dos enzimas tipo-tripsina: acrosina y espermosina; se ha sugerido que el conjunto de éstas, más una enzima tipo-quimotripsina, estaría involucrado en un sistema de lisinas espermáticas que participaría en la fecundación (Hoshi y cols., 1981; Sawada y cols., 1984). Se ha denominado acrosina a una de las enzimas tipo-tripsina debido a que comparte con la enzima acrosomal de mamíferos características como: pH óptimo, especificidad de sustrato, sensibilidad a inhibidores, respuesta a  $\text{CaCl}_2$  y peso molecular (Sawada y cols., 1982). Por otra parte, se ha observado que en los espermatozoides de la ascidia *Ciona intestinalis* existiría una actividad tipo-quimotripsina que estaría involucrada en el paso del espermatozoide por la cubierta vitelina del huevo (Marino y cols., 1992).

Por otra parte, en erizo de mar, el invertebrado marino utilizado más ampliamente en estudios de fecundación, también existe una enzima tipo-tripsina de origen espermático y ha sido ultraestructuralmente localizada en el acrosoma usando SBTI (inhibidor de la tripsina del poroto de soya) conjugado a ferritina (Green & Summers, 1979; 1980). Se ha demostrado su liberación a consecuencia de la reacción del acrosoma (Levine y cols., 1978) y se sugiere que podría tener algún papel en la disolución de la envoltura de gelatina durante la fecundación debido a que la actividad enzimática de extractos espermáticos sobre las envolturas ovocitarias, es inhibida por SBTI (Yamada & Aketa, 1981). La posible

participación de esta enzima en la fecundación es reforzada por hallazgos que muestran que tanto la hidrólisis de BAEE (benzoil arginina etil ester, sustrato para tripsina) por acción de los extractos espermáticos, como la fecundación son inhibidas por DFP (diisopropilfluorofosfato) el cual es un potente inhibidor de enzimas tipo-tripsina (Levine y cols., 1978). La fecundación *in vitro* de erizo de mar también se inhibe con el inhibidor de serino-proteasas: NPGB (*p*-nitrofenil-*p'*-guanidinobenzoato) (Hoshi y cols., 1979). La sensibilidad a inhibidores de la enzima tipo-tripsina de los espermatozoides de erizo de mar ha sido utilizada como un fundamento científico para clasificarla como una enzima similar a la acrosina de mamíferos.

En los espermatozoides de erizo de mar no sólo se ha encontrado actividad enzimática tipo-tripsina, también hay hallazgos de enzimas tipo-quimotripsina que parecen desempeñar un rol tanto en la reacción del acrosoma como en la penetración de las cubiertas ovocitarias (Hoshi et al., 1979; Yamada & Aketa, 1981).

Por otra parte, en la estrella de mar *Marthasterias glacialis*, también se ha descrito una proteasa acrosomal involucrada en la disolución de la capa de gelatina del ovocito (Sousa & Azevedo, 1986; Sousa y cols., 1992). Esta enzima se ha caracterizado como tipo-tripsina debido a que hidroliza el sustrato BAEE y a que esta hidrólisis es inhibida por los inhibidores de serinas proteasas: PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro), SBTI y TLCK (N  $\alpha$ -*p*-tosil-sL-lisina clorometil cetona-HCl) (Sousa y cols., 1992).

Las evidencias presentadas aquí demuestran que en moluscos, ascidias y equinodermos participan –como en mamíferos– enzimas de origen espermático durante la fecundación. Estas especies corresponden a grupos taxonómicos que poseen espermatozoides móviles; sin embargo, en la naturaleza también existen especies que poseen espermatozoides que carecen de la capacidad de movimiento y en las cuales se desconoce si actúan enzimas de los espermatozoides durante la fecundación. Un ejemplo de tales especies con espermatozoides inmóviles lo constituye el camarón de roca

*Rhynchocinetes typus*, Crustáceo Decápodo que, al igual que todos los miembros de este grupo taxonómico, posee espermatozoides carentes de movimiento. El espermatozoide de *R. typus* es inmóvil debido a que es aflagelado, no posee cabeza ni cola, en contraste, está constituido por un cuerpo y un proceso acicular rígido (Dupré & Barros, 1982) y durante la asociación gamética el extremo distal del proceso acicular se une a la superficie del ovocito (Barros y cols., 1986). Además de estas características, no se ha observado acrosoma en los espermatozoides de *R. typus* (Dupré & Barros, 1982).

Otras especies de Crustáceos Decápodos, en cambio, poseen un acrosoma y es así como en *Sicyonia ingentis*, se ha observado que la fecundación es precedida por una reacción acrosómica en la que se observa liberación de contenido acrosomal (Clark y cols., 1981; Griffin y cols., 1987; 1988). Se ha sugerido que dentro del contenido expuesto existirían enzimas que participarían, como en erizo de mar y mamíferos, en la fecundación (Griffin & Clark, 1990), pero hasta el momento se desconoce la existencia de enzimas en tales contenidos como tampoco ha sido demostrada la participación de algún tipo de proteasas de los espermatozoides durante la fecundación. Sin embargo, se ha observado la participación de enzimas tipo-tripsina en la inducción de la reacción acrosómica de *S. ingentis* (Griffin & Clark, 1990). Debido a que la capacidad inductora de la reacción acrosómica reside en el agua de ovocitos maduros, se piensa que tales enzimas serían de origen ovocitario. Por otra parte, también se considera la alternativa que la actividad enzimática observada corresponda a una enzima del espermatozoide que se activaría por acción de algún componente del ovocito (Griffin & Clark, 1990).

La ausencia de reacción acrosómica en los espermatozoides de *R. typus* no es un caso aislado entre los Crustáceos Decápodos, los espermatozoides de *M. rosebergii* también carecen de ella (Lynn & Clark, 1983). Para estas especies se ha postulado que el proceso acicular cumpliría las funciones de acrosoma (Clark y cols., 1973; 1981; Yudin y cols.,

1979; Kleve y cols., 1980; Lynn & Clark, 1983; Dupré & Barros, 1983), pero no se ha dilucidado claramente su actuación como tal.

La falta de movimiento de los espermatozoides de los Crustáceos Decápodos plantea interrogantes acerca de la forma de aproximación de estos gametos y de la manera en que se lleva a cabo el paso del espermatozoide por las cubiertas extracelulares del ovocito. Particularmente, nos ha interesado estudiar la participación de enzimas de origen espermático en el mecanismo de penetración del espermatozoide de *R. typus* a través de las cubiertas ovocitarias debido a que contamos con evidencias que muestran que, durante la interacción gamética, el espermatozoide ejerce un efecto lítico en la superficie del ovocito (Barros y cols., 1986). Estas observaciones cobran mayor interés cuando se considera que en los espermatozoides de esta especie no se distingue un acrosoma (Dupré & Barros, 1983). Hemos enfocado nuestro estudio hacia la búsqueda de enzimas tipo-tripsina ya que esta acción enzimática constituye el tipo de actividad lítica de origen espermático más comúnmente asociada a la fecundación.



## Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo propone que durante la fecundación del camarón de roca *Rhynchocinetes typus*, el espermatozoide atraviesa las cubiertas del ovocito mediante la acción digestiva de una proteasa.

## Objetivos principales

- Estudiar la existencia de enzimas proteolíticas tipo-tripsina en extractos de espermatozoides de *R. typus* utilizando geles de disolución compuestos por poliacrilamida copolimerizada con gelatina.
- Dilucidar la participación de una actividad tipo-tripsina de origen espermático en la fecundación de *R. typus*.

## Objetivos secundarios

- Estudiar el proceso de fecundación *in vitro* de *R. typus* utilizando Microscopía Electrónica.
- Estudiar la estructura de las cubiertas ovocitarias de *R. typus*.
- Estudiar la composición de las cubiertas ovocitarias de *R. typus* mediante electroforesis.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico

Se utilizó ejemplares de *Rhynchocinetes typus* obtenidos desde el Molo de Abrigo del Puerto de Valparaíso (71°50'W, 33°01'S). Se procesó los animales en el Laboratorio de Embriología de la Universidad de Valparaíso, alternativamente fueron transportados vivos hasta el Acuario de la P. Universidad Católica de Chile. Allí se mantuvo los ejemplares en contenedores de 20 litros, a temperaturas de 9° a 14° C, con fotoperíodo artificial de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad y alimentación diaria basada en bivalvos cocidos. En estas condiciones, los animales experimentaron mudas normales del exoesqueleto y las hembras completaron un ciclo de maduración ovárica.

### Gametos y fecundación *in vitro*

Para observar a nivel ultraestructural el proceso de penetración del espermatozoide a través de las cubiertas ovocitarias se realizó ensayos de fecundación *in vitro* con gametos maduros obtenidos de los siguientes modos.

### Espermatozoides

Espermatozoides maduros de *R. typus* fueron obtenidos desde el segmento medio del conducto deferente usando la técnica descrita por Barros y cols. (1986). Se depositó los segmentos medios de los conductos deferentes en agua de mar natural filtrada (AMNF) a través de una membrana de miliporo de 0.2µm. Se recuperó los espermatozoides rasgando

los conductos deferentes con pinzas finas y además por electroeyaculación de acuerdo a Barros y cols. (1986). Para esto se colocó un par de electrodos en la base del quinto par de pereiópodos y se aplicó una estimulación eléctrica de 6V/seg. Se recuperó los espermatóforos liberados desde el gonoporo con una pipeta Pasteur (este procedimiento no mata a los animales).

### **Ovocitos maduros**

Ovocitos maduros de *R. typus* fueron disecados de ovarios de hembras adultas, 48 horas después de la muda del exoesqueleto. Los ovarios quedaron expuestos al remover el caparazón dorsal y los ovocitos maduros fueron liberados al lavar los ovarios con AMNF. Se seleccionó los ovocitos que presentaron un diámetro aproximado de 600µm y coloración anaranjada. Estos fueron inseminados antes de 3 minutos de permanencia en agua de mar.

### **Fecundación *in vitro***

Se realizó los ensayos de inseminación *in vitro* de ovocitos maduros con una concentración de espermatozoides de 50.000 a 100.000 células/ml. Se colocó los espermatozoides en cápsulas Falcon 3001 y los huevos maduros fueron agregados a la suspensión espermática directamente desde el ovario. La mezcla de gametos se agitó suavemente durante 5 minutos con una pipeta Pasteur. La coincubación se realizó a 17°C por 1 a 2 horas, finalizado este período se procesó los huevos para evaluar fecundación con el microscopio electrónico de barrido o para su observación con el microscopio electrónico de transmisión.

### **Microscopía Electrónica**

Se fijó las muestras en solución de Karnovsky (1965) y agua de mar (1:1) por 2 horas. Después de la fijación, se lavó los ovocitos en una solución tampón de cacodilato

0.3 M, pH:8.0 que contenía  $\text{CaCl}_2$  200 mM; luego se post-fijó en  $\text{OsO}_4$  al 1%, por una hora. Posteriormente se lavó nuevamente las muestras en la solución tampón de cacodilato antes descrita y se deshidrató las muestras en acetona (microscopía de barrido) o etanol (microscopía de transmisión). Para microscopía de barrido, se secó los huevos a la presión y temperatura críticas del  $\text{CO}_2$  en un aparato Sorvall. El material seco se cubrió con oro-paladio en un Sputter Pelco 91.000 y se realizó las observaciones en un microscopio Jeol JSM 25s II. Para microscopía de transmisión, se impregnó el material deshidratado en resina de baja viscosidad (Spurr, 1969). Se realizó los cortes en un ultramicrotomo Sorvall Porter Blum MT2-B y se tiñó con acetato de uranilo y citrato de plomo, usando las técnicas convencionales.

### **Cubiertas ovocitarias**

Para dilucidar si las cubiertas ovocitarias de *R. typus* contenían proteínas que podrían ser atacadas por enzimas proteolíticas del espermatozoide, se aisló cubiertas y se estudió su patrón electroforético.

#### **1) Aislamiento de cubiertas**

Se aisló las cubiertas poniendo los ovocitos maduros en una solución de agua de mar artificial sin calcio a la que se adicionó EGTA ( $\text{NaCl}$  0.4 M,  $\text{KCl}$  9 mM,  $\text{MgCl}_2$  23 mM,  $\text{MgSO}_4$  25 mM,  $\text{NaHCO}_3$  2 mM, EGTA 10 mM, pH: 8.2). Se transfirió los ovocitos maduros desde el ovario a una cápsula Falcon 3001 con 3 ml de la solución antes descrita. Después de una incubación a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos, las cubiertas se separaron espontáneamente de los huevos y se las aisló en forma individual con una pipeta de punta fina.

Para observar el efecto de tripsina sobre las cubiertas ovocitarias se sometió los ovocitos maduros y las cubiertas aisladas a un tratamiento con una solución de 0.1% de tripsina.

## **2) Electroforesis de cubiertas ovocitarias.**

Se utilizó aproximadamente 200 cubiertas ovocitarias para cada uno de los análisis electroforéticos. Se lavó las cubiertas con agua desionizada (20 MegaOhms) a temperatura ambiente por 5 horas, luego se las centrifugó a 500 x g por 10 minutos. Las cubiertas fueron solubilizadas en 30µl de la solución empleada como tampón de muestra (Tris-HCl 0.0625 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.002%, β-mercaptoetanol 5%, pH 6.8). La mezcla se calentó a 100°C por 5 minutos y se centrifugó a 8500 x g por 10 min. La electroforesis se realizó en un sistema de soluciones tampón descrito por Laemmli (1970), se cargó las muestras en mini-geles de poliacrilamida al 8% y se aplicó una diferencia de potencial de 100V. Las proteínas separadas fueron teñidas con Azul de Coomassie.

## **3) Tinción PAS de proteínas de cubiertas ovocitarias separadas electroforéticamente**

La presencia de glicoproteínas entre los constituyentes de las cubiertas ovocitarias se reveló usando la técnica de Margi (1989). Se fijó los geles por inmersión en una solución de etanol:ácido acético: agua destilada (40:5:55) durante 18 horas con 3 cambios de la solución. Luego se dejó los geles en una solución de ácido peryódico al 0.7% durante 2-3 horas. Posteriormente, se trató los geles con una solución de metabisulfito de sodio al 0.2% preparado en ácido acético al 5%, por dos horas. Finalmente se incubó los geles con el reactivo de Schiff durante 12-18 horas a 4°C.

## **Ensayos de inhibición de fecundación *in vitro***

Para estudiar la posible participación de actividades proteolíticas tipo-tripsina de los espermatozoides en la fecundación de *R. typos* realizamos ensayos *in vitro* con espermatozoides tratados previamente con inhibidores para tripsina.

Suspensiones de espermatozoides de 50.000-100.000 células/ml fueron incubadas con alguno de los siguientes inhibidores de proteasas: 25mM SBTI (inhibidor de la tripsina del poroto de soya), 1mM de PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro), o 1mM de pAB (p-aminobenzamidina), por 15 minutos a 17°C. Finalizada la incubación se agregó los ovocitos maduros directamente desde el ovario de una hembra. La mezcla se agitó suavemente durante 5 minutos y se incubó a 17°C por 1-2 horas. Finalmente, se procesó los huevos para microscopía electrónica de barrido donde se evaluó la fecundación.

Como controles se usó gotas de espermatozoides del mismo origen que las tratadas con inhibidores, pero a las que se les omitió dicho tratamiento.

## **Ensayos de detección de actividad proteolítica en los espermatozoides.**

### **1) Preparación del extracto espermático**

Los espermatozoides fueron obtenidos del segmento medio de los conductos deferentes y posteriormente fueron colocados en una solución de Tris HCl 50 mM, pH 7.4 a 17°C, luego se centrifugó la suspensión a 2500 x g, por 3 minutos, a 4°C. Se resuspendió el pellet en 300 µl de Tris HCl 50 mM pH 7.4 y se sonicó por 10 minutos en un baño de hielo. La mezcla se centrifugó a 18500 x g, por 3 min, a 4°C; el sobrenadante se liofilizó para concentrar su contenido y se mantuvo a -80°C para su utilización en los ensayos de actividad enzimática. El método de extracción no incluye la adición de inhibidores para proteger las probables actividades proteolíticas de una autólisis.

## 2) Electroforesis de disolución

Se preparó un gel al 10% de poliacrilamida-SDS y gelatina 0.1% de acuerdo a lo descrito por Arboleda & Gerton (1988). Se utilizó tampón de muestra sin agente reductor (Tris HCl 0.1 M, glicerol 10%, SDS 1%, pH 8.6). Se cargó 10µg de proteínas por carril. La electroforesis se corrió a 150-200 V a 4°C. Al finalizar ésta, el gel se desmontó y lavó en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 con Tritón X-100 2.5% durante una hora. Posteriormente se sometió a tres lavados de 20 minutos con Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Luego el gel se incubó en Tris-HCl 50 mM suplementado con CaCl<sub>2</sub> 6,8 mM y MgCl<sub>2</sub> 23 mM por 17-19 horas a 37°C. Finalmente el gel se tiñó con Azul de Coomassie al 0.25% en ácido acético: metanol: agua (1:3:6) y se destiñó con ácido acético: metanol: agua (1:3:6). Las bandas correspondientes a proteasas no se tiñeron con Azul de Coomassie debido a que las enzimas digirieron localmente la gelatina.

Se estudió el efecto de 1 mM de SBTI ó 1 mM de pAB sobre las actividades proteolíticas registradas en los geles, agregando dichos inhibidores de tripsina en la solución de Tris-HCl/CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>.

## RESULTADOS

### Descripción de los gametos de *R. typus*

#### Espermatozoides

La estructura de los espermatozoides de *Rhynchocinetes typus* ha sido descrita en detalle por Dupré & Barros (1983), por lo que aquí se dará una breve descripción con fines de orientación. Los espermatozoides de *R. typus*, almacenados en el conducto deferente tienen la forma de una tachuela (Fig. 1a), en ellos se distingue un cuerpo semiesférico de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y un proceso acicular de 53  $\mu\text{m}$  de largo cuya posición es perpendicular a la base del cuerpo. Cuando se suspende los espermatozoides en agua de mar, éstos experimentan un cambio de forma y de tamaño, pues desde el cuerpo despliegan 9 a 13 rayos coplanares que le confieren al cuerpo un diámetro aproximado de 80  $\mu\text{m}$  y la apariencia de un paraguas invertido (Fig. 1b). Los rayos están unidos por una membrana y en el extremo distal de cada uno emerge una espina radial de 50  $\mu\text{m}$  de largo orientada perpendicularmente al plano de los rayos. A nivel ultraestructural y en un corte transversal, el proceso acicular es una estructura de apariencia tubular de 1.5 a 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro en la base, está constituido por una pared densa a los electrones de aproximadamente 0.4  $\mu\text{m}$  de espesor y una región central poco densa a los electrones y de aproximadamente 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, que posee un material filamentoso. Externamente, el proceso acicular presenta estriaciones paralelas al eje mayor del proceso acicular (Fig 1c). En los espermatozoides de este camarón no se observa un acrosoma, un organelo de origen golgiano limitado por membrana y que experimenta un fenómeno de exocitosis durante la fecundación (Dupré & Barros, 1983).



## Ovocitos

Los ovocitos maduros de *R. typus* son de color anaranjado, tienen un diámetro promedio de 600  $\mu\text{m}$  y están rodeados por tres cubiertas diferentes (Fig. 2a). El análisis con el microscopio electrónico de transmisión de cortes de ovocitos (Fig. 2b), mostró que la cubierta más externa, corion, tiene un espesor promedio de 0.5  $\mu\text{m}$  e incluye filamentos de 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 3a). La cubierta intermedia tiene 2.0  $\mu\text{m}$  de espesor y la apariencia de una red laxa. Finalmente, la envoltura más interna, o membrana vitelina, tiene aproximadamente 4.0  $\mu\text{m}$  de espesor y la apariencia de una red compacta. Con el microscopio electrónico de barrido se observa que la cubierta vitelina es fenestrada y a través de sus perforaciones pasan microvellosidades del ovocito (Fig. 3b). La tinción con orceína lactoacética mostró que los ovocitos maduros están en la metafase de la primera división meiótica (Fig. 4a), a diferencia de los inmaduros que se encuentran en estado de vesícula germinativa (Fig. 4b).

## Inseminación de ovocitos maduros

Nos interesó estudiar ultraestructuralmente el proceso de fecundación para observar el proceso de penetración del espermatozoide por las cubiertas del ovocito. En nuestros experimentos hemos definido que un huevo ha sido fecundado cuando en el microscopio electrónico de barrido observamos que un espermatozoide ha penetrado las cubiertas ovocitarias (Fig. 8a,b). Esta definición se ha validado en estudios anteriores realizados con el microscopio electrónico de transmisión, los que muestran la formación de pronúcleos en los huevos fecundados de acuerdo a este criterio (Fig. 8c) (Dupré, 1991).

Durante la interacción de los gametos de *R. typus*, los espermatozoides toman contacto con la superficie del ovocito a través del extremo distal del proceso acicular, en el que se observa una pequeña dilatación (Fig. 5a). En el lugar del contacto espermatozoide-

ovocito la superficie ovocitaria presenta signos de digestión, mientras que en el proceso acicular las estriaciones longitudinales externas se han modificado considerablemente (Fig. 5b); en esta etapa, los espermatozoides aparecen con sus rayos plegados. En una etapa más avanzada del proceso de fecundación se observa que tanto el corion como la envoltura fenestrada subyacente están perforadas en el lugar de entrada del espermatozoide (Fig. 6a). Esta perforación tiene bordes lisos y un diámetro ligeramente mayor al del proceso acicular. También es posible observar que la superficie del proceso acicular se ha modificado y presenta pequeñas perforaciones en la zona de acción catalítica (Fig. 6b). A medida que el espermatozoide se incorpora al ovocito, se observa que las microvellosidades que atraviesan la cubierta fenestrada rodean el proceso acicular y se fusionan con él (Figs. 7a y b); también en esta etapa, es posible distinguir pequeñas perforaciones en la superficie del proceso acicular (Fig. 7b). En las etapas finales de la fecundación ingresan los rayos y espinas radiales del espermatozoide (Fig. 8a) y se forma un cono de fecundación en el lugar de la entrada del espermatozoide (Fig. 8b). Las espinas radiales son las últimas estructuras del espermatozoide que se incorporan al ovocito (Fig. 8b). La fecundación culmina con la entrada de todo el espermatozoide al citoplasma ovocitario.

### Cubiertas ovocitarias

Las cubiertas ovocitarias aisladas en agua de mar artificial sin calcio, a la que se adicionó 10mM de EGTA, son transparentes y aproximadamente esféricas, con un diámetro promedio de 600 $\mu$ m (Fig. 9a). El examen microscópico reveló que algunas cubiertas se obtienen contaminadas con plaquetas de vitelo; sin embargo, la mayoría de éstas se eliminan durante el proceso de lavado. En el estudio electroforético se usó sólo envolturas libres de contaminación. La electroforesis con SDS y beta mercaptoetanol, reveló la existencia de 7 bandas principales entre 84 y 180 kDa. Algunas bandas más tenues se ubicaron por debajo de los 84 kDa (9b). La tinción PAS-peryodato mostró que los componentes de peso

molecular de aproximadamente 180 kDa corresponden a proteínas PAS positivas y por ende, a glicoproteínas (Fig. 9c).

El tratamiento con tripsina de ovocitos maduros y cubiertas aisladas conduce a la disolución total de éstas.

### Ensayos de inhibición

El porcentaje de ovocitos maduros fecundados *in vitro* alcanza el 45.9% (Tabla 1). De los ovocitos fecundados, el 78% estaba siendo penetrado por un solo espermatozoide, mientras que en el restante 20% los ovocitos podían ser penetrados hasta por 6 espermatozoides (Fig. 10).

La estructura proteica de las cubiertas ovocitarias y su disolución con tripsina nos han conducido a examinar el efecto de inhibidores para tripsina en la fecundación. Al preincubar espermatozoides durante 15 minutos con inhibidores para tripsina se obtuvo una inhibición de la fecundación de: 45.8% con 25 mM de SBTI, 62.8% con 1 mM de PMSF y 41.2% con 1 mM de pAB (Tabla 1). En los casos de poliespermia de los ovocitos inseminados con espermatozoides tratados con inhibidores, se observó que el número de espermatozoides era menor de 6 (datos no suministrados).

### Ensayos de detección de proteasas

La actividad proteolítica de los espermatozoides de *R. typus* se estudió mediante geles de disolución preparados con geles de poliacrilamida al 10% copolimerizada con gelatina al 0.1%. Al utilizar esta técnica para estudiar el extracto espermático preparado a pH neutro se observó la existencia de una banda de actividad enzimática que presentó mayor movilidad electroforética que la tripsina y quimotripsina utilizadas como referencia

(Fig. 11). La banda de actividad es inhibida completamente cuando se incuban los geles con 1 mM de SBTI o 1 mM de pAB (Fig. 12). Por otra parte, al utilizar geles con poliacrilamida al 12%, se observó dos bandas de actividad enzimática.

## DISCUSION

En esta Tesis se ha demostrado que los extractos espermáticos de *R. typus* preparados a pH: 7.4 y estudiados en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina presentan actividad gelatinolítica. Esta gelatinolisis corresponde a actividad proteolítica de acuerdo a lo señalado por Heussen & Dowdle (1980). Más aún, las bandas de digestión fueron inhibidas cuando los geles fueron tratados con los inhibidores para tripsina SBTI (inhibidor de la tripsina del poroto de soya) y pAB (p-aminobenzamidina). Es interesante destacar que se ha utilizado estos mismos inhibidores para inhibir la actividad de la acrosina de mamíferos (Fraser, 1982; Yunes y cols., 1993). La enzima tipo-tripsina de los espermatozoides de *R. typus*, extraída a pH neutro, fue recuperada en una extracción a pH ácido realizada según lo descrito para obtener acrosina de espermatozoides de mamíferos (Leyton, 1986). El extracto ácido de los espermatozoides de *R. typus* se ha evaluado, a través de su actividad enzimática, por la hidrólisis del sustrato esterásico BAEE (benzoil arginina etil ester) en relación al tiempo. La actividad del extracto se ha medido en un sistema de orden cero, con exceso de sustrato, a 253 nm, pH:8.0 y a 25°C, también hemos observado que esta actividad es inhibida por 1 mM SBTI y 1 mM pAB (datos no mostrados). El conjunto de estos resultados sugeriría que los espermatozoides de *R. typus* tienen una actividad enzimática tipo-tripsina.

Con el propósito de recuperar las enzimas proteolíticas presentes en los espermatozoides, ya sea de tipo-tripsina o quimotripsina (Levine y cols., 1978; Yamada & Aketa, 1981; Pinto y cols., 1990), se realizó una extracción a pH neutro. Este tipo de extracción permitió recuperar de los espermatozoides del crustáceo una actividad

proteolítica que, sin corresponder a una enzima acrosomal debido a la ausencia de acrosoma en los espermatozoides, podría corresponder a una enzima vinculada a la fecundación. Esta situación podría ser similar a lo observado en ascidias, cuyos espermatozoides carentes de acrosoma también poseen enzimas proteolíticas asociadas a la fecundación (Sawada y cols., 1982). Como nuestra hipótesis se refiere a la existencia de enzimas tipo-tripsina en los espermatozoides de *R. typus*, utilizamos dos inhibidores para tripsina con el objetivo de dilucidar si la banda de proteólisis observada en los geles correspondía a la actividad de una enzima de esta naturaleza. La completa desaparición de la banda de actividad con 1 mM de SBTI y 1 mM de pAB sugiere que una enzima tipo-tripsina está presente en los espermatozoides. Para verificar la existencia de una enzima tipo-tripsina se realizó una extracción a pH ácido, ya que bajo estas condiciones se favorece la estabilidad de la enzima, se aumenta la disociación del complejo enzima-inhibidor y se previene la autoactivación de la enzima (Schill, 1974). Para estudiar la posible existencia de enzimas tipo-tripsina en este extracto se eligió el sustrato BAEE, que se ha utilizado para diagnosticar enzimas tipo-tripsina tanto en mamíferos como en invertebrados (Brown y cols., 1975; Levine y cols., 1978; Bhattacharyya y cols., 1979; Yamada & Aketa, 1991; Sousa y cols., 1992).

Para los espermatozoides de la estrella de mar *M. glacialis* también se ha utilizado la presencia de bandas de actividad en geles de poliacrilamida/gelatina y la inhibición de éstos por pAB, como un criterio para diagnosticar enzimas tipo-tripsina (Sousa y cols., 1992). La actividad enzimática del extracto espermático de *M. glacialis* sobre BAEE y la inhibición de ésta al pretratar los espermatozoides con SBTI constituyen –al igual que para nosotros– un refuerzo para sostener la proposición de la existencia de una enzima tipo-tripsina en los espermatozoides de *R. typus* (Sousa y cols., 1992).

El hallazgo de una banda de actividad proteolítica al analizar extractos espermáticos neutros de *R. typus* en geles de poliacrilamida al 10%, y de dos bandas al utilizar geles al

12% (datos no suministrados), ha sido interpretada como resultado de la posible existencia de dos isoformas de la misma enzima. Alternativamente, hemos considerado que la existencia de dos bandas podría corresponder a productos de la autodigestión de la misma enzima.

Hemos observado que la actividad enzimática en los geles de disolución depende de la presencia de concentraciones milimolares de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  (datos no suministrados). Una situación similar ocurre con los espermatozoides de la ascidia *H. roretzi* (Sawada y cols., 1982) y con los espermatozoides de mamíferos (Polakoski & Mc Rorie, 1973). Esto podría interpretarse como un efecto estabilizador de tales iones sobre la actividad enzimática del extracto, un fenómeno de este tipo se ha descrito para algunas serino-proteasas cuya actividad es estabilizada, pero no necesariamente dependiente, de la presencia de calcio (Sarath y cols., 1989).

La posible función de la actividad enzimática tipo-tripsina de los espermatozoides de *R. typus* durante el proceso de fecundación, es apoyada por el hallazgo que la fecundación *in vitro* era inhibida en un 45.8%, al pretratar los espermatozoides con 25 mM de SBTI, en un 62.8%, al pretratarlos con 1 mM pAB, y en un 41.2%, al usar 1 mM de PMSF. Un efecto inhibitorio similar se ha demostrado en estudios de fecundación *in vitro* de ovocitos ascidia (Hoshi y cols., 1981), de erizo de mar (Levine y cols., 1978) y hamster dorado (De Ioannes y cols., 1990). Para descartar un posible efecto inespecífico de los inhibidores sobre los ovocitos de *R. typus*, sería necesario preincubar los ovocitos con los diferentes inhibidores, lavarlos y posteriormente inseminarlos. Sin embargo, todo este manejo experimental resulta impracticable en *R. typus* debido a que los ovocitos deben ser inseminados antes de tres minutos de permanencia en agua de mar, después de ese tiempo no hay fecundación. Esta observación podría tener su explicación en la existencia de un mecanismo de prevención de la poliespermia de los ovocitos maduros de *R. typus*. Sin embargo, para resolver el problema del posible efecto inespecífico de los inhibidores sobre

los ovocitos, repetimos los experimentos utilizando ovocitos inmaduros ya que éstos pueden ser lavados y posteriormente fecundados. En estos experimentos se observó 60% y 75% de inhibición de la fecundación cuando los espermatozoides fueron pretratados con 25 mM de SBTI y 1 mM de pAB, respectivamente. El porcentaje de fecundación de los ovocitos inmaduros tratados con 25 mM de SBTI y 1 mM de pAB, posteriormente lavados y luego inseminados fue de 65.3 y 78.2% respectivamente, mientras que en los controles sin tratamiento fue de 68.9%. Estos resultados sugieren que los inhibidores para tripsina afectan la fecundación sin ocasionar un efecto inespecífico sobre los ovocitos.

Tanto la presencia de una actividad enzimática en el espermatozoide de un crustáceo decápodo como su posible papel en la fecundación constituyen datos novedosos en la investigación de las interacciones gaméticas en este grupo zoológico. Una actividad de este tipo había sido sólo sugerida para los espermatozoides inmóviles de los crustáceos decápodos (Lynn & Clark, 1983; Griffin & Clark, 1990), pero nunca se había demostrado su existencia.

La composición proteica de las cubiertas ovocitarias de *R. typus* y la disolución de éstas por tripsina apoyarían la sugerencia que el espermatozoide inmóvil penetraría las cubiertas del huevo con la mediación de una enzima tipo-tripsina. En mamíferos, la entrada del espermatozoide parece estar mediada tanto por su movimiento hiperactivado como por la actividad del sistema proacrosina/acrosina (Barros y cols., 1992). La digestión controlada de la ZP3 por parte de la acrosina permitiría que los oligosacáridos presentes en la ZP2 se asocien con la proacrosina para mantener al espermatozoide unido a la zona (O'Rand & Fisher, 1987; De Ioannes y cols., 1990). Ciclos de unión, activación de la acrosina gatillada por la zona pelúcida y la digestión de ésta, permitirían el avance del espermatozoide a través de esa envoltura. Una situación similar se podría proponer para el espermatozoide de *R. typus*, sin que esto excluya la existencia de un componente activo –aún desconocido– en el mecanismo de penetración que involucre proteínas del



citoesqueleto del espermatozoide (Pérez y cols, 1991). Los filamentos del corion se unirían al extremo distal del proceso acicular como parte de un mecanismo de enganche de los espermatozoides que contribuiría a su desplazamiento a través de las cubiertas ovocitarias. Las microvellosidades de la membrana del ovocito, por otra parte, se unen al proceso acicular de los espermatozoides (Barros y cols., 1986) y esto sugeriría que podrían participar en la unión de los gametos. La unión del espermatozoide con el ovocito a través de las microvellosidades de éste último, es un fenómeno frecuente en la fecundación (Barros y Fraklin, 1968; Barros y Herrera, 1977; Epel y Vacquier, 1978).

El proceso acicular es el organelo que está en el frente de penetración espermática, por lo tanto tendríamos que asumir que éste corresponde al acrosoma, al menos desde un punto de vista funcional. El proceso acicular tiene una pared densa a los electrones formada por fibrillas de 10nm de diámetro y un centro poco denso a los electrones que abarca toda la extensión del proceso acicular, exceptuando el extremo más distal (Dupré y Barros, 1983). La enzima podría estar ubicada en la región central y ser liberada a través de la pared por modificación de ésta. Efectivamente, hemos observado una pequeña modificación del extremo más distal del proceso acicular durante el contacto inicial de éste con el ovocito, también hemos visto la modificación de las estriaciones longitudinales externas de la pared del proceso acicular y hemos notado pequeñas perforaciones en la superficie del proceso acicular modificado. La región central podría corresponder a una matriz como la de los acrosomas de los espermatozoides de mamíferos y el contacto con el corion podría gatillar, de un modo aún desconocido, la liberación de la enzima desde la región central.

Hay evidencias que durante la interacción gamética en mamíferos, el ovocito induce la liberación de enzimas de origen espermático. La proposición original que la reacción acrosómica ocurría en la zona pelúcida –o al menos se completaba en ella (Franklin y cols., 1970)- se reforzó por el hallazgo que la cadena polipeptídica de una de las glicoproteínas de la zona pelúcida, la ZP3, es la responsable de la inducción de la reacción acrosómica (Florman y cols., 1984; Florman & Wassarman 1985; Wassarman, 1990). Esta propiedad de la zona pelúcida de inducir la reacción acrosómica se ha demostrado en el ratón (Wassarman y cols., 1986; Kligman y cols., 1991; Leyton y cols., 1989), hamster (Cherr y cols., 1986; Yoshimatsu & Yanagimachi, 1988; Uto y cols., 1988; Yunes y cols., 1992), conejo (O’Rand & Fisher, 1987), toro (Florman & First, 1989a,b) y humanos (Nagae et al., 1986; Cross y cols., 1988). Así, es posible que en *R. typus* el primer contacto espermatozoide-ovocito pudiera gatillar un evento destinado a exponer y/o activar la enzima tipo-tripsina. El hecho que la perforación realizada por el proceso acicular en la superficie del huevo sea de bordes muy definidos, sugeriría que enzima tipo-tripsina de los espermatozoides de *R. typus* no es soluble y probablemente está estrechamente asociada al proceso acicular.

Durante la fecundación de *R. typus* el espermatozoide establece el primer contacto con el huevo maduro a través del ápice del proceso acicular, esta unión es fuerte ya que no se disocia al pipetear los huevos con fuerza (Barros y cols., 1986). Esto sugiere que en la unión espermatozoide-huevo de *R. typus* participarían moléculas similares a la bindina descrita en erizo de mar (Vacquier y Moy, 1977). La ubicación de estas moléculas de unión estaría restringida al proceso acicular debido a que –como hemos observado- los espermatozoides que casualmente se unen al huevo por los rayos, se desprenden fácilmente al pipetear suavemente los huevos. Después de la asociación inicial el espermatozoide de *R. typus* podría permanecer unido a las cubiertas a través de un mecanismo que podría involucrar enzimas del tipo-tripsina como se ha comunicado en mamíferos (Töpfer-Petersen, 1990; Jones y cols., 1988).

El hallazgo de una enzima tipo-tripsina en los espermatozoides de *R. typus* no excluye que en estos espermatozoides también existan otras actividades enzimáticas vinculadas a la fecundación. En otros invertebrados marinos se ha encontrado actividades espermáticas tipo: tripsina, quimotripsina y aril sulfatasa asociadas a la fecundación (Heller & Raftery, 1973; Levine y cols., 1978; Hoshi y cols., 1979; Hoshi & Moriya, 1980; Green & Summers, 1980; Yamada & Aketa, 1981; Hoshi y cols., 1981; Pinto y cols., 1990; Matsumura & Aketa, 1991; Sousa y cols., 1992; Marino y cols., 1992).

En estudios futuros sería interesante dilucidar la posible existencia de otras actividades enzimáticas en el espermatozoide de *R. typus* realizando experimentos de actividad de extractos espermáticos sobre sustratos específicos como ATEE para quimotripsina (Yamada & Aketa, 1981) y p-nitrofenilsulfato para arilsulfatasa (Hoshi & Moriya, 1980). También podría utilizarse sustratos fluorogénicos específicos que permiten detectar con alta sensibilidad una determinada actividad enzimática (Pinto y cols., 1990). La participación de estas enzimas en la fecundación podría dilucidarse al pretratar los espermatozoides con inhibidores específicos, evaluando posteriormente su efecto en los niveles de fecundación *in vitro*.

Una interrogante muy importante que debe ser resuelta a futuro se refiere a la localización de la actividad enzimática que hemos detectado en el espermatozoide de *R. typus*. En los espermatozoides de mamíferos, la acrosina está localizada en el acrosoma (Barros y cols., 1992), al igual que la enzima tipo-tripsina del espermatozoide de erizo de mar (Green & Summers, 1980). Sin embargo, se ha reconocido que la arilsulfatasa —que también cumpliría un papel en la penetración del espermatozoide de erizo de mar a través de las cubiertas ovocitarias— no estaría ubicada en el acrosoma (Hoshi & Moriya, 1980). La ubicación de la enzima tipo-tripsina demostrada en el espermatozoide de *R. typus* podría estudiarse utilizando SBTI conjugado a FITC o a ferritina como se ha hecho para la determinación ultraestructural de la enzima tipo-tripsina del espermatozoide de erizo de

mar (Green & Summers, 1980). Esta interrogante podría también abordarse con anticuerpos policlonales preparados contra la banda de actividad enzimática que los extractos espermáticos de *R. typus* desarrollan en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina. Estos mismos anticuerpos podrían utilizarse para investigar el compromiso real que esta enzima pudiera tener en la fecundación utilizándolos en ensayos de inhibición de la fecundación *in vitro*.

Finalmente valga un comentario con respecto al posible mecanismo de encuentro de los gametos *in vivo*. Se ha sugerido que se realizaría en la bolsa incubatriz de la hembra por la corriente de agua generada como consecuencia del movimiento de los pleópodos de la hembra. Un mecanismo de esta naturaleza ha sido también propuesto para explicar la fecundación del crustáceo decápodo *Penaeus aztecus* que –al igual que todos los crustáceos decápodos- posee espermatozoides inmóviles (Clark y cols., 1973).

En conclusión, las evidencias presentadas y discutidas aquí, demostrarían como válida la hipótesis original en el sentido que una enzima tipo-tripsina sería la responsable del paso del espermatozoide a través de las cubiertas ovocitarias.

## CONCLUSIONES

1. El ovocito maduro de *Rhynchocinetes typus* posee tres cubiertas extracelulares: el corion, la cubierta intermedia y la membrana vitelina.
2. Las cubiertas extracelulares del ovocito maduro de *R. typus* son de composición proteica. Una de las proteínas, separada electroforéticamente, es PAS positiva.
3. Las cubiertas ovocitarias son digeridas por tripsina.
4. Con geles de poliacrilamida al 10% copolimerizada con gelatina al 0.1%, se demostró la existencia de una banda de actividad proteolítica.
5. La banda de digestión registrada en geles con poliacrilamida al 10% es completamente inhibida con 1 mM de SBTI y 1 mM de pAB.
6. La fecundación de *R. typus* fue inhibida entre un 45 y un 63% por efecto del tratamiento de los espermatozoides con los inhibidores de la tripsina: SBTI, PMSF y pAB.
7. Toda esta evidencia apunta a la existencia de una enzima tipo-tripsina en el espermatozoide de *R. typus* y a su probable participación durante la fecundación.

Figura 1. Microfotografía de contraste de fases de: (1a) Espermatozoides de *Rhynchocinetes typus* recuperados del conducto deferente. Observe el aspecto de tachuela que caracteriza al espermatozoide, en él se distingue el proceso acicular (pa) y el cuerpo (c) (1000x). (1b) Segundos después que el espermatozoide ha sido depositado en agua de mar éste despliega sus rayos (r) y espinas radiales (er) adoptando la forma de un paraguas invertido (1000x). (1c) Microfotografía electrónica de barrido. En el proceso acicular se puede distinguir las estriaciones longitudinales externas (el) (51000x).

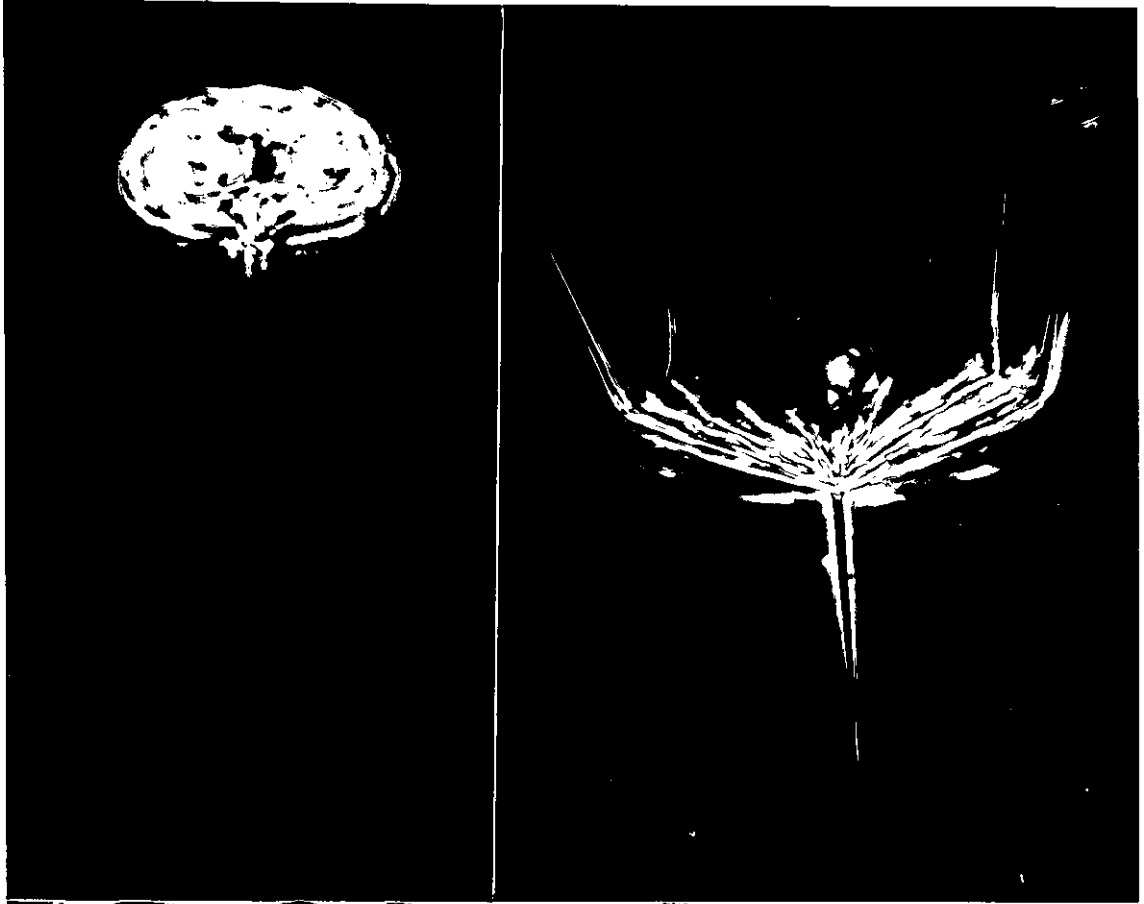


Figura 2. (2a) Microfotografía de contraste de fases de un ovocito maduro de *R. typus*, observe las envolturas del ovocito (e) (20x). (2b) Microfotografía electrónica de transmisión a través de las envolturas de un ovocito maduro. Observe el corion (co) que aparece formado por un sector interno de alta densidad electrónica y por un sector interno que incluye perfiles de estructuras membranosas de diferente forma y tamaño (flechas), envoltura intermedia (ei), membrana vitelina (mv) y citoplasma (ci) (13000x).



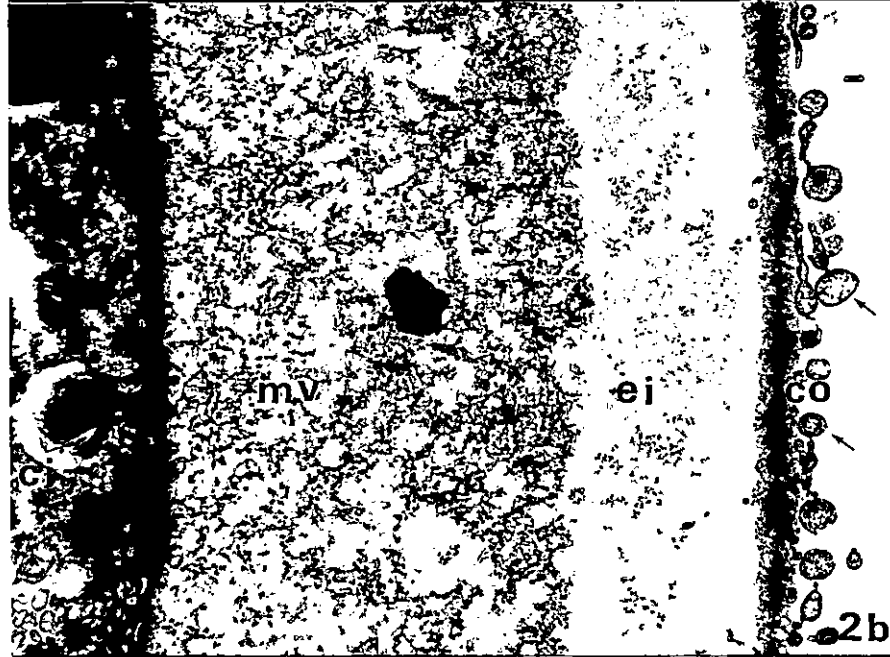


Figura 3. Microfotografías electrónicas de barrido. (3a) membrana vitelina, observe su aspecto fenestrado (15000). (3b) corion, observe la estructura del sector externo del corion que aparece formado por estructuras discoidales (flechas cerradas) y digitiformes (flechas abiertas) (13000x).

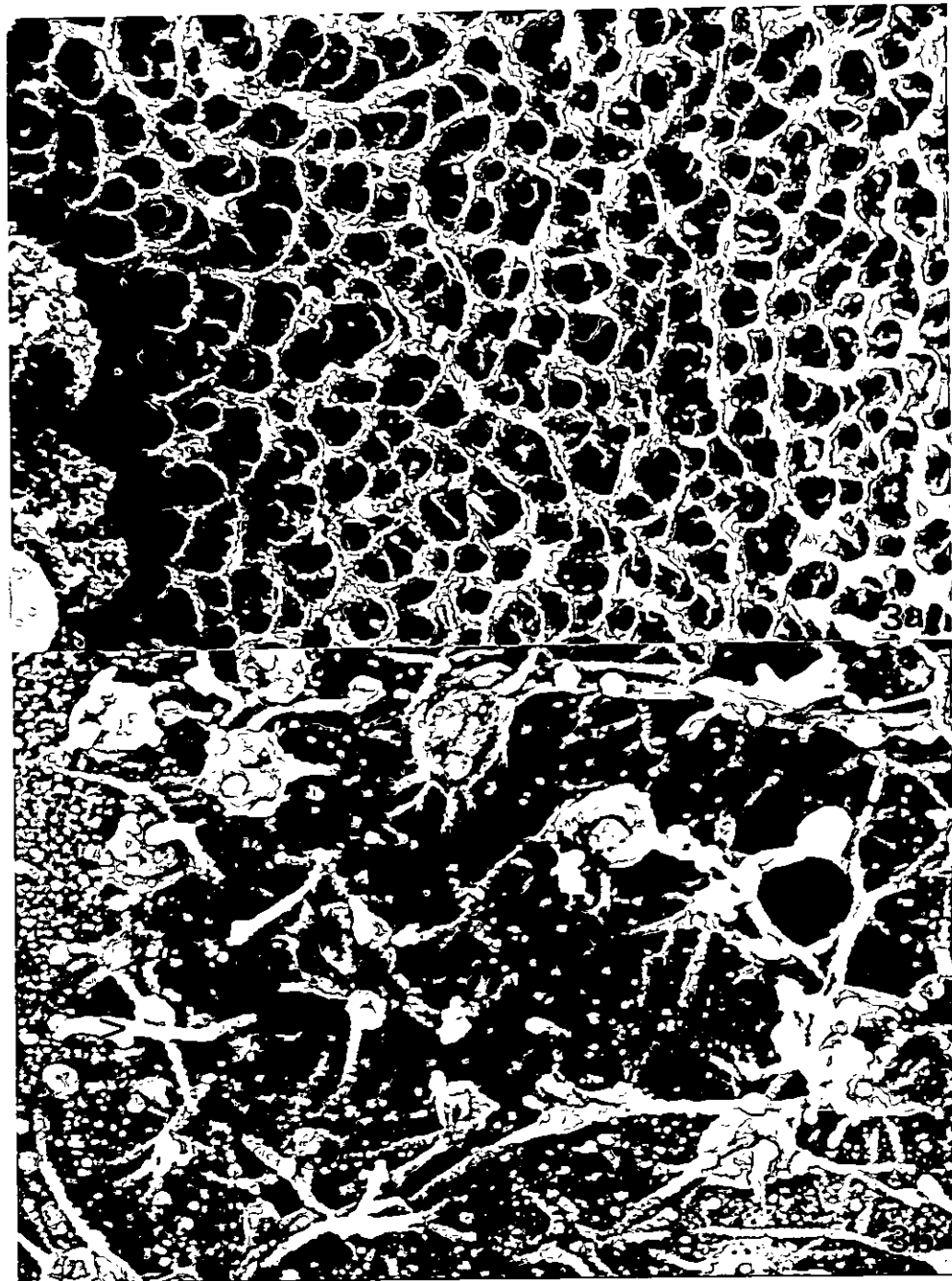


Figura 4. Microfotografías de contraste de fases de huevos transparentados con metanol:cloroformo (1:1) y teñidos con orceína lactoacética. (4a) placa metafásica de la primera división meiótica de un ovocito maduro (290x). (4b) vesícula germinativa de un ovocito inmaduro (52x).

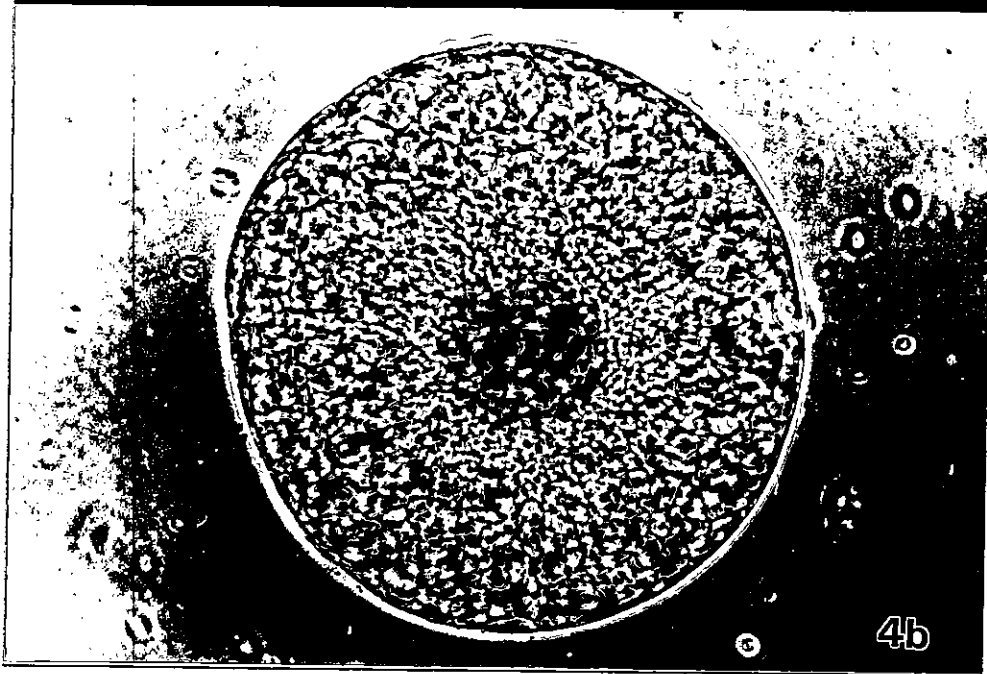
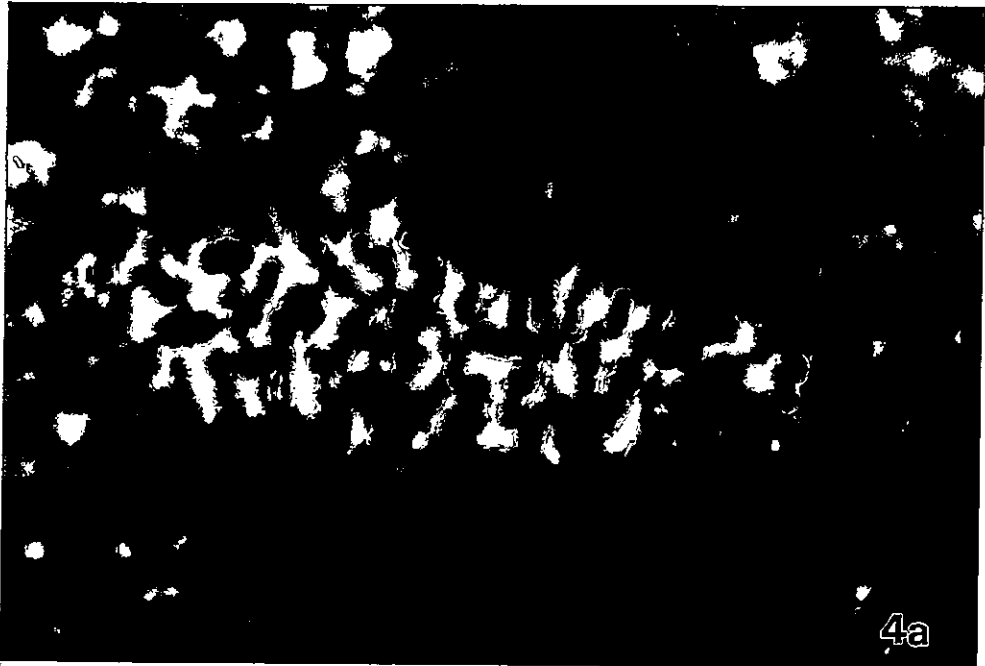


Figura 5. Microfotografías electrónicas de barrido. (5a) espermatozoide de *R. typus* en su contacto inicial con el ovocito, observe que el espermatozoide ha plegado sus rayos (3000x). En (5b) se observa un detalle de esta misma interacción, vea el extremo distal del proceso acicular dilatado, la modificación de las estriaciones longitudinales externas del proceso acicular y la degradación de las cubiertas ovocitarias que se ha interpretado como el inicio del proceso de digestión de éstas por parte del espermatozoide (61500x).



Figura 6. Microfotografías electrónicas de barrido. (6a) Muestra un espermatozoide que ha progresado en el proceso de penetración por las cubiertas ovocitarias (9500x). (6b) A mayor aumento se puede observar que las estriaciones longitudinales del proceso acicular han sido reemplazados por pliegues concéntricos de la superficie. Comparando esta figura con la 5 podrá observar el aumento del diámetro del canal de penetración del espermatozoide (55000x).



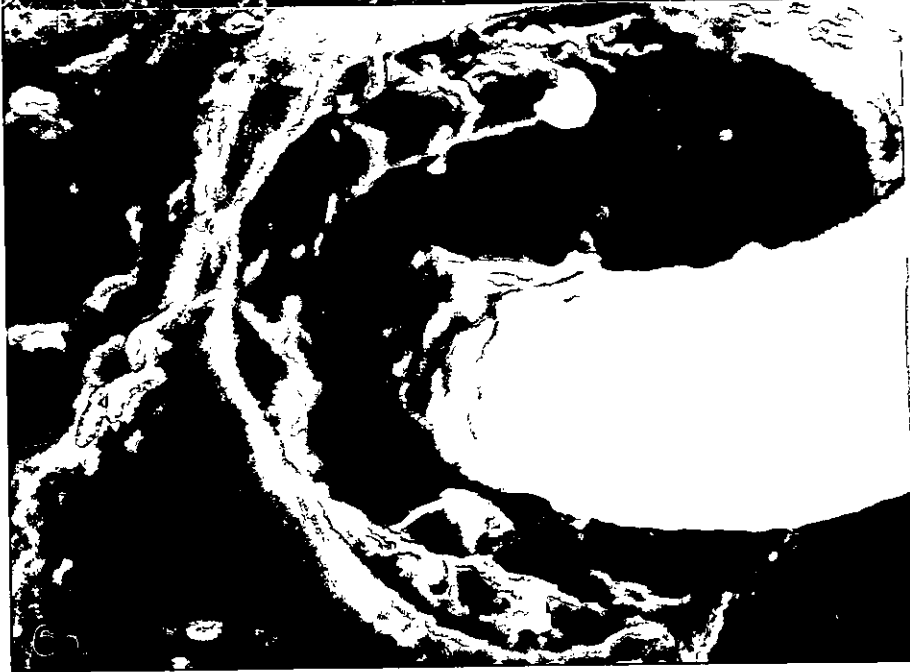


Figura 7. Microfotografía electrónica de barrido de: (7a) un espermatozoide en que se observa el extremo del proceso acicular sobre la membrana plasmática (4000x). (7b) A mayor aumento se observa que las microvellosidades del ovocito están en estrecho contacto con el proceso acicular (29000x).



Figura 8. Microfotografía electrónica de barrido de: (8a y b) etapas finales del proceso de penetración del espermatozoide al ovocito. En (a) observe que el proceso acicular ha penetrado completamente al ovocito quedando afuera sólo los rayos y espinas radiales (2500x), en (b) observe la formación de un cono de fecundación (2200x). (8c) Corte por un ovocito fecundado en el que se puede observar el espermatozoide totalmente incorporado en el citoplasma ovocitario (1700x).

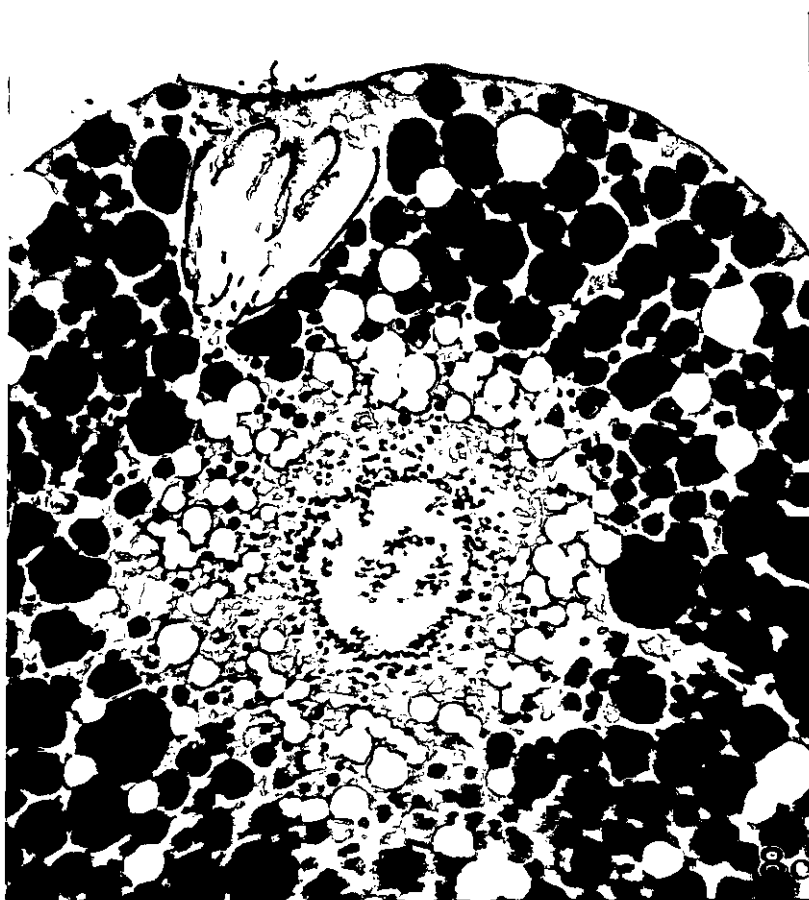
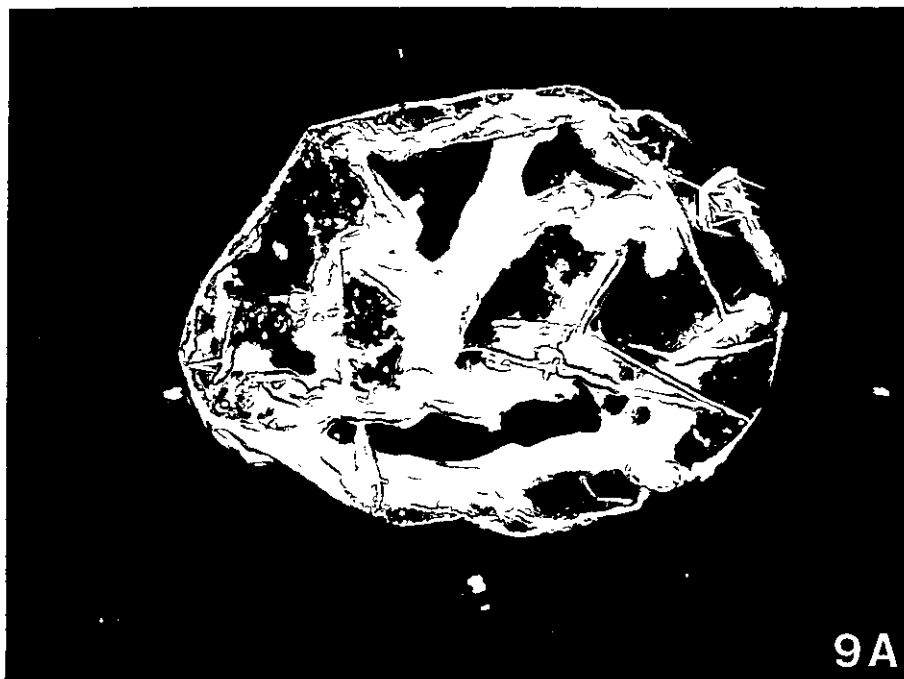


Figura 9. (9a) Microfotografía de contraste de fases de una cubierta ovocitaria aislada en agua de mar sin calcio a la que se adicionó 10 mM EGTA (32x). (9b y c) Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% de cubiertas de ovocitos maduros solubilizadas con beta mercaptoetanol y SDS, tinción con Azul de Coomassie (9b); tinción PAS, observe la presencia de, al menos, una banda PAS positiva (9c).



9A

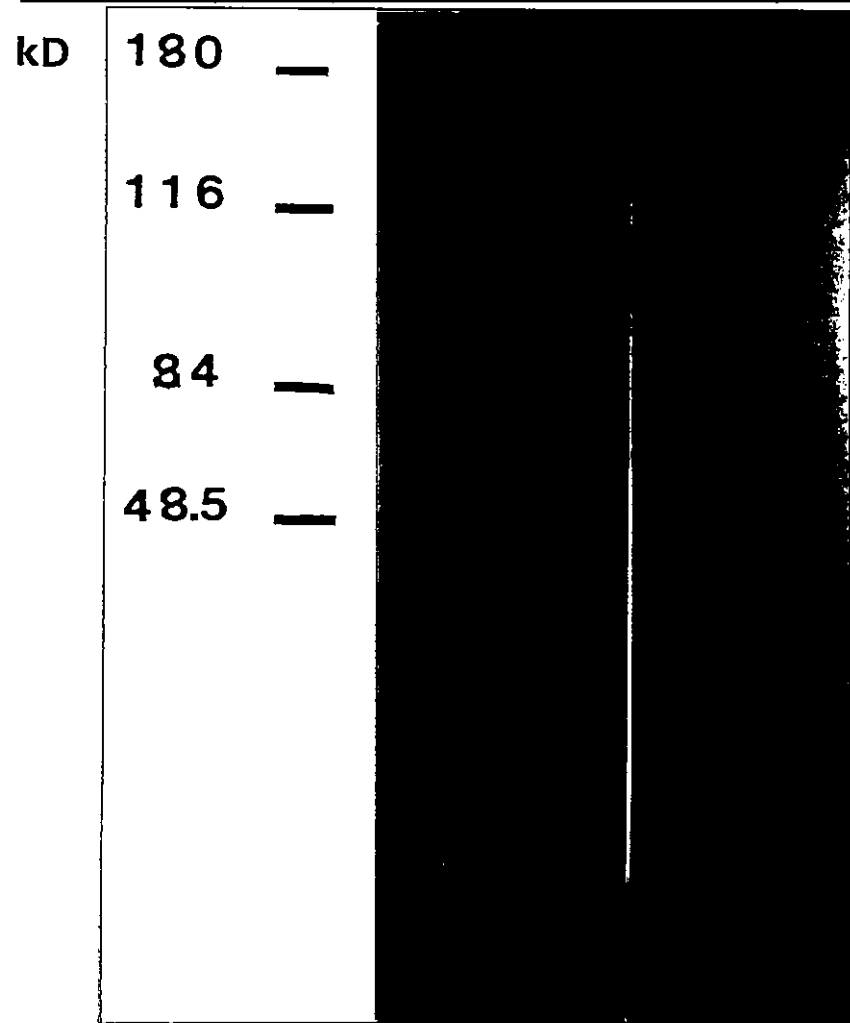


Figura 10. Microfotografía electrónica de barrido de un ovocito que está siendo penetrado por varios espermatozoides (750x). Evidencia suministrada en el texto sugiere que los espermatozoides podrían penetrar el ovocito generando poliespermia.



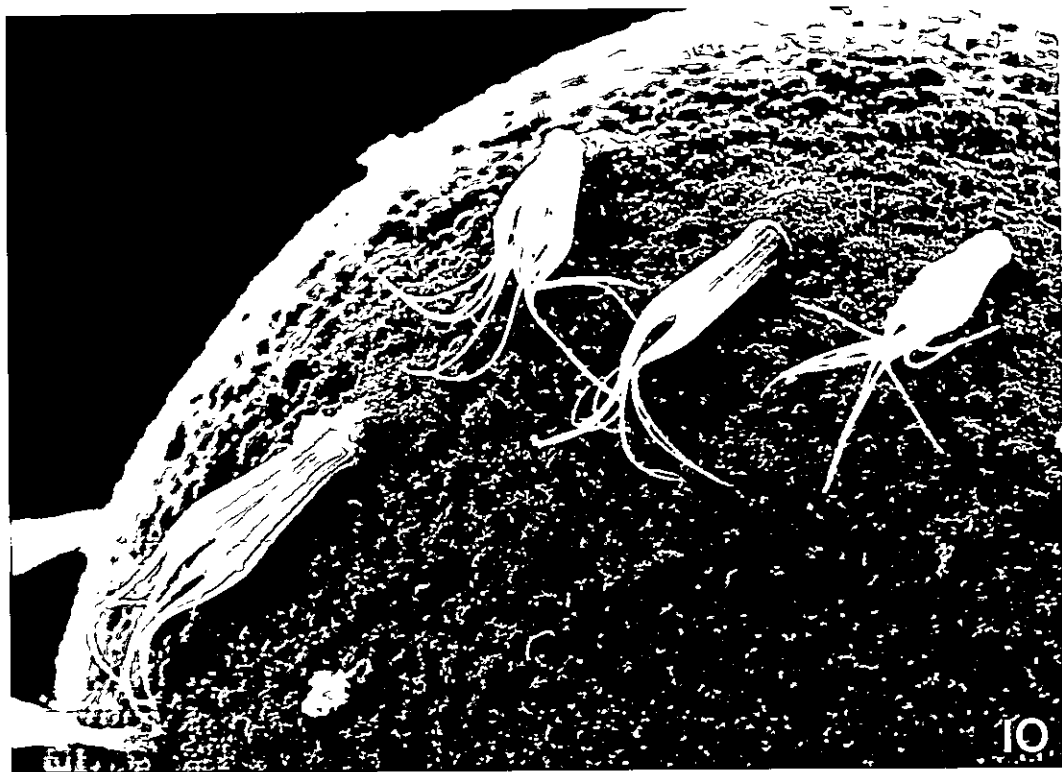


Figura 11. Geles de disolución con poliacrilamida al 10% y gelatina al 0,1%. Se observa una banda de actividad proteolítica.



Figura 12. Geles de disolución con poliacrilamida al 10% y gelatina al 0.1%. En (a) se observa la banda de digestión y en (b) y (c) la inhibición de esta actividad con 1 mM de SBTI y 1 mM de pAB, respectivamente.

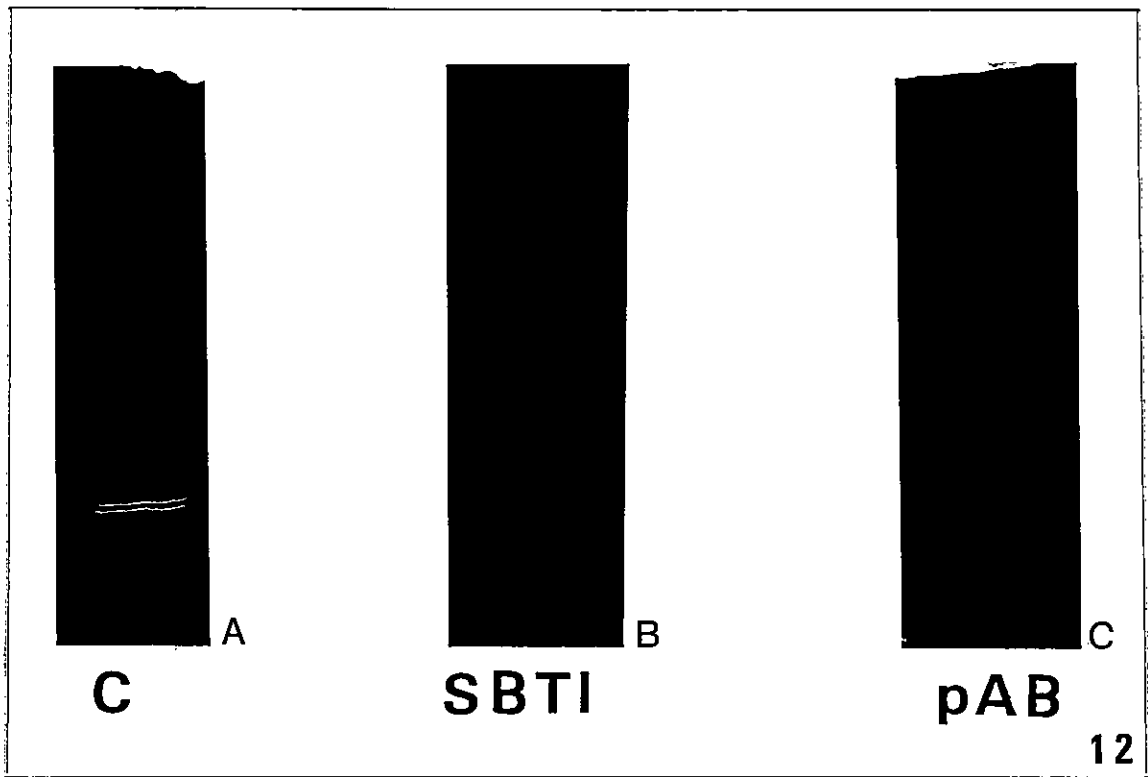


Tabla I. Muestra la inhibición de la fecundación *in vitro* de ovocitos maduros de *R. typus* inseminados con espermatozoides previamente tratados durante 15 minutos con cada uno de los inhibidores. La coincubación de los gametos se realizó en presencia de los inhibidores, durante 1 a 2 horas, en agua de mar natural microfiltrada, pH:8.0 y a 17°C. Como controles se usó espermatozoides que durante 15 minutos fueron mantenidos en agua de mar natural microfiltrada.

TABLA I

EFFECTO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN LA  
FECUNDACION DE OVOCITOS DE *Rhynchocinetes typus*

Inhibidor (mM)	Nº de huevos obser./ Nº de huevos fec.	% fecundación	% inhibición
Control (sin inhibidor)	1360/625	45.9	—
SBTI (25mM)	1350/336	24.9	45.8
PMSF (1mM)	164/28	17.1	62.8
pAB (1mM)	37/10	27.0	41.2

## REFERENCIAS

- Arboleda C. & Gerton G. (1988). Proacrosin/Acrosin during guinea pig spermatogenesis. *Dev. Biol.* 125:217-225.
- Austin, C.R. & Bishop, M.W.H. (1958a) Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 149:234-240.
- Austin, C.R. & Bishop, M.W.H. (1958b). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 149:241-248.
- Barros C., Bedford J., Franklin L. & Austin C. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34:c1-c5.
- Barros C. & Herrera H. (1977). Ultrastructural observations of the incorporation of guinea-pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 49:47-50.
- Barros C. & Franklin L. (1968). Behavior of the gametes membranes during sperm entry into the mammalian egg. *J. Cell. Biol.* 37:C13-C18.
- Barros C., Capote C., Pérez C., Becker M. & De Ioannes A. (1992). Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biol. Res.* 25:31-40.
- Barros C., Dupré E. & Viveros L. (1986). Sperm-egg interaction in the shrimp *Rhynchocinetes typus*. *Gam. Res.* 14:171-180.
- Bhattacharyya A., Goodpasture J. & Zaneveld L. (1979). Acrosin of mouse spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 237:e40-e44.



Bleil & Wassarman (1983). Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoproteins. *Dev. Biol.* 95:317-324.

Brown C., Andani Z. & Hartree E. (1975). Isolation from spermatozoa, activation by cations and inorganic solvents, and influence of cations on its reactions with inhibitors. *Biochem. J.* 149:133-146.

Clark W., Talbot P., Neal R., Mock C. & Salsler R. (1973). *In vitro* fertilization with non motile spermatozoa of the Brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Mar. Biol.* 22:353-354.

Clark W., Kleve M. & Yudin A. (1981). An acrosome reaction in natantian schrimp. *J. Exp. Zool.* 218:279-291.

Cherr G., Lambert H., Maizel S. & Katz D. (1986). *In vitro* studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.* 114:1419-131.

Cross N., Morales P., Overstreet J. & Hanson F. (1988). Induction of the acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.* 114:235-244.

De Ioannes A., Becker M.I., Pérez C., Capote C. & Barros C. (1990). Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. In: N. Alexander, D. Griffin, J. Spieler & G. Waites (eds) *Gamete Interaction: Prospects for immunocontraception*. Wiley Liss. New York: pp 185-195.

Dupré E. & Barros C. (1983). Fine structure of the mature spermatozoon of *Rhynchocinetes typus*, Crustacea Decapoda. *Gam. Res.* 7:1-18.

Dupré E. (1991). Interacción gamética en *Rhynchocinetes typus* (Crustacea, Decapoda, Natantia); destino de las estructuras espermáticas y formación del pronúcleo macho. Tesis de Magister. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

- Epel D. & Vacquier V. (1978). Membrane fusion events during invertebrate fertilization. *Cell. Surf. Rev.* 5:1-63.
- Florman H., Bechtol K. & Wassarman P. (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106:243-255.
- Florman H. & Wassarman P. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-324.
- Florman H. & First N. (1989a). The regulation of acrosomal exocytosis I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev. Biol.* 128:453-463.
- Florman H. & First N. (1989b). The regulation of acrosomal exocytosis II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev. Biol.* 128:464-473.
- Franklin L., Barros C. & Fussel. E. (1970). The acrosomal region and the acrosoma reaction in the sperm of the golden hamster. *Biol. Reprod.* 3:180.
- Fraser L. (1982). p-aminobenzamidina, an acrosin inhibitors, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 185-194.
- Green J. & Summers R. (1979). Ultrastructural localization of a trypsin-like enzyme in sea urchin sperm. *Amer. Zool.* 19:904.
- Green J. & Summers R. (1980). Ultrastructural demonstration of trypsin-like protease in acrosome of sea urchin sperm. *Science* 209:398-400.
- Griffin F., Clark W., Crowe J. & Crowe I. (1987). Intracellular pH decreases during the *in vitro* induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingestis*. *Biol. Bull.* 173:311-323.

- Griffin F., Shigekawa K. & Clark W. (1988). Formation and structure of the acrosomal filament in the sperm of *Sicyonia ingestis*. J. Exp. Zool. 246:94-102.
- Griffin F. & Clark W. (1990). Induction of acrosomal filament formation in the sperm of *Sicyonia ingestis*. J. Exp. Zool. 254: 296-304.
- Heller, E. & Raftery, M. (1973). Isolation and purification of three egg-membrane lysins from sperm of the marine invertebrate *Megathura crenulata*. Biochemistry 12:4106-4113.
- Heussen C. & Dowdle E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing SDS and copolymerized substrates. Anal. Biochem. 102:196-202.
- Hoshi M., Moriya T., Aoyagi T., Umezawa H., Mohri H. & Nagay Y. (1979). Effects of hydrolase inhibitors on fertilization of sea urchins. 1. Protease inhibitors. Gam. Res. 2:107-119.
- Hoshi M. & Moriya T. (1980). Arylsulfatase of sea urchin sperm. Arylsulfatase as a lysin of sea urchins. Dev. Biol. 74:343-350.
- Hoshi M., Numakuna T. & Sawada H. (1981). Evidence for participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: Effects of protease inhibitors.
- Jones R., Brown C. & Lancaster R. (1988). Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. Development 102:781-792.
- Karnovsky M. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. 27:137a.

Kleve M., Yudin A. & Clark W. (1980). Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell*, 12:29-45.

Kligman I., Glasner M., Storey B. & Kopf G. (1991). Zona pellucida-mediated acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa: characterization of the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 145:344-355.

Kuzan F., Fleming A., Seidel G. (1984). Successful fertilization *in vitro* of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil. Steril.* 41:766-770.

Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Levine A., Walsh K. & Fodor E. (1978). Evidence of an acrosine like enzyme in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 63:299-306.

Leyton L., De Ioannes A., Croxatto H., Graham E., & Elce J. (1986). Two satisfactory methods for purification for human acrosin. *Biochem. Cell Biol.* 64:1020-1024.

Leyton L. & Saling (1989). 95 KD sperm proteins bind ZP3 and serve as substrates for tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11692-11695.

Lynn J. & Clark W. (1983). A morphological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 164:446-458.

Margni R. (1989). *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos.* pp 651-652. Ed. Médica Panamericana.

Marino R., De Santis R., Hirohashi N., Hoshi M., Pinto M. & Usui N. (1992). Purification and characterization of a vitelline coat lysin from *Ciona intestinalis* spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 32:383-388.

Matsumura K. & Aketa K. (1991). Proteasome (Multicatalytic Proteinase) of sea urchin sperm and its possible participation in the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 29:189-199.

Miyamoto H. & Chang M. (1973). Effects of protease inhibitors on the fertilizing capacity of hamster spermatozoa. *Biol. reprod.* 9:533-537.

Nagae T., Yanaguimachi R., Srivastava P. & Yanaguimachi H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 45:701-707.

O'Rand M. & Fisher S. (1987). Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae. *Dev. Biol.* 119:551-559.

Pérez C., Roco M., Castro A., Dupré E., Shatten G. & Barros C. (1991). Localization of microfilaments and a tubulin-like protein in Crustacean (*Rhynchocinetes typus*) spermatozoon. *Mol. Reprod. Dev.* 28:373-379.

Pinto M., Hoshi M., Marino R., Amoroso A. & De Santis R. (1990). Chymotrypsin-like enzymes are involved in sperm penetration through the vitelline coats of *Ciona intestinalis* egg. *Mol. Reprod. Dev.* 26:319-323.

Polakoski K. & Mc Rorie R. (1973). Boar acrosin. Classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248:8183-8188.

Sarath G., de la Motte R. & Wagner F. (1989). Protease assay methods. En *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Editado por Beynon R. y Bond J. IRL Press. Eynsham. Oxford. Inglaterra.

Sawada H., Yokosawa H., Hoshi M. & Ishii S. (1982). Evidence for acrosine-like enzyme in sperm extract and its involvement in fertilization of the ascidian *H. Roretzi*. Gam. Res. 5: 291-301.

Sawada H., Yokosawa H. & Ishii S. (1984) Purification and characterization of two types of trypsin-like enzymes from sperm of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Evidence for the presence of spermosin, a novel acrosin-like enzyme. J. Biol. Chem. 259: 2900-2904.

Schill W. & Wolff H. (1974). Ultrastructure of sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen preservation. Int. J. Fertil. 19:217-223.

SeGall G. & Lennarz W. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. Dev. Biol. 71:33-48.

Sousa M. & Azevedo C. (1986). Cytochemical study on the spermatozoon and at early fertilization in *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea). Biol. Cell 56:79-84.

Sousa M., Moradas-Ferreira P. & Acevedo C. (1992). Presence of a trypsin-like protease in starfish sperm acrosome. J. Exp. Zool. 261: 349-354.

Spurr, A. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 29:31-43.

Stambaugh R., Brackett B. & Mastroianni L. (1969). Inhibition of *in vitro* fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. Biol. Reprod. 1:223-227.

Töpfer-Petersen E., Steinberger M., Eschenbach E. & Zucker A. (1990). Zona pellucida induces proacrosin to acrosin conversion, Int. J. Androl. 13:190-196.

Tyler A. (1939). Extraction of an egg membrane lysin from sperm of the giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 25:317-

Urch, U., Warrip, N. & Hedick J. (1985). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233:479-483.

Uto N., Yoshimatsu N., Lopata A. & Yanaguimachi R. (1988). Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 248:113-120.

Vacquier V. & Moy G. (1977). Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:2456-2460.

Valdivia M., Yunes R., Meléndez J., De Ioannes A., Leyton L., Becker MI. & Barros C. (1993). Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Mol. Reprod. Dev.* (en revisión).

Wassarman P., Bleil J., Florman H., Greve J., Roller R. & Salzmann G. (1986). Nature of the mouse egg's receptor for sperm. En: *The Molecular and Cellular biology of Fertilization.* HEDRICK JL (ed) NY, Plenum Press pp. 55-71.

Wassarman P. (1990). Profile of mammalian sperm receptor. *Dev.* 108:1-17.

Yamada Y. & Aketa K. (1981). Vitelline layer lytic activity in sperm extracts of the sea urchin, *Hemicentrotus purpuratus*. *Gam. Res.* 4:193-202.

Yoshimatsu N. & Yanaguimachi R. (1988). Effects of cations and other medium components on the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Dev. Growth Differ.* 30:651-659.

Yudin A., Clark W. & Kleve M. (1979). An acrosome reaction in Natantian sperm. *J. Exp. Zool.* 210:569-574.

Yunes R., Meléndez J., Valdivia M. & Barros C. (1992). Golden hamster perivitelline spermatozoa do not show proacrosin/acrosin at the inner acrosomal membrane. *Biol. Res.* 25:91-93.

Yunes R., Meléndez J., Giacaman A., De Ioannes A. & Barros C. (1993). Reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida de hamster. En: Avances en Biología Celular, J. Becerra & JM. Pérez-Fígares (eds)., Ed: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga, Málaga, España. (en prensa).

Zaneveld L., Robertson R., Kessler M. & Williams W. (1971). Inhibition of fertilization *in vivo* by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. J. Reprod. Fertil. 25:387-392.