

VCH-FC
DC-B
L685
C-1

EVENTOS MOLECULARES IMPLICADOS EN
LAS INTERACCIONES DE GAMETOS
DE RATON

TESIS ENTREGADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
DE CHILE, EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGIA

LISETTE LEYTON CAMPOS

JUNIO 1989



Director de Tesis : Dra. Patricia Saling
Department of Obstetrics and Gynecology and
Department of Cell Biology
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina, USA.

Profesor Patrocinante : Dr. Juan Fernández
Laboratorio de Biología Celular
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de aprobación de Tesis de Doctorado.

Se informa a la comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias, que
la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

LISETTE LEYTON CAMPOS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, para el Grado
de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de
Defensa de Tesis rendido el día 26 de Julio de 1989.

Profesor Patrocinante

Dr. Juan Fernández



Comisión Informante de Tesis

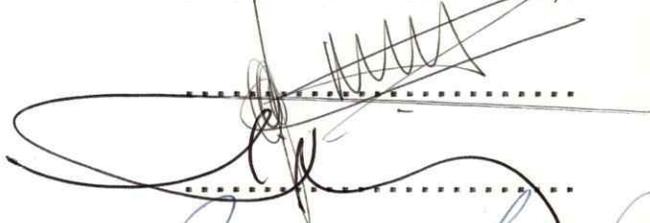
Dr. Luis Valladares



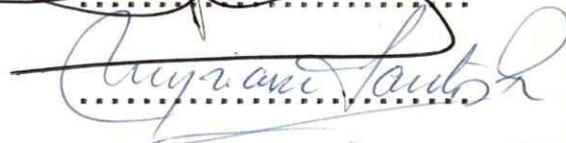
Dr. Patricio Morales



Dr. Miguel Llanos



Dr. Arturo Ferreira



Dra. Myriam Santos



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de la Dra. Patricia Saling
ubicado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de Duke
University Medical Center, Durham, North Carolina, USA.



A mis padres

A Pat y Keith



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en muy breves palabras a todas aquellas personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis.

A mis familiares y amigos que en sus cartas me enviaban el cariño y apoyo que se necesita para sobrevivir en una tierra tan lejana y distinta. En especial a mis padres, hermanos y a Francisco.

I would also like to thank the members of my North American family for their love and friendship: Pat and Keith, all my hispanic friends and my labmates.

I am grateful to Drs. K. Burrige, S. Earp, J. Glenney, P. Maness, and B. McCune for their generous gifts of some of the antibodies used in this study.

Al Dr. Juan Fernández por la dedicación prestada en su patrocinio.

A Alfredo y a todo el grupo de Inmunología de la P. Universidad Católica de Chile, por recibirme en su laboratorio como de vuelta en casa y brindarme las facilidades para la edición de esta tesis. A mis amigos del Laboratorio de Endocrinología de la misma Universidad.

Al Club de Rotarios de La Reina y a la Fundación Rotaria del Rotary International por financiar mi estadía en los Estados Unidos y a Duke University por recibirme en su hermoso Campus.



ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica de bovino
CTC	Clortetraciclina
DAG	1,2 Diacil glicerol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Inmuncensayo en fase sólida de enzimas
FTU	Unidad funcional que transduce una señal
IAP	Proteína activante de islote
IgG	Inmunoglobulina G
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₄	Inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato
kD	Kilodalton
mAc	Anticuerpo monoclonal
MC	Medio de cultivo
M _r	Peso molecular relativo
pAc	Anticuerpo policlonal
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
PBS	Tampón fosfato salino
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PK-C	Proteína quinasa C
PL-C	Fosfolipasa C

PTK	Proteína quinasa para tirosinas
PVP	Polivinil pirrolidona
RA	Reacción acrosómica
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TN	Tampón Tris-NaCl
TNC	Tampón Tris-NaCl-CaCl ₂
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato
TPA-ZP	Zona pelúcida modificada por TPA
ZP	Zona pelúcida

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 : Esquema de la hipótesis de agregación de los receptores espermáticos inducida por la ZP3.
- FIGURA 2 : Comparación del perfil de proteínas de ZP de ovocitos ováricos aisladas con dos métodos diferentes.
- FIGURA 3 : Análisis autorradiográfico de las proteínas de ZP separadas por PAGE-SDS antes (A) y después (B) de la purificación.
- FIGURA 4 : Ensayo de ELISA para titular sueros preinmunes e inmunes contra ZP total solubilizada.
- FIGURA 5 : Reactividad de los anticuerpos anti-proteínas de la ZP reveladas por "immunoblots".
- FIGURA 6 : Cromatografía de afinidad en columna de proteína A-Sefarosa de los sueros de conejo.
- FIGURA 7 : Análisis de las IgGs purificadas de sueros de conejos mediante PAGE-SDS.

FIGURA 8 : Análisis autorradiográfico de la reactividad de anti-ZP2 y anti-ZP3 con ZP total y solubilizada, por ensayo de "Dot-Blot".

FIGURA 9 : "Dot-Blot" de glicopéptidos de ZP con anticuerpos anti-ZP.

FIGURA 10 : Purificación de fragmentos Fab de IgG anti-ZP3 en columna de afinidad de proteína A-Sefarosa.

FIGURA 11 : Análisis de las Igs anti-ZP3 antes y después de la digestión con papaína mediante PAGE-SDS.

FIGURA 12 : Reactividad de anticuerpos anti-proteínas de ZP ensayadas por "immunoblot".

FIGURA 13 : Efecto del mAc M42 en las reacciones de acrosoma inducidas por ZP3.

FIGURA 14 : Efecto del mAc M42 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides capacitados y tratados con proteínas de la ZP.

FIGURA 15 : Efecto del mAc M42 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides capacitados e incubados con proteínas de ZP modificadas por TPA.

FIGURA 16 : Distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides de ratón tratados con glicopéptidos de ZP seguidos por incubación con anticuerpos anti-proteínas de ZP.

FIGURA 17 : Efecto de la concentración de IgG anti-ZP3 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides tratados con glicopéptidos.

FIGURA 18 : Efecto de los anticuerpos anti-ZP en la distribución de patrones de fluorescencia de CTC de espermatozoides capacitados e incubados con TPA-ZP.

FIGURA 19 : Reactividad por "Western Blot" de las proteínas espermáticas con las de la ZP marcadas con ^{125}I .

FIGURA 20 : Reactividad de ^{125}I -ZP con diferentes concentraciones de espermatozoides.

FIGURA 21 : Efecto de la capacitación en la fosforilación de proteínas espermáticas por tirosina quinasas.

FIGURA 22 : Efecto de Ca^{2+} y La^{3+} sobre la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas.

FIGURA 23 : Efecto de ZP en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas.

FIGURA 24 : Efecto del mAc M42 en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas.

FIGURA 25 : Localización inmunofluorescente de los residuos de fosfotirosina.

FIGURA 26 : Un modelo para la reacción acrosómica.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 : Reactividad de los anticuerpos anti-fosfotirosina con
proteínas espermáticas de 95 kD que se unen a ZP

RESUMEN

Una de las interacciones gaméticas importantes que aseguran el éxito de la fecundación es aquella que ocurre entre la membrana plasmática del espermatozoide y la zona pelúcida (ZP), una cubierta acelular que rodea al ovocito. La interacción se produce como resultado del reconocimiento entre moléculas específicas del espermatozoide y de la ZP.

No ha sido todavía posible determinar cual(es) es(son) los receptor(es) espermáticos para la ZP. Sin embargo, se sabe que la ZP3, una de las glicoproteínas de la ZP de ratón, es responsable de la unión al espermatozoide, actuando como ligando. Luego de dicha unión, la ZP3 induce la reacción acrosómica (RA), un evento exocitótico que ocurre como resultado de la fusión y vesiculación de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Esto permite la liberación del contenido acrosomal dejando expuesta la membrana acrosomal interna.

En esta tesis se estudió algunos de los eventos moleculares que ocurren durante la fecundación en el ratón. Específicamente aquellos involucrados en la interacción espermatozoide-ZP y la RA inducida por la ZP3.

En el ratón, la RA ha sido separada en dos fases: 1) fase de transición de "B" a "S" y 2) fase de transición de "S" a "AR".

El anticuerpo monoclonal murino M42, dirigido contra un antígeno de espermatozoides de ratón se empleó en algunos de los experimentos realizados en este trabajo porque inhibe la RA inducida fisiológicamente (ZP), pero no la inducida farmacológicamente (ionóforo de calcio, A 23187). Se determinó que el anticuerpo monoclonal M42 bloquea específicamente las RA inducidas por la ZP3. Sin embargo, si el anticuerpo se agrega a espermatozoides que se encuentran en un estado intermedio de la RA ("S"), no tiene efecto sobre la RA. Estas observaciones llevaron a sugerir que el anticuerpo M42 actúa en una fase temprana del proceso, y que no puede bloquear la RA una vez que la cascada de reacciones se ha iniciado.

Es posible que durante la primera fase de transición de la RA ocurra un reordenamiento de moléculas a nivel de la membrana. Así, quizás el anticuerpo M42 actúe bloqueando el movimiento de los componentes de la membrana. De esta forma, una vez que el reordenamiento y la formación de complejos moleculares se produce, ya no es capaz de inhibir el proceso. Con esta idea en mente y tratando de comprender cómo ZP3 se une a los receptores espermáticos y luego induce la RA se ensayó la hipótesis que la ZP3 podría producir la agregación de los receptores en el espermatozoide, desencadenando las reacciones que llevan a la RA. Se sabe que pequeños glicopéptidos de la ZP3 retienen su habilidad de unirse a los espermatozoides pero no inducen la RA, lo cual sugiere que el gatillamiento de la RA requiere de la parte peptídica de la ZP3. La hipótesis se examinó entonces, incubando espermatozoides con glicopéptidos de la ZP y utilizando como entrecruzador de los glicopéptidos unidos, anticuerpos

policlonales anti-ZP3. Se observó que la bivalencia de los anticuerpos era suficiente para inducir la RA. Mientras tanto, fragmentos Fab de IgG anti-ZP3 (monovalentes) no inducían la RA, a menos que se adicionara un segundo anticuerpo bivalente capaz de entrecruzar los fragmentos Fab (IgG anti-conejo). Estos hallazgos sugieren que la agregación de proteínas del espermatozoide, reconocidas por los glicopéptidos de la ZP3, es suficiente para gatillar los eventos que ocurren durante la exocitosis acrosomal.

Se desconoce cuales son las rutas bioquímicas que siguen al evento de agregación. Sin embargo, en espermatozoides de ratón se han identificado algunas moléculas y se han detectado algunos procesos que participan en la "transducción" de señales en membranas de células somáticas. Es el caso de proteínas reguladas por nucleótidos de guanina (G_i), fosfolipasa C, flujo de calcio y protones y proteína quinasa-C.

Por analogía con mecanismos de "transducción" de señales presentes en otros tipos celulares (células con receptores a insulina o a factor de crecimiento epidermal), se estudió la existencia, en espermatozoides de ratón, de una proteína quinasa específica para tirosina. Para esto se utilizó anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-fosfotirosina y se observó que tres proteínas espermáticas de pesos moleculares 52, 75, y 95 kD reaccionaban con ellos. Las proteínas fosforiladas de 52 y 75 kD se detectaron sólo en espermatozoides capacitados, mientras que la de 95 kD estaba presente también en espermatozoides frescos. Además, se encontró que el nivel de inmunoreactividad de la proteína de 95 kD no está relacionada con la

motilidad, pero sí aumenta con la capacitación e interacción de los espermatozoides con la ZP.

Por otra parte, se intentó abordar la caracterización del receptor del espermatozoide para la ZP3, utilizando ensayos de "Western Blot" de proteínas espermáticas probadas directamente con proteínas de la ZP purificadas y marcadas radioactivamente. ^{125}I -ZP y ^{125}I -ZP3 reaccionaron de igual manera con proteínas de 95 y 42 kD y aunque se desconoce la relación que existe entre estas últimas, en cuanto a su interacción con ZP, resultó interesante que una proteína de 95 kD se uniera a la glicoproteína de la ZP y pudiera al mismo tiempo servir de sustrato para una tirosina quinasa. Las siguientes observaciones sugieren que pudiera tratarse de la misma proteína: a) proteínas espermáticas de 95 kD unidas a la ZP reaccionan además con anticuerpos anti-fosfotirosina de una manera que es dependiente de la concentración de la ZP y b) los anticuerpos anti-fosfotirosina reaccionan con proteínas localizadas en la región acrosomal, la misma área de los espermatozoides que se ha demostrado unen ZP3.

Los resultados presentados en esta tesis son utilizados en la elaboración de un modelo que explique, a nivel molecular, como la ZP3 induce la cascada de reacciones bioquímicas que llevan a la exocitosis acrosomal.

ABSTRACT

The interaction between mammalian spermatozoa and the zona pellucida (ZP), an acellular coat surrounding the oocyte, is a crucial step in the fertilization process. This interaction involves recognition between specific molecules present in the sperm plasma membrane and in the ZP.

Sperm receptor(s) for ZP binding has(have) not been characterized yet. However, it is known that ZP3, one of the three glycoproteins of the ZP, is responsible for the binding activity (ligand). After such a binding, ZP3 induces the acrosome reaction (AR), an exocytotic event that takes place as a result of fusion and vesiculation of the sperm plasma membrane with the outer acrosomal membrane. Subsequently, the acrosomal content is released and the inner acrosomal membrane becomes the limiting membrane.

In this thesis we studied some of the molecular events that take place during fertilization in mouse. Specifically, those related with sperm-ZP interaction and the AR induced by ZP3.

In mouse, the AR has been subdivided in two steps: 1) transition between "B" to "S", and 2) transition between "S" to "AR".

The murine monoclonal antibody, M42, directed against a mouse sperm antigen, was used in some of these experiments, since it inhibits physiologically (ZP) but not pharmacologically (Ca^{2+} ionophore, A 23187) induced AR. It is shown here, that M42 antibody

specifically blocks AR induced by ZP3. However, when it is added to sperm that are already in an intermediate state of the AR ("S"), it has no effect on the surface. These findings suggest that the M42 antibody acts in an early step of the AR cascade and that it is unable to prevent subsequent events of this cascade once it has been initiated.

It is likely that during the first transition step of the AR, a molecular rearrangement at the membrane surface takes place. In this regard, perhaps the M42 antibody acts by blocking the movement of components in the membrane, therefore, once the rearrangement and formation of molecular complexes is underway, the antibody is no longer effective. Having this in mind, and trying to understand how does ZP3 bind to sperm receptors and then induce the AR, the hypothesis that ZP3 might cause the aggregation of sperm receptors, triggering the reactions that lead to AR, was tested. It is known, that small ZP3 glycopeptides retain their binding activity but not AR-inducing activity, suggesting that the polypeptide portion of ZP3 is important for AR triggering. In order to test the hypothesis, sperm were incubated with ZP glycopeptides and polyclonal antibodies anti-ZP3 were used as a cross-linking agent of sperm-bound glycopeptides. It was found that bivalency of the antibodies was sufficient to induce the AR. Whereas, univalent Fab fragments of anti-ZP3 IgG, do not induce the AR, unless a second bivalent antibody, able to cross-link the Fab fragments, was added to the medium. These findings suggest that the aggregation of sperm proteins that are

recognized by ZP3 glycopeptides, is enough to trigger the events leading to acrosomal exocytosis.

It is unknown which are the biochemical routes following the aggregation event. However, some molecules and processes that participate in membrane signal transduction in somatic cells, have been identified in mouse sperm. This is the case of specific guanine nucleotides regulatory proteins (G_i), phospholipase C, Ca^{2+} and H^+ fluxes, and protein kinase C.

By analogy with signal transduction mechanisms that exist in other cell types (cells possessing insulin or epidermal growth factor receptors), the presence of a protein tyrosine kinase was studied in mouse sperm. Monospecific polyclonal antibodies anti-phosphotyrosine were used for this purpose, and three sperm proteins with molecular weight of 95, 75, and 52 kD were found tyrosine phosphorylated. The 52 and 75 kD proteins were detected only in capacitated sperm, while the 95 kD protein was phosphorylated in both, fresh and capacitated sperm. Furthermore, it was found that the immunoreactivity of the 95 kD protein with the antibodies is not related to sperm motility, but it is increased with capacitation and further with sperm ZP-binding.

On the other hand, it was attempted to characterize sperm receptor for ZP3 by using Western Blot assay of sperm proteins directly probed with purified and labelled ZP proteins. ^{125}I -ZP and ^{125}I -ZP3 react with 95 and 42 kD sperm proteins in a similar extent. Although, the relationship between these 95 and 42 kD proteins is unknown, it is interesting that a 95 kD protein that binds to ZP3 could also serve as a substrate for protein tyrosine kinase. The

following observations suggest that it might be the same protein: a) 95 kD sperm proteins that bind to ZP also react with anti-phosphotyrosine antibodies in a ZP-concentration dependent manner, and b) anti-phosphotyrosine antibodies react with proteins localized in the acrosomal region, the same area of the sperm shown to bind ZP3.

The findings presented in this thesis are used to present a model which explain, at a molecular level how does ZP3 induce the cascade of biochemical reactions leading to the acrosomal exocytosis.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	14
1. Preparación de material biológico y reactivos.....	14
1.1. Obtención de gametos.....	14
1.1.1. Ovocitos.....	14
1.1.2. Espermatozoides.....	15
1.2. Obtención de ZP de ovocitos ováricos.....	15
1.3. Obtención de ZP modificadas por el TPA.....	16
1.4. Preparación de glicopéptidos de la ZP.....	17
1.5. Ensayos biológicos.....	18
1.5.1. Bicensayo de unión de espermatozoides a la ZP.....	18
1.5.2. Bicensayo de competencia en la unión de espermatozoides a ZP intactas.....	18
1.6. Evaluación del estado del acrosoma por ensayo de fluorescencia.....	19
1.7. Purificación de las glicoproteínas de la ZP.....	20
1.8. Reactivos inmunológicos.....	22
1.8.1. Anticuerpos monoclonales M42.....	22
1.8.2. Anticuerpos policlonales anti-fosfotirosina.....	22
1.8.3. ¹²⁵ I-IgG anti-conejo preparada en cabra.....	23

1.8.4. Anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de la ZP y su purificación.....	23
1.8.5. Preparación de los fragmentos Fab de anticuerpos anti-ZP3.....	25
1.9. Caracterización de los anticuerpos contra proteínas de la ZP.....	25
1.9.1. Titulación de los sueros por ELISA.....	25
1.9.2. Caracterización de sueros de conejo por "immunoblots" con la ZP.....	26
1.9.3. Titulación de las Igs anti-ZP por la técnica de "Dot Blot".....	27
1.9.4. Ensayo de proteínas.....	28
2. Anticuerpos monoclonales M42 y la reacción acrosómica inducida por la ZP.....	28
2.1. Efecto del mAc M42 sobre la actividad inductora de RA que posee la ZP.....	28
2.2. Efecto del mAc M42 sobre espermatozoides con acrosoma en distintos estados de la reacción.....	29
3. Estudio de la hipótesis de agregación de receptores utilizando Igs anti-ZP3.....	30
3.1. Efecto de Igs anti-ZP3 bivalentes sobre la actividad inductora de la reacción acrosómica.....	30
3.2. Efecto de Igs anti-ZP3 monovalentes sobre la actividad inductora de la reacción acrosómica.....	31
4. Estudio de la presencia de un sustrato para tirosina quinasa y los receptores para ZP3.....	31

4.1.	Electroforesis e "immunoblot" de proteínas espermáticas..	31
4.1.1.	Detección de proteínas que se unen a la ZP.....	32
4.1.2.	Inmunodetección de residuos de fosfotirosinas en espermatozoides.....	33
4.2.	Detección de residuos de fosfotirosina en proteínas espermáticas unidas a la ZP.....	34
4.2.1.	Preparación de proteínas espermáticas de 95 kD.....	34
4.2.2.	Ensayo de "Dot Blot" para detectar fosfotirosinas.....	34
4.3.	Inmunofluorescencia indirecta para detectar residuos de fosfotirosina.....	35
RESULTADOS.....		37
1.	Preparación de material biológico y reactivos.....	37
1.1.	Obtención y purificación de glicoproteínas de la ZP.....	37
1.2.	Glicopéptidos de la ZP.....	37
1.3.	Caracterización de los antisueros dirigidos contra ZP2 y ZP3.....	40
1.4.	Purificación y caracterización de las Igs anti-ZP2 y anti-ZP3.....	41
1.5.	Obtención de fragmentos Fab de IgG anti-ZP3.....	46
2.	Anticuerpos monoclonales M42 y la reacción acrosómica inducida por la ZP.....	51
2.1.	Efecto del mAc M42 en la reacción acrosómica inducida por la ZP.....	51
2.2.	Efecto del mAc M42 sobre espermatozoides con acrosomas en distintos estados de la reacción.....	54

3.	Estudio de la hipótesis de agregación de receptores utilizando Igs anti-ZP3.....	58
3.1.	Inducción de reacción acrosómica por glicopéptidos de la ZP y anticuerpos contra ZP3 bi- y monovalentes.....	58
3.2.	Inducción de la reacción acrosómica por ZP modificada por TPA y anticuerpos policlonales anti-ZP3.....	61
4.	Estudio de la presencia de un sustrato para tirosina quinasa y los receptores para la ZP3.....	61
4.1.	Detección de proteínas espermáticas que se unen a la ZP..	61
4.2.	Inmunodetección de residuos de fosfotirosinas en proteínas espermáticas.....	64
4.3.	Efecto del Ca^{2+} y del La^{3+} en la fosforilación de residuos de tirosina.....	67
4.4.	Efecto de ZP en la fosforilación de residuos de tirosina.....	71
4.5.	Efecto del mAc M42 en la fosforilación en residuos de tirosina.....	71
4.6.	Relación entre la proteína de 95 kD que se une a la ZP y la que sirve de sustrato para la tirosina quinasa.....	73
4.7.	Localización por inmunofluorescencia de los residuos de fosfotirosina en espermatozoides intactos.....	75
	DISCUSION.....	79
	Proposición de un modelo para la reacción acrosómica.....	89
	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	98

REFERENCIAS.....	100
APENDICE I.....	110
Medios y soluciones tamponantes.....	110
APENDICE II.....	113
Trabajos publicados	113

INTRODUCCION

El desarrollo de la mayoría de los animales comienza con la fecundación, un proceso donde dos células haploides altamente especializadas se fusionan para generar una célula diploide denominada cigoto. Los mecanismos que regulan y controlan la precisión de la fecundación existen en múltiples niveles para asegurar la exitosa continuidad de la vida. En mamíferos, así como en numerosos otros grupos animales, dichas células haploides son: el gameto femenino, u ovocito, y el gameto masculino, o espermatozoide.

La maduración completa de los espermatozoides es un requerimiento importante para que ambos gametos puedan reconocerse e interactuar entre sí. El espermatozoide maduro, puede ser "capacitado" y penetrar a través de las capas celulares y acelulares que rodean al ovocito para fecundarlo (Bedford, 1983; Yanagimachi, 1988).

Las envolturas del ovocito constituyen las barreras de la fecundación y aseguran la selección del espermatozoide que es funcionalmente adecuado. La cubierta mas externa, denominada cúmulo oóforo, es una masa de células de la capa granulosa del folículo, que se encuentra embebida en una matriz extracelular compuesta por glicosaminoglicanos. Esta barrera puede ser sobrepasada por los espermatozoides cuya motilidad es suficiente para penetrarla. La cubierta acelular mas interna del huevo es la zona pelúcida (ZP), una especie de ligando que reacciona con los espermatozoides y que además

detiene el paso de espermatozoides adicionales, una vez que el huevo ha sido fecundado (Wassarman, 1987a,b).

Uno de los eventos que provee especificidad a la fecundación es la unión del espermatozoide a la ZP, y esta especificidad indica la presencia de moléculas de reconocimiento en ambas partes. Como consecuencia de la interacción de estas moléculas, se desencadena un evento excitótico en la cabeza del espermatozoide conocido como reacción del acrosoma (RA). Los mecanismos que median esta interacción, particularmente aquellos que ocurren a nivel molecular, son muy poco conocidos pero, algunas evidencias, que serán detalladas mas adelante señalan que éstos podrían ser muy similares a los que operan en otros sistemas en donde la interacción de dos moléculas desencadena una respuesta celular. Por esto, la interacción entre las moléculas del espermatozoide y las de la ZP será considerada como la que ocurre entre un receptor y su ligando en células somáticas. Se denominará "receptores" a aquellas moléculas del espermatozoide que siendo proteínas de la membrana, se unen a un ligando en forma específica, saturable y desencadenan una respuesta celular. Por otra parte, las moléculas de la ZP que se unen a los receptores del espermatozoide se denominarán ligandos.

En el caso del ratón se sabe que en la interacción espermatozoide-ZP, que es previa a la penetración del primero a través de la zona, el espermatozoide sigue una secuencia de al menos tres eventos conocidos como: adhesión, unión a la ZP, y RA (Hartmann et al., 1972; Saling et al., 1979; Wassarman et al., 1985a).

La adhesión y la unión a la ZP se han diferenciado mecánicamente. Así, espermatozoides adheridos a la ZP pueden ser removidos por pipeteo suave o centrifugación en gradiente de densidad, mientras que los unidos, no son afectados por este tratamiento (Saling et al., 1978). La unión es, entonces, la interacción que corresponde a aquella, específica y saturable, semejante a la que ocurre entre un receptor y su ligando.

La propiedad del espermatozoide de unirse a la ZP es función de su maduración epididimal y de la presencia de Ca^{2+} . Sin embargo, no requiere haber sido previamente capacitado (Saling, 1982). La RA, en cambio, sí depende de la capacitación y esto parece estar relacionado directamente con la movilidad de las moléculas de la membrana.

La capacitación es un proceso de naturaleza no precisada, necesario para que el espermatozoide adquiera motilidad hiperactiva y la posibilidad de experimentar la RA (Fraser, 1977; Fraser and Ahuja, 1988; Yanagimachi, 1988). Se ha sugerido que uno de los cambios importantes que ocurren durante la capacitación es el aumento en la permeabilidad y fluidez en microdominios de la membrana debido a la disminución en su contenido de colesterol (Go and Wolf, 1985).

Se considera al acrosoma como un lisosoma modificado o gránulo de zimógeno (Friend, 1977), y se encuentra ubicado en la región anterior de la cabeza del espermatozoide entre el núcleo y la membrana plasmática. Está limitado por una sola membrana que al plegarse da origen a las llamadas membrana acrosomal interna y externa. La RA es un evento excitotóxico que ocurre como resultado de la fusión en diversos puntos de la membrana plasmática con la membrana acrosomal

externa. Se produce una vesiculación de las membranas y la consecuente liberación del contenido acrosomal (Wassarman, 1988).

En algunas especies, fundamentalmente en el cobayo y en el hamster, es posible examinar directamente la presencia del acrosoma con microscopía de luz (Huang et al., 1981). Sin embargo, en muchas otras se requiere de técnicas de fluorescencia o microscopía electrónica (Saling and Storey, 1979; Florman et al., 1984; Cross et al., 1986). Específicamente en el ratón, se utiliza un método de fluorescencia que permite seguir la RA y definir tres patrones de fluorescencia: "B" (banded), "S" (spotty) y "AR" (acrosome reacted), por los cuales pasa un espermatozoide capacitado y con acrosoma intacto, hasta que se completa la RA (Saling and Storey, 1979; Ward and Storey, 1984; Lee and Storey, 1985).

La ZP de ovocitos de ratón contiene tres glicoproteínas sulfatadas llamadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Shimizu et al., 1983). Estas proteínas son altamente glicosiladas y esto explica el rango amplio de pesos moleculares (M_r) que se observa cuando son separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y en condiciones no reductoras. Los M_r promedios que se les han asignado son: 200 kD para ZP1, 120 kD para ZP2 y 83 kD para ZP3. Los estudios ultraestructurales indican que la ZP es una matriz tridimensional porosa y altamente organizada. La ZP2 y la ZP3 son monómeros que se ordenan en dímeros de ZP2-ZP3 que se repiten formando filamentos ramificados, mientras que la ZP1 es un dímero que entrecruza estos filamentos (Bleil and Wassarman, 1980a; Greve and Wassarman, 1985; Wassarman, 1988). La ZP está compuesta por estas

proteínas en diferentes proporciones. La menos abundante, la ZP1, tiene probablemente un papel estructural mientras que, la ZP2 y la ZP3 parecen estar involucradas en la unión del espermatozoide a la ZP.

Utilizando ensayos de competencia en la unión a la ZP, se determinó que la ZP3 era la responsable de la interacción entre la zona y los espermatozoides y que la ZP1 y la ZP2 no tenían efecto significativo en el ensayo (Bleil and Wassarman, 1980b; Wassarman et al., 1985b). Además, estudios autorradiográficos de montajes completos de espermatozoides incubados con ^{125}I -ZP3 o con ^{125}I -ZP2, mostraron que la ZP3 se une a espermatozoides con acrosoma intacto pero no a espermatozoides reaccionados. En cambio, la ZP2 se une preferentemente a espermatozoides con acrosoma reaccionado. Esto llevó a sugerir que la ZP3 estaba involucrada en la unión primaria y que la ZP2 era el ligando que mediaba la unión secundaria del espermatozoide, necesaria para mantenerlo unido a la ZP una vez que ha ocurrido la RA (Bleil and Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988).

La molécula de ZP3 (83 kD) está compuesta por una cadena polipeptídica de 44 kD y oligosacáridos ligados a nitrógeno (N) o a oxígeno (O) (Florman and Wassarman, 1985). Para evaluar la funcionalidad de la ZP3, esta molécula fue sometida a tratamientos químicos y enzimáticos que permitieron ensayar por separado sus diferentes grupos. Usando β -N-acetil-D-glucosaminidasa (Florman and Wassarman, 1985), se determinó que la eliminación de oligosacáridos ligados a N de la ZP3 (Elder and Alexander, 1982) no afectaba su interacción con para el receptor espermático. Sin embargo, la desglicosilación casi

completa de la molécula por tratamiento con ácido trifluorometano-sulfónico (Edge et al., 1981) impedía a la ZP3 unirse al espermatozoide. Además, si la ZP3 era sometida a una hidrólisis alcalina suave, que la dejaba como una cadena polipeptídica glicosilada sólo en los residuos N (Sharon, 1975), dejaba de unirse a los espermatozoides. Por otra parte, si la ZP3 era digerida con pronasa, los glicopéptidos que se obtenían y cuyo M_r fluctuaba entre 1.5-6 kD, se unían a los espermatozoides (Florman et al., 1984). Estas observaciones sugirieron que la actividad de ligando de la ZP3 podía ser atribuida a sus grupos oligosacáridos ligados a O.

Se ha determinado, además, que la porción polipeptídica de la ZP3 es responsable de la actividad inductora de la RA (Bleil and Wasserman, 1983), ya que pequeños glicopéptidos obtenidos de la molécula son capaces de unirse a los espermatozoides pero no inducen la RA (Florman et al., 1984). En este contexto, Endo y col. (1987a,b) presentaron datos controvertidos que indicaban, que la presencia de la parte peptídica de la ZP3 no era suficiente para inducir la RA. La base de tal aseveración se encuentra en los experimentos que se señalan brevemente a continuación: ovocitos obtenidos de oviductos de hembras superovuladas se trataron con el éster activo de forbol, 12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA). El éster, que es un activador de la proteína quinasa C, actúa a nivel del huevo induciendo cambios en las glicoproteínas de la ZP, que aparentemente se asemejan a los que se producen con la fecundación. La ZP3 no cambia su M_r ni su movilidad electroforética en geles bidimensionales. Sin embargo, es capaz de unirse al receptor del espermatozoide, pero no

de inducir la RA. Los espermatozoides tratados con la ZP3 modificada por el TPA (TPA-ZP) logran avanzar hasta el estado intermedio de la RA (patrón "S") pero no la completan. En este caso, la parte peptídica de la ZP3 estaba presente pero no era funcional.

La identificación de la(s) molécula(s) del espermatozoide que sirve(n) como receptor(es) para la ZP3 es todavía un problema no resuelto. Se ha seguido muchas rutas diferentes para identificar el receptor y se ha sugerido diversas moléculas para esta función como: galactosil transferasa (López et al., 1985), fucosil transferasa (Hoshi et al., 1983), fucosa o proteínas que unen sulfato de fucosa (Shalgi et al., 1986; Huang et al., 1982) y sitio sensible a inhibidor de tripsina (Saling, 1981). Mientras la inhibición de cada uno de estos sitios bloquea la unión entre el espermatozoide y la ZP, la relación que pueda existir entre las moléculas responsables de estas actividades no es clara. Además, ninguna de ellas ha sido aislada del espermatozoide ni caracterizada, y la evidencia que existe para postular a la galactosil transferasa como el candidato mas probable para ser el receptor, está siendo cuestionada (Benau et al., 1988; Fraser and Ahuja, 1988; Saling, 1989).

En el laboratorio en que se realizó esta tesis se ha intentado recientemente abordar el problema de la identificación de los componentes espermáticos involucrados en la interacción de gametos de ratón, mediante anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón que reconocen antígenos del espermatozoide. Estos pueden ser usados como sondas en la exploración de eventos que ocurren durante la fecundación. Con esta metodología se ha producido algunos mAbs capaces de

bloquear la fecundación en estados definidos, aunque no en el estado de unión del espermatozoide a la ZP (Saling and Lakoski, 1985; Saling and Waibel, 1985; Saling et al., 1985). El más estudiado de estos anticuerpos ha sido el mAc M42 (Saling, 1986; Saling et al., 1986a,b; Lakoski et al., 1988), que es una inmunoglobulina G (IgG) que se une a un antígeno presente en la cresta acrosomal del espermatozoide de ratón. Análisis mediante "immunoblot", realizado con espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo, ha demostrado que el mAc M42 detecta dos bandas de M_r de 200 y 220 kD. El anticuerpo M42 inhibe la fecundación in vitro en un proceso dependiente de la concentración y de la presencia de la ZP. Durante la fecundación in vitro (Saling and Lakoski, 1985), o in vivo (Saling et al., 1986a), el mAc M42 ejerce su efecto inhibiendo la RA en espermatozoides unidos a la ZP. Mas aún, se sabe que M42 inhibe la RA inducida fisiológicamente por la ZP y no aquella inducida por el ionóforo de calcio A23187 (Saling, 1986). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual el anticuerpo ejerce este efecto.

Hasta ahora, no se sabe cómo el receptor del espermatozoide "transduce" el estímulo, provocado por la unión del ligando (ZP) a su receptor (proteínas espermáticas) hasta gatillar la respuesta celular que es la RA. Sin embargo, se sabe que algunos de los factores que han sido involucrados en rutas de "transducción" de señales en diversos tipos celulares (Gilman, 1987; Neer and Clapham, 1988) parecen estar también presentes en el espermatozoide. Algunos de estos factores son: flujos de Ca^{2+} y H^+ , proteínas reguladas por nucleótidos de guanina (proteínas G), proteína quinasa C (PK-C) e

inositol fosfatos, y fosfolipasa C (PL-C). Estos serán discutidos brevemente en los siguientes párrafos.

En el ratón, la presencia de Ca^{2+} es un requerimiento absoluto para que ocurra la RA (Fraser and Ahuja, 1988), y se sabe que uno de los cambios que se observa en la primera fase de la RA (durante la transición de "B" a "S") es un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Lee and Storey, 1988). Se sabe también que, en los espermatozoides que poseen sus membranas acrosomales intactas, existe un gradiente de H^+ que se pierde cuando los espermatozoides avanzan hacia el patrón "S" de la RA (Lee and Storey, 1985). Esto significa probablemente que ocurre una salida de H^+ durante la primera fase de la RA. Finalmente, se ha sugerido que la reacción primaria corresponde al aumento de Ca^{2+} intracelular y que como consecuencia se pierde el gradiente de H^+ (Lee and Storey, 1988).

En células somáticas, PK-C parece tener un papel importante en eventos de excitosis y su actividad enzimática puede ser activada por 1,2-diacil glicerol (DAG) y por ésteres de forbol (Nishizuka, 1984; Berridge, 1986, 1987). Para ensayar si la PK-C está implicada en la excitosis acrosomal inducida por la ZP, los espermatozoides se capacitaron en un medio que contenía el éster de forbol (TPA) y posteriormente se incubaron con ZP. Se observó que la incubación de los espermatozoides con el TPA y la ZP, producía un cambio en la cinética de la RA acelerando la transición de los espermatozoides de "B" a "S" y retardando la transición de "S" a "AR". La incubación de los espermatozoides con DAG en lugar de TPA, mostraba el mismo efecto. Ambos reactivos, TPA y DAG, actuaban solamente en presencia

de la ZP, ya que aún cuando se usaron concentraciones altas de ellos no se observó efecto alguno en ausencia de la ZP. Debido a que el aumento de DAG fisiológico se debe en parte a la activación del ciclo de recambio de inositol fosfatos, se sugirió también un papel de los inositol fosfatos en la RA inducida por la ZP (Lee et al., 1987). Además, se sabe que la enzima responsable de la producción de DAG en la célula, la fosfolipasa C (PL-C), también se encuentra presente en espermatozoides de ratón (Ndeeto, 1988).

Muchos receptores de la superficie celular actúan a través de proteínas reguladas por nucleótidos de guanina (proteínas G), las cuales acoplan el receptor al sistema apropiado para generar las señales en la membrana plasmática (Casey and Gilman, 1988). Un ejemplo clásico de tal sistema regulador es la modulación por estimulación (vía G_s) e inhibición (vía G_i) de la enzima adenilato ciclasa (Gilman, 1984; Birnbaumer et al., 1985). La evidencia reciente obtenida de una variedad de sistemas sugiere que una familia creciente de proteínas tipo G_i está presente en las células. Los miembros de esta familia se han definido por la habilidad que tiene la subunidad α de la proteína para ser ADP-ribosilada e inactivada por la toxina pertussis (o IAP) (Martin et al., 1985; Mitchell et al., 1986). Se ha demostrado, además, que las proteínas tipo G_i tienen la habilidad de inhibir la adenilato ciclasa, pueden regular canales iónicos (Yatani et al., 1987), inhibir corrientes de entrada de calcio (Hescheler et al., 1987), estimular el metabolismo de inositol fosfatos (Cockcroft, 1987) y mediar indirectamente la actividad de la fosfolipasa A_2 (Burch et al., 1986). En espermatozoides de ratón se

ha demostrado, la presencia de proteínas de tipo G_s asociadas con el proceso de RA (Endo et al., 1987c, 1988). Mas recientemente, se ha identificado dos tipos de proteínas del tipo G_s en células espermáticas de ratón que podrían ser funcionalmente diferentes (Jones et al., 1989). Las proteínas G han sido involucradas en la RA porque cuando se capacitan espermatozoides en presencia de IAP y luego se incuban con la ZP solubilizada o con la ZP3 purificada, los espermatozoides no experimentan la RA. Además, no progresan al estado intermedio de la RA, lo que indica que IAP inhibe una de las etapas iniciales de la RA. Por lo tanto, el grupo de espermatozoides tratados con IAP y luego con la ZP permanece en el patrón "B" y esto se correlaciona con la retención del gradiente de H^+ a través de la membrana. Por otra parte, cuando los espermatozoides son capacitados en presencia de IAP y luego incubados con la ZP intacta mas TPA, su fase de transición de "B" a "S" se ve acelerada, mientras que la de "S" a "AR", retardada, y en la misma forma que ocurre en ausencia de la incubación inicial con IAP (Lee et al., 1987). Esto indica que el efecto inhibitorio de IAP es sobrepasado completamente por el efecto del TPA y la ZP. De la misma manera, RA espontáneas y aquellas inducidas por el ionóforo de Ca^{2+} A23187, no son inhibidas por la incubación con IAP (Endo et al., 1988).

Los hallazgos anteriores demuestran que en el espermatozoide existen elementos de "transducción" de señales típicos de otros tipos celulares.

En esta tesis el objetivo general fue estudiar los procesos moleculares involucrados en la RA inducida por la ZP, teniendo como hipótesis que una agregación de receptores espermáticos es inducida por la unión de la ZP3, gatillando la RA (Figura 1). En el ensayo de esta hipótesis se utilizó como herramienta, glicopéptidos de ZP3 y anticuerpos policlonales dirigidos contra la ZP3.

Objetivos específicos:

- Purificación de las proteínas de la ZP.
- Estudio de la relación del antígeno M42 y la RA inducida por la ZP3.
- Búsqueda del (de los) receptor(es) espermático(s) para la ZP3.
- Estudio de la presencia de una proteína quinasa específica para tirosina en espermatozoides de ratón.

Los resultados obtenidos son discutidos para presentar una nueva visión de los eventos moleculares involucrados en el gatillamiento de la RA.

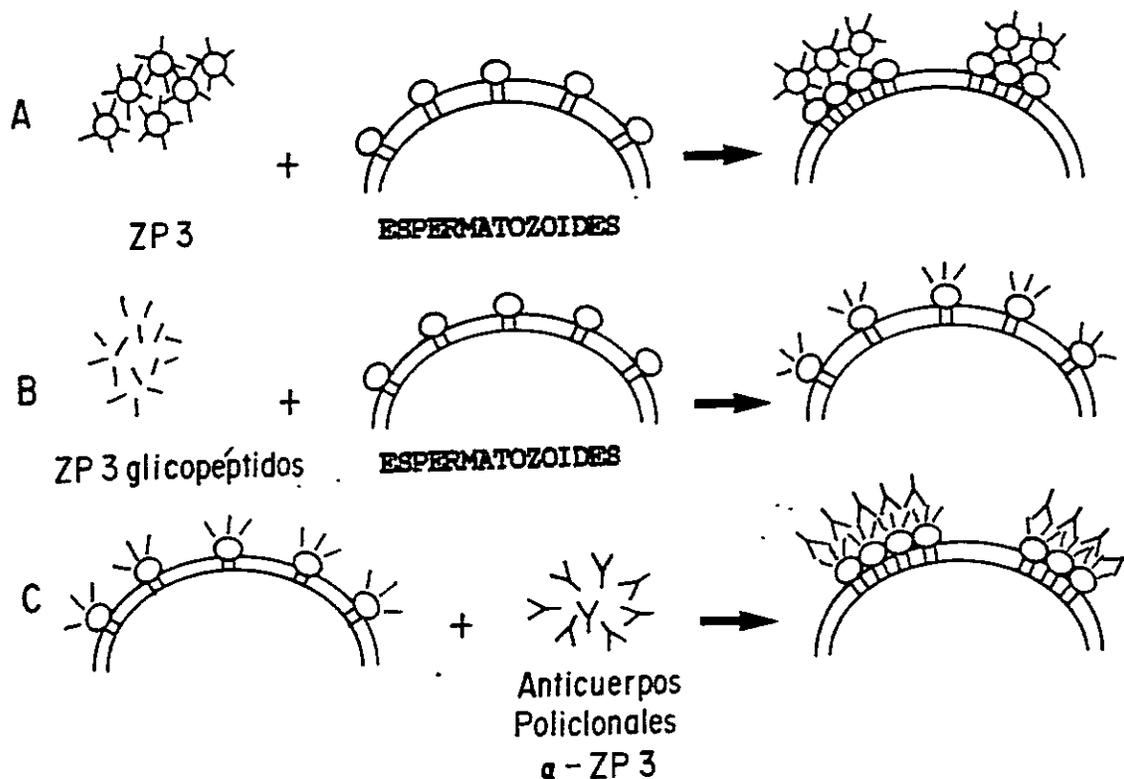


FIGURA 1 : Esquema de la hipótesis de agregación de los receptores espermáticos inducida por la ZP3

Esta hipótesis plantea que la unión de la ZP3 a sus receptores en la membrana plasmática del espermatozoide induciría un evento de agregación que provoca la "transducción" de señales a través de la membrana, para desencadenar la RA. (A) representa moléculas hipotéticas de la ZP3. El círculo corresponde a la porción polipeptídica y las líneas a los oligosacáridos que se unen a los receptores. Cuando las moléculas de ZP3 se incuban con los espermatozoides, los oligosacáridos se unen a los receptores de la membrana causando su agregación y gatillando la RA. (B) pequeños glicopéptidos de la ZP3 se unen a los receptores, pero no inducen la RA. (C) ensayo de la hipótesis: el entrecruzamiento de los glicopéptidos unidos a los receptores espermáticos con anticuerpos dirigidos contra la ZP3, debería inducir la RA.

MATERIALES Y METODOS

1. Preparación de material biológico y reactivos

1.1. Obtención de gametos

1.1.1. Ovocitos: Los ovocitos se retiraron de oviductos de ratones de composición genética homogénea (CD-1, Charles River Breeding Co., Wilmington, MA). Las hembras, de 42 días de edad, se las indujo a superovular por administración intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina de suero de yegua preñada seguido, luego de 36-56 h, de 5 UI de gonadotrofina coriónica humana. Después de la segunda inyección (13-16 h mas tarde), las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos, los que se recolectaron en aceite mineral (dimetilsiloxano 20 cs.; Dow Corning, Contour Chemical Co., North Reading, MA) a 37°C. Utilizando un microscopio estereoscópico y agujas estériles de 27G se rompieron las ampollas hinchadas y de esta manera se permitió la salida de los ovocitos en cúmulo. Para remover las células del cúmulo oóforo, los ovocitos recuperados se trasladaron a una gota de medio de cultivo (MC modificado, ver Apéndice I para la preparación de medios y soluciones tamponantes) que contenía hialuronidasa al 0.05% . Después de 1-2 min de incubación en hialuronidasa los ovocitos se trasladaron a gotas frescas de MC donde por pipeteo se separaron las células de cúmulo adheridas a la ZP y se eliminó la enzima. Los ovocitos obtenidos de esta manera se emplearon en los ensayos

biológicos y en la preparación de ZP modificada por el éster de forbol TPA.

Alternativamente, se obtuvo las ZP de ovocitos de folículos ováricos de ratones hembras CD-1 de 21 días de edad, para utilizarlos en ensayos en que se requerían grandes cantidades de ZP y en los cuales la presencia del ovocito no era necesaria.

1.1.2. Espermatozoides: Los espermatozoides se obtuvieron del epidídimo de ratones CD-1 maduros a los que se sacrificó por dislocación cervical. La porción caudal de los epidídimos se recolectaron en MC o en solución tamponante que contenía Tris/ NaCl (tampón TN). Luego se realizó cortes en el tejido epididimal para permitir la salida de los espermatozoides y su desaglutinación mediante una incubación en TN o en MC por 3-5 min a 37°C. La capacitación de los espermatozoides se logró por incubación en MC por 60-90 min a 37°C y en un ambiente con 5% CO₂/aire. Para capacitar espermatozoides, éstos se resuspendieron siempre a una concentración de 10⁶ espermatozoides/ml y en todos los ensayos, en que se incubó espermatozoides capacitados con ovocitos, se empleó una concentración final de 5 x 10⁵ espermatozoides/ml.

La manipulación de los gametos se realizó bajo aceite mineral y su incubación, se hizo a 37°C en un ambiente con 5% CO₂/aire.

1.2. Obtención de ZP de ovocitos ováricos

El método empleado para la obtención de ZP de ovarios es una modificación del procedimiento descrito por Lakoski y col. (1988). Brevemente, ovarios obtenidos de 35 animales se recolectan en 4 ml de tampón de homogeneización en hielo. El tejido se homogeneiza con

vástago de vidrio y la suspensión resultante se lleva a 1% desoxico-
lato de sodio. Después de la homogeneización se hace una centrifuga-
ción en gradiente de Percoll y las ZP se recuperan extrayendo la
banda que las contiene (Lakoski et al., 1988). La modificación del
método consiste en agregar al material recuperado un volumen de
solución para congelar y descongelar y someterlo a tres ciclos de
congelamiento (en N₂ líquido) y descongelamiento (a 20°C). Luego,
las ZP se lavan por centrifugación (800 g por 15 min) y se congelan a
-80°C hasta el momento de usarlas.

La calidad del material obtenido se probó por electroforesis en
geles de poliacrilamida- bisacrilamida (Bio-Rad laboratories,
Richmond, CA) al 7.5% en presencia de SDS (PAGE-SDS) y en condiciones
no reductoras. Las proteínas en el gel se visualizaron por tinción
con nitrato de plata (Wray et al., 1981).

1.3. Obtención de ZP modificadas por el TPA.

El tratamiento de los ovocitos con el éster de forbol TPA para
obtener las ZP modificadas se realizó como ha sido descrito en la
literatura (Endo et al., 1987a,b) y como se indica brevemente a
continuación. Los ovocitos obtenidos del oviducto se recuperaron en
solución MC-PVP, se trataron con 10 ng/ml de TPA en MC-PVP por 60 min
a 37°C y luego se lavaron con el mismo medio sin TPA (5 veces). Los
ovocitos tratados se trasladaron a MC-PVP acidificado a pH 4 para
solubilizar las ZP. Al cabo de 20 min, la solución que contenía las
ZP modificadas por TPA (TPA-ZP) se retiró dejando los ovocitos en el
fondo de la cápsula, y se neutralizó con NaOH 1 N.

Se probó si las TPA-ZP unían espermatozoides utilizando el bioensayo de unión de los espermatozoides a las ZP, que se describe mas adelante (sección 1.5.2). Se empleó en este ensayo ovocitos tratados con el TPA que se encontraban en el paso previo a la solubilización de la ZP. Como control se utilizaron ovocitos tratados solamente con MC-FVP.

Después de demostrar que las TPA-ZP siguen uniéndose a los espermatozoides, de la misma forma que lo hacen las ZP de los ovocitos controles, se utilizaron en los ensayos de inducción de la RA.

1.4. Preparación de glicopéptidos de la ZP

Una de las preparaciones de ZP de ovarios de 35 ratones se lavó 2 veces por centrifugación (10 000 g por 5 min) en tampón TN que contenía CaCl_2 (tampón TNC). El sedimento se resuspendió en 100 μl de la misma solución y las ZP se solubilizaron por calentamiento a 60°C por 60 min. Las ZP solubilizadas se incubaron con pronasa del tipo insoluble (pronasa conjugada con carboximetilcelulosa) a 37°C por 12 h, agregando enzima fresca a las 6 h después de iniciada la incubación. El resultado de la digestión se ensayó por PAGE-SDS usando gel de acrilamida-bisacrilamida al 15%. Se analizó por electroforesis, 10 μl de la solución de proteínas de la ZP (aproximadamente 1 μg de proteína) antes y después de la digestión con pronasa y las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

La habilidad de los glicopéptidos de la ZP para unirse a los espermatozoides se probó usando ensayo de competencia en la unión de

los espermatozoides a las ZP, que se describe mas adelante (sección 1.5.2). Se ensayaron 4 concentraciones diferentes de cada preparación de glicopéptidos y la capacidad de inhibir la unión se comparó a la que presentaban concentraciones conocidas de la ZP total, no digerida y solubilizada. La concentración de las preparaciones de glicopéptidos, definida como, cantidad equivalente de ZP/ μ l, se calculó basándose en dicho ensayo de competencia.

1.5. Ensayos biológicos

1.5.1. Bioensayo de unión de espermatozoides a la ZP intacta

Se realizó este bioensayo con las ZP de ovocitos obtenidos de oviducto tratados y no tratados con TPA, así como también la de ovocitos de folículos ováricos, incubando 20-30 ZP con espermatozoides capacitados en un volumen final de 30 μ l de MC, por 15 min, a 37°C y en un ambiente de 5% CO₂/aire. Finalizada la incubación, las ZP se lavaron tres veces en MC, y luego se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en PBS, por 5 min. Después de lavar las ZP nuevamente en MC, se hizo un montaje completo de éstas entre portaobjeto y cubreobjeto para contar los espermatozoides unidos a cada ZP con ayuda de un microscopio de contraste de fases.

1.5.2. Bioensayo de competencia en la unión de espermatozoides a ZP intactas

La habilidad de las ZP totales solubilizadas, de las glicoproteínas de la ZP purificadas y de los glicopéptidos de la ZP, para unirse a espermatozoides capacitados se probó haciendo uso del ensayo de competencia (Bleil and Wassarman, 1980b). Este ensayo consiste en incubar por 10 min espermatozoides capacitados con diversas

concentraciones, expresadas en ZP equivalentes/ μ l, de las proteínas a ensayar. Posteriormente, se agregan ovocitos con las ZP intactas y luego de 15 min de coincubación las ZP se lavan y montan como se indicó anteriormente (ver sección 1.5.1.), contándose el número de espermatozoides unidos a cada ZP. La disminución del número de espermatozoides unidos a las ZP se interpreta como una evidencia indirecta que las glicoproteínas o glicopéptidos en solución se han unido a los receptores espermáticos y están bloqueando la unión de los espermatozoides a las ZP intactas.

1.6. Evaluación del estado del acrosoma por ensayo de fluorescencia

Para estudiar el estado de integridad morfo-funcional del acrosoma de espermatozoides capacitados e incubados bajo distintas condiciones se utilizó una técnica de fluorescencia que emplea el antibiótico clortetraciclina (CTC) (Saling and Storey, 1979; Ward and Storey, 1984), que al ser quelado en presencia de cationes divalentes emite una señal fluorescente que se hace mas intensa cuando mas disminuye la polaridad del medio (Caswell and Hutchinson, 1971). Por lo tanto, al incubarlo con los espermatozoides, éstos muestran diversos patrones de fluorescencia que dependen del estado en que se encuentren sus membranas. Así, se ha definido tres patrones de fluorescencia que permiten seguir la RA y que corresponden a los patrones "B", "S" y "AR". El patrón "B" se observa en espermatozoides con acrosoma intacto, el "S", en espermatozoides que se encuentran en un estado intermedio de la RA y el "AR", en espermatozoides con

acrosoma completamente reaccionado (Saling and Storey, 1979; Florman and Storey, 1982; Lee and Storey, 1985).

El método consiste en incubar 5 μ l de la solución de CTC con 5 μ l de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos que ha sido entibiado previamente a 37°C. Después de 30 seg de incubación en obscuridad y a 37°C, los espermatozoides se fijan agregando al medio 0.5 μ l de glutaraldehído al 12.5% en Tris 1 M. Se cubre la preparación con un cubreobjetos y se examinan los espermatozoides con epifluorescencia. La solución de CTC debe ser preparada al momento de usar y mantenida en obscuridad durante el ensayo.

En cada experimento se examinaron mas de 100 espermatozoides por grupo de tratamiento y los datos que se muestran representan un promedio de al menos tres réplicas de cada condición experimental.

1.7. Purificación de las glicoproteínas de la ZP

Las ZP de ovocitos de folículos ováricos que habían sido previamente aisladas y almacenadas a -80°C se descongelaron y lavaron por centrifugación (10 000 g por 5 min) con solución tampón PBS-PVP. La suspensión de ZP se equilibró a 4°C para proceder a marcar radioactivamente las proteínas de las ZP según Bleil y Wassarman (1983) con reactivo ¹²⁵I-Bolton Hunter (éster N-hidroxisuccinimida de ácido p-hidroxifenil propiónico iodado; New England Nuclear, Boston, MA). La marcación se realizó incubando ~10 000 ZP (aproximadamente 40 μ g de proteína) con 500 μ Ci del compuesto radioactivo por 15 min a 4°C. Posteriormente, se paró la reacción con glicina 0.1 M en PBS-PVP. Una vez marcadas, las ZP se lavaron con PBS-PVP por centrifugación para retirar el compuesto radioactivo que no se unió a las proteínas.

La purificación de las proteínas de la ZP se realizó por electroforesis y electroelución (Bleil and Wassarman, 1980a; Florman et al., 1984). Para la electroforesis se utilizó una cámara vertical y un sistema de solución tamponante Tris-glicina-SDS, y el gel se preparó con acrilamida-bisacrilamida al 7.5% (Laemmli, 1970). La muestra que contenía las ZP marcadas se resuspendió en mezcla desnaturalante y se sometió a ebullición por 5 min. Las proteínas desnaturaladas se separaron electroforéticamente y se detectaron por autoradiografía, exponiendo el gel a un film de rayos X (AR-5, Kodak) por 10 min a 4°C entre láminas intensificadoras. Utilizando marcadores adecuados de pesos moleculares (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), las proteínas de la ZP se identificaron por su movilidad electroforética y los trozos de gel que contenían ZP1, ZP2 y ZP3 se cortaron y electroeluyeron a 300 V por 4 h, en cámara de Elutrap (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

Terminada la elución, las proteínas purificadas se recuperaron en aparatos Centricon 30 (Amicon Corporation, Lexington, MA), que poseen una membrana con límite de exclusión de 30 kD, y se procedió a dializarlas y concentrarlas por centrifugación. La diálisis se realizó, primero contra urea 8M (para remover el SDS) y luego contra PBS (para remover la urea). Posteriormente, las muestras se centrifugaron hasta obtener un volumen aproximado de 100 µl y se congelaron a -80°C para preservarlas hasta el momento de ser utilizadas.

1.8. Reactivos inmunológicos

1.8.1. Anticuerpos monoclonales M42

El anticuerpo monoclonal (mAc) M42 se aisló de sobrenadante de cultivo de hibridomas por cromatografía de afinidad (Lakoski et al., 1988) realizada con IgG anti ratón preparada en cabra, acoplada a Sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Luego se dializó contra PBS y se utilizó en los ensayos a una concentración final de 200 µg/ml.

1.8.2. Anticuerpos policlonales anti-fosfotirosina

Se usaron dos preparaciones diferentes de anticuerpos policlonales (pAcs) y tres preparaciones de mAcs dirigidos contra fosfotirosina para la inmunodetección de residuos de tirosina fosforilados presentes en proteínas espermáticas. Los resultados obtenidos con todos ellos fueron idénticos, por lo que se utilizó en los ensayos indistintamente cualquiera de ellos. Una de las preparaciones de pAcs, producida en conejo, se purificó por cromatografía de afinidad con fosfotirosina como fuera descrito (Wang, 1985), y fue donado por la Dra. Patricia Maness. Este anticuerpo se utilizó en "immunoblots" a una concentración final de 0.5 µg/ml, y en inmunofluorescencia indirecta a 1 µg/ml. La segunda preparación de pAcs, también producida en conejos, fue proporcionada por el Dr. Shelton Earp (Kamps and Sefton, 1988). Esta preparación de anticuerpos purificados se utilizó a una concentración de 2 µg/ml en la inmunodetección de residuos de tirosina fosforilados. La detección en "immunoblots" de los pAcs anti-fosfotirosina se realizó por incubación con ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra.

Las tres preparaciones de mAbs anti-fosfotirosina donadas por el Dr. John Glenney (Glenney et al., 1988), se utilizaron en "immuno-blots" a una concentración de 2 µg/ml. En la detección de los mAbs se incubó primero la nitrocelulosa con IgG anti-ratón preparada en conejo (fracción sérica, dilución 1:100, Cappel Laboratories, Malvern, PA) y luego con ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra.

1.8.3. ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra

IgG anti-conejo preparada en cabra purificada por afinidad, iodada usando Iodogen, fue donada por el Dr. Keith Burridge. La preparación de anticuerpos marcados se empleó a 10⁶ cpm/ml en la inmunodetección de anticuerpos de conejo.

1.8.4. Anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de la ZP y su purificación

La obtención de pAbs contra cada una de las glicoproteínas de la ZP se realizó inmunizando conejos machos blancos (New Zeland). Las ZP aisladas de ovocitos ováricos se separaron electroforéticamente bajo condiciones no reductoras en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 7.5%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron del gel a papel de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) de acuerdo a la técnica de Towbin y col. (1979) y se localizaron las tres glicoproteínas por su movilidad electroforética. Se cortaron cuidadosamente las áreas de la nitrocelulosa en donde se ubicaban ZP2 y ZP3 y luego de secarlas se disolvieron en 300 µl de dimetil sulfóxido. La solución obtenida se mezcló con un volumen igual de Adyuvante de Freund y se utilizó para inmunizar a los conejos machos (Knudsen, 1985). Los animales recibieron un total de 4 inmunizaciones. El

día 1, recibieron ~1 µg de proteína en Adyuvante de Freund Completo, el día 28, 56 y 100, recibieron ~1 µg, ~1 µg y ~3 µg de proteína, respectivamente, en Adyuvante de Freund Incompleto. Todas las inmunizaciones se realizaron vía subcutánea, inyectando a los animales en diferentes puntos del lomo. Antes de comenzar las inmunizaciones y 15 días después de cada inyección, se extrajo sangre de cada uno de los conejos y los sueros obtenidos se titularon mediante la técnica de ELISA (Notebuom et al., 1984). La reactividad de los sueros con las proteínas de la ZP se ensayó mediante "immuno-blots", como será descrito mas adelante.

Los sueros preinmunes (controles) e inmunes anti-ZP2 y anti-ZP3, se purificaron primero mediante una precipitación con sulfato de amonio al 50% a 4°C. El precipitado obtenido se lavó dos veces con solución de sulfato de amonio al 50% por centrifugación (10 000 g por 30 min, 4°C), se solubilizó en un volumen de PBS igual al inicial y luego se dializó repetitivamente con PBS.

La fracción no dializable se recuperó y purificó pasándola a través de una columna de afinidad de proteína A-Sefarosa a 4°C. Luego de cargada la muestra se lavó la columna con PBS hasta que la densidad óptica a 280 nm disminuyó a cero y entonces las Igs retenidas por la columna se eluyeron con glicina 0.1 M pH 3.0. El eluido se neutralizó inmediatamente con gotas de Tris 1 M y las proteínas purificadas se dializaron contra PBS a 4°C y luego se concentraron en aparatos de Centriprep 30 (Amicon Corporation, Lexington, MA). Alícuotas de 500 µl se almacenaron a -20°C.

Los anticuerpos purificados se titularon mediante la técnica de "Dot Blot" (Hardman and Jarvis, 1965).

1.8.5. Preparación de los fragmentos Fab de anticuerpos anti-ZP3

Anticuerpos purificados anti-ZP3 se digirieron con papaína del tipo insoluble siguiendo la técnica descrita por Goding (1986). La enzima se lavó por centrifugación (10 000 g por 2 min) con PBS y luego se resuspendió en PBS que contenía EDTA 2 mM y cisteína 5 mM a pH 7.5. Se dejó incubando por 15 min a 37°C para inducir la activación de la enzima y luego se incubó con las Igs anti-ZP3 en rotación por 3 h a 37°C. Finalizada la incubación, se retiró la enzima por centrifugación y la solución que contenía los fragmentos se pasó por una columna de proteína A-Sefarosa para separar los fragmentos Fab de los fragmentos Fc y moléculas de Igs sin digerir. La fracción de proteína que no fue retenida por la columna, y que corresponde a aquella que contiene los fragmentos Fab, se recolectó y concentró en Centricon 30 a un volumen de 200-300 µl.

El éxito de la digestión y purificación de los fragmentos Fab se determinó sometiendo las muestras a electroforesis en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% y las proteínas se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie. La reactividad de los fragmentos se ensayó por "immunoblot" con la ZP total, como se describirá posteriormente.

1.9. Caracterización de los anticuerpos contra proteínas de la ZP

1.9.1. Titulación de los sueros por ELISA

Pocillos de una placa de microtitulación (96 pocillos, Dynatech Laboratories Inc.) se activaron por desecación de 10 µl de solución

que contenía la ZP total solubilizada a 10 µg/ml en tampón TNC. Una vez activada la placa, los sitios reactivos remanentes se bloquearon con BSA 3% / NaN_3 10 mM en tampón TN durante 1-2 h a temperatura ambiente y luego la placa se lavó con TN/ Tween 20 al 0.5% durante 4 min. Posteriormente, se agregaron a los pocillos activados diluciones seriadas de los sueros a ensayar y se incubaron por toda la noche a 4°C. Después de lavar 4 veces por 4 min cada vez con TN/ Tween 20 al 0.5%, los anticuerpos unidos a las proteínas de la ZP se detectaron incubando con peroxidasa conjugada a IgG anti-conejo preparada en cabra (Kierkegaard & Perry, Gaithersburg, MA) utilizando 4-cloro 1-naftol como sustrato (Noteboom et al., 1984). La absorbancia del producto coloreado de la reacción se leyó a 405 nm en un lector de EIA (Bio-Rad model 2250).

1.9.2. Caracterización de sueros de conejo por "immunoblots" con la ZP

Se descongeló las ZP obtenidas de ovocitos ováricos de 35 animales y se lavó dos veces con PBS por centrifugación. Luego, las ZP se resuspendieron en 100 µl de mezcla desnaturalante y la suspensión resultante se hirvió por 5 min. Para separar estas proteínas por electroforesis, 8 µg de la suspensión se cargaron en un minigel preparativo de acrilamida-bisacrilamida al 7.5%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron del gel a papel de nitrocelulosa y una vez finalizada la transferencia, el papel se incubó por 1 h en una solución de leche (sin materia grasa) al 3% en PBS, para bloquear los sitios remanentes. La lámina de nitrocelulosa se cortó en tiras de ~5 mm de ancho para probar la reactividad entre las glicoproteínas y

los distintos sueros. Se probaron sueros preinmunes e inmunes de anti-ZP2 y anti-ZP3 a una dilución de 1:500, para anti-ZP2, y 1:250, para anti-ZP3 en solución de dilución para sueros. Después de 3 h a 37°C y con continua agitación, las tiras de nitrocelulosa se lavaron 5 veces con la misma solución de dilución y cada lavado se realizó manteniendo la nitrocelulosa en agitación por 15 min. Luego, las tiras se incubaron por 1 h a 4°C en una solución con ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra para detectar el lugar donde se unieron los anticuerpos primarios. Las tiras de nitrocelulosa se lavaron como antes, se dejaron secar y luego se expusieron a un film de rayos X entre láminas intensificadoras a -70°C por toda la noche.

De la misma manera en que se probó la reactividad y especificidad de los antisueros dirigidos contra las proteínas de la ZP, se ensayaron las Igs purificadas y los fragmentos Fab de Igs anti-ZP3.

1.9.3. Titulación de las Igs anti-ZP por la técnica de "Dot Blot"

Los anticuerpos purificados se titularon mediante la técnica de "Dot Blot" utilizando diluciones seriadas de éstos (Handman and Jarvis, 1985). Una lámina de nitrocelulosa se embebió en solución tampón TN y se montó en el aparato de microtitulación (Bio-Dot microtitration apparatus, Bio-Rad, Richmond, CA). Se agregó a los pocillos una solución de TNC, que contenía la ZP total y solubilizada (~100 ng/pocillo) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Luego se bloquearon los sitios remanentes de cada pocillo incubando por 30 min con TN/ BSA 1%/ NaN_3 10 mM. Después de lavar una vez con tampón TN, los pocillos se incubaron con diluciones seriadas de sueros preinmunes o inmunes, anti-ZP2 o anti-ZP3 por 1 h a temperatura

ambiente. Se lavó nuevamente, pero esta vez repetitivamente y con tampón TN que contenía Tween 20 al 0.5%. Finalizado este lavado se desensambló la cámara de "Dot Blot" y la nitrocelulosa se incubó en TN/BSA 3%/ Na₂CO₃ 10 mM, para bloquear todos los sitios libres de la lámina. Para seguir la reacción de las Igs con las proteínas de la ZP, se utilizó como segundo anticuerpo ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra, el cual se detectó por análisis autoradiográfico. De la misma manera, se probó la reactividad de los anticuerpos dirigidos contra ZP2 y ZP3 con los glicopéptidos de la ZP.

1.9.4. Ensayo de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el ensayo de proteínas de "Bio-Rad" en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los resultados se cuantificaron en un lector EIA, utilizando como estándar la proteína BSA.

2. Anticuerpos monoclonales M42 y la reacción acrosómica inducida por la ZP

2.1. Efecto del mAc M42 sobre la actividad inductora de RA que posee la ZP

Se incubó espermatozoides capacitados con o sin el mAc M42 (200 µg IgG/ml) por 15 min en MC a 37°C. Luego se agregó: a) sólo MC; b) ZP total solubilizada, o c) proteínas purificadas de la ZP, a una concentración de 4 ZP equivalentes/µl y se incubaron por 30 min adicionales en las condiciones anteriores. Luego se determinó el estado del acrosoma utilizando la técnica de CTC que ha sido ya descrita.

El ionóforo de calcio A23187 se utilizó como control positivo del ensayo por su capacidad de producir la RA in vitro (Saling, 1986). Espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo se capacitaron a 37°C en MC que contenía NaCl 60 mM; después de 60 min se agregó el ionóforo al medio (concentración final 3 μ M en 0.1% dimetilformamida; Calbiochem, La Jolla, CA) y la incubación se continuó por 30 min adicionales. El estado del acrosoma se visualizó mediante la técnica de CTC.

2.2. Efecto del mAc M42 sobre espermatozoides con acrosoma en distintos estados de la reacción

Para determinar cuándo el mAc M42 inhibe la RA se probó agregarlo a dos grupos diferentes de espermatozoides: uno, donde la mayoría de ellos se encontraba con su acrosoma intacto (patrón "B" de fluorescencia) y el otro, donde los espermatozoides se encontraban principalmente con su acrosoma en estado intermedio de la RA (patrón "S" de fluorescencia). Los espermatozoides capacitados y con su acrosoma intacto se incubaron con el anticuerpo M42 (15 min) y luego con TPA-ZP (30 min; 4 ZP/ μ l). En otro grupo experimental se invirtió el orden de adición de manera que los espermatozoides se incubaron primero con TPA-ZP (30 min; 4 ZP/ μ l) para obtener espermatozoides con patrón "S" de fluorescencia (Endo et al., 1987a), luego con el mAc M42 (15 min) y finalmente con ZP (30 min; 4 ZP/ μ l).

Como control del experimento se estudió el efecto de las diversas preparaciones de ZP en ausencia del anticuerpo. Espermatozoides capacitados se incubaron sin ZP, con ZP total (4 ZP/ μ l), o con TPA-ZP (4 ZP/ μ l). Después de 30 min se retiró una alícuota de cada grupo de

tratamiento y se procesaron directamente para el ensayo de CTC. Las muestras que contenían TPA-ZP se incubaron por 30 min adicionales con ZP total solubilizada o con TPA-ZP (4 ZP/ μ l). Otros controles incluyeron incubaciones: a) con y sin TPA-ZP (4ZP/ μ l) por los mismos tiempos de incubación de los grupos experimentales y b) con TPA-ZP por 45 min seguido por una adición de TPA-ZP o ZP total solubilizada con incubación adicional de 30 min.

Las muestras de espermatozoides tratados en las diferentes formas, se procesaron para ensayo de CTC una vez finalizadas las incubaciones.

3. Estudio de la hipótesis de agregación de receptores utilizando Igs anti-ZP3

3.1. Efecto de Igs anti-ZP3 bivalentes sobre la actividad inductora de la reacción acrosómica

Se incubó espermatozoides previamente capacitados en MC sin ZP, con ZP total solubilizada, con TPA-ZP o con glicopéptidos de la ZP (siempre a una concentración de 4 ZP equivalentes/ μ l) por 30 min a 37°C en 5% CO₂/aire. A los espermatozoides preincubados se agregaron anticuerpos anti-ZP2 o anti-ZP3 (concentración final, 2 μ g/ml y 10 μ g/ml, respectivamente), por un segundo período de incubación de 30 min usando las mismas condiciones.

A modo de control se probó incubar con Igs anti-ZP3 en ausencia de la incubación inicial con la ZP, realizar la segunda incubación con Igs anti-ZP2 a concentración de 2 y 10 μ g/ml, o bien con Igs de los sueros preinmunes de los conejos.

Después de las incubaciones señaladas se examinó el estado del acrosoma mediante la técnica de CTC.

3.2. Efecto de Igs anti-ZP3 monovalentes sobre la actividad inductora de la reacción acrosómica

De manera similar a lo descrito en la sección 3.1., espermatozoides capacitados y preincubados con glicopéptidos de la ZP (4 ZP equivalentes/ μ l) por 30 min, se sometieron a una segunda incubación de 30 min con el fragmento Fab de anti-ZP3 (10 μ g/ml) y en algunos experimentos se incluyó una incubación adicional de otros 30 min con IgG anti-conejo preparada en cabra (10 μ g/ml). Los controles de esta serie experimental incluyeron las siguientes incubaciones: a) sólo en MC por 90 min, b) con glicopéptidos seguido por IgG bivalente anti-ZP3, y c) glicopéptidos seguido por IgG anti-conejo preparada en cabra en ausencia de fragmentos anti-ZP3.

Después de las incubaciones indicadas se examinó el estado del acrosoma mediante la técnica de CTC.

4. Estudio de la presencia de un sustrato para tirosina quinasa y los receptores para ZP3

4.1. Electroforesis e "immunoblot" de proteínas espermáticas

Se recuperaron muestras de espermatozoides inmediatamente después de la dispersión de las células desde la porción caudal del epidídimo en tampón TN. Se tomaron alícuotas de estas muestras y el resto de los espermatozoides se centrifugaron suavemente (100 g por 10 min) y se resuspendieron en MC sin BSA. Se retiró una alícuota de esta

suspensión y el resto de los espermatozoides se capacitaron y luego incubaron en ausencia y en presencia de: ZP solubilizada (1 ZP/ μ l) o mAc M42 (200 μ g/ml). Otros tratamientos incluyeron incubación de muestras recuperadas en TN, por 30-60 min en tampón TNC o en tampón TN que contenía LaCl_3 25 μ M a 37°C.

Los espermatozoides tratados se centrifugaron (12 000 g por 5 min) y se resuspendieron en un volumen igual de mezcla desnaturante (concentrada 2 veces) a una concentración de 3×10^6 espermatozoides/20 μ l de mezcla desnaturante. La suspensión se homogeneizó en vórtex, se llevó a ebullición por 5 min y se cargó (20 μ l/carril) en geles de acrilamida-bisacrilamida al 7.5% o al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin y col. (1979).

4.1.1. Detección de proteínas que se unen a la ZP

Espermatozoides recuperados en tampón TN se incubaron por 30 min a 37°C en tampón TNC. Sus proteínas se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 7.5% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Después de la transferencia la lámina de nitrocelulosa se incubó con solución de leche sin materia grasa al 3% en PBS, que contenía NaN_3 10 mM. Tres tiras de nitrocelulosa que contenían las mismas muestras de espermatozoides, fueron incubadas con soluciones de proteínas de la ZP marcadas con ^{125}I (10⁶ cpm/ml): una con ZP total, la segunda con ZP2 y la otra con ZP3, en PBS/ NaN_3 10 mM por 3 h a temperatura ambiente. Después de la incubación la nitrocelulosa fue exhaustivamente lavada con PBS que contenía 0.5% de

NP-40, secada y expuesta a un film de rayos X a -70°C para análisis autoradiográfico.

4.1.2. Inmunodetección de residuos de fosfotirosina en espermatozoides

Se recuperó espermatozoides de epidídimo en tampón TN y se incubaron bajo distintas condiciones, como se indicó anteriormente (ver sección 4.1.). Las muestras de células espermáticas se separaron en geles de acrilamida-bisacrilamida al 10 % y se transfirieron posteriormente a láminas de nitrocelulosa. Después de la transferencia, la reactividad no específica de las láminas se bloqueó con gelatina al 2% (Tipo water fish skin gelatin) en Tris 50 mM/ NaCl 0.1 M/ Tween 20 0.5%/ NaN_3 10 mM por 1-2 h a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se incubó después, con IgG anti-fosfotirosina preparada en conejo en tampón TN, que contenía Tween 20 al 0.5%, por 3 h a temperatura ambiente. En geles corridos paralelamente se separaron las proteínas de las muestras de espermatozoides en duplicado y luego se transfirieron a nitrocelulosa. Dos tiras de nitrocelulosa conteniendo muestras iguales se incubaron una, con el anticuerpo anti-fosfotirosina y la otra con una preparación de anticuerpo cuya reactividad había sido bloqueada por incubación de 1 h con α -fosfo-DL-tirosina 40 mM, con el propósito de detectar sólo la reactividad no específica. Después de lavar 5 veces, por 15 min cada vez, con tampón TN, que contenía Tween 20 al 0.5%, la nitrocelulosa se incubó con ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra por 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar como antes, las láminas de nitrocelulosa se secaron y analizaron por autoradiografía. Posteriormente, las

regiones de la nitrocelulosa que contenían las bandas de interés se cortaron y contaron en un contador gamma (Beckman), para estimar los niveles relativos de fosforilación de tirosinas.

4.2. Detección de residuos de fosfotirosina en proteínas espermáticas unidas a la ZP

4.2.1. Preparación de proteínas espermáticas de 95 kD

Se capacitó espermatozoides en MC que contenía $100 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$. Después se lavaron por centrifugación (100 g por 10 min) con el mismo medio pero sin BSA, para luego solubilizarlos en mezcla desnaturalante y separar sus proteínas en gel de acrilamida-bisacrilamida al 10%. La electroferesis y todas las manipulaciones posteriores de las muestras se realizaron en presencia de Na_3VO_4 $100 \mu\text{M}$ para impedir desfosforilación por acción de fosfatasas. Se cortó la región de 95 kD del gel y se electrocluyeron las proteínas en cámara de Elutrap. La muestra obtenida se dializó en Centricon 30 primero, con urea 8 M y luego con tampón TNC. La preparación de proteínas de 95 kD se empleó en el ensayo de "Dot Blot" que se describe a continuación.

4.2.2. Ensayo de "Dot Blot" para detectar fosfotirosinas

Una lámina de nitrocelulosa se embebió en tampón TNC y se montó en la cámara de microtitulación Bio-Rad. Se aplicó a los pocillos ZP solubilizadas en TNC-PVP ($10 \text{ ZP}/\mu\text{l}$), según se indica en la Tabla 2, y se incubaron por 30 min. Después se bloqueó los sitios remanentes de la nitrocelulosa incubando por 30 min con TNC/BSA 1%. Luego de enjuagar los pocillos una vez con tampón TNC, que contenía Tween 20 0.5%, se aplicó $10 \mu\text{l}$ de la preparación de proteínas de 95 kD de

espermatozoides, según se indica en la Tabla 2. Después de 30 min de incubación se lavó exhaustivamente los pocillos con tampón TN/Tween 20 al 0.5%. Posteriormente, se agregó a los pocillos indicados en la Tabla 2, mAc de ratón dirigido contra fosfotirosina (PY12, 2 µg/ml; Glenney et al., 1988) diluido en solución tamponante TN/Tween 20 0.5%/BSA 0.1%. Después de incubar los mAc toda la noche a 4°C, se lavó los pocillos repetitivamente con la solución tamponante que se usó para diluir los mAc. Se desensambló la cámara de "Dot Blot" y la nitrocelulosa se bloqueó completamente incubándola con TN/Tween 20 0.5%/gelatina 2%/BSA 4% para luego procesarla con el propósito de ver si existían residuos fosforilados en las proteínas de 95 kD que se habían unido a la ZP. La inmunodetección se realizó incubando primero 45 min con IgG anti-ratón preparada en conejo (dilución 1:100 del suero; Cappell Labs) y luego otros 45 min con ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra. Seguido a cada una de las incubaciones se realizaron lavados de la nitrocelulosa con TN/Tween 20 0.5%/BSA 0.1%. La nitrocelulosa lavada se dejó secar y se contó directamente la radioactividad de los sitios de la nitrocelulosa donde se realizó las diversas incubaciones. Se utilizó en este último paso un contador gamma (Beckman).

4.3. Inmunofluorescencia indirecta para detectar residuos de fosfotirosina

Espermatozoides obtenidos en tampón TN, capacitados en MC (con o sin exposición a proteínas de la ZP), se fijaron en formaldehído al 4% (Ultrapure - TEM Grade, Tousimis Research Corp., Rockville, MD) en PBS por 10 min. Después de centrifugar (1 300 g por 15 min) los

espermatozoides se incubaron en PBS, que contenía glicina 50 mM por 30 min, se centrifugaron y resuspendieron en PBS. Los espermatozoides se depositaron en portaobjetos de 8 pocillos (Roboz Surgical Instrument Co., Inc., Washington DC.) (5×10^4 espermatozoides/pocillo) y se dejaron secar a 37°C por 10-15 min. Finalizada la etapa de secado, los portaobjetos se enjuagaron con PBS y se incubaron con PBS/ suero de cabra 5%/ BSA 2%/ NaN_3 10 mM (tampón de bloqueo) por 30-60 min. Anticuerpos anti-fosfotirosina, bloqueados y no bloqueados con o-fosfotirosina, se agregaron a los pocillos e incubaron por 3 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de lavar repetidas veces con PBS, se agregó IgG anti-conejo preparada en cabra, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (1:200 en tampón de bloqueo; Kierkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) y se incubó como antes por 1 h. Después de lavar nuevamente, los portaobjetos se enjuagaron con agua destilada y se realizó un montaje en glicerol 70%/ 1,4-diazobiciclo (2,2,2) octano (DABCO) en PBS, pH 8.6, cubriendo el espécimen con un cubreobjetos alargado.. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser examinadas al microscopio con óptica de contraste de fases y epifluorescencia.

Todos los reactivos fueron adquiridos de la compañía Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, a menos que se indique algo distinto.

RESULTADOS

1. Preparación de material biológico y reactivos

1.1. Obtención y purificación de glicoproteínas de la ZP

Las ZP aisladas de ovocitos ováricos por el método descrito se compararon por PAGE-SDS con las obtenidas al utilizar el método de Lakoski y col. (1988) sin modificar. La figura 2 muestra que las modificaciones introducidas en este trabajo resultaron en una preparación considerablemente mas limpia (Figura 2, carril A). Las ZP obtenidas de esta manera se marcaron radioactivamente con ^{125}I , se purificaron y analizaron por electroforesis y autorradiografía, encontrándose que las tres glicoproteínas separadas estaban libres de contaminación (Figura 3).

Para demostrar que la ZP3 purificada seguía uniéndose a los espermatozoides, se usó el ensayo de competencia en la unión de espermatozoides a ZP intactas. Se utilizó ZP2 como control negativo y ZP total solubilizada, como control positivo del ensayo. Los resultados indicaron que el procedimiento de purificación no compromete la habilidad de la ZP3 para unirse a los espermatozoides (datos no suministrados).

1.2. Glicopéptidos de la ZP

El tratamiento de las ZP solubilizadas con pronasa del tipo insoluble resultó en la producción de glicopéptidos de la ZP que migraron en PAGE-SDS con un M_r menor que 30 kD, resultado similar al

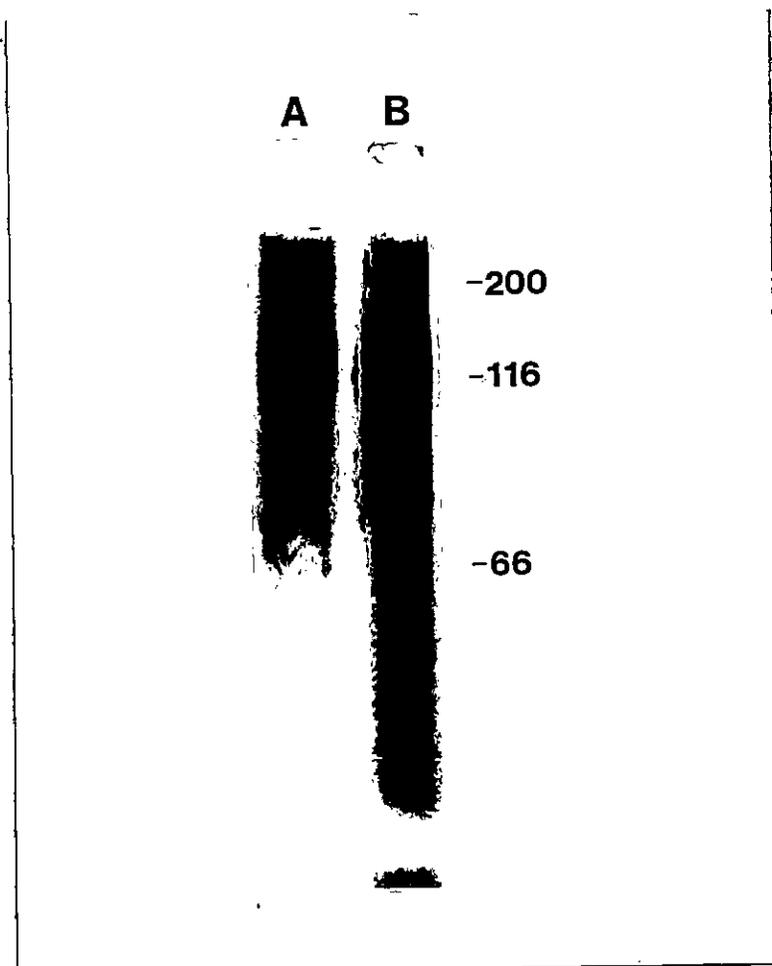


FIGURA 2 : Comparación del perfil de proteínas de ZP de ovocitos ováricos aisladas con dos métodos diferentes.

Las proteínas se separaron electroforéticamente en PAGE-SDS en gel al 7.5% bajo condiciones no reductoras y se revelaron mediante tinción con nitrato de plata. El carril A muestra ZP obtenidas por el método descrito en esta tesis y el carril B, ZP aisladas por centrifugación en gradiente de Percoll, según fuera descrito por Lakoski y col. (1988). La migración de los estándares de peso molecular ($\times 10^3$ kD) están indicados a la derecha del carril B.

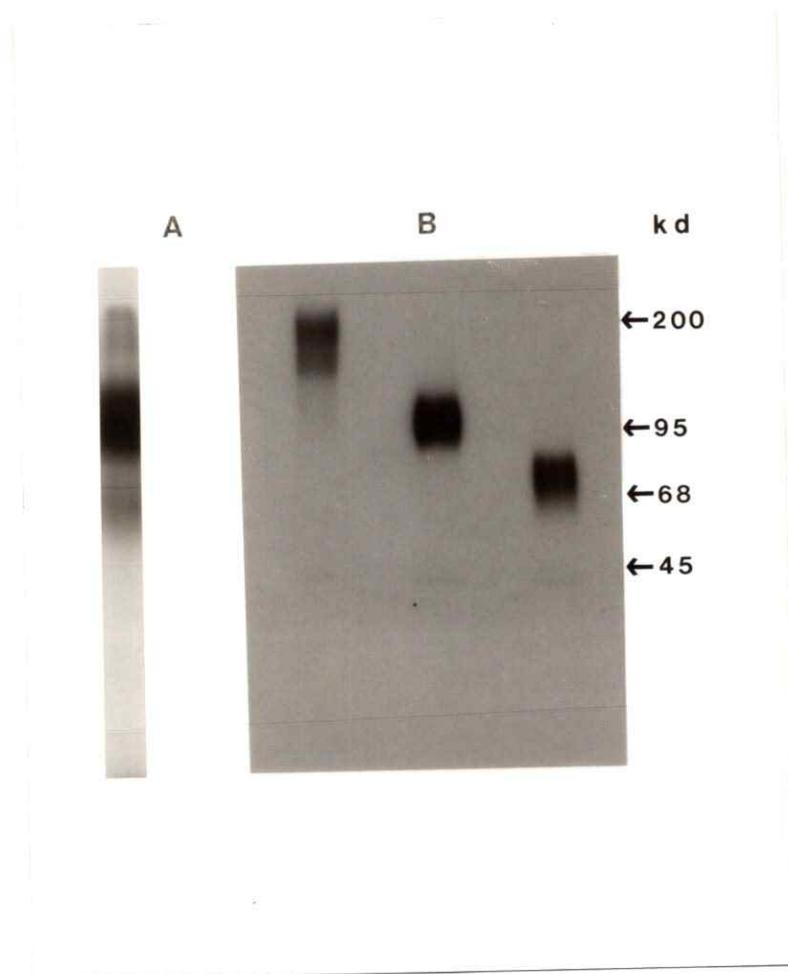


FIGURA 3 : Análisis autoradiográfico de las proteínas de ZP separadas por PAGE-SDS antes (A) y después (B) de la purificación. Las proteínas marcadas radioactivamente se separaron por electroforesis bajo condiciones no reductoras, y las bandas se visualizaron exponiendo el gel a un film de rayos X por 4 hrs a -70°C . La banda tenue en el panel B que corre justo bajo los 45 kD corresponde al frente de solvente del minigel. Los estándares de peso molecular están indicados en el lado derecho de la figura ($\times 10^{-3}$ kD).

obtenido por Florman y col. (1984). Cuando se realizó electroforesis de este material (datos no suministrados) no se encontró evidencia de la presencia de ZP sin digerir.

El ensayo de competencia en la unión de los espermatozoides a la ZP reveló, que los glicopéptidos obtenidos conservaban su habilidad de unión a los receptores espermáticos. La cantidad mas alta de glicopéptidos que se ensayó, inhibió la unión entre los espermatozoides y la ZP en aproximadamente un 90%. Al utilizar ZP total y solubilizada en este ensayo, se logró este porcentaje de inhibición cuando se empleó una concentración de 3 ZP/ μ l, por lo tanto, se estimó que la concentración mas alta de glicopéptidos ensayada correspondía a 3 ZP equivalentes/ μ l. Esta estimación de concentración de los glicopéptidos de la ZP, basada en el porcentaje de inhibición de la interacción espermatozoide-ZP, se utilizó para ensayar la actividad inductora de la RA de los glicopéptidos. Así, se observó que a una concentración estimada de 4 ZP equivalentes/ μ l, los glicopéptidos de la ZP coíncubados por 30 min con espermatozoides capacitados, no indujeron la RA. Mientras tanto, el tratamiento con ZP sin digerir a la misma concentración, provocó inducción de la RA en aproximadamente un 70% de la población de espermatozoides tratados.

1.3. Caracterización de los antisueros dirigidos contra ZP2 y ZP3

La titulación de los antisueros de conejo obtenidos 15 días después de cada inmunización con proteínas de la ZP, se realizó utilizando la técnica de ELISA, que fuera descrita anteriormente (ver materiales y métodos). La figura 4 muestra la titulación de los

sueros colectados después de la inmunización cuaternaria y la reactividad no específica de los sueros preinmunes. El título de los antisueros, definido como el 50% de la reactividad máxima, fue de aproximadamente 1/1000, para anti-ZP2, y 1/2000, para anti-ZP3. Mientras tanto, los sueros preinmunes correspondientes mostraron respuesta inespecífica, con un título de 1/4 diluciones.

El análisis por "immunoblot", con proteínas de la ZP totales separadas electroforéticamente y transferidas a papel de nitrocelulosa, mostró que los antisueros reaccionaban específicamente con las proteínas de la ZP correspondientes (Figura 5b y d), mientras que los sueros preinmunes no mostraron reacción (Figura 5a y c).

1.4. Purificación y caracterización de las Igs anti-ZP2 y anti-ZP3

Sueros preinmunes e inmunes anti-ZP2 y anti-ZP3 se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A-Sefarosa. Un perfil típico de elución se muestra en la figura 6. Las IgGs purificadas se examinaron por PAGE-SDS en gel al 10% de acrilamida-bisacrilamida, en condiciones no reductoras, el cual fue teñido con Azul de Coomassie. La figura 7 muestra las cuatro preparaciones de IgGs purificadas a partir de sueros preinmunes e inmunes, anti-ZP2 y anti-ZP3, pudiendo observarse que se encuentran libres de contaminantes.

Para estimar la concentración de anticuerpos policlonales monoespecíficos, que debían ser empleados en el estudio de los efectos de los anticuerpos sobre la función espermática, se titularon las fracciones purificadas de las IgGs por la técnica de "Dot-Blot" y

TITULACION SUEROS DE CO NEJO

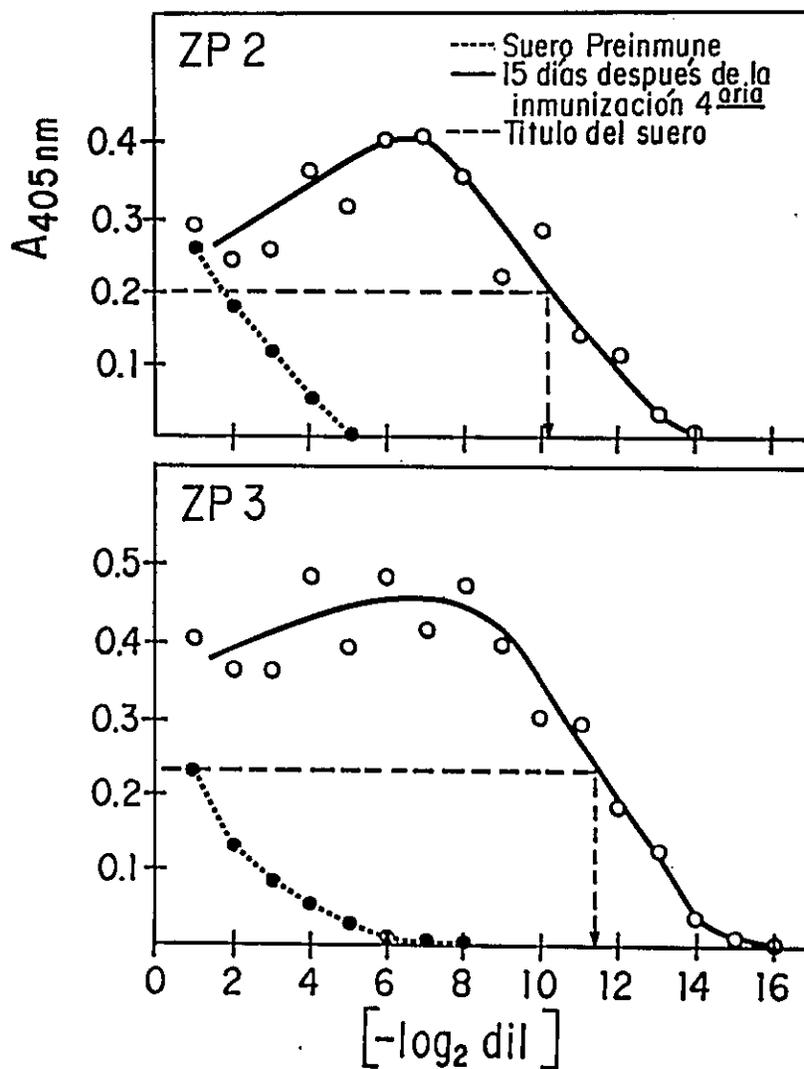


FIGURA 4 : Ensayo de ELISA para titular sueros preinmunes e inmunes contra ZP total solubilizada.

Se utilizó ZP total solubilizada para activar la placa de microtitulación (100 ng/pocillo) y se bloquearon los sitios remanentes con ESA. Luego se ensayaron diluciones seriadas de los sueros preinmunes e inmunes, anti-ZP2 y anti-ZP3 y la reacción se siguió con un conjugado de peroxidasa-anti-IgG de conejo preparado en cabra, utilizando como sustrato 4-cloro-1-naftol. El producto coloreado de la reacción se monitoreó leyendo Absorbancia a 405 nm. El título de los antisueros fue definido como el 50% de la reactividad máxima.

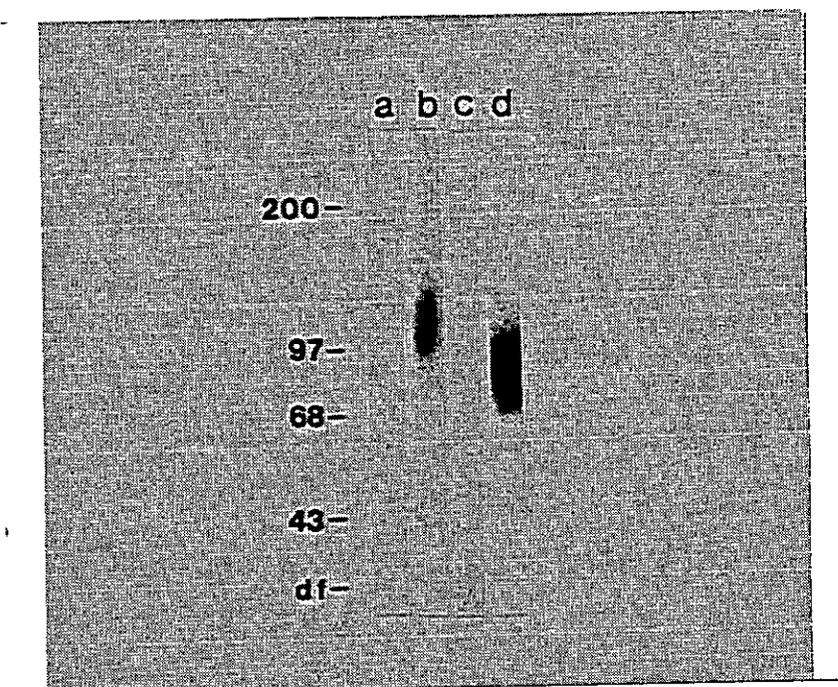


FIGURA 5 : Reactividad de los anticuerpos anti-proteínas de la ZP reveladas por "immunoblots".

Se separó electroforéticamente las proteínas de la ZP y luego se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Después de bloquear los sitios remanentes de la nitrocelulosa con leche (sin materia grasa) al 3% en PES, la lámina se incubó con los anticuerpos anti-ZP, se lavó, y la reacción se siguió empleando la sonda radioactiva ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. La autorradiografía indica que anticuerpos anti-ZP2 (carril b) y anticuerpos anti-ZP3 (carril d) reaccionan con las proteínas correspondientes, mientras que los sueros preinmunes respectivos no presentan reactividad (carriles a y c). Los estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) están ubicados a la izquierda de la figura.

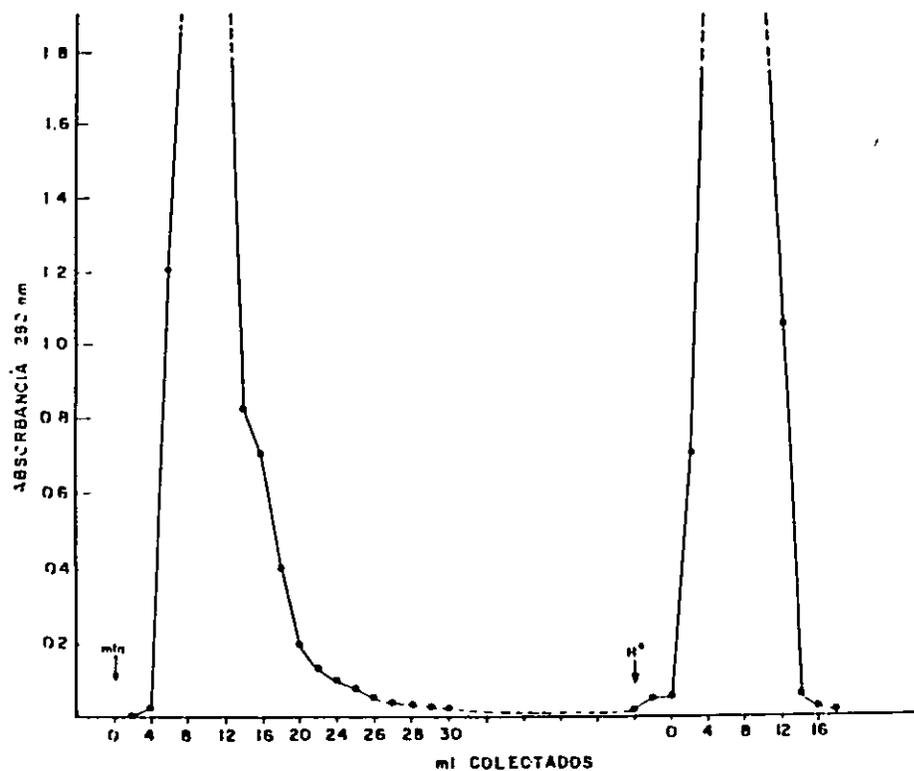


FIGURA 6 : Cromatografía de afinidad en columna de proteína A-Sefarosa de los sueros de conejo.

La figura muestra el perfil típico de elución que se obtiene en una purificación de Igs de sueros. El primer pico de proteínas representa a todas aquellas proteínas séricas que no son Igs y el segundo, que aparece luego de eluir lo retenido por la columna con solución ácida (H^+), corresponde a las Igs del suero.

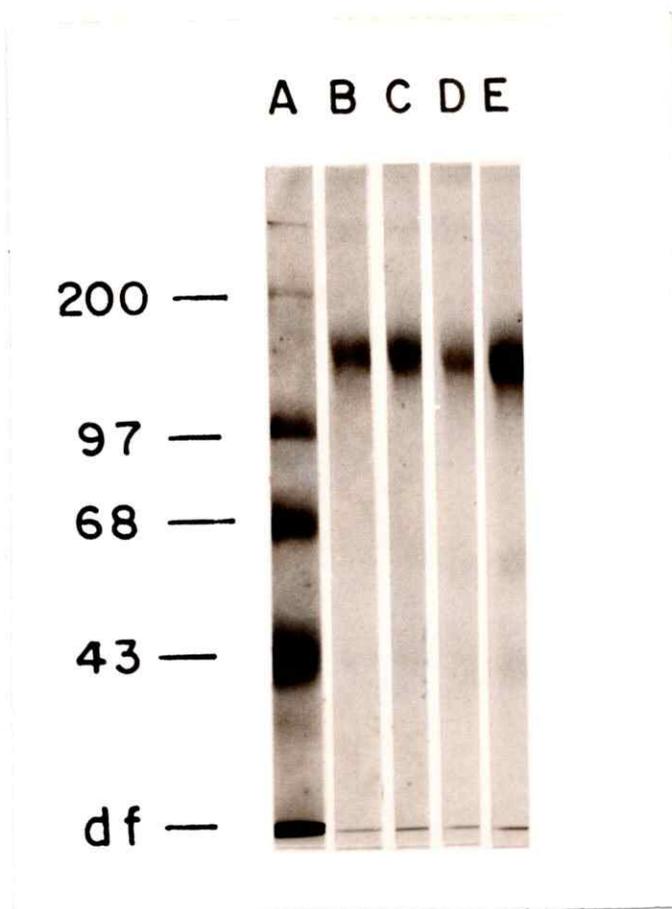


FIGURA 7 : Análisis de las IgGs purificadas de sueros de conejos mediante PAGE-SDS.

Igs de sueros de conejo se purificaron por cromatografía de afinidad en columna de proteína A-Sefarosa. Las Igs purificadas se corrieron en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10 % y las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Carril A, estándares de peso molecular (valores $\times 10^{-3}$ kD). Carriles B y D, IgGs de sueros preinmunes anti-ZP2 y anti-ZP-3, respectivamente. Carriles C y E, IgGs de antisueros anti-ZP2 y anti-ZP3, respectivamente. Se puede observar que las preparaciones están compuestas principalmente de IgGs.

los resultados se muestran en la figura 8. IgG anti-ZP2 (dilución 1/2^o, es decir 2 µg/ml) e IgG anti-ZP3 (dilución 1/2^o, es decir 10 µg/ml) mostraron reactividad específica cuando se compararon con la IgG preinmune proveniente de cada conejo. Por lo tanto, estas fueron las concentraciones de anticuerpos que se eligieron para iniciar los experimentos de ensayo del efecto que tenían sobre la inducción de RA en espermatozoides capacitados.

De la misma manera se examinó la reactividad de los anticuerpos anti-ZP con los glicopéptidos de la ZP. Los resultados demostraron que ambos anticuerpos, anti-ZP2 y anti-ZP3, se unen específicamente a los glicopéptidos y de manera similar a lo observado con la ZP no digerida (Figura 9).

1.5. Obtención de fragmentos Fab de IgG anti-ZP3

Después de la digestión de anti-ZP3 con papaína se realizó una separación cromatográfica en columna de proteína A-Sefarosa. La figura 10 muestra el perfil de elución obtenido de esta columna y el primer pico corresponde a proteínas que no se unieron a la proteína A. Las fracciones no retenidas por la columna, que contienen los fragmentos Fab, se concentraron usando Centricon 30 y se ensayaron por electroforesis en condiciones no reductoras. Las proteínas del gel, visualizadas por tinción con Azul de Coomassie, se ven libres de contaminación y el M_r de los fragmentos Fab obtenidos es de aproximadamente 35 kD (Figura 11). Cuando se ensayó la reactividad de los fragmentos en "immunoblot" sobre nitrocelulosa, que contenía proteínas de la ZP separadas previamente por electroforesis, se observó que sólo reaccionaban específicamente con la ZP3 (Figura 12, carril C).

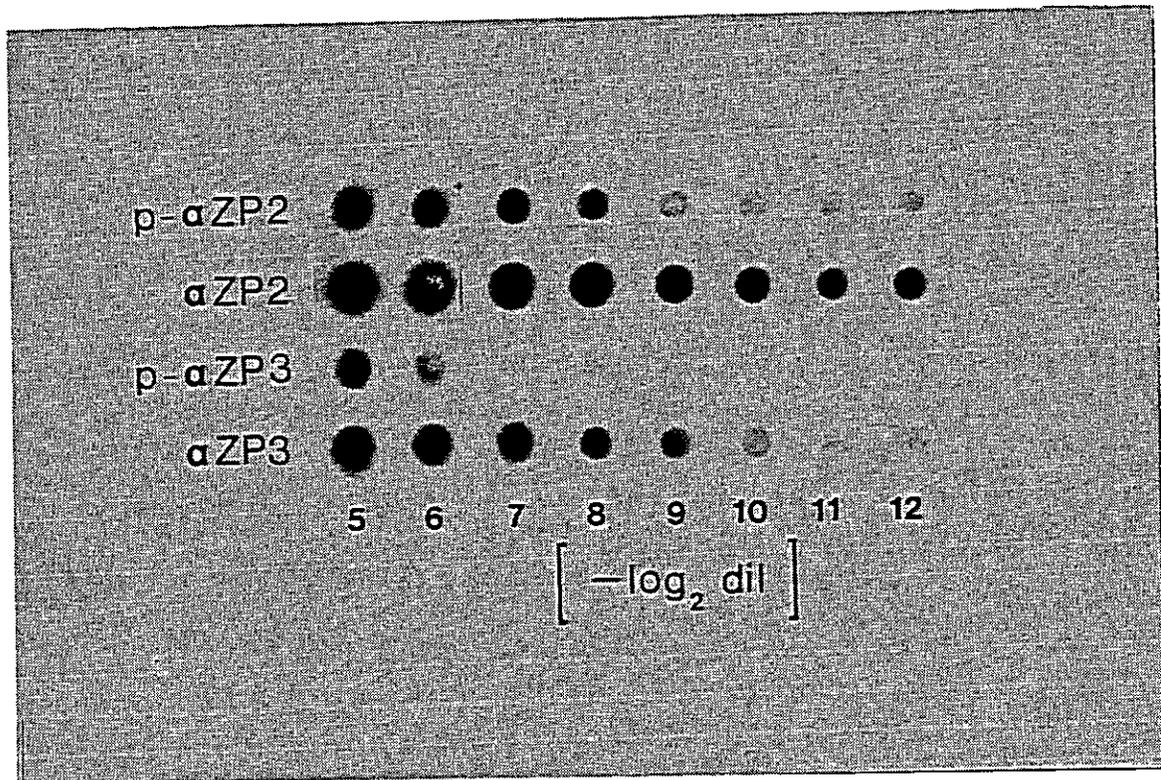


FIGURA 8 : Análisis autoradiográfico de la reactividad de anti-ZP2 y anti-ZP3 con ZP total y solubilizada, por ensayo de "Dot-Blot".

Los pocillos de nitrocelulosa se activaron con ZP total y solubilizada (100 ng/pocillo), seguido por diluciones seriadas de IgGs de sueros preinmunes (p-αZP2, p-αZP3), o IgGs de antisueros (αZP2, αZP3). Después de lavar la lámina de nitrocelulosa se ensayó la reactividad de las IgGs de los sueros con la sonda radiactiva ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. Los resultados muestran la reactividad específica de los antisueros.

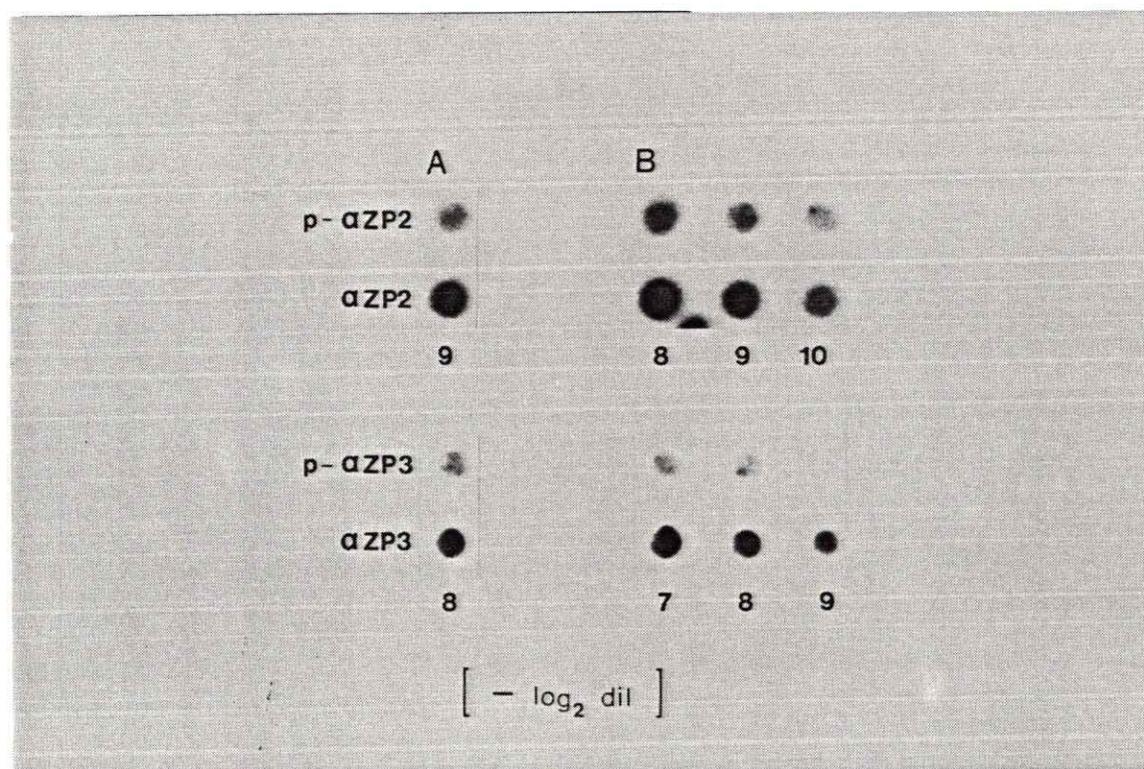


FIGURA 9 : "Dot-Blot" de glicopéptidos de ZP con anticuerpos anti-ZP.

El análisis autoradiográfico indica que IgG anti-ZP2 e IgG anti-ZP3 reconocen a los glicopéptidos de la ZP. Los pocillos de nitrocelulosa que contenían ZP total solubilizada (A) o glicopéptidos de ZP (B) (100 ng/ml) se incubaron con IgGs anti-ZP2 y anti-ZP3 preinmunes (p-αZP) e inmunes (α-ZP). Tres diluciones diferentes de los sueros fueron incubados con los glicopéptidos. La reactividad fue ensayada con ¹²⁵I-IgG anti-conejo preparada en cabra.

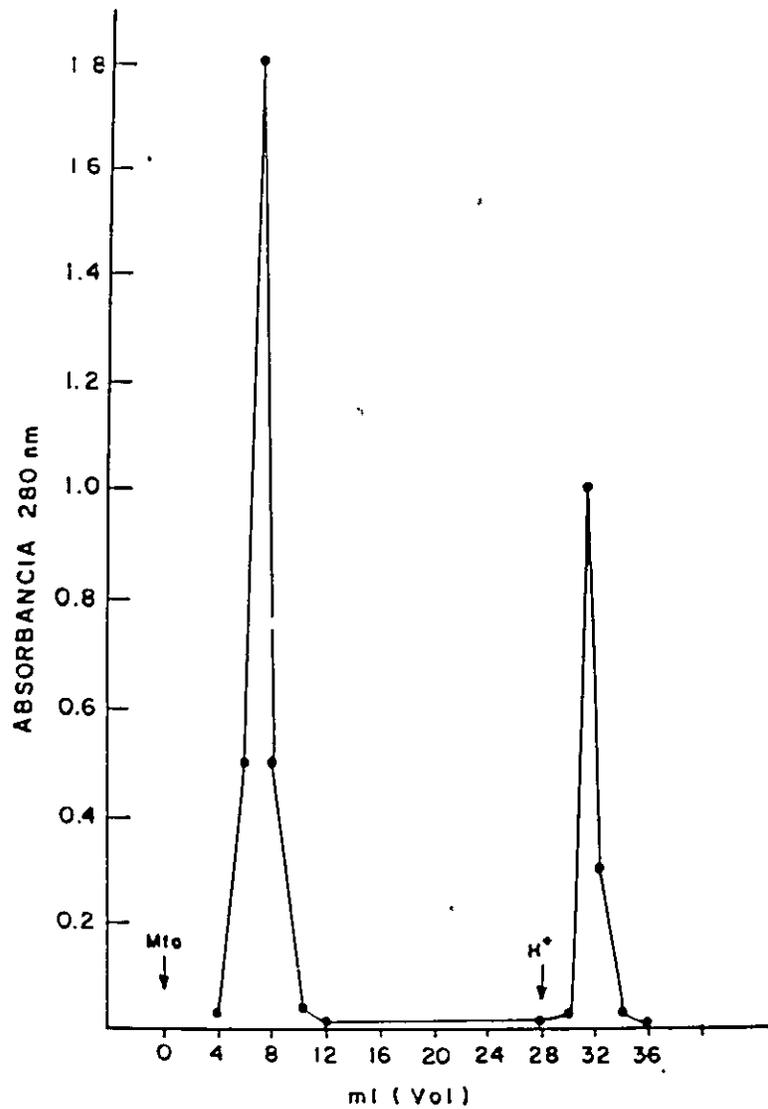


FIGURA 10 : Purificación de fragmentos Fab de IgG anti-ZP3 en columna de afinidad de proteína A-Sefarosa.

La muestra se aplicó en PBS a la columna y el primer pico de proteínas, que corresponde a lo que no se retuvo en ella, contiene los fragmentos Fab. La fracción de proteínas retenida por la proteína A está compuesta por los fragmentos Fc y las moléculas de IgG completas, las cuales son eluidas de la columna al aplicar la solución ácida (H^+).

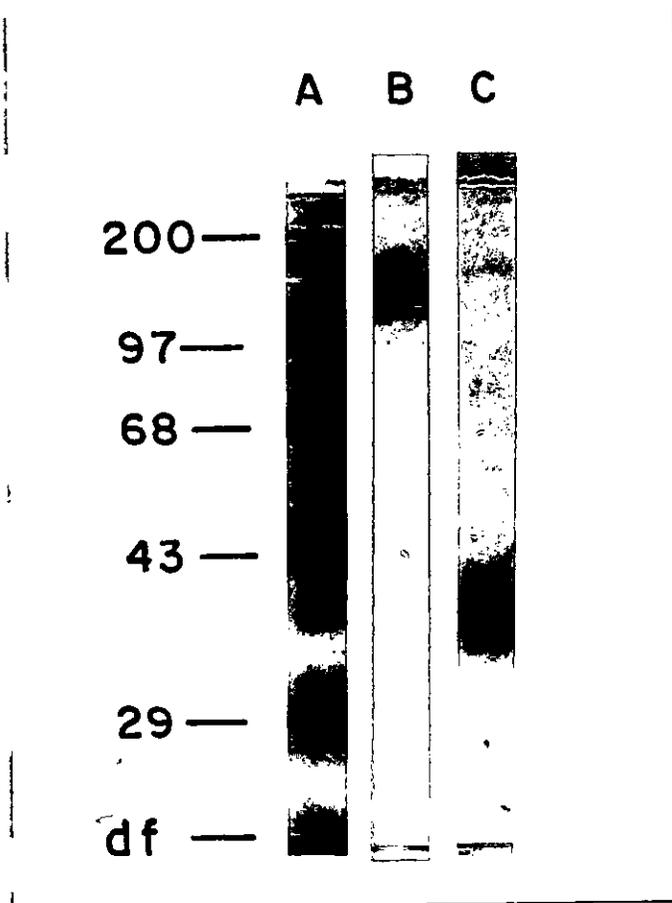


FIGURA 11 : Análisis de las Igs anti-ZP3 antes y después de la digestión con papaina mediante PAGE-SDS.

Las Igs se corrieron en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% en condiciones no reductoras y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. (A) muestra los estándares de peso molecular (valores $\times 10^{-3}$ kD). (B) IgG anti-ZP3 antes y (C) después de la digestión con papaina (df, indica frente de solvente).

En la figura 12, las líneas A y B corresponden a la reactividad de los pAbs anti-ZP2 y anti-ZP3, respectivamente, que han sido incluidas para comparación.

2. Anticuerpos monoclonales M42 y la reacción acrosómica inducida por la ZP

2.1. Efecto del mAc M42 en la RA inducida por la ZP

Se ensayó la actividad inductora de la RA de la ZP total solubilizada y de las proteínas de la ZP purificadas y se probó el efecto del mAc M42 sobre esta actividad. Después de la incubación con el ionóforo de catión divalente, A23187, utilizado como control positivo del ensayo, $59 (\pm 5)\%$ ($X \pm DS$) de los espermatozoides mostraban el patrón de fluorescencia "AR", mientras que $41 (\pm 4)\%$ de las células mostraban patrones "B" o "S". Suspensiones de espermatozoides incubadas en paralelo con la ZP total o la ZP3 purificada, presentaron 57% y 64%, respectivamente, de espermatozoides en patrón "AR" (Figura 13). En cambio, células incubadas con la ZP2 sólo mostraron 10% de los espermatozoides con patrón "AR". La preincubación de los espermatozoides con el mAc M42, seguido por incubación con ZP total o ZP3, indicó que el mAc M42 inhibe la RA inducida por ambas en un porcentaje semejante: 6% de RA al incubar con la ZP y 8% de RA al incubar con ZP3 (Figura 13).

El siguiente análisis de la inhibición del mAc M42 sobre la RA inducida por la ZP se muestra en la figura 14. En este caso, se grafica la distribución de las células de acuerdo a los tres patrones fluorescentes de CTC. La ZP total y la ZP3 indujeron la RA de los

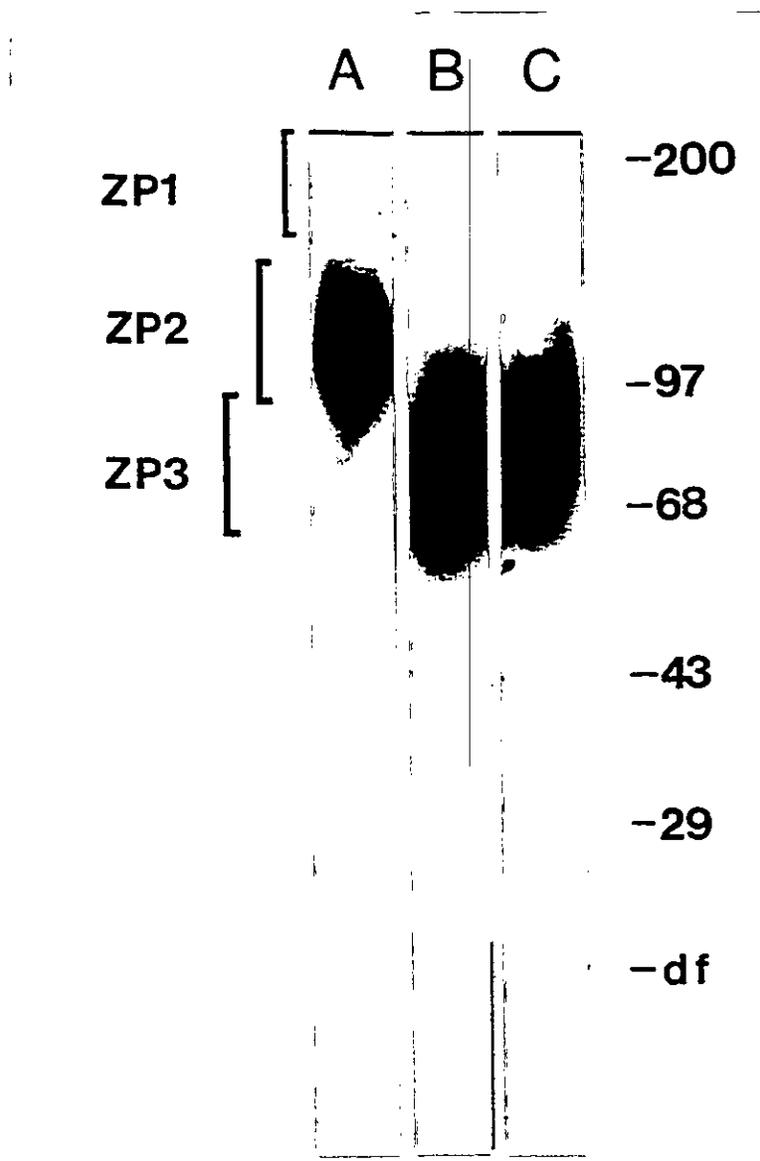


FIGURA 12 : Reactividad de anticuerpos anti-proteínas de ZP ensayadas por "immunoblot".

Las proteínas de ZP separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa y la inmunoreactividad de los anticuerpos anti-ZP digeridos y sin digerir se muestra de la siguiente manera: carril A, IgG anti-ZP2; carril B, IgG anti-ZP3 y carril C, fragmento Fab de anti-ZP3. La autoradiografía revela que tanto los anticuerpos bivalentes como los monovalentes reaccionan específicamente con la proteína esperada de ZP. Los estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) están indicados a la derecha de la figura.

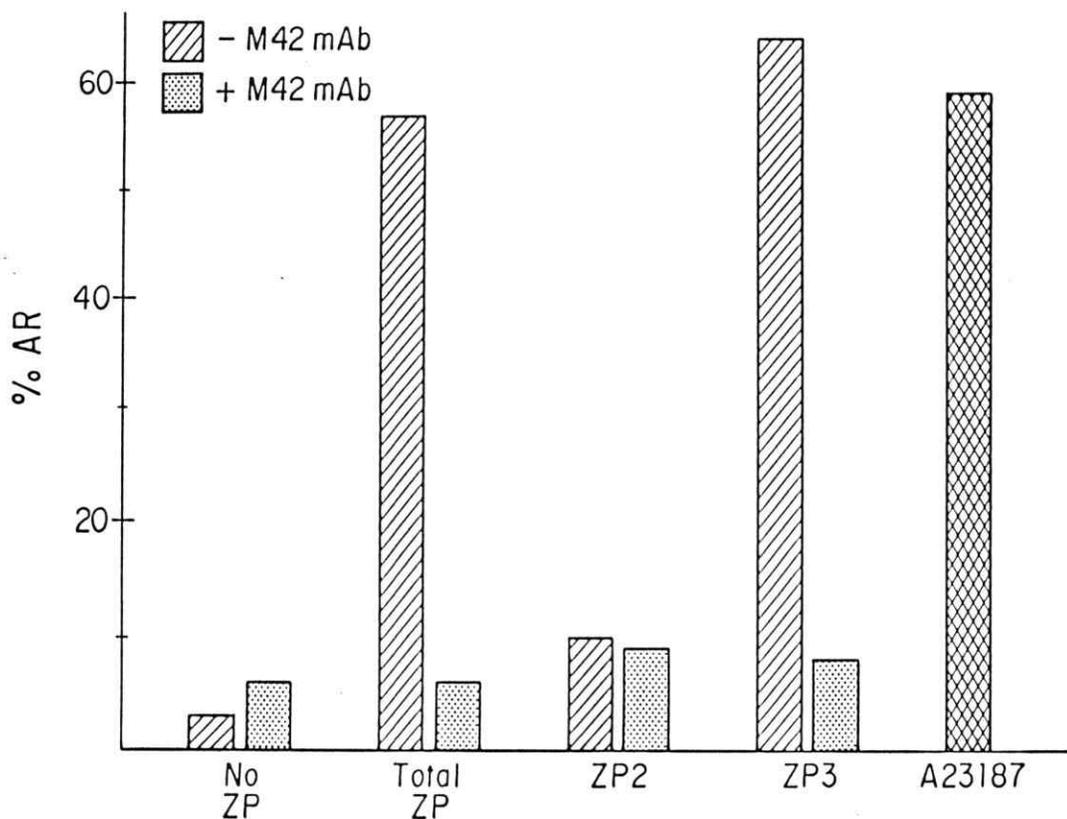


FIGURA 13 : Efecto del mAc M42 en las reacciones de acrosoma inducidas por ZP3.

Se incubaron espermatozoides capacitados, con o sin el anticuerpo M42 en CM a 37°C en 5% CO₂/aire por 15 min y luego se expusieron al medio que contenía la proteína indicada en la figura, a una concentración de 4 ZP equivalente/ μ l. Después de 30 min de incubación, se examinaron los acrosomas de los espermatozoides utilizando el ensayo CTC. El ionóforo de calcio A23187 se utilizó como control positivo de la RA. El eje de las abscisas indica el porcentaje de espermatozoides reaccionados que se encontró bajo las diferentes condiciones.

espermatozoides (Figura 14, panel A), mientras que el anticuerpo M42 previno la reacción en ambos casos, inhibiéndola a nivel de estado acrosómico intacto (patrón "B") (Figura 14, panel B). Los valores de desviaciones estándares, no fueron incluidos en los gráficos para no complicar su entendimiento. Sin embargo, nunca fueron mayores a un 8%.

2.2. Efecto del mAc M42 sobre espermatozoides con acrosomas en distintos estados de la reacción

La ZP de ovocitos de oviducto fueron modificados por tratamiento con el éster de forbol (TPA). Se ensayó la actividad de unión de espermatozoides capacitados a las ZP de ovocitos tratados y no tratados con TPA, y en ambos casos, un número similar de espermatozoides se unió a cada ZP: en el caso de ovocitos controles se encontraron 35 ± 10 espermatozoides unidos/ZP; y en el de las ZP de ovocitos tratados con TPA, 40 ± 11 espermatozoides unidos/ZP. Estos resultados indicaron que las modificaciones que puede producir el TPA no afectan las propiedades de ligando de la ZP.

Las ZP modificadas por TPA se solubilizaron y utilizaron en los experimentos destinados al estudio del efecto de TPA-ZP y mAc M42 sobre la RA. Los resultados de tales experimentos se muestran en la figura 15, e indican que el tratamiento inicial por 30 min con TPA-ZP deja a los espermatozoides en un estado intermedio de la RA (patrón "S"), tal como ha sido previamente descrito (Endo et al., 1987a,b). La siguiente incubación de estas células con ZP total y solubilizada les permitió completar la RA (Figura 15). Por el contrario, la adición secundaria de TPA-ZP, en vez de ZP total, no cambia la

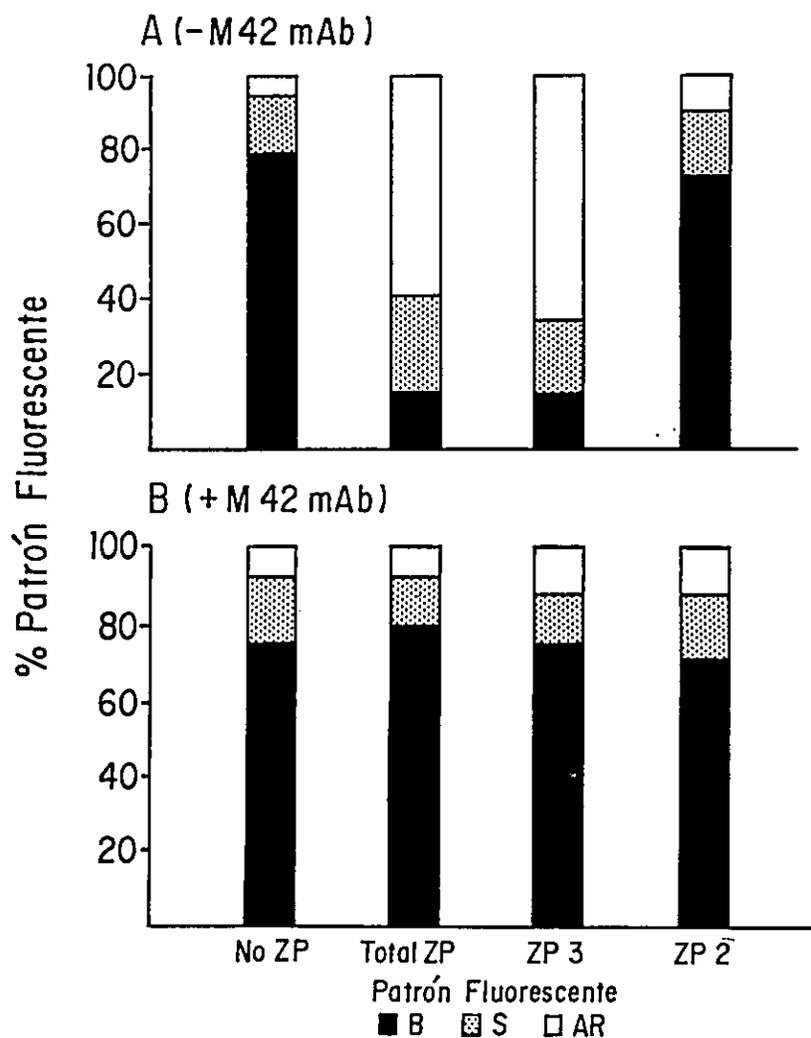


FIGURA 14 : Efecto del mAc M42 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides capacitados y tratados con proteínas de la ZP.

Espermatozoides capacitados se incubaron por 15 min en presencia (200 µg/ml) o ausencia de la IgG M42 en MC. Posteriormente, se incubaron con la solución de ZP (4 ZP/ul) que se indica en la figura. Después de 30 min a 37°C, se determinó el estado acrosomal procesando los espermatozoides por el ensayo de CTC. Por cada grupo de tratamiento se contó al menos 100 espermatozoides y el eje de las abscisas, indicado por % de patrón fluorescente representa el % de espermatozoides que presentaba uno u otro de los patrones.

distribución de patrones fluorescentes de este grupo de espermatozoides, con respecto a la tratada por sólo una vez con TPA-ZP; 67 (\pm 3)% de los espermatozoides tratados dos veces con TPA-ZP permanecieron en patrón "S".

La incubación de los espermatozoides con TPA-ZP, luego con el anticuerpo M42 y finalmente con ZP total solubilizada, condujo a las células a progresar al patrón "AR" de la reacción. El mAc M42 no inhibió la RA (Figura 15). Sin embargo, cuando se alteró el orden de adición de los reactivos, de manera que los espermatozoides que se encontraban con su acrosoma intacto se incubaron primero con el anticuerpo M42 y después con TPA-ZP, la RA fue inhibida y los espermatozoides permanecieron en el patrón "B" de fluorescencia de CTC (Figura 15).

Dada la heterogeneidad de cualquier grupo de espermatozoides que se obtenga es imposible tener un 100% de las células en una fase determinada de la RA. Por esta razón, se habla de espermatozoides en uno u otro estado dependiendo de las características que presente la mayoría de los espermatozoides en un determinado grupo de tratamiento.

Para determinar el número de espermatozoides que experimentan reacciones acrosómicas espontáneas a través del período de incubación, una alícuota de espermatozoides incubada en ausencia de proteínas de la ZP se examinó por el ensayo de CTC a distintos tiempos en cada experimento. Los valores que aparecen en la figura 15 representan aquellos determinados usando células recuperadas a los

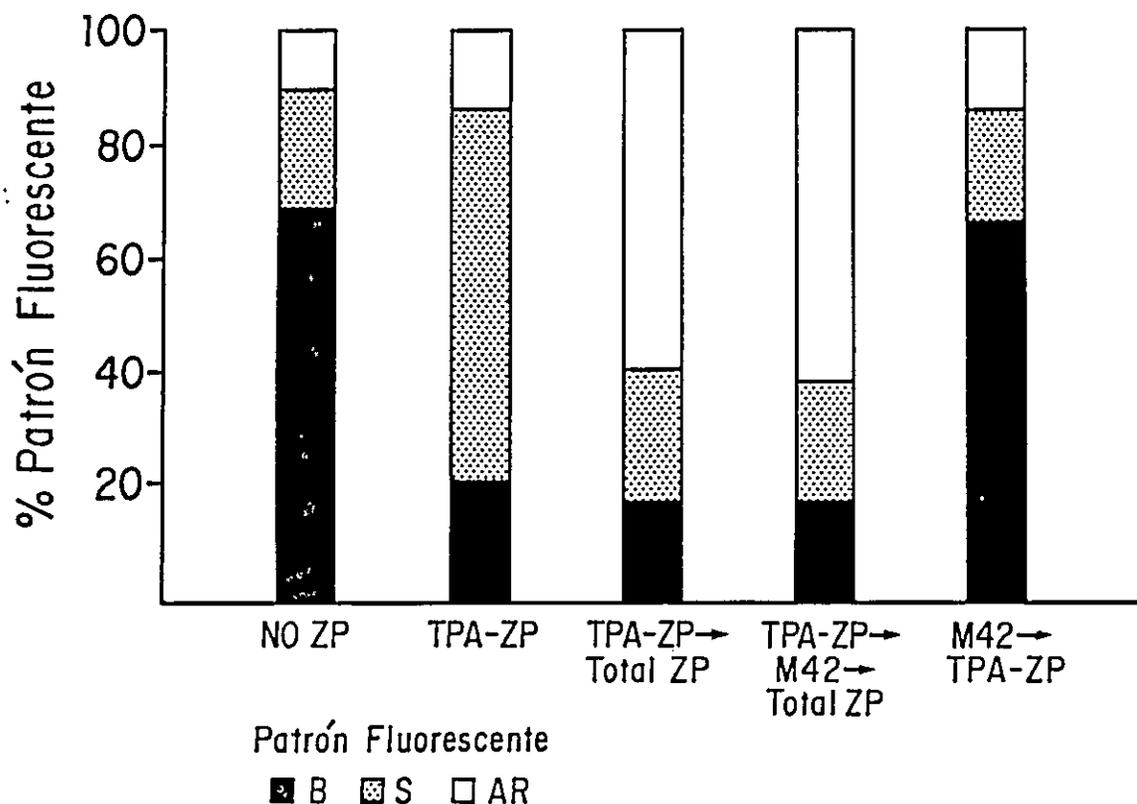


FIGURA 15 : Efecto del mAc M42 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides capacitados e incubados con proteínas de ZP modificadas por TPA.

Los espermatozoides se capacitaron y se dividieron en 5 grupos que se trataron de la siguiente manera: a) control incubado en MC sin adición de ZP, se señala en la figura como No ZP; b) incubación con TPA-ZP a una concentración de 4 ZP equivalentes/ μ l, aparece como TPA-ZP; c) incubación de 45 min con TPA-ZP y con posterior adición de ZP no modificada (TPA-ZP --> Total ZP); d) incubación de 30 min con TPA-ZP, seguida por 15 min de incubación con 200 μ g/ml de la IgG M42 y finalmente por 30 min de incubación con ZP no modificada (TPA-ZP --> M42 --> Total ZP); y e) incubación con IgG M42 por 15 min, seguido por 30 min con TPA-ZP (M42 --> TPA-ZP). Muestras de (a) se procesaron a los 0, 30 y 75 min por el ensayo de CTC entregando las tres, resultados similares. Para (b), (c), (d) y (e), las muestras fueron procesadas solamente a 75 min. Los resultados representan el promedio de tres experimentos. El % de patrón fluorescente representa el % de espermatozoides que se encontraban en el patrón fluorescente que se indica.

30 min de iniciado el ensayo y no difieren significativamente de aquellos observados al completar el experimento.

3. Estudio de la hipótesis de agregación de receptores utilizando

Igs anti-ZP3

3.1. Inducción de la reacción acrosómica por glicopéptidos de la ZP y anticuerpos contra ZP3 bi- y monovalentes

Glicopéptidos de la ZP pueden unirse a espermatozoides capacitados (Figura 16). Un 70% de los espermatozoides permanece con acrosoma en el patrón "B" después de la incubación con glicopéptidos, similar a lo encontrado en espermatozoides capacitados, incubados sólo en MC (T=0 en Figura 16). Como control positivo de la RA se usó ZP total, solubilizada y 60% de los espermatozoides mostró acrosoma reaccionado después de este tratamiento.

Al agregar IgGs anti-ZP3 a espermatozoides previamente tratados con glicopéptidos de la ZP se observó la inducción de la RA (Figura 16, panel A). El porcentaje de RA alcanzado por esta grupo de espermatozoides fué similar al que se obtuvo en los controles positivos del ensayo (tratamiento con ZP total, Wb ZP). Después de la incubación de los espermatozoides con glicopéptidos de la ZP se ensayó también adicionar sueros preinmunes o anticuerpos anti-ZP2 (a 2 o 10 µg/ml) y en estos casos, no se observó efecto sobre la RA.

De acuerdo con la hipótesis de agregación de receptores, los resultados sugieren que las IgGs anti-ZP3 pueden unirse a los glicopéptidos, que a su vez están unidos a los receptores del espermatozoide, e inducir su agregación gatillando así la RA. Si

esto es correcto, los espermatozoides tratados con glicopéptidos de la ZP no deberían experimentar la RA en presencia de los anticuerpos anti-ZP3 monovalentes, a menos que se trate de RA espontáneas. El efecto de anticuerpos monovalentes se ensayó tratando espermatozoides capacitados primero con glicopéptidos, y después con fragmentos Fab anti-ZP3. Como se muestra en la figura 16B, el 70 % de los espermatozoides así tratados presentaban acrosoma intacto, indicado por el patrón "B" del ensayo de CTC. Mas aún, si estas células se incubaban posteriormente con IgG anti-conejo preparada en cabra, con el objeto de entrecruzar los fragmentos Fab, la mayoría de los espermatozoides mostraba acrosoma reaccionado (Figura 16B). En ausencia de fragmentos Fab de anti-ZP3, la IgG anti-conejo preparada en cabra no tuvo efecto sobre el estado del acrosoma.

Algunos de los espermatozoides tratados con glicopéptidos de la ZP y dilución 1/1250 de los pAcs anti-ZP3, mostraban el patrón fluorescente "AR", y se observó que esta cantidad aumentaba al incrementar las concentraciones de IgG anti-ZP3 con que se trataban los espermatozoides. Este experimento demostró que la respuesta era dependiente de la dosis (Figura 17), lo cual corrobora que el efecto de los anticuerpos anti-ZP3 sobre la inducción de RA es específico. La dilución 1/250 del anticuerpo anti-ZP3 corresponde a 10 µg/ml y es la concentración que se utilizó en los demás ensayos. Es interesante notar también que, con concentraciones submáximas de IgG anti-ZP3, la cantidad de espermatozoides que se encontraba en patrón "S" del ensayo de CTC era substancialmente mas grande que la observada sin el tratamiento con anti-ZP3. Esto sugiere que un entrecruzamiento

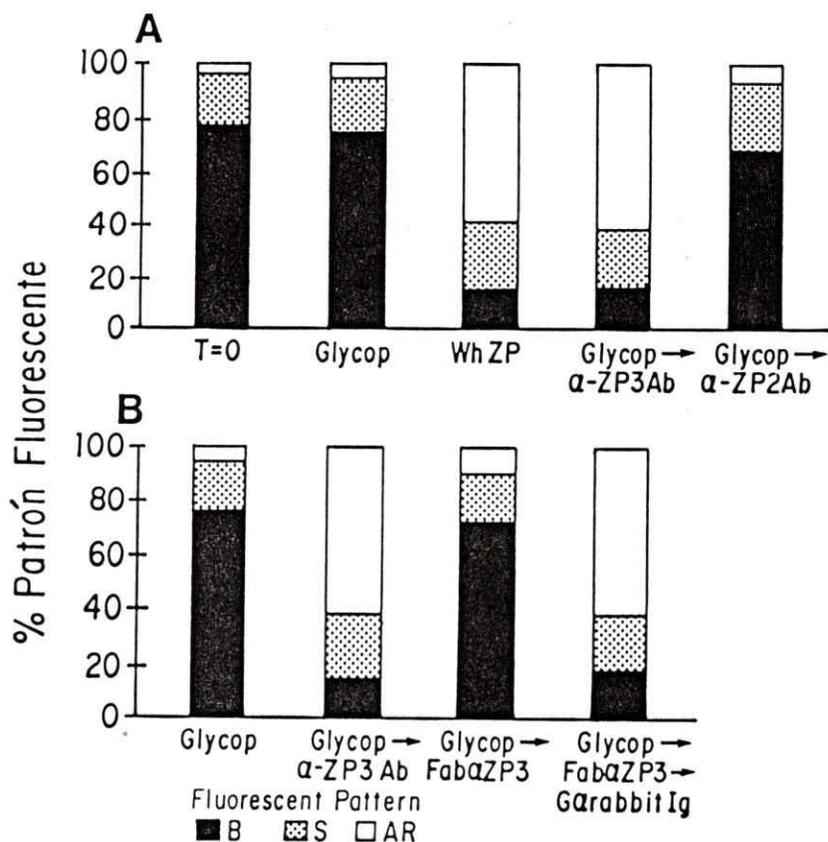


FIGURA 16 : Distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides de ratón tratados con glicopéptidos de ZP seguidos por incubación con anticuerpos anti-proteínas de ZP.

Se ensayó por el ensayo de CTC, una alícuota de muestra control correspondiente a espermatozoides capacitados. Se recuperaron también las muestras de esta preparación al completarse el experimento. Se incubaron espermatozoides capacitados con los siguientes reactivos: glicopéptidos de ZP (glicop), o ZP total (Wh ZP) cada uno a 4 ZP/ μ l; con IgG anti-ZP3 o Fab (10 μ g/ml); con IgG anti-ZP2 (2 μ g/ml); y/o IgG anti-conejo preparada en cabra (10 μ g/ml). La duración de cada incubación fue de 30 min. El orden de adición de reactivos se indica en la figura bajo cada una de las barras. El estado del acrosoma se examinó por el ensayo de CTC. (A) muestra el efecto de la incubación con glicopéptidos seguida por anticuerpos anti-ZP3 bivalentes y (B) muestra el efecto de anti-ZP3 monovalente seguido o no, por IgG anti-conejo preparada en cabra. Los datos representan el porcentaje de células observadas en cada uno de los tres patrones de fluorescencia de CTC y que se indica como % de patrón fluorescente en el eje de las abscisas.

incompleto de las moléculas que reaccionan con los anticuerpos pudiera ser la razón de la existencia de ese patrón de fluorescencia.

3.2. Inducción de la reacción acrosómica por ZP modificada por TPA y anticuerpos policlonales anti-ZP3

Se ha demostrado previamente que la incubación de espermatozoides capacitados con TPA-ZP los lleva a un estado intermedio de la RA (Endo et al., 1987a,b). Esta puede completarse si se realiza una segunda incubación con ZP total y solubilizada (Figura 17). El mismo resultado puede ser obtenido si en vez de ZP total se agrega IgG anti-ZP3 (10 µg/ml), después del pretratamiento con TPA-ZP (Figura 18). Mientras tanto, IgG anti-ZP2 (Figura 18), e IgG de suero preinmune anti-ZP3 (dato no mostrado), no promueven el mismo efecto.

4. Estudio de la presencia de un sustrato para tirosina quinasa y los receptores para la ZP3

4.1. Detección de proteínas espermáticas que se unen a la ZP

Para detectar proteínas del espermatozoide que se unen a ZP3 es necesario optimizar las condiciones de preparación de las células para recuperar membranas plasmáticas de la región acrosomal. Espermatozoides de ratón expuestos a Ca^{2+} en ausencia de condiciones capacitantes, muestran niveles mínimos de RA espontánea reteniendo, por lo tanto, la membrana plasmática de la región acrosomal (Saling and Storey, 1979; Lee and Storey, 1985). Esta preparación de espermatozoides también muestra máxima actividad de unión a la ZP, independiente del estado de capacitación (Saling et al., 1978). Estos hallazgos se emplearon en la preparación de las muestras de

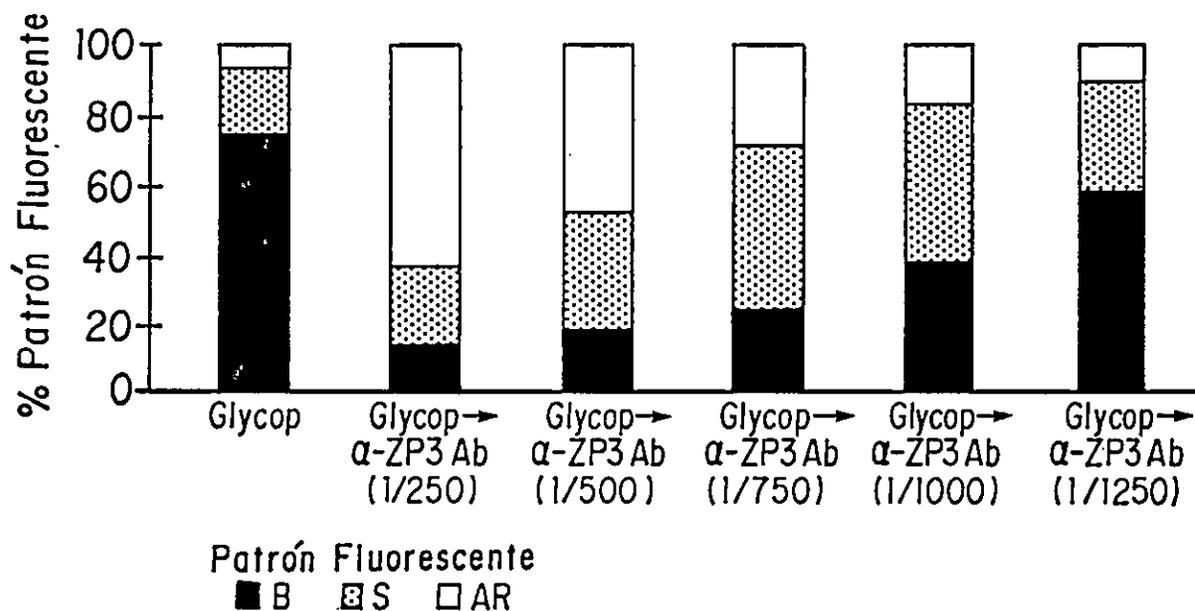


FIGURA 17 : Efecto de la concentración de IgG anti-ZP3 en la distribución de patrones fluorescentes de CTC de espermatozoides tratados con glicopéptidos.

Se incubaron espermatozoides capacitados con glicopéptidos (Glicop), a 4 ZP equivalentes/ μ l, por 30 min. Se agregaron diferentes diluciones de IgG anti-ZP3 por un período adicional de incubación de 30 min. Una dilución de 1/250 de anti-ZP3 representa una concentración de 10 μ g IgG/ml. Se evaluó el estado del acrosoma por el ensayo de CTC. Los datos representan el porcentaje de espermatozoides observado en cada uno de los tres estados fluorescentes de CTC y se señalan como % de patrón fluorescente.

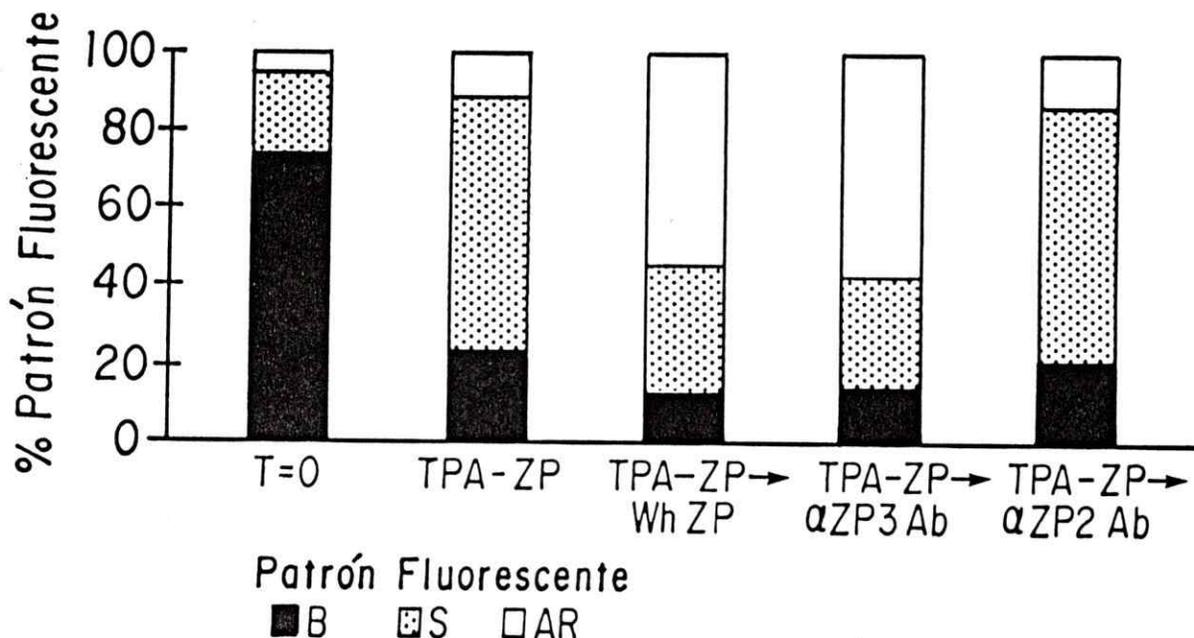


FIGURA 18 : Efecto de los anticuerpos anti-ZP en la distribución de patrones de fluorescencia de CTC de espermatozoides capacitados e incubados con TPA-ZP.

Espermatozoides capacitados se incubaron por 30 min con TPA-ZP (4 ZP/ μ l) y luego se expusieron, por un período adicional de 30 min a: i) ZP solubilizada total (4 ZP/ μ l), Wh ZP; ii) IgG anti-ZP3 (10 μ g/ml), α ZP3 Ab; iii) IgG anti-ZP2 (2 μ g/ml), α ZP2 Ab. Se determinó el estado del acrosoma utilizando el ensayo de CTC. La distribución de patrones fluorescentes no cambió substancialmente en las muestras de control durante el curso del experimento, estas muestras incluyeron espermatozoides capacitados a los cuales se agregó solamente MC (T=0), ó TPA-ZP (TPA-ZP). Los datos representan el porcentaje de células observadas en cada uno de los tres patrones fluorescentes de CTC y se indican como % de patrón fluorescente en el eje de las abscisas.

espermatozoides de ratón, con el propósito de optimizar la recuperación de las proteínas espermáticas implicadas en la unión primaria a la ZP. Las proteínas de espermatozoides de ratón preparadas incubando las células por 30 min en tampón TNC y solubilizando las proteínas en mezcla desnaturalante, se separaron electroforéticamente y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. El "Western Blot", probado directamente con ^{125}I -ZP o con ^{125}I -ZP3, mostró que ambas sondas radioactivas reaccionaban de manera similar con las proteínas del espermatozoide (Figura 19 A y C). Además, se observó que la intensidad de las bandas es dependiente de la concentración de espermatozoides con que se cargó cada carril (Figura 20). Se detectaron en forma prominente dos bandas de Mr 95 kD y 42kD y se observó una reactividad leve con componentes de bajo Mr que corren cerca del frente de solvente del gel. Con las proteínas preparadas de esta manera, ^{125}I -ZP2 no se unió a las proteínas de 95 y 42 kD ni tampoco a otras proteínas (Figura 19B).

4.2. Inmuno-detección de residuos de fosfotirosinas en proteínas espermáticas

Preparaciones de espermatozoides obtenidas como se indica en materiales y métodos (ver sección 4.1.1.) y que corresponden a espermatozoides recuperados en TN o en MC y capacitados o sin capacitar, mostraron que se encuentran presentes proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y que el nivel de fosforilación parece aumentar marcadamente después de la capacitación (Figura 21). Espermatozoides frescos no capacitados obtenidos en TN o en MC, mostraron un bajo nivel de fosforilación en residuos de tirosina en

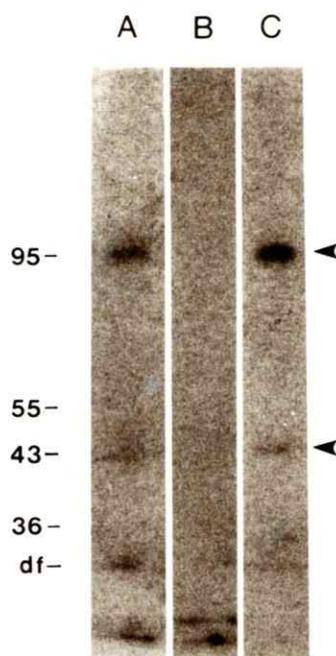


FIGURA 19 : Reactividad por "Western Blot" de las proteínas espermáticas con las de la ZP marcadas con ^{125}I .

Espermatozoides recuperados de la región caudal del epidídimo se incubaron por 30 min en tampón TN que contenía calcio y se solubilizaron en mezcla desnaturalante. Posteriormente, las proteínas espermáticas se separaron en un gel al 10%, cargando aproximadamente 3×10^6 espermatozoides/carril y luego, se transfirieron del gel a una lámina de nitrocelulosa. Después de bloquear los sitios de reactividad inespecífica de la lámina, ésta se incubó directamente con las proteínas de ZP marcadas radiactivamente. ^{125}I -ZP (carril A) y ^{125}I -ZP3 (carril C) mostraron reactividad con proteínas espermáticas de 95 y 42 kD (indicado por cabezas de flechas), mientras que ^{125}I -ZP2 no se unió a ninguna proteína de los espermatozoides obtenidos de esta forma. Estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) aparecen a la izquierda de la figura y df indica el frente del solvente.

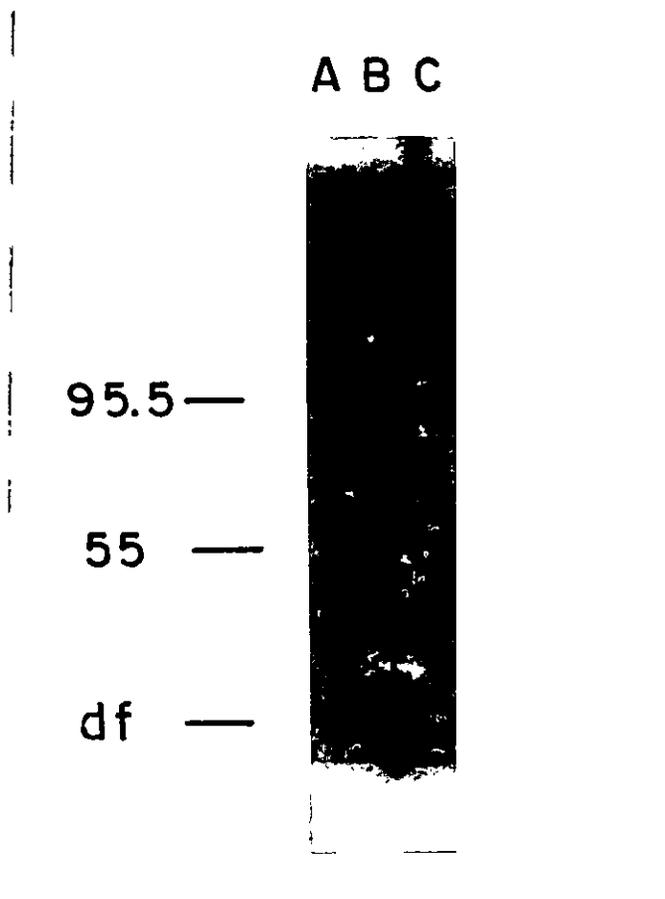


FIGURA 20 : Reactividad de ^{125}I -ZP con diferentes concentraciones de espermatozoides.

(A) se cargaron aproximadamente 3×10^6 espermatozoides; (B) 1.5×10^6 ; y (C) 0.75×10^6 . Las proteínas de los espermatozoides separadas por electroforesis y transferidas a nitrocelulosa se probaron con ZP marcada radioactivamente, como se indica en la figura 19 (véase también materiales y métodos sección 4.1.1.). A la izquierda aparecen los estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) y df indica el frente del solvente.

proteínas de 95 kD (Figura 21, carril A y B) comparados con espermatozoides que han sido capacitados por 60 min en MC (Figura 21, carril C). La comparación de la radioactividad (estimada en cuentas por minuto, datos no suministrados) encontrada en la banda de proteínas de 95 kD presente en todas las preparaciones, reveló que no existe diferencia significativa (3% de diferencia) entre las muestras de espermatozoides sin capacitar obtenidas en TN (carril A) o en MC (carril B), mientras que la muestra de espermatozoides capacitados en MC (carril C) mostró un incremento de 1.8 veces con respecto a las otras dos.

Si el mismo "immunoblot" se expone a un film de rayos X por un período de tiempo mas largo, la muestra de espermatozoides capacitados muestra 3 proteínas fosforiladas en tirosina, las cuales poseen Mr de 95, 75 y 52 kD (Figura 22, carril B). Nunca se observó que células no capacitadas mostraran las dos fosfoproteínas de mas bajo Mr, independiente de la longitud de la exposición autorradiográfica. La reactividad de las bandas mostró ser específica para fosfotirosina, ya que las mismas muestras de espermatozoides incubadas con anticuerpos anti-fosfotirosina que habían sido previamente bloqueados por incubación con o-fosfo-DL-tirosina 40 mM, no mostraron inmunoreactividad alguna (Figura 21 y 22, carril D-F).

4.3. Efecto del Ca^{2+} y del La^{3+} en la fosforilación de residuos de tirosina

Inmediatamente después que los espermatozoides son liberados de la región caudal del epidídimo ocurren dos cambios principales en ellos: uno es la habilidad para unirse a la ZP y el segundo es la

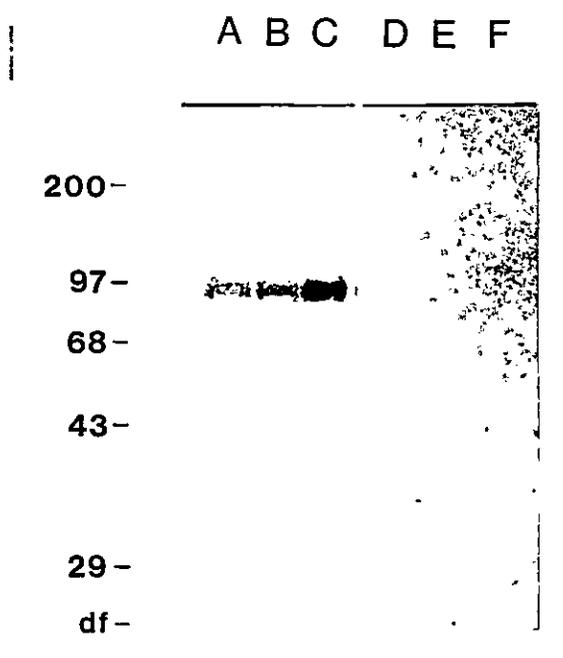


FIGURA 21 : Efecto de la capacitación en la fosforilación de proteínas espermáticas por tirosina quinasas. Espermatozoides recuperados en tampón TN (A y D), en CM (B y E) o capacitados en CM por 60 min (C y F) se solubilizaron en mezcla desnaturalante y se cargaron en un gel al 10 %. Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa. Dos tiras de nitrocelulosa que contenían muestras idénticas se incubaron con anticuerpos anti-fosfotirosina no bloqueados (A-C) y previamente bloqueados (D-F) por incubación de 1 hr con o-fosfo-DL-tirosina 40 mM. Se detectó la presencia de proteínas fosforiladas utilizando ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. El análisis autoradiográfico corresponde a una exposición corta del gel al film de rayos X para visualizar mejor la diferencia en la intensidad de las bandas. Estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) aparecen a la izquierda de la figura. Se observa una banda de M_r 95 kD que se hace mas prominentemente con la capacitación.

adquisición de la motilidad. Estos cambios están asociados con la presencia de Ca^{2+} en el medio. En el caso de la motilidad parece requerirse el transporte de Ca^{2+} desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula, ya que la adición de La^{3+} inhibe rápidamente la motilidad (Heffner et al., 1980). Mientras que, para la unión a la ZP se necesita Ca^{2+} extracelular, pero el transporte de Ca^{2+} hacia adentro de la célula no es necesario. Por esta razón el La^{3+} puede substituir completamente al Ca^{2+} para que el espermatozoide se una a la ZP (Saling et al., 1978).

Para estudiar si el incremento en la fosforilación de residuos de tirosina, que se encuentra después de la capacitación, estaba relacionado con la adquisición de motilidad y/o con la capacidad de unión a la ZP se recuperaron espermatozoides en tampón TN que contenía Ca^{2+} o La^{3+} y se incubaron a 37°C por 60 min. Se comparó la reactividad de anticuerpos anti-fosfotirosina de estas células, con la de espermatozoides completamente capacitados, incubados en MC por 60 min. Los resultados presentados en la figura 22 indicaron que espermatozoides capacitados (carril B) expresan 3 proteínas (95, 75 y 52 kD) que son reconocidas por anticuerpos anti-fosfotirosina, mientras que espermatozoides incubados con Ca^{2+} o La^{3+} sólo muestran la proteína de 95 kD (carriles A y C, respectivamente). El nivel de fosforilación en los espermatozoides incubados con La^{3+} , estimado contando la radioactividad de los trozos de nitrocelulosa que contenían las bandas de 95 kD y que habían sido cortados del "blot", no diferió de las de otras preparaciones a pesar de la carencia de motilidad de estas células.

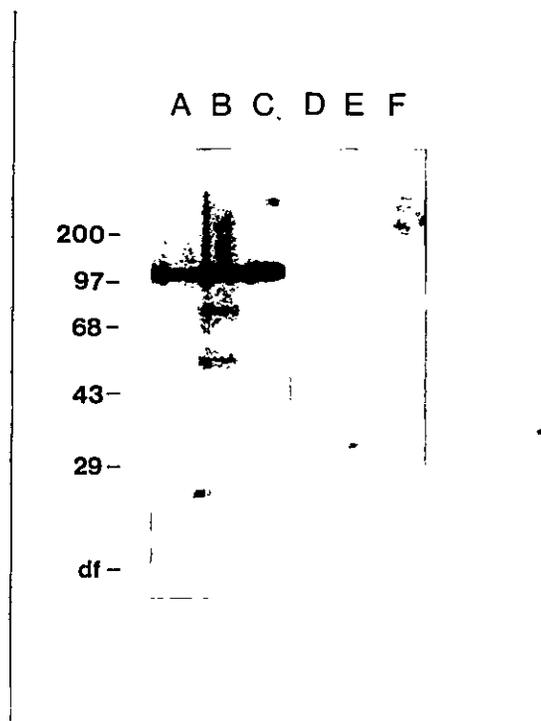


FIGURA 22 : Efecto de Ca^{2+} y La^{3+} sobre la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas.

Se trataron los espermatozoides con tampón TNC por 60 min a 37°C (carriles A y D); 60 min en DM a 37°C en incubador (carriles B y E) o con tampón TN que contenía La^{3+} $25 \mu\text{M}$ por 60 min a 37°C (carriles C y F). Luego de solubilizar las proteínas de las diferentes preparaciones de espermatozoides en mezcla desnaturalante, éstas se separaron por electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa. Tiras de nitrocelulosa que contenían muestras iguales se incubaron en paralelo con anticuerpos anti-fosfotirosina no bloqueados (A-C) y bloqueados (D-F) con *o*-fosfotirosina. La reactividad de los anticuerpos con las proteínas espermáticas se ensayó con ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. Los pesos moleculares ($\times 10^{-3}$ kD) aparecen al lado izquierdo de la figura. Dos proteínas fosforiladas de M_r 75 y 52 kD, aparte de la de 95 kD observada en los otros casos, aparecen al aumentar el período de exposición del gel al film en el carril que contiene los espermatozoides capacitados. Ni el Ca^{2+} , ni el La^{3+} en un medio isotónico simple permiten la fosforilación de estas proteínas de menor M_r .

4.4. Efecto de la ZP en la fosforilación de residuos de tirosina

En base a esclarecer si la unión del ligando (ZP3) en este sistema promueve la fosforilación de residuos de fosfotirosina, se incubó espermatozoides capacitados en ausencia o presencia de la ZP solubilizada. En presencia de la ZP se encontraron las mismas proteínas fosforiladas que se observaban en espermatozoides que habían sido capacitados en ausencia de la ZP, pero la reactividad de los anticuerpos anti-fosfotirosina con la proteína de 95 kD se vió aumentada cuando la ZP estaba presente en la incubación (Figura 23). Esto sugiere un aumento en la cantidad de residuos anti-fosfotirosina. La comparación de las cuentas encontradas en las bandas de la proteína de 95 kD reveló que en presencia de la ZP se produce un aumento de la fosforilación de 1.9 veces, con respecto a lo que se encuentra en espermatozoides capacitados e incubados en ausencia de la ZP (Figura 23, carriles C y D).

Para apreciar mejor las diferencias en los niveles de fosfotirosina observados entre las muestras, la autorradiografía se realizó exponiendo el film de rayos X brevemente (Figura 23). Exposiciones mas largas del mismo "immunoblot" mostraron las mismas tres proteínas características de preparaciones de espermatozoides capacitados (Mr 95, 75 y 52 kD).

4.5. Efecto del mAc M42 en la fosforilación de residuos de tirosina

Se examinó también la fosforilación en residuos de tirosina en espermatozoides incubados con el mAc M42. Como se indica en la figura 24, tanto los espermatozoides capacitados en ausencia del

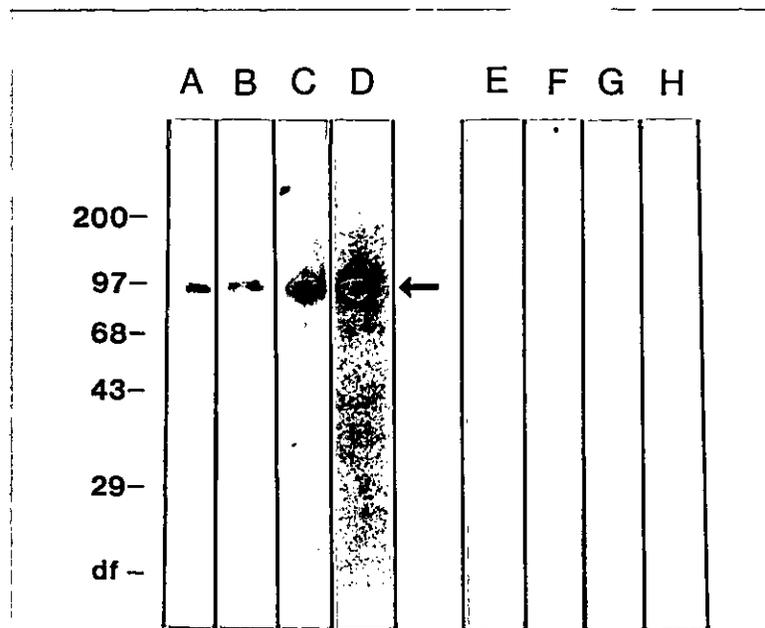


FIGURA 23 : Efecto de ZP en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas. Espermatozoides obtenidos en tampón TN (A y E), en CM (B y F), capacitados por 60 min en MC (C y G), o bien capacitados por 60 min con adición de ZP a los 30 min de incubación (D y H), se solubilizaron en mezcla desnaturalante, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una lámina de nitrocelulosa. Cada muestra se corrió en duplicado. Los carriles A-D, muestran la reacción de las proteínas con anticuerpos anti-fosfotirosina sin bloquear. Los carriles E-H, que representan los duplicados de los carriles A-D, muestran la reactividad no específica de los anticuerpos anti-fosfotirosina (se utilizó pAbs anti-fosfotirosina bloqueados previamente con o-fosfotirosina). Se siguió la reactividad de los anticuerpos con la sonda radiactiva ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. El gel se expuso al film de rayos X sólo brevemente para visualizar las diferencias en la intensidad de las bandas. Se observa que la fosforilación de la banda de 95 kD se hace mas prominente con la capacitación y mas aún con la incubación con ZP. Pesos moleculares estándares ($\times 10^{-3}$ kD) aparecen a la izquierda de la figura.

anticuerpo (carril b), como aquellos capacitados en su presencia (carril c), mostraron las mismas tres proteínas fosforiladas en tirosina. Sin embargo, la intensidad de la señal obtenida fué menor para las 3 bandas en aquellos espermatozoides tratados con el anticuerpo. Contando directamente la radioactividad de las 3 proteínas reactivas que aparecen en los carriles b y c de la figura 24, se encontró que la intensidad de la señal disminuye dos veces como consecuencia del tratamiento con el mAc M42 (datos no suministrados).

4.6. Relación entre la proteína de 95 kD que se une a la ZP y la que sirve de sustrato para la tirosina quinasa

Con el propósito de estudiar la relación existente entre las proteínas de 95 kD, que habían sido identificadas anteriormente utilizando sondas radioactivas (proteínas de la ZP marcadas) e inmunológicas (pAcs anti-fosfotirosina), se utilizó un ensayo de "Dot Blot". La pregunta que se quería responder era si ambas sondas reconocían a la misma o a diferentes proteínas. El ensayo consistió en utilizar a las proteínas de la ZP, específicamente ZP3, como elemento de captura para retener a la proteína de 95 kD que se une a la ZP. Posteriormente, se estudiaba si esta proteína retenida se encontraba fosforilada en tirosinas, utilizando para ello mAcs de ratón dirigidos contra fosfotirosina, los cuales se revelaron empleando un segundo anticuerpo preparado en conejo y dirigido contra Igs de ratón, y un tercero dirigido contra Igs de conejo que poseía una marca radioactiva.

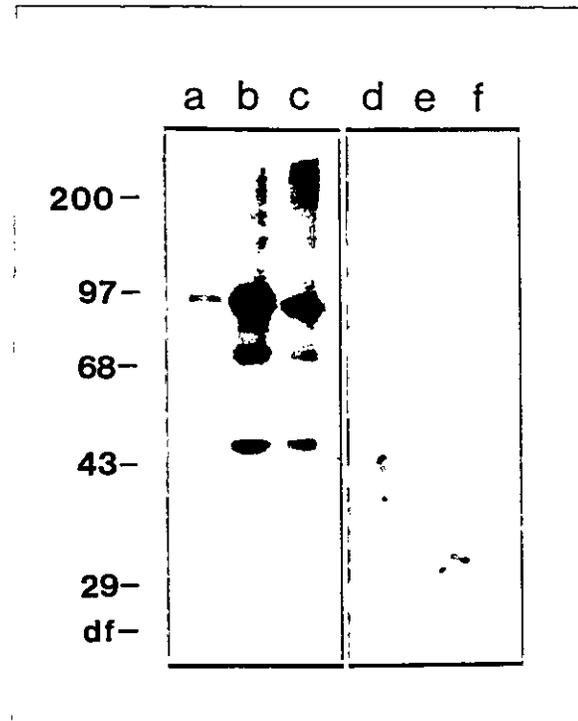


FIGURA 24 : Efecto del mAc M42 en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas espermáticas.

Espermatozoides obtenidos en tampón TN (a y d), espermatozoides capacitados por 60 min en CM (b y e) y espermatozoides capacitados en CM en presencia del anticuerpo M42 (200 µg/ml) (c y f), se solubilizaron en mezcla desnaturalante y sus proteínas se separaron por electroforesis en gel al 10% para transferirlas a nitrocelulosa. La nitrocelulosa se incubó con anticuerpos anti-fosfotirosina no bloqueados (a-c) y bloqueados (d-f) con o-fosfotirosina y la reactividad se siguió con ^{125}I -IgG anti-conejo preparada en cabra. Estándares de peso molecular ($\times 10^{-3}$ kD) aparecen señalados a la izquierda de la figura. Se observa que las proteínas de los espermatozoides capacitados en presencia del anticuerpo (c) presentan bandas mas tenues de fosforilación comparadas con aquellas de espermatozoides capacitados en su ausencia (b).

Los resultados de este experimento aparecen en la Tabla 2. Al comparar los resultados obtenidos en ausencia (columna D) y en presencia de la ZP (columnas E y F) se observa que la reactividad del anticuerpo anti-fosfotirosina aumentó 8 veces al activar la nitrocelulosa con 50 ZP (columna E), y 20 veces al hacerlo con 100 ZP (columna F). Se incluyeron en este experimento una serie de controles como: omisión de la incubación con anticuerpo anti-fosfotirosina (columna B), omisión de la incubación con proteínas del espermatozoide (columna C), utilización de un anticuerpo anti-fosfotirosina que ha sido previamente bloqueado por incubación con fosfotirosina (columna G).

La evidencia que se presenta hasta ahora no es suficiente para señalar si se trata de una o más proteínas de 95 kD, sin embargo, se sugiere que las proteínas de un M_r aproximado de 95 kD, que interactúan con la ZP de una manera dependiente de la concentración de la ZP, también reaccionan con anticuerpos anti-fosfotirosina.

4.7. Localización por inmunofluorescencia de los residuos de fosfotirosina en espermatozoides intactos

Se usó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para localizar los anticuerpos anti-fosfotirosina en espermatozoides fijados. Los anticuerpos reaccionaron con la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide (Figura 25) observándose una fluorescencia de apariencia punteada. Se observó también una fluorescencia débil en la pieza media, que según indican experimentos controles se debe a reacción inespecífica del segundo anticuerpo (Figura 25F). En preparaciones de espermatozoides fijados previo a la capacitación,

TABLA 1

Reactividad de los anticuerpos anti-fosfotirosina con proteínas espermáticas de 95 kD que se unen a ZP

	A	B	C	D	E	F	G
<u>Tratamiento</u>							
ZP/pocillo	0	0	50	0	50	100	50
proteína de 95 kD	#	+	-	+	+	+	+
mAc anti-F.tir.	-	-	+	+	+	+	**
<u>Radioactividad unida</u>							
cpm específicas	0	0	0	23	184	452	0

Una lámina de nitrocelulosa montada en un aparato de microtitulación Bio-Rad se activó aplicando a los pocillos solución de glicoproteínas de ZP en tampón TNC, según se indica. Después de bloquear los sitios remanentes, se agregó a cada pocillo una alícuota de la preparación de proteínas de 95 kD del espermatozoide, como se indica en la tabla. Luego de realizar varios lavados se agregó un mAc anti-fosfotirosina (PY12, 2 µg/ml, Glenney et al., 1988) en los pocillos que se señalan en la tabla. Posteriormente, la nitrocelulosa se incubó con una IgG anti-Igs de ratón preparada en conejo y luego se detectó la reactividad con ¹²⁵I-IgG anti-Igs de conejo preparada en cabra.

Se determinó la radioactividad unida contando cada pocillo de reacción, directamente en un contador gamma. Las cuentas específicas se definieron como las cpm mayores que aquellas que se encontraron en el pocillo que aparece en la columna G, en donde se usó mAc anti-fosfotirosina bloqueado con fosfotirosina (el número real de cpm en este caso fue de 85).

#: - indica adición sólo de tampón irrelevante; + indica adición del reactivo que se especifica.

*: se utilizó mAc anti-fosfotirosina previamente bloqueado con fosfotirosina.

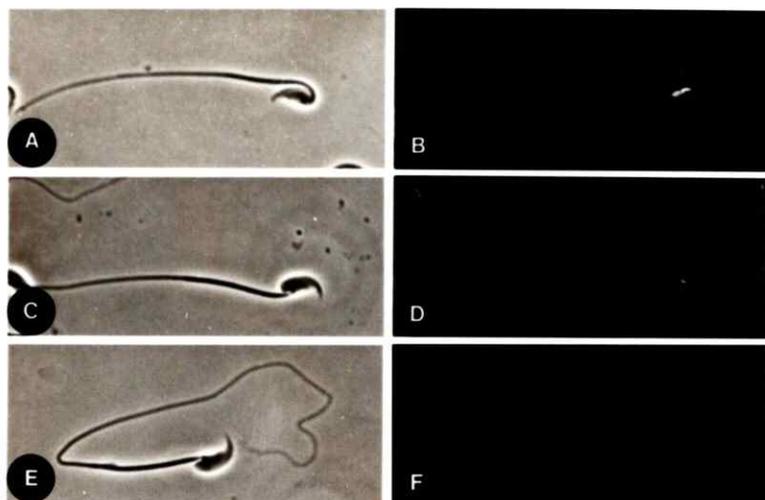


FIGURA 25 : Localización inmunofluorescente de los residuos de fosfotirosina.

Micrografías de contraste de fases (A, C y E) y de epifluorescencia (B, D y F) de espermatozoides de ratón incubados con anticuerpos anti-fosfotirosina. La reactividad de los anticuerpos seguida con un anticuerpo anti-conejo conjugado con FITC, aparece como una fluorescencia punteada en la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide (panel B y D). La fluorescencia débil de la pieza media puede ser atribuida a reacción inespecífica, ya que cuando se usan anticuerpos anti-fosfotirosina bloqueados con fosfotirosina aparece sólo este tipo de fluorescencia y no la de la cabeza (panel F).

muy pocas células (5%) mostraron fluorescencia acrosomal. La capacitación de los espermatozoides aumentó la proporción de células marcadas a aproximadamente 15% y después de la exposición a la ZP solubilizada, aproximadamente 35% de los espermatozoides mostró fluorescencia del acrosoma.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por "immuno-blots" en donde se observa que los niveles de fosfotirosina aumentan con la capacitación y con la incubación con la ZP. Estos podrían estar indicando que lo observado en los blots, se debe a un aumento del número de espermatozoides que muestran fosforilación, mas que a un mayor número de residuos fosforilados por espermatozoide.

DISCUSION

En esta tesis se utilizó diferentes metodologías con el propósito de explorar en mas detalle lo que ocurre cuando se produce la interacción de gametos de ratón. En especial se estudió cómo la ZP induce la RA al unirse a receptores existentes en el espermatozoide.

La actividad inductora de la RA, que posee la ZP de ratón, ha sido esencialmente atribuida a su componente ZP3 (Florman et al., 1984). Dado que dicha actividad es inhibida por mAc M42 (Saling, 1986), se estudió si la inhibición de la inducción de la RA, podía también atribuirse a una acción directa o indirecta de estos anticuerpos sobre la molécula ZP3 y no sobre los otros componentes de la ZP. Los resultados obtenidos indicaron que el mAc M42 inhibe la RA inducida por la ZP3 de la misma manera que inhibe aquella inducida por la ZP total. Además, sugirieron que el mAc M42 actúa probablemente en una fase temprana de la cascada de reacciones que tienen lugar durante este proceso, ya que, una vez que la RA ha sido iniciada, el anticuerpo no impide que la ZP induzca la culminación de la RA.

Los cambios producidos a consecuencia de la RA, pueden ser visualizados mediante el ensayo de fluorescencia con CTC (Saling and Storey, 1979; Ward and Storey, 1984). De esta forma se han identificado tres patrones fluorescentes que se suceden temporalmente una vez iniciada la respuesta celular. El patrón "S" de este ensayo

coincide, en el tiempo, con el aumento de Ca^{2+} intracelular y la consecuente pérdida del gradiente de protones (Lee and Storey, 1985, 1988). Para explicar cómo se produce este patrón de fluorescencia, se ha sugerido que previo a la fusión de las membranas ocurre un reordenamiento de las proteínas en la membrana plasmática (Lee and Storey, 1985). Así, el mAc M42 podría bloquear tal reordenamiento impidiendo la formación de un complejo molecular, necesario para gatillar el evento exocitótico de la RA. De esta manera, también se explica que, una vez iniciado el reordenamiento, el anticuerpo no impida el desarrollo normal de la RA en presencia de la ZP. Por otra parte, es probable que el efecto del mAc M42 se relacione con el aumento de Ca^{2+} intracelular, ya que cuando se induce dicho aumento por vías no fisiológicas (espermatozoides tratados con A23187; Saling, 1986), el mAc M42 no tiene efecto. Por lo tanto, tal incremento en la concentración de calcio podría estar relacionado con el reordenamiento de proteínas a nivel de la membrana que se ha propuesto. Al respecto, una proteína de 210 kD que está presente en el acrosoma de espermatozoides de erizo de mar parece regular el flujo de Ca^{2+} durante la RA fisiológica (Trimmer et al., 1985, 1986). Sin embargo, la relación que pueda existir entre la acción del mAc M42 y el cambio en los niveles de Ca^{2+} intracelulares, es un tema para investigaciones futuras.

Se ha demostrado que en algunos sistemas las respuestas celulares mediadas por receptores pueden ser gatilladas por agregación de estos últimos (Detmers et al., 1987; Ikari et al., 1988). En esta tesis se ensayó la hipótesis que la exocitosis acrosomal podría iniciarse,

también, como resultado de la agregación de receptores inducida por la ZP3. Los resultados de este estudio son consistentes con tal hipótesis.

Anteriormente, se había sugerido que la interacción de la ZP3 con los espermatozoides inducía un cambio conformacional a nivel del receptor espermático que gatillaba la RA (Wassarman et al., 1985a). Según los resultados aquí presentados, la interacción de las proteínas espermáticas con su ligando no es suficiente para inducir una respuesta celular, a menos que se produzca un evento de entrecruzamiento de tales proteínas. Se sugiere entonces, que la agregación de las proteínas del espermatozoide reconocidas por la ZP3 tiene alguna función en la inducción de la RA. Si esto es así, se podría predecir que anticuerpos polivalentes dirigidos directamente contra las moléculas del espermatozoide que unen a la ZP3 debieran ser capaces de promover la RA en ausencia de la ZP. De acuerdo con lo planteado es pertinente señalar que un mAc que reacciona con diversas proteínas de la membrana de espermatozoides de erizo de mar induce en éstos, la RA (Trimmer et al., 1987).

Se ha demostrado recientemente, que espermatozoides capacitados sometidos a tratamiento con TPA-ZP quedan con sus acrosomas en un estado intermedio de la RA (Endo et al., 1987a,b). En esta tesis se muestra que la RA puede ser completada si los espermatozoides, así tratados, se incuban posteriormente con la ZP total solubilizada o con pAcs anti-ZP3 (Figura 18). Es posible, que la multivalencia de la molécula de ZP3 se modifique por el tratamiento con el TPA, de manera que, aunque sigue siendo capaz de actuar como ligando, la

agregación de las proteínas que reconoce ocurra sólo a un nivel subumbral. Los resultados obtenidos con TPA-ZP son similares a aquellos observados al utilizar diferentes concentraciones de pAcs anti-ZP3, ya que en este caso, cuando se disminuyó la concentración de anticuerpos, una gran proporción de espermatozoides permanecieron en patrón "S" y no completaron la RA (Figura 17). Entonces, tanto en espermatozoides tratados con TPA-ZP como en aquellos tratados con las diluciones 1/750 y 1/1000 de los pAcs anti-ZP3, se podría sugerir que se está produciendo una agregación incompleta de las proteínas espermáticas y que por lo tanto los espermatozoides pueden iniciar la RA, pero no completarla. Sería interesante determinar si en ambos casos están realmente operando mecanismos similares.

Llama la atención, que en la mayoría de las condiciones en que se incubaron los espermatozoides, se encontró un porcentaje similar de células en estado intermedio de la RA. Una explicación que podría dar cuenta de esto es que, en todas las poblaciones de espermatozoides existe un número de ellos que no completan su maduración y, por lo tanto, podrían carecer de parte de la maquinaria requerida para experimentar la RA. De esta forma, si algún evento de agregación se desencadena a nivel de su membrana plasmática, ya sea de manera espontánea o inducida por un estímulo, la RA podría iniciarse pero no llegar a término. Otra explicación posible, puede estar relacionada con la presencia de espermatozoides inmóviles y/o no viables de cada población, ya que aunque se sabe que los espermatozoides muertos experimentan una RA "falsa" (Yanagimachi, 1988), se desconoce el estado acrosomal que poseen los espermatozoides inmóviles. Para

experimentos futuros se considerará importante la cuantificación de los parámetros de motilidad y viabilidad, que no se incluyó en esta tesis.

Dada la heterogeneidad inevitable de las preparaciones de espermatozoides es imposible tener un 100% de las células en una fase determinada de la RA. Por esta razón, se dice que los espermatozoides experimentan la RA o no, dependiendo de las características que presente la mayoría de ellos en una determinada población.

Alguna similitud existe entre éste con otros sistemas (por ejemplo, células con receptores para insulina o EGF), con respecto al gatillamiento de una respuesta celular mediado por un evento de agregación. Considerando lo anterior se investigó si la exocitosis acrosomal involucra la activación de una proteína tirosina quinasa (PTK), enzima que se sabe es parte intrínseca de los receptores mencionados (Carpenter, 1987; Yarden and Ullrich, 1988). Los resultados de estos estudios muestran que los espermatozoides contienen proteínas fosforiladas en tirosina que migran en la región de 95 kD, y que su fosforilación aumenta con la capacitación y el tratamiento posterior con la ZP.

Dado que, la capacitación involucra un aumento en la permeabilidad y fluidez de la membrana (Bedford, 1983), es probable que favorezca también la extractabilidad de las proteínas de membrana por acción de detergentes (SDS). En este caso, el aumento aparente de la fosforilación sería una consecuencia de lo señalado y no de una activación real de la PTK. Sin embargo, los resultados obtenidos con ensayos de inmunofluorescencia usando pAbs anti-fosfotirosina, en

donde los espermatozoides han sido fijados y no sometidos a procedimientos de extracción, también indican que la capacitación y el tratamiento con la ZP, tienen un efecto positivo sobre las fosforilaciones, haciendo menos probable que los resultados se deban a diferencias de extractabilidad de las proteínas.

Por otra parte, sólo en espermatozoides capacitados, se encontraron otras dos proteínas fosforiladas en tirosina con M_r de 75 y 52 kD, las cuales podrían representar productos de degradación de la proteína de 95 kD, o bien, sustratos endógenos de la PTK. Se sabe que en el caso del receptor para insulina, éste posee una K_m baja para autofosforilarse si se compara con la que posee para fosforilar otros sustratos (Hunter and Cooper, 1985). Si la proteína de 95 kD tuviese actividad de PTK capaz de autofosforilarse, se podría explicar que siempre exista un nivel basal de fosforilación en esta proteína y se podría también especular, que la PTK se activa con la capacitación, siendo capaz sólo entonces, de fosforilar otros sustratos endógenos como las proteínas de 75 y 52 kD.

De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, es interesante señalar que en espermatozoides de erizo de mar se han identificado tres proteínas fosforiladas con M_r de 100, 75 y 52 kD, cuyos niveles de fosforilación aumentan notablemente cuando los espermatozoides son incubados en presencia de péptidos obtenidos de huevo de la misma especie. Sin embargo, no se sabe qué amino ácidos son los que se fosforilan (Bentley et al., 1987).

Por otro lado, como aún no se ha aclarado la naturaleza del receptor del espermatozoide para ZP3 (revisado en, Saling, 1989), se

intentó abordar este problema utilizando para ello la técnica de "Western Blot". Se observó que, dos proteínas del espermatozoide con M_r de 95 y 42 kD se unen a ZP3. Otros investigadores, utilizando técnicas similares, han informado que proteínas del espermatozoide con M_r diferentes a los que aquí se presentan, también se unen a la ZP. Así, O'Rand y col. (1985) encontraron que la ZP total de ratón reconocía proteínas de bajo M_r (14-18 kD) en el espermatozoide y Jones y col. (1988) informaron que en el cerdo, cuando se empleaba extracto ácido de espermatozoides, la ZP reconocía un componente de 53 kD. Las diferencias en los resultados obtenidos se pueden atribuir a la forma en que se preparan los espermatozoides o la ZP como sonda radioactiva. En el desarrollo de esta tesis se encontró que ocasionalmente, durante el procedimiento de marcación de las proteínas de la ZP, se destruía completamente su reactividad y que cuando esto ocurría no se observaba banda alguna en los "blots", aún después de exponerlos por largos períodos a films de rayos X. Por otro lado, para realizar estos experimentos, se puso un cuidado especial en la preparación de los espermatozoides, con el propósito de preservar la membrana plasmática de la región acrosomal, ya que en esta región están presumiblemente localizados los receptores primarios para la ZP (Bleil and Wassarman, 1986). En los experimentos de O'Rand y col. (1985), se recuperó los espermatozoides en un medio isotónico simple y nunca se los expuso a un medio con calcio, el cual se sabe es necesario para que los espermatozoides puedan unirse a la ZP (Saling, 1982).

Los resultados aquí presentados, indican que la ZP2 no presenta reactividad con las proteínas del espermatozoide obtenidas tratando de preservar su membrana plasmática (Figura 19). Se ha sugerido, recientemente, que la ZP2 podría unirse a un receptor secundario del espermatozoide, que se expone después de la RA (Bleil and Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988). De esta forma, si se prepara un extracto ácido de espermatozoides, con el propósito de preservar las proteínas que se encuentran en la matriz acrosomal o la membrana acrosomal interna (Leyton et al., 1986), la ZP2 podría unirse a proteínas espermáticas en "Western Blot" y posiblemente, a proteínas distintas de las que une ZP3. Los resultados de Jones y col. (1988) podrían entonces estar mostrando, la interacción de la ZP2 con moléculas del espermatozoide que actúan como receptor secundario.

Es importante destacar, que aún cuando se puede encontrar explicaciones que den cuenta de las diferencias de los resultados, éste es el primer trabajo en el cual se ha utilizado proteínas purificadas de la ZP como sondas radiactivas.

Con los resultados presentados en esta tesis, se podría sugerir que, la proteína de 95 kD que se une a ZP3, sirve también de sustrato para una PTK. Aunque no se ha demostrado directamente que esta proteína sea la misma, existen dos líneas de evidencia que argumentan en favor de esta idea. Primero, utilizando ensayos de inmunofluorescencia indirecta se observó que, los anticuerpos anti-fosfotirosina se localizan en la región acrosomal de los espermatozoides, y según ha sido demostrado por Bleil y Wassarman (1986), los receptores del espermatozoide de ratón para la ZP3, también se ubican en la

misma región. Segundo, se demostró que las proteínas espermáticas con M_r de 95 kD que se unen a ZP solubilizada e inmovilizada sobre lámina de nitrocelulosa, también reaccionan con los anticuerpos anti-fosfotirosina. Además, se encontró que dicha reacción ocurría de una manera dependiente de la cantidad de ZP inmovilizada (Tabla 1). Es posible, que una o más proteínas de 95 kD estén presentes en la solución de proteínas espermáticas utilizada y que proteínas diferentes, que se encuentran asociadas entre sí, den cuenta de la unión a ZP y de la reactividad con los pAbs. Sin embargo, dado que en otras células existen receptores que son intrínsecamente proteína tirosina quinasas capaces de autofosforilarse, como es el caso de los receptores para insulina o para EGF (Cohen et al., 1982; Rosen et al., 1983; Petruzelli et al., 1984), es tentador sugerir que la habilidad de unir a ZP y la de servir de sustrato para una tirosina quinasa, radica en una sola proteína de 95 kD. Será interesante estudiar si se trata realmente de una misma proteína y si además posee actividad intrínseca de PTK.

Recientemente, Saling (1989) realizó una revisión extensa sobre las interacciones entre los espermatozoides y las matrices extracelulares del huevo. Basada en la información existente sobre este tema y en datos obtenidos durante este trabajo de tesis, propuso un modelo para la RA que se describe brevemente a continuación. El evento excitotónico de la RA se gatilla por la agregación de subunidades que conforman un complejo multimérico en la membrana plasmática que está sobre el acrosoma. Algunas o todas las subunidades del complejo poseen sitios de unión específicos para los oligosacáridos ligados a

O en la ZP3. En los espermatozoides no capacitados la ZP3 puede unirse a las subunidades pero no inducir su agregación. Esto podría deberse a que, previo a la capacitación, las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide no poseen la habilidad de formar microdominios. En espermatozoides capacitados, el ensamblaje de las subunidades se completa formando un receptor, el cual será capaz de transducir señales. A este receptor se le denominó FTU, y su naturaleza multimérica podría dar cuenta de la variedad de agentes químicos, aparentemente no relacionados entre sí, que se sabe inhiben la interacción espermatozoide-ZP (Saling, 1989). Por otra parte, el modelo de Saling para la RA permite explicar también, por qué se producen RA espontáneas, ya que, como consecuencia del aumento de la fluidez de la bicapa después de la capacitación, se favorecería la interacción de las subunidades que forman la FTU. El modelo predice que la RA no es dependiente de la ZP3, pero que ésta actuaría acelerando la RA por entrecruzamiento de las subunidades de la FTU, favoreciendo así la formación de receptores.

Se introduce así un concepto nuevo, que es la formación de un receptor por agregación de sus subunidades mediada por el ligando. Siendo los espermatozoides células en estado de diferenciación terminal, no parece extraño que puedan poseer un sistema único de recepción del estímulo. El hecho que varias subunidades forman un receptor, tiene la ventaja de poner una barrera mas en la selección del espermatozoide que es funcionalmente apto para la fecundación.

Los resultados presentados en esta tesis permiten incorporar otros elementos al modelo de Saling. En breve, la ZP3 se uniría a una

proteína de 95 kD, la cual sería una de las subunidades de la FTU, así como a otras proteínas, probablemente una de 42 kD. Se induciría, entonces, la agregación de las subunidades ensamblándose los receptores, los cuales provocarían la activación de una proteína quinasa específica para tirosina. Los niveles de fosforilación se verían aumentados y esto se manifestaría como una señal que gatilla la exocitosis acrosomal.

Un gran número de receptores celulares ejercen su acción acoplando el receptor al sistema efector mediante proteínas G (Gilman, 1987; Naer and Clapham, 1988). El acoplamiento vía proteínas G puede llevar a la producción de al menos dos tipos diferentes de mensajeros intracelulares: cAMP generado vía la activación de la adenilato ciclasa e inositol fosfatos (IP_3 e IP_2) producidos por la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). Existe evidencia indirecta de la participación de los inositol fosfatos en la RA (Lee and Storey, 1987; Roldan and Harrison, 1988a,b), en cambio, cAMP parece no tener efecto (Tezon et al., 1989). Además, no se ha encontrado en los espermatozoides la proteína G estimuladora de la adenilato ciclasa (G_s ; Kopf et al., 1986).

Especulando aún mas y considerando aquellos elementos presentes en los espermatozoides de mamíferos, se propone un modelo para la RA el que se detalla a continuación.

PROPOSICION DE UN MODELO PARA LA REACCION ACROSOMICA

La exocitosis acrosomal, consta de dos fases: a) fase de transición de "E" a "S" y b) fase de transición de "S" a "AR", ambas

aparecen esquematizadas en la Figura 26 (el tamaño de la molécula de ZP3 ha sido exagerado para una mejor ilustración del modelo).

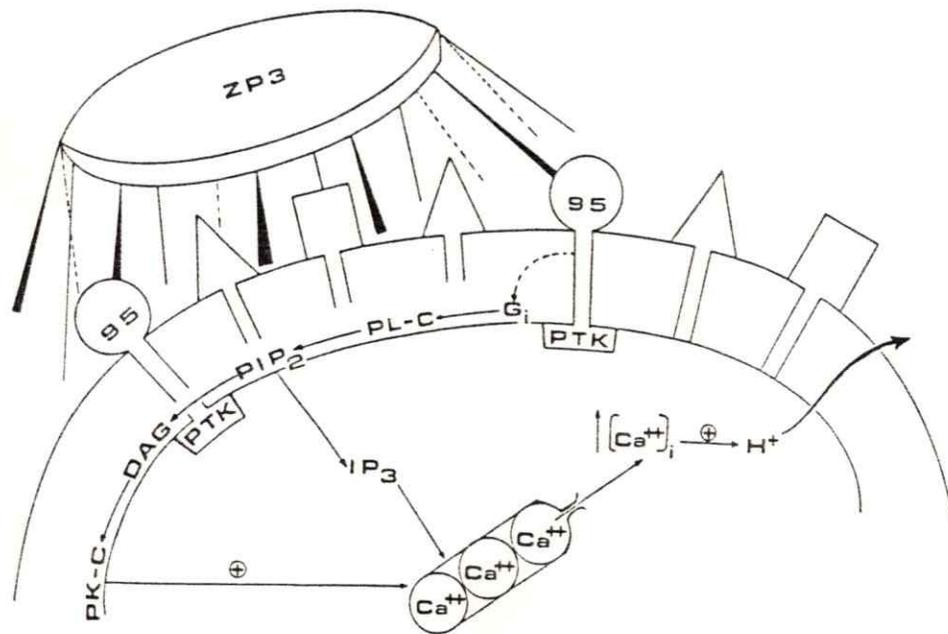
En la primera fase (Figura 26A), la unión del ligando (ZP3) a las subunidades del receptor activa la fosfolipasa-C (PL-C) a través de una proteína que une GTP (G_i). La activación de la PL-C induce la degradación de PIP_2 en DAG e IP_3 . El IP_3 activa la liberación de Ca^{2+} en el citoplasma. Este Ca^{2+} correspondería al almacenado en vesículas que se ubican sobre la membrana acrosomal externa (Friend, 1977). El DAG activa a una de las isoenzimas de la PK-C, probablemente una que se activa en forma independiente de Ca^{2+} (Burack et al., 1988). La activación de esta enzima podría estimular también la liberación de Ca^{2+} ya sea, activando la ATPasa que transporta Ca^{2+} o bien la proteína de intercambio Na^+/Ca^{2+} (Nishizuka, 1986). Se produce entonces, un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y como consecuencia se pierde el gradiente de H^+ por salida de los mismos hacia el espacio extracelular.

Luego, los espermatozoides en patrón "S" son aquellos que han experimentado los cambios descritos en la primera fase, y que poseen diferentes grados de agregación de subunidades. Una vez que se completa la formación de la FTU (o receptor) comienza la transición de "S" a "AR" lo que constituye la segunda fase del proceso (Figura 26B). En esta fase, cada FTU que se forme estimulará la activación de las PTK por autofosforilación de las enzimas. La PTK activada puede fosforilar, además, diversos sustratos como por ejemplo G_i' . Como consecuencia de la fosforilación, la G_i' se activa y se cree que de alguna manera participa en la activación de la PL-C'. La

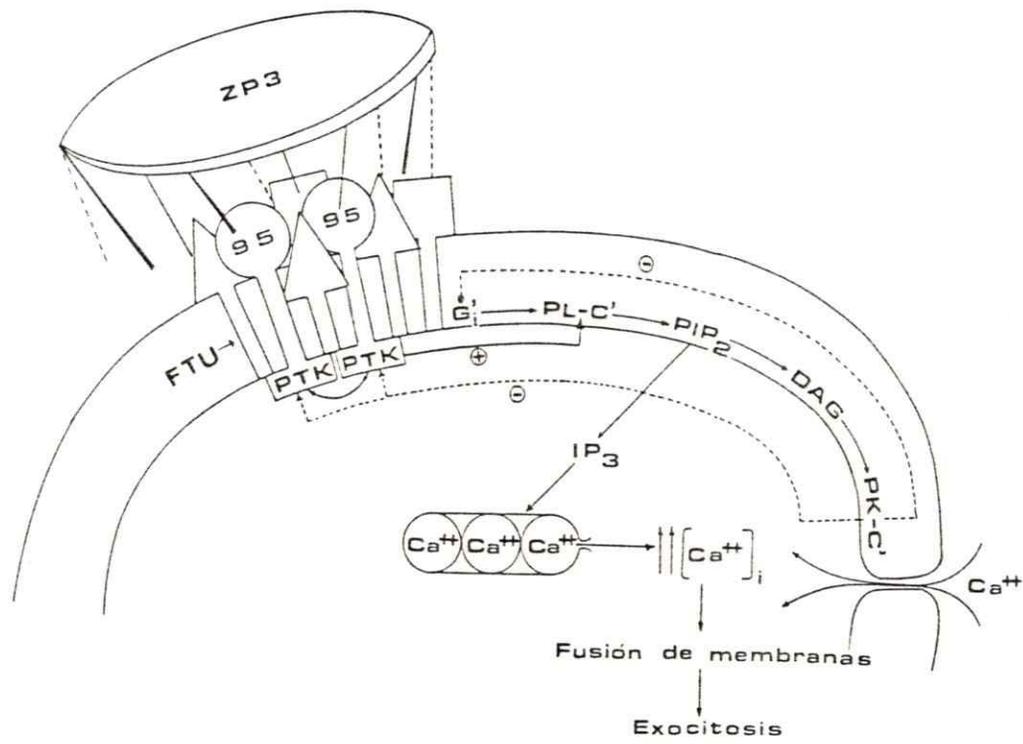
FIGURA 26 : Un modelo para la reacción acrosómica

La RA aparece dividida en dos fases. En la primera fase (A) la unión de ZP3 a las subunidades del receptor espermático activa la fosfolipasa C (PL-C) a través de una proteína que une GTP (G_1). La PL-C activada degrada fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) a 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). IP_3 estimula la liberación de Ca^{2+} al citosol. DAG activa a una de las isoenzimas de la proteína quinasa C (PK-C) que actuaría también estimulando la liberación de Ca^{2+} . Se produce un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y como consecuencia hay salida de protones al espacio extracelular. La agregación de las proteínas producida por la ZP3 forma la unidad funcional capaz de transducir señales a través de las membranas (FTU). Una vez que se completa la formación de la FTU comienza la segunda fase del proceso (B). Cada FTU formada estimula la activación de tirosina quinasas (PTK) por autofosforilación. La PTK activada fosforila a G_1' , lo cual permite la activación de PL-C'. Esta última degrada PIP_2 a DAG e IP_3 . DAG activa a otra isoenzima de PK-C (PK-C') que regula negativamente el proceso inhibiendo G_1' o PTK. Finalmente, IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} intracelular y también la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes del receptor. La alta concentración de Ca^{2+} intracelular alcanzada induce la fusión de las membranas y la exocitosis acrosomal.

A. Transición de 'B' a 'S'



B. Transición de 'S' a 'AR'



actividad de la PL-C' podría ser mas prolongada en esta fase dada la presencia incrementada de Ca^{2+} intracelular (Wahl et al., 1987), degradando mayor cantidad de PIP_2 en IP_3 y DAG. El DAG activa una PK-C que en esta fase, por existir un nivel ya aumentado de Ca^{2+} intracelular puede corresponder a una de las isoenzimas que se activa de manera dependiente de Ca^{2+} y que se ha denominado en este modelo PK-C'. En este caso la PK-C' actúa como regulador negativo de la respuesta celular. Dada la existencia de diferentes isoenzimas que se activan bajo diversas condiciones, las PK-C pueden constituir un mecanismo de regulación positivo o negativo de la respuesta celular (Wahl and Carpenter, 1988; Nishizuka, 1988). Así, en la primera fase de la RA (Figura 26A) PK-C actúa como regulador positivo de la respuesta estimulando la liberación de Ca^{2+} , mientras que en la segunda fase lo hace en forma negativa. Las vías por las cuales actúa la PK-C' para ejercer la regulación negativa son dos: por fosforilación de residuos de serina de la PTK, lo cual se sabe disminuye la actividad de la enzima (Takayama et al., 1984; Bollag et al., 1986) y por una acción sobre las proteínas G, lo que desacoplaría al receptor de la activación de la PL-C' mediante la proteína G_1' (Llano and Marty, 1987; Muldoon et al., 1987). Por otro lado, PL-C' puede ser activada por fosforilación directa realizada por la PTK, evitándose la ruta a través de G_1' . Finalmente, IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares y también la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes del receptor con la consiguiente entrada de Ca^{2+} . La concentración elevada de Ca^{2+} intracelular que se alcanza induce la fusión de las membranas en algunos

sitios, produciéndose la vesiculación que culmina en la exocitosis acrosomal.

Para explicar el hecho que basófilos y neutrófilos responden en forma diferente frente a estímulos excitóticos, se ha involucrado recientemente a más de una proteína G en la respuesta (Gomperts, 1986; Cockcroft et al., 1987; Howell et al., 1987). Dado que se han descrito dos tipos de proteínas G_i en el espermatozoide de ratón (Jones et al., 1989), es probable que la RA proceda en dos fases que se regulan por proteínas G_i diferentes. En este contexto, se ha presentado alguna evidencia preliminar, que sugiere que la RA en espermatozoides de mamíferos es un proceso bifásico, donde la primera fase se realiza sin entrada de Ca^{2+} , mientras que la segunda implica una entrada masiva de Ca^{2+} que promueve la fusión de las membranas (Roldan and Harrison, 1988a,b). Los experimentos de Lee and Storey (1987), donde se estudia el efecto del éster de forbol (TPA) directamente sobre los espermatozoides y en presencia de ZP, también sugieren que las fases de transición de "B" a "S" y de "S" a "AR" están sometidas a procesos de regulación diferentes.

Es indudable que el modelo antes presentado necesita más evidencias, sin embargo, es pertinente para dar cuenta de las siguientes observaciones:

1) Pequeños glicopéptidos de ZP3 pueden unirse a los espermatozoides pero no son capaces de inducir la RA.

De acuerdo al modelo si se pierde la multivalencia de ZP3 el evento de agregación no procede.

2) La ZP modificada por el TPA puede unirse a los espermatozoides e inducir la RA sólo hasta el estado intermedio de la reacción, patrón "S".

Es probable que en este caso ocurra una agregación incompleta de las subunidades que conforman la FTU, de manera que la señal de unión de ZP3 a las proteínas del espermatozoide no se transmita apropiadamente.

3) Las RA espontáneas ocurren con mayor frecuencia en espermatozoides capacitados que en no capacitados.

Las FTU tienen la posibilidad de formarse con mayor probabilidad en una membrana fluida, debido a que su formación involucra la movilidad de sus componentes. De todas formas, la frecuencia con que se formen estos complejos será menor que la que exista en las RA mediadas por la ZP3.

4) Un entrecruzador externo como la IgG anti-ZP3 puede inducir la RA en espermatozoides que tienen en su superficie glicopéptidos de la ZP3 o TPA-ZP.

La IgG anti-ZP3 agrega las moléculas de la ZP3 que están unidas al espermatozoide permitiendo la formación de una FTU completa y dejando que la RA proceda.

5) Cuando los espermatozoides son capacitados en presencia del TPA y luego incubados con la ZP y el TPA, la transición de "B" a "S" se acelera, mientras que la de "S" a "AR" se retarda. Ambos reactivos necesitan estar presentes al mismo tiempo.

El TPA puede activar la PK-C y la PK-C' de una manera que es dependiente de la presencia de la ZP. Es probable que la agregación

inducida por la ZP y el primer aumento que se produce de la concentración de Ca^{2+} intracelular sean necesarios para dar cuenta del patrón "S" y por ello se necesite la presencia de ambos. Por otra parte, la PK-C activada por el TPA puede inducir la liberación de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares, al igual que lo hará el segundo mensajero (IP_2) producido por la vía normal de unión del ligando. De esta manera, la concentración de Ca^{2+} aumentará más rápidamente que lo normal dando cuenta de la transición acelerada de "B" a "S". Es posible, también, que por el tratamiento con el TPA se active la PK-C', regulando negativamente la segunda fase por su acción sobre la PTK y la G_1' . Por lo tanto, la transición de "S" a "AR" se retardará a pesar de formarse los agregados que activan la PTK.

6) Espermatozoides capacitados en presencia de IAP no experimentan reacción acrosómica cuando son tratados con la ZP. La reacción se detiene cuando los espermatozoides están con su acrosoma aún intacto o en patrón "B". Sin embargo, si se agrega el ionóforo A23187 al medio de incubación que contiene IAP, se sobrepasa el efecto inhibitorio y la RA se completa.

IAP inactiva la proteína G_1 la cual está localizada muy al comienzo de la cascada de reacciones y por tanto la RA no puede ser gatillada aún en presencia de la ZP. Este efecto inhibitorio puede ser sobrepasado por el ionóforo porque éste permite la entrada de calcio de una forma masiva y distinta a la fisiológica, por lo que la concentración de Ca^{2+} intracelular que se alcance será suficiente para inducir la excitación.

7) IAP no tiene efecto alguno cuando se agrega el TPA y la ZP al medio de incubación. El efecto que se observa es el mismo que cuando se agrega el TPA y la ZP sin IAP (véase punto 5).

En este caso, aún cuando las G_1 y G_1' sean inactivadas por IAP, el efecto observado será el mismo que se vería si IAP no estuviera presente porque el TPA activa las PK-C y PK-C', que son dos enzimas que están actuando en etapas posteriores de la cascada de reacciones. Además, como la ZP está presente se producirán los agregados necesarios para activar la PTK, la cual podrá fosforilar directamente la PL-C' provocando su activación.

8) Los resultados presentados sobre la inmunodetección de residuos de fosfotirosina en proteínas de espermatozoides, que han sido capacitados en presencia del mAc M42 indican que los niveles de fosforilación es disminuido por el anticuerpo (Figura 24).

El incremento en el nivel de fosforilación que se encuentra después de la capacitación puede deberse a la formación espontánea de agregados. Un hecho que apoya esta idea es que la presencia de ZP, la cual favorecería la agregación de las subunidades del receptor, aumenta aún mas dichos niveles. Luego, la agregación espontánea que ocurre como consecuencia de la capacitación podría ser inhibida en parte por el mAc M42, por bloqueo del movimiento de las proteínas de la membrana. Por lo tanto, si los espermatozoides se capacitan en un medio que contiene el anticuerpo, la agregación se verá disminuida y por ende, el nivel de fosforilación también.

Los datos experimentales, aunque aún insuficientes, parecen ser compatibles con este modelo, cuya importancia es proveer una base para orientar la dirección de experimentos futuros.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

- 1) El anticuerpo monoclonal murino M42, dirigido contra antígenos del espermatozoide de ratón, inhibe específicamente la RA inducida por la ZP3.
- 2) El mAc M42 sólo inhibe la RA cuando los espermatozoides tienen su acrosoma intacto. Una vez que la RA se ha iniciado, el anticuerpo no impide que la ZP induzca la culminación de la RA.
- 3) La interacción de las proteínas del espermatozoide con la ZP3 no es suficiente para inducir una respuesta celular, a menos que se produzca un evento de entrecruzamiento de dichas proteínas. Se sugiere que la agregación de las proteínas espermáticas reconocidas por ZP3 gatilla la RA.
- 4) Tres proteínas espermáticas se encontraron fosforiladas en residuos de tirosina después de la capacitación cuyos M_r son 52, 75 y 95 kD. Sólo la proteína de 95 kD se encontró fosforilada en espermatozoides sin capacitar. Se sugiere que las fosfotirosinas de las proteínas de 52 y 75 kD podrían representar marcadores específicos de la capacitación.

5) La ZP3 se une a dos proteínas espermáticas de M_r 95 y 42 kD, las cuales presumiblemente actuarían como receptores primarios para la ZP.

6) Los resultados acá presentados sugieren que la actividad de proteína ligante para ZP3 y la actividad de sustrato para una tirosina quinasa podrían estar presentes en la misma proteína espermática de 95 kD.

Finalmente, se postula un modelo para explicar cómo ocurre la RA: ZP3 se une a una proteína de 95 kD, que es una de las subunidades del receptor espermático, induciendo la agregación de ésta y otras proteínas. Este evento permite la formación de los receptores que provocan la activación de una proteína quinasa específica para tirosina. Los niveles de fosforilación aumentan, manifestándose este cambio, como una señal que gatilla la exocitosis acrosomal. Muy probablemente, dicha señal está relacionada con una entrada masiva de Ca^{2+} , el cual no sólo promovería cambios fisicoquímicos a nivel de las estructuras del acrosoma, sino también la activación "óptima" de enzimas hidrolíticas involucradas en la RA (Meizel, 1984).

REFERENCIAS

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

Benau, D.A., and Storey, B.T. (1987). Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol. Reprod.* 36, 282-292.

Benau, D.A., McGuire, E.J., and Storey, B.T. (1988). A further characterization of the mouse sperm zona-binding site with galactosyltransferase activity. *Biol. Reprod.* 38 (suppl. 1), 142.

Bentley, J.K., Khatra, A.S., and Garbers, D.L. (1987). Receptor-mediated phosphorylation of spermatozoa proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 15708-15713.

Berridge, M.J. (1986). Second messenger dualism in neuromodulation and memory. *Nature* 323, 294-295.

Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 159-193.

Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Cerione, R.A., Hildebrandt, J.D., Sunyer, T., Rojas, F.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Iyengar, R. (1985). Structural basis of adenylate cyclase stimulation and inhibition by distinct guanine nucleotide regulatory proteins. In "Molecular aspects of cellular regulation". (ed. P. Cohen, and M.D. Houslay). Vol. 4, pp.131-178. Elsevier. Amsterdam.

Bleil, J.D., and Wassarman P.M. (1980a). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Devel. Biol.* 76, 185-202.

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

Bleil, J.D., and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Devel. Biol.* 95, 317-324.

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

- Bleil, J.D., Greve, J.M., and Wassarman, P.M. (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Devel. Biol.* 128, 376-385.
- Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., and Koshland, D.E. Jr. (1986). Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83, 5822-5824.
- Burack, R., Walker, J., and Sando, J. (1988). A protein kinase C isozyme with relatively calcium independent membrane binding. *J. Cell Biol.* 107, 720a.
- Burch, R.M., Luini, A., and Axelrod, J. (1986). Phospholipase A₂ and Phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to α_1 -adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83, 7201-7205.
- Carpenter, G. (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 881-914.
- Casey, P.J., and Gilman, A.G. (1988). G protein involvement in receptor-effector coupling. *J. Biol. Chem.* 263, 2577-2580.
- Caswell, A.H., and Hutchinson, J.D. (1971). Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 43-49.
- Cockcroft, S. (1987). Polyphosphoinositide phosphodiesterase: Regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, G_p. *TIBS.* 12, 75-78.
- Cockcroft, S., Howell, T.W., and Gomperts, B.D. (1987). Two G-proteins act in series to control stimulus-secretion coupling in mast cells: Use of neomycin to distinguish between G-proteins controlling polyphosphoinositide phosphodiesterase and exocytosis. *J. Cell Biol.* 105, 2745-2750.
- Cohen, S., Fava, R.A., and Sawyer S.T. (1982). Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 79, 6237-6241.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., and Hanson, F.W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226.
- Detmers, P.A., Wright, S.D., Olsen, E., Kimball, B., and Cohn, Z.A. (1987). Aggregation of complement receptor on human neutrophils in the absence of the ligand. *J. Cell Biol.* 105, 1137-1145.

- Edge, A.S.B., Faltynek, C.R., Hof, L., Reichert, L.E., and Weber, P. (1981). Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 118, 131-137.
- Elder, J.H., and Alexander, S. (1982). Endo- β -N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 79, 4540-4544.
- Endo, Y., Schultz, R.M., and Kopf, G.S. (1987a). Effects of phorbol esters and diacylglycerol on mouse eggs: Inhibition of fertilization and modification of the zona pellucida. *Devel. Biol.* 119, 199-209.
- Endo, Y., Kopf, G.S., and Schultz, R.M. (1987b). Effects of phorbol esters on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction-inducing activity of the mouse zona pellucida protein, ZP3. *Devel. Biol.* 123, 574-577.
- Endo, Y., Lee, M.A., and Kopf, G.S. (1987c). Evidence for a role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida induced mouse sperm acrosome reaction. *Devel. Biol.* 119, 210-216.
- Endo, Y., Lee, M.A., and Kopf, G.S. (1988). Characterization of the islet activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Devel. Biol.* 129, 12-24.
- Florman, H.M. and Storey, B.T. (1982). Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Devel. Biol.* 91, 121-130.
- Florman, H.M., and Wassarman, P.M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41, 313-324.
- Florman, H.M., Bechtol, K.B., and Wassarman, P.M. (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Devel. Biol.* 106, 243-255.
- Fraser, L.R. (1977). Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. Exp. Zool.* 202, 439-444.
- Fraser, L.R., and Ahuja, K.K. (1988). Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res.* 20, 491-519.
- Friend, D.S. (1977). The organization of spermatozoal membrane. In "Immunobiology of Gametes" (eds. Edidin, M., and Johnson, M.H.) pp. 5-30. Cambridge University Press, London.
- Gilman, A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36, 577-579.

- Gilman, A.G. (1987). G-proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- Glenney, J.R., Zokas, L., and Kamps, M.P. (1988). Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J. Immunol. Methods* 109, 277-285.
- Go, K.J., and Wolf, D.P. (1985). Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32, 145-153.
- Goding, J.W. (1986). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Second Ed. Academic Press, London.
- Gomperts, B.D. (1986). Calcium shares the limelight in stimulus-secretion coupling. *TIBS.* 11, 290-292.
- Greve, J.M., and Wassarman, P.M. (1985). Mouse eggs extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 181, 253-264.
- Handman, E., and Jarvis, H.M. (1985). Nitrocellulose-based assay for the detection of glycolipids and other antigens: Mechanism of binding to nitrocellulose. *J. Immunol. Methods* 83, 113-123.
- Hartmann, J.F., Gwatkin, R.B.L., and Hutchinson, C.F. (1972). Early contact interaction between mammalian gametes in vitro: Evidence that this vitellus influences adherens between sperm and zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 69, 2767-2769.
- Heffner, L.J., Saling, P.M., and Storey, B.T. (1980). Separation of calcium effects on motility and zona binding in mouse spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 212, 53-59.
- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W., and Schultz, G. (1987). The GTP-binding protein, G_{β} , regulates neuronal calcium channels. *Nature* 352, 445-446.
- Hoshi, M., De Santis, R., Pinto, M.R., Cotelli, F., and Rosati, F. (1983). Is sperm α -L-fucosidase responsible for sperm-egg binding in *Ciona Intestinalis*? In "The Sperm Cell" (ed. J.Andre) pp. 107. Martinus Nijhoff Publishers. Boston, London.
- Howell, T.W., Cockcroft, S., and Gomperts, B.D. (1987). Essential synergy between Ca^{2+} and guanine nucleotides in exocytotic secretion from permeabilized rat mast cells. *J. Cell Biol.* 105, 191-197.
- Huang, T.T.F., Fleming, A.D., and Yanagimachi, R. (1981). Only acrosome-reacted spermatozoa can bind and penetrate zona pellucida: A study using the guinea pig. *J. Exp. Zool.* 217, 287-290.
- Huang, T.T.F., Ohzu, E., and Yanagimachi, R. (1982). Evidence suggesting that L-fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. *Gamete Res.* 5, 355-361.

Hunter, T., and Cooper, J.A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 897-930.

Ikari, N., Yoshino, H., Moses, A.C., and Flier, J.S. (1988). Evidence that receptor aggregation may play a role in transmembrane signaling through the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol. Endo.* 2, 831-837.

Jones, J.L., Kopf, G.S., and Schultz, R.M. (1989). Variability in electrophoretic mobility of G_i-like proteins: Effects of SDS. *FEBS Letters* 243, 409-412.

Jones, R., Brown, C.R., and Lancaster, R.T. (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.

Kamps, M.P., and Sefton, B.M. (1988). Identification of multiple novel polypeptide substrates of the v-src, v-yes, v-fps, v-fos, and v-erb-B oncogenic tyrosine kinases utilizing antisera against phosphotyrosine. *Oncogene* 2, 305-315.

Kopf, G.S., Woolkalis, M.J., and Gerton, G.L. (1986). Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* 261, 7327-7331.

Knudsen, K.A. 1985. Protein transferred to nitrocellulose for use as immunogen. *Anal. Biochem.* 147, 285-288.

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

Lakoski, K.A., Carron, C.P., Cabot, C.L., and Saling, P.M. (1988). Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: Response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 38, 221-233.

Lee, M.A., and Storey, B.T. (1985). Evidence for plasma membrane impermeability to small ions in acrosome-intact mouse spermatozoa bound to mouse zonae pellucidae, using an aminopropylidine fluorescent pH probe: Time course of the zona-induced acrosome reaction monitored by both chlortetracycline and pH probe fluorescence. *Biol. Reprod.* 33, 235-246.

Lee, M.A., and Storey, B.T. (1988). Influx of Ca²⁺ is the primary reaction mediating the first stage of the zona induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 38 (suppl. 1), 93.

Lee, M.A., Kopf, G.S., and Storey, B.T. (1987). Effects of phorbol esters and diacylglycerol on the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 36, 617-627.

Leyton, L., De Ioannes, A.E., Croxatto, H.B., Graham, E.J., and Elce J.S. (1985). Two Affinity Chromatography Methods for Purification of Human Acrosin. *Biochem. Cell Biol.* 64, 1020-1024.

Llano, I., and Marty, A. (1987). Protein kinase C activators inhibit the inositol triphosphate-mediated muscarinic current response in rat lacrimal cells. *J. Physiol.* 394, 239-248.

López, L.C., Bayna, E.M., Litoff, D., Shaper, J.H., and Shur, B.D. (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* 101, 1501-1510.

Martin, J.M., Hunter, D.D., and Nathanson, N.M. (1985). Islet activating proteins inhibits physiological responses evoked by cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Role of guanosine triphosphate binding proteins in regulation of potassium permeability. *Biochemistry* 24, 7521-7525.

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

Michell, T., Winslow, J.W., Smith, J.A., Seidman, J.G., and Neer, E.J. (1986). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the GTP-binding protein α_i and identification of a related protein, α_n . *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83, 7663-7667.

Muldoon, L.L., Jamieson, G.A.Jr., and Villereal, M.L. (1987). Calcium mobilization in permeabilized fibroblast: Effects of inositol triphosphate, orthovanadate, mitogens, phorbol esters, and guanosine triphosphate. *J. Cell. Physiol.* 130, 29-36.

Ndeto, G.W.T. (1988). Characterization of the phospholipase C activity of caudal epididymal mouse sperm. *Biol. Reprod.* 38 (suppl. 1), 173.

Neer, E.J., and D.E. Clapham. (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333, 129-134.

Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.

Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.

Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

Noteboom, W.D., Knurr, K.E., Kim, H.S., Richmond, W.G., Martin, A.P., and Vorbeck, M.L. (1984). An ELISA for screening hybridoma cultures for monoclonal antibodies against a detergent solubilized integral membrane protein. *J. Immunol. Methods* 75, 141-148.

O'Rand, M.G., Matthews, J.E., Welch, J.E., and Fisher, S.J. (1985). Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa in nitrocellulose blots. *J. Exp. Zool.* 235, 423-428.

Petruzzelli, L., Herrera, R., and Rosen, O.M. (1984). Insulin receptor is an insulin-dependent tyrosine protein kinase: copurification of insulin-binding activity and protein kinase activity to homogeneity from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 81, 3327-3331.

Roldan, E.R.S., and Harrison, R.A.P. (1988a). Polyphosphoinositide breakdown is a necessary early event in the mammalian sperm acrosome reaction. In "Abstracts of the British Society for Cell Biology", Bristol, (In press).

Roldan, E.R.S., and Harrison, R.A.P. (1988b). Ionic analysis of molecular events during the mammalian sperm acrosome reaction. In "Abstracts for the Society for the Study of Fertility", Edinburgh, (In press).

Rosen, O.M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L.M., and Cobb, M.H. (1983). Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 80, 3237-3240.

Saling, P.M. (1981). Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 78, 6231-6235.

Saling, P.M. (1982). Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: Reversible immobilization of mouse sperm by lanthanum. *Biol. Reprod.* 26, 429-436.

Saling, P.M. (1986). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. IV. A monoclonal antibody prevents zona penetration by inhibition of the acrosome reaction. *Devel. Biol.* 117, 511-519.

Saling, P.M. (1989). Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. In "Oxford Reviews of Reproductive Biology" (ed. C.A. Finn) Vol.11, pp. 339-388. Oxford Univ. Press, London.

Saling, P.M., and Storey, B.T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: Chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 83, 544-555.

Saling, P.M. and Lakoski, K.A. (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. II. Inhibition of sperm penetration through the zona pellucida using monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 33, 527-536.

Saling, P.M., and Waibel, R. (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. III. Passive immunization with a single monoclonal antibody inhibits pregnancy and fertilization in vivo. *Biol. Reprod.* 33, 537-544.

Saling, P.M., Wolf, D.P., and Storey, B.T. (1978). Calcium-dependent binding of mouse epididymal spermatozoa to the zona pellucida. *Devel. Biol.* 65, 515-525.

Saling, P.M., Sowinski, J., and Storey, B.T. (1979). An ultra-structural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucidae in vitro. *J. Exp. Zool.* 209, 229-238.

Saling, P.M., Irons, G., and Waibel, R. (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization: I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 33, 515-526.

Saling, P.M., Morton, P.C., and Waibel, R. (1986a). Contraceptive effect of two anti-sperm monoclonal antibodies, administered singly and in combination, in the mouse. In "Immunological approaches to contraception and the promotion of fertility" (ed. G.P. Talwar), pp. 191-199. Plenum Pub. Co., New York.

Saling, P.M., Waibel, R., and Lakoski, K.A. (1986b). Immunological identification of sperm antigens that participate in fertilization. In "The molecular and cellular biology of fertilization (ed. J.L. Hedrick) pp. 95-111. Plenum Pub. Co., New York.

Shalgi, R., Matityahu, A., and Nebel, L. (1986). The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol. Reprod.* 34, 446-452.

Sharon, N. (1975). Complex carbohydrates. In "Their chemistry, biosynthesis, and functions". Reading, Massachusetts: Addison-Wesley.

Shimizu, S., Tsuji, M., and Dean, J. (1983). In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J. Biol. Chem.* 258, 5868-5863.

Takayama, S., White, M.F., Lauris, V., and Kahn, C.R. (1984). Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 81, 7797-7801.

Towbin, H., Staehelin, T.H., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 16, 4359-4364.

Trimmer, J.S., Trowbridge I.S., and Vacquier V.D. (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.

Trimmer, J.S., Schackmann R.W., and Vacquier V.D. (1986). Monoclonal antibodies increase intracellular Ca^{+2} in sea urchin spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83, 9055-9059.

Trimmer, J.S., Ebina, Y., Schackmann, R.W., Meinhof, C.-G., and Vacquier, V.D. (1987). Characterization of a monoclonal antibody that induces the acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Cell Biol.* 105, 1121-1128.

Visconti, P.E., and Tezon, J.G. (1989). Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.* 40, 223-231.

Wahl, M.I., and Carpenter, G. (1988). Regulation of epidermal growth factor-stimulated formation of inositol phosphate in A-431 cells by calcium and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 7581-7590.

Wahl, M.I., Sweatt, J.D., and Carpenter, G. (1987). Epidermal growth factor (EGF) stimulates inositol trisphosphate formation in cells which overexpress the EGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142, 688-695.

Wang, J. (1985). Isolation of antibodies for phosphotyrosine by immunization with a v-abl oncogene-encoded protein. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3640-3643.

Ward, C.R., and B.T. Storey. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Devel. Biol.* 104, 287-296.

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

Wassarman, P.M. (1988). Fertilization in mammals. *Sci. Am.* 259, 52-58.

Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J., and Salzman, G.S. (1985a). Nature of the mouse egg's receptor for sperm. In "The molecular and cellular biology of fertilization". (ed. J.L. Hedrick) pp. 55-78. Plenum Pub. Co., New York.

Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J., Salzman, G.S., and Samuels, F.G. (1985b). The mouse egg's receptor for sperm: What is it and how does it work?. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 50, 11-19.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, B., and Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118, 197-203.

Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. In "Physiology of Reproduction" (eds. E. Knobil and J. Neill) Vol. 1, pp 135-185. Raven Press. New York.

Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. Ann. Rev. Biochem. 57, 443-478.

Yatani, A., Codina, J., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1987). Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k . Science 235, 207-211.

APENDICE I

MEDIOS Y SOLUCIONES TAMPONANTES

Medio de cultivo MC, pH 7.4

Medio Krebs-Ringer-bicarbonato suplementado con:

Piruvato de sodio, 1 mM

Lactato de sodio, 25 mM

Glucosa, 5.56 mM

Albúmina sérica de bovino (BSA), 20 mg/ml

Tampón TN: pH 7.2

Tris-OH, 20 mM

NaCl, 130 mM

Tampón de homogenización: pH 7.4

Trietanolamina, 25 mM

NaCl, 150 mM

MgCl₂, 1 mM

CaCl₂, 1 mM

Lima bean trypsin inhibitor (LBTI), 1 mg/ml

Nonidet P-40, 1 %

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 %

DNAasa, 0.25 mg/ml

Hialuronidasa, 0.25 mg/ml

Solución para congelar y descongelar, preparada en MC, pH 7.4

BSA, 0.02 %

NP-40, 0.2 %

Acido de etilendiamino tetraacético (EDTA), 10 mM

PMSF, 1 mM

LBTI, 10 µg/ml

Solución de MC-PVP, pH 7.4

MC sin BSA que contiene polivinil pirrolidona al 0.4 %

Tampón TNC: pH 7.4

Tris-OH, 20 mM

NaCl, 126 mM

CaCl₂, 1.7 mM

Solución de clortetraciclina, preparada en tampón TN, pH 7.8

CTC, 500 µM

Cisteína, 5 mM

Tampón PBS, pH 7.2, 0.15 M

NaCl, 0.14 M

KCl, 2.68 mM

Na₂HPO₄, 0.008 M

KH₂PO₄, 1.15 mM

Tampón PBS-PVP, pH 7.2

Polivinil pirrolidona al 0.4 % en PBS

Tampón Tris-Glicina-SDS, pH 8.3

Tris-OH, 25 mM

Glicina, 192 mM

SDS, 0.1 %

Mezcla desnaturante: pH 6.8

Tris-HCl, 62.5 mM

Glicerol, 10 %

SDS, 2 %

Pyronin Y, 0.001 %

Solución de dilución para sueros, pH 7.2

Tris-OH, 50 mM

NaCl, 0.1 M

Tween 20, 0.5 %

NaN₃, 10 mM

APENDICE II

TRABAJOS PUBLICADOS

- 1) Leyton, L., Robinson, A., and Saling, P.M. (1989). Relationship between the M42 Antigen of Mouse Sperm and the Acrosome Reaction Induced by ZP3. *Devel. Biol.* 132, 174-178.
- 2) Leyton, L., and Saling, P.M. (1989). Evidence that Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers the Acrosome Reaction. *J. Cell Biol.* 108, 2163-2168.
- 3) Leyton, L., and Saling, P.M. (1989). 95 kD Sperm Proteins Bind ZP3 and Serve as Tyrosine Kinase Substrates in Response to Zona Binding. *Cell* 57, 1123-1130.