

DOC-B
C947

CARACTERIZACION MOLECULAR DE β -ACROSINA DE CERDO, c✓
ESTUDIO DE SU PARTICIPACION EN LA UNION SECUNDARIA A LA
ZONA PELUCIDA

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

Por

JAVIER ADOLFO CROSBY RUSSO

Enero de 1999

Directores de tesis: Dra. María del Pilar Carvallo

Dr. Claudio Barros

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

JAVIER ADOLFO CROSBY RUSSO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de Diciembre de 1998.

Directores de Tesis:

Dra. Maria del Pilar Carvallo

M. P. Carvallo

Dr. Claudio Barros

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Rosalba Lagos

Rosalba Lagos

Dra. Catherine Connelly

Catherine Connelly

Dr. Luis Burzio

Dr. Luis Valladares

Luis Valladares

Dr. Ariel Orellana

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. María del Pilar Carvallo y en el Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, bajo la dirección del Dr. Claudio Barros.

A Paulette
la mujer de mi vida
mi compañera encantadora
mi apoyo constante

A Noemi
mi bebé
ahora una niña
hermosa y valiente

A la memoria de mis padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me brindaron su apoyo y colaboración durante la realización de esta tesis. En forma especial:

A la Dra. María del Pilar Carvallo por haber aceptado valientemente ser mi tutora y por haberme recibido en su laboratorio. Además, por la excelente formación en biología molecular que me entregó y su constante apoyo humano.

Al Dr. Claudio Barros por haberme guiado en esta tesis, por su aporte crítico y por la formación científica entregada. Además, por brindarme una oportunidad laboral a través de la Universidad Católica de Chile que me permitió terminar esta tesis.

Al Dr. Roy Jones del Laboratory of Sperm Function del Babraham Institute, Cambridge, United Kindom, por su colaboración en el desarrollo y discusión de los estudios de unión y por el generoso y desinteresado recibimiento en su laboratorio.

A los Doctores Soledad Sepúlveda, María Inés Becker y Alfredo De Ioannes por sus valiosos aportes al definir mi proyecto de tesis y su constante interés en los objetivos logrados.

A todos los miembros del Laboratorio de Genética Molecular Humana del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile por su compañerismo y amistad permanente. En especial a Mauricio Moraga por su soportable sarcasmo constructivo y por su colaboración en los análisis de filogenia.

A todos los miembros del Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile por su entusiasmo y buena disposición. En especial a Pedro Cortés por su excelente trabajo fotográfico, a Mario García por su ayuda permanente y a Leonardo Saenz y Lissette Lapierre por su oportuna colaboración.

A Agrícola El Monte y al Matadero Friosa por su desinteresado y muy generoso ofrecimiento del uso de material biológico de sus instalaciones (muestras de semen de verraco y ovarios de cerda, respectivamente).

A FONDECYT que al financiar esta tesis con un proyecto de Doctorado permitió adquirir los materiales necesarios para desarrollar el trabajo y financiar dos estadías de investigación en el extranjero, fundamentales en el desarrollo de esta tesis. Además, a los Proyectos FONDECYT 1.940.662 y 1.971.234 del Dr. Claudio Barros que financiaron en parte la realización de esta tesis y me ayudaron económicamente.

A los Doctores Rosalba Lagos, Catherine Connelly, Luis Burzio, Luis Valladares y Ariel Orellana por sus valiosas sugerencias durante los avances de tesis y durante la revisión de este manuscrito.

INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xix
INTRODUCCION	1
A. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	4
A.1. Lugar donde ocurre <i>in vivo</i> la capacitación.	5
A.2. Capacitación espermática <i>in vitro</i> .	6
B. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA ZONA PELUCIDA	8
C. UNION PRIMARIA DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELUCIDA	10
D. REACCION ACROSOMICA	12
D.1. Inducción de la reacción acrosómica <i>in vivo</i> .	13
D.2. Participación de proteínas reguladoras de la reacción acrosómica.	14
D.3. Modelos del mecanismo molecular de la reacción acrosómica.	15
D.4. El espermatozoide reaccionado pierde la capacidad de unión primaria pero aún así se mantiene unido a la zona pelúcida.	17
E. SISTEMA PROACROSINA/ACROSINA	19
F. UNION SECUNDARIA A LA ZONA PELUCIDA	22

F.1. Participación del sistema proacrosina/acrosina.	22
F.2. Mecanismo de la unión secundaria a la zona pelúcida.	23
G. PENETRACION ESPERMATICA DE LA ZONA PELUCIDA	26
G.1. Hipótesis mecánica.	27
G.2. Hipótesis enzimática.	28
G.3. Evidencias en contra de la participación de acrosina en la penetración espermática a través de la zona pelúcida.	30
HIPOTESIS DE LA TESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
MATERIALES Y METODOS	34
A. REACTIVOS	34
B. OLIGONUCLEOTIDOS	36
C. EXTRACCION Y ANALISIS DE RNA TOTAL	41
C.1. Extracción de RNA total.	41
C.2. Análisis por electroforesis del RNA.	42
C.3. Análisis por Northern.	42
C.4. Marcación de la sonda por el método del “random primer labelling system”.	43
C.5. Transcripción reversa – PCR.	43
D. PRODUCCION DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA DE β -ACROSINA	44
D.1. Reacción de amplificación por el método de PCR.	44

D.2. Producción del fragmento de cDNA de β -acrosina mutante.	45
E. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA DE β -ACROSINA	46
E.1. Electroforesis en geles de agarosa.	46
E.2. Purificación de fragmentos de cDNA.	47
E.3. Secuenciación de DNA.	48
E.3.a. Purificación de fragmentos de DNA a ser secuenciados.	48
E.3.b. Marcación del partidor.	48
E.3.c. Mezcla de reacción.	48
E.3.d. Reacción de secuenciación.	49
E.3.e. Terminación.	49
E.3.f. Electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución en condiciones desnaturalantes.	50
F. PREPARACION DEL DNA PLASMIDIAL Y SUBCLONACION	50
F.1. Digestión y desfosforilación.	50
F.2. Ligación de fragmentos de DNA al vector pGEX2T.	51
F.3. Preparación de bacterias competentes.	51
F.3.a. Método del CaCl_2 .	51
F.3.b. Método de Hanahan.	52
F.4. Transformación de bacterias competentes.	54
F.5. Selección de bacterias transformadas.	54
F.6. Minipreparación de DNA plasmidial.	54
F.7. Determinación de la presencia y orientación del inserto.	55

G. EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	56
G.1. Expresión de la proteína recombinante.	56
G.2. Electroforesis de las proteínas recombinantes en geles de poliacrilamida.	57
G.3. Purificación de la proteína recombinante.	57
G.4. Separación de la proteína quimérica por digestión con trombina.	58
H. PURIFICACION DE PROACROSINA Y DE ZONAS PELUCIDAS DE CERDO	58
H.1. Purificación de proacrosina de espermatozoides de cerdo.	58
H.2. Purificación de las glicoproteínas de la zona pelúcida.	59
I. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PROTEASICA, INMUNOREACTIVIDAD Y CAPACIDAD DE UNION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	59
I.1. Actividad proteasica.	59
I.2. Inmunodetección de las proteínas recombinantes de β -acrosina.	60
I.3. Unión de proteínas recombinantes a ^{125}I -ZPGPs y ensayo de competencia.	61
I.4. Unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas <i>in toto</i> y ensayo de competencia.	62
I.5. Ensayos autoradiográficos de la unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas <i>in toto</i> .	63
J. ENSAYOS DE PENETRACION ESPERMATICA Y FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	64
J.1. Medios de cultivo.	64
J.2. Colecta de semen y lavado de espermatozoides de cerdo.	65

J.3. Colecta de zonas pelúcidas de cerdo.	66
J.4. Ensayo de penetración de zonas pelúcidas y de competencia de las proteínas recombinantes.	66
J.5. Ensayos de penetración espermática y competencia de las proteínas recombinantes con espermatozoides humanos y zonas pelúcidas cadavéricas humanas.	67
J.6. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos ováricos de cerdo.	68
J.7. Fecundación <i>in vitro</i> y competencia de las proteínas recombinantes de espermatozoides de cerdo y ovocitos madurados <i>in vitro</i> .	69
J.8. Análisis a microscopía electrónica de barrido.	69
RESULTADOS	71
A. ANALISIS DEL mRNA DE PROACROSINA POR NORTHERN	71
B. TRANSCRIPCION REVERSA Y AMPLIFICACION DEL cDNA DE β -ACROSINA	71
C. AMPLIFICACIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	77
D. PRODUCCION DE LA MUTANTE Ser/Ala ²²² DE β -ACROSINA	78
E. EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS DISTINTAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	78
F. INMUNODETECCION DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	81
G. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	84
H. UNION DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A ¹²⁵ I-ZPGPs	86

I.	ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNION A ¹²⁵ I-ZPGPS CON POLISACARIDOS SULFATADOS	88
J.	UNION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A ZONAS PELUCIDAS <i>in toto</i>	91
K.	ENSAYOS DE PENETRACION ESPERMATICA HOMOLOGA A ZONAS PELUCIDAS DE CERDO	96
K.1.	Ensayos de penetración espermática a zonas pelúcidas de cerdo.	96
K.2.	Ensayos de fecundación <i>in vitro</i> en cerdo.	99
L.	ENSAYOS DE PENETRACION ESPERMATICA HOMOLOGA A ZONAS PELUCIDAS CADEVERICAS HUMANAS	103
	DISCUSION	107
A.	EXPRESION DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA	107
B.	INMUNODETECCION DE LAS FORMAS RECOMBINANTES β -ACROSINA	108
C.	ACTIVIDAD ESTERASICA DE β -ACROSINA RECOMBINANTE	109
D:	UNION DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A LAS ZPGPS	111
E.	ANALISIS DE MODELAJE DE β -ACROSINA	114
F.	HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE β -ACROSINA DE SIETE ESPECIES DE MAMIFEROS	119
G.	UNION DE β -ACROSINA RECOMBINANTE A LAS ZONAS PELUCIDAS <i>in toto</i>	123

H. PAPEL DE β -ACROSINA RECOMBINANTE EN LA PENETRACIÓN ESPERMÁTICA <i>in vitro</i>	125
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFIA	130

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Listado de enzimas acrosomales	3
Tabla 2 : Partidores utilizados en la amplificación de los distintos fragmentos de β -acrosina de cerdo.	37
Tabla 3 : Estrategia de uso de los distintos partidores para generar los fragmentos de β -acrosina de cerdo.	38
Tabla 4 : Estándares de peso molecular.	47
Tabla 5 : IC_{50} aproximado dado las condiciones de no saturación de los competidores de la unión de ^{125}I -ZPGPs a las formas recombinante de β -acrosina y a la proteína nativa proacrosina.	90
Tabla 6 : Entradas usadas para el modelaje del Direct-Swiss Model pedido para Acro-cerdo	116

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	: Esquema que representa el modelo de la estructura proteica del sistema proacrosina/acrosina.	21
Figura 2	: Ubicación de los partidores en la secuencia del cDNA de proacrosina de cerdo.	39
Figura 3	: Esquema del vector de expresión pGEX2T.	53
Figura 4	: Análisis por Northern del RNA total de testículo de cerdo.	72
Figura 5	: Análisis de los productos obtenidos por transcripción reversa y PCR.	74
Figura 6	: Análisis del cDNA de β -acrosina purificado.	75
Figura 7	: Secuencia nucleotídica del fragmento de 819 pares de bases del gen de acrosina clonado dentro del vector de expresión pGEX2T y la secuencia aminoacídica deducida.	76
Figura 8	: Generación de una mutante del sitio catalítico de β -acrosina.	79
Figura 9	: Amplificación de los distintos fragmentos de DNA de β -acrosina.	80
Figura 10	: Análisis de la expresión de las formas recombinantes de β -acrosina.	82

Figura 11	:	Immunodetección de las proteínas recombinantes de β -acrosina con el anticuerpo policlonal anti-acrosina α -38.	83
Figura 12	:	Activación enzimática de la β -acrosina recombinante y de proacrosina.	85
Figura 13	:	Unión de ^{125}I -ZPGPs a las formas recombinantes de β -acrosina.	87
Figura 14	:	Ensayos de competencia entre la unión de ^{125}I -ZPGPs a las formas recombinantes de β -acrosina.	89
Figura 15	:	Unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas <i>in toto</i> a tres tiempos distintos.	92
Figura 16	:	Capacidad de unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas <i>in toto</i> .	93
Figura 17	:	Especificidad de la unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas <i>in toto</i> .	95
Figura 18	:	Localización de la unión de ^{125}I - β -acrosina a la zona pelúcida <i>in toto</i> .	97
Figura 19	:	Análisis de la unión de espermatozoides de cerdo a zonas cadavéricas de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina.	98
Figura 20	:	Análisis de la reacción acrosómica de espermatozoides de cerdo sobre la superficie de las zonas cadavéricas de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina.	100

Figura 21	:	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de cerdo.	101
Figura 22	:	Análisis microscópico de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de cerdo.	102
Figura 23	:	Análisis de la fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina.	104
Figura 24	:	Ensayos de penetración de zonas pelúcidas humanas en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina.	106
Figura 25	:	Unión relativa a ^{125}I -ZPGPs de proacrosina, péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de β -acrosina.	113
Figura 26	:	Representación esquemática de la estructura de β -acrosina de cerdo producido en RasMol.	117
Figura 27	:	Diagrama esquemático de la estructura de β -acrosina de cerdo producido en RasMol.	118
Figura 28	:	Relaciones filogenéticas de secuencias de aminoácidos de β -acrosina de algunos mamíferos.	121
Figura 29	:	Comparación de las secuencias de aminoácidos de β -acrosina de siete mamíferos.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	:	adenosina-5' trifosfato
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$:	desoxiadenosina 5'- $[\alpha^{32}\text{P}]$ trifosfato
BAEE	:	N α -benzoil-L-arginina etil ester
BSA	:	seroalbúmina de bovino
CIP	:	fosfatasa alcalina de intestino de ternero
cpm	:	cuentas por minuto
CTAB	:	bromuro de hexadecil-trimetilamonio
dATP	:	2'desoxiadenosina-5' trifosfato
dCTP	:	2'desoxicitidina-5' trifosfato
dTTP	:	2'desoxitimidina-5' trifosfato
dGTP	:	2'desoxiguanosina-5' trifosfato
ddATP	:	2',3'didesoxiadenosina-5' trifosfato
ddCTP	:	2',3'didesoxicitidina-5' trifosfato
ddTTP	:	2',3'didesoxitimidina-5' trifosfato
ddGTP	:	2',3'didesoxiguanosina-5' trifosfato
DEAE	:	dietilaminoetil
DEPC	:	dietil pirocarbonato
DO	:	densidad óptica
dsDNA	:	DNA de hebra doble
DTAB	:	bromuro de dodecil-trimetilamonio
DTT	:	ditiotreitól
DMSO	:	dimetilsulfóxido
EDTA	:	ácido etilendiaminotetraacético
FSH	:	hormona folículo estimulante
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$:	adenosina 5'- $[\gamma^{32}\text{P}]$ trifosfato

GST	:	glutación-S-transferasa
HCG	:	gonadotropina coriónica humana
Hepes	:	ácido N-[hidroxietil]piperazina-N'-[etanosulfónico]
HSA	:	seroalbúmica humana
IPTG	:	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
¹²⁵ I-ZPGPs	:	glicoproteínas de la zona pelúcida yodadas
K-MES	:	2-[N-morfolino]etanosulfonico de potasio
MOPS	:	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfonico
PMSF	:	fenilmetilsulfonil fluoruro
PCR	:	Reacción de polimerización en cadena
pb	:	pares de bases
RT-PCR	:	reacción de transcripción reversa acoplada a la reacción de polimerasa en cadena
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TLCK	:	N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
Taq	:	Thermus aquaticus
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	:	tris-(hidroximetil)-aminometano
Tm	:	temperatura media de fusión del DNA
WGA	:	aglutinina de germen de trigo
ZP	:	zona pelúcida
ZPGPs	:	glicoproteínas de la zona pelúcida

RESUMEN

Para que ocurra la fecundación en mamíferos el espermatozoide debe pasar a través de las células de la granulosa, penetrar la zona pelúcida y posteriormente fusionarse con el ovocito. Los mecanismos moleculares propuestos para explicar la penetración a través de la zona pelúcida consideran que: 1) acrosina actúa directamente como proteasa, digiriendo la zona pelúcida y facilitando así el paso del espermatozoide; 2) proacrosina se une a las glicoproteínas de la zona pelúcida (ZPGPs) y una vez establecida esta unión secundaria, proacrosina se autodigiere liberando al espermatozoide de esta unión. Así, la repetición continua de este mecanismo facilitaría la penetración del espermatozoide.

La unión secundaria es esencialmente de tipo iónico, involucrando grupos polisulfatos en las ZPGPs y residuos básicos en proacrosina. La densidad y la orientación de los grupos sulfato en las ZPGPs parecen ser parámetros críticos en mediar el reconocimiento y la unión, ya que pequeñas variaciones en su estequiometría serían las responsables de proporcionar la especie especificidad de la fecundación. El hecho que tanto proacrosina como β -acrosina presenta la misma capacidad de unión a los grupos polisulfatos de la zona pelúcida sugiere que el dominio carboxilo terminal de proacrosina tiene poca importancia en la actividad de unión.

En esta tesis se estudió la participación de β -acrosina en la unión secundaria a la zona pelúcida. Para ello, se subclonaron fragmentos de cDNA derivados del mRNA de proacrosina de cerdo y se expresaron cinco proteínas recombinantes: β -acrosina, un mutante del sitio catalítico (Ser/Ala²²²), la cadena pesada, el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal de β -acrosina. De ellas, solamente β -acrosina recombinante, una vez liberada de la proteína de fusión, mostró actividad enzimática.

La capacidad de unión de las proteínas recombinantes a ¹²⁵I-ZPGPs se evaluó en un ensayo de dot blot. Sólo β -acrosina recombinante, la mutante del sitio catalítico y la cadena pesada de β -acrosina, se unen a las ZPGPs. La unión es dependiente de la concentración de la proteína recombinante e inhibible por polímeros polisulfatados. Puesto que β -acrosina recombinante y la mutante del sitio catalítico presentan la misma capacidad de unión, se concluye que la actividad proteolítica no sería necesaria para el proceso de unión. Por otra parte, como la cadena pesada de β -acrosina sólo une un 52% del máximo y las dos recombinantes de los extremos amino y carboxilo terminal no unen a ZPGPs, la unión secundaria en cerdo requeriría de la secuencia completa de β -acrosina para que se forme el dominio de unión.

Mediante ensayos de unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto*, se determinó que la unión es saturable y estable en el tiempo. Además, puede ser desplazada tanto por proacrosina nativa como por fucoidano. Por autoradiografía se determinó que β -acrosina recombinante se une y localiza en forma heterogénea en toda la superficie y grosor de la zona pelúcida. Lo que sugiere que los ligandos para β -acrosina no se encontrarían homogéneamente distribuidos en la zona pelúcida. En conjunto, estos resultados permiten concluir que acrosina participa en la unión secundaria, uniéndose específica y selectivamente a las glicoproteínas de la zona pelúcida.

Para estudiar la contribución de acrosina en la unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* preincubando los ovocitos con las proteínas recombinantes o en presencia de ellas. En las condiciones experimentales usadas, la unión de las proteínas recombinantes de β -acrosina de cerdo no afectó la fecundación homóloga (cerdo) ni heteróloga (humano). Estos resultados sugieren la participación de otras proteínas del acrosoma del espermatozoide en la unión secundaria, los cuales reconocerían ligandos distintos a los que la β -acrosina recombinante bloqueó.

SUMMARY

In mammalian fertilization the spermatozoa must pass through the granulosa cells, penetrate the zona pellucida and finally fuse with the oocyte. The molecular mechanism proposed to explain zona pellucida penetration considers that: 1) acrosin acts directly as a protease which digests the zona pellucida, allowing the sperm to pass through it; 2) proacrosin binds the zona pellucida glycoproteins (ZPGPs) and once this secondary binding is established, proacrosin autodigests itself leaving the sperm free to bind again. Therefore, continual repetition of this mechanism will facilitate sperm penetration.

The secondary binding involves ionic interactions between polysulphated groups of the zona pellucida glycoproteins and basic residues on procacrosin. The density and orientation of sulphated groups on ZPGPs seem to be critical parameters mediating recognition and binding, since small changes in the stoichiometry are responsible for providing the specie specificity of fertilization. The fact that proacrosin and β -acrosin present the same binding capacity towards polysulphated groups on ZPGPs suggests that the carboxy terminal end of proacrosin has no importance in the binding.

In this thesis we studied the participation of the β -acrosin in the secondary binding to the zona pellucida. This was achieved by subcloning DNA fragments

derived from boar proacrosin mRNA and expressing as glutathione transferase fusion proteins the following five recombinant proteins: β -acrosin, a mutant of the catalytic site, β -acrosin Ser/Ala²²², β -acrosin heavy chain, amino and carboxy termini of β -acrosin. Of these only recombinant β -acrosin, after cleavage from the fusion protein, showed enzymatic activity.

The binding capacity of the recombinant proteins to ZPGPs was evaluated with a dot blot assay. Only recombinant β -acrosin, the catalytic site β -acrosin mutant and β -acrosin heavy chain bind ZPGPs. This binding depends on the recombinant concentration and is inhibited by sulphated polymers. Since recombinant β -acrosin and the catalytic site mutant have the same binding capacity, the proteolytic activity is not necessary for the binding mechanism. However, since β -acrosin heavy chain has only 52% of the maximal binding capacity and the shorter amino and carboxy terminal recombinant proteins do not bind ZPGPs, for boar fertilization, the secondary binding on would require the complete amino acid sequence of β -acrosin to form the binding domain.

Binding assays *in toto* between the iodinated recombinant β -acrosin and whole zona pellucida showed that this binding is saturable and stable in time. Moreover, it can be blocked by the native proacrosin and by fucoidan. By autoradiography we determined that the recombinant β -acrosin bind and localize on

the entire surface and thickness of the zona pellucida in a heterogeneous distribution. This suggests that the ligands for β -acrosin would not be homogeneously distributed on the zona pellucida. These results permit us to conclude that acrosin acts on secondary binding, binding specific- and selectively to the zona pellucida glycoproteins.

To study the contribution of acrosin in the secondary binding of the sperm to the zona pellucida, we performed *in vitro* fertilization assays in the presence of the recombinant proteins or by preincubation of the oocyte with these proteins. Under the experimental conditions used, binding of β -acrosin recombinant proteins do not block homologous (boar) or heterologous (human) sperm penetration. These results suggest that there may be other proteins in the acrosome reacted spermatozoa that participate in the secondary binding, and that these proteins recognize ligands that are different from those blocked by β -acrosin recombinant proteins.

INTRODUCCION

La fecundación es el proceso por el cual el espermatozoide y el ovocito se unen para dar origen a un cigoto diploide que es genéticamente distinto a sus progenitores. Esta forma de reproducción bisexual, llevada a cabo por la fecundación de los gametos, se encuentra representada en muchos metazoarios incluidos los mamíferos. En mamíferos, el ovocito ovulado está envuelto en una matriz extracelular denominada zona pelúcida y más externamente rodeado por una masa de células de la granulosa. Para que ocurra la fecundación, el espermatozoide debe pasar a través las células de la granulosa, penetrar la zona pelúcida y una vez en contacto con el ovocito, se produce la fusión de las membranas gaméticas. Esto activa al ovocito, iniciando cambios citoplasmáticos que permiten finalizar su meiosis e iniciar el desarrollo embrionario.

La zona pelúcida media el reconocimiento inicial entre el espermatozoide y el ovocito y, en la mayoría de los mamíferos, la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide es especie-específica. La zona pelúcida juega un importante papel en los subsecuentes eventos del proceso de la fecundación, como son el constituir la barrera especie-específica, ser la responsable de la

inducción de la reacción acrosómica del espermatozoide y del bloqueo a la poliespermia.

El espermatozoide por su parte, debe sufrir dos procesos claves antes de fecundar al ovocito: expresar una motilidad hiperactivada y sufrir la exocitosis acrosomal o reacción acrosómica. Ambos eventos se producen como consecuencia de la "capacitación" espermática y son un requisito indispensable para la penetración espermática a través de la zona pelúcida. La motilidad hiperactivada consiste en que el movimiento del espermatozoide deja de ser progresivo y las ondulaciones del flagelo presentan una mayor amplitud y un menor radio de curvatura y frecuencia (Katz y cols., 1978). Estos cambios en el movimiento flagelar, facilitarían el paso del espermatozoide por las células de la corona radiada y la penetración a través de la zona pelúcida. La reacción acrosómica expone y/o libera el contenido acrosomal, el cual contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas (Tabla 1). De estas, hialuronidasa y acrosina han sido las más estudiadas y caracterizadas. La reacción acrosómica permite no sólo que el espermatozoide cruce a través de la zona pelúcida sino que además determina cambios en la membrana plasmática de la región ecuatorial del espermatozoide que la vuelven fusogénica a la membrana plasmática del ovocito.

Hialuronidasa	Galactosidasa
Proacrosina/acrosina	Glucoronidasa
Fosfolipasa A	Catepsina D
Fosfolipasa C	Catepsina L
Arilsulfatasa	Calpaina II
Arilamidasa	Metaloendoproteasa
Colagenasa	L-Fucosidasa
N-Acetilhexosaminidasa	Peptidilpeptidasa
N-Acetilglucosaminidasa	Ornitin decarboxilasa

Tabla 1. Listado de algunas enzimas acrosomales (Yanagimachi, 1994).

A. CAPACITACION ESPERMATICA

El espermatozoide de mamífero recién eyaculado es mótil pero incapaz de fecundar a un ovocito, pues no puede alcanzar el estado hiperactivado ni sufrir la reacción acrosómica inmediatamente. El espermatozoide requiere de un período de tiempo durante el cual tienen lugar cambios moleculares intracelulares y en la superficie de su membrana plasmática que le permiten una adecuada interacción con la zona pelúcida y posteriormente con la membrana plasmática del ovocito. Este proceso de adquisición de la capacidad fecundante dependiente del tiempo fue originalmente definido como "capacitación" (Austin, 1951; Chang, 1951, Austin, 1952; Yanagimachi, 1994). Se han descrito muchos cambios intracelulares en el espermatozoide capacitado, por ejemplo, en la concentración de iones intracelulares (Mrsny y cols., 1984; Hyne y cols., 1985), en la actividad glicolítica y el consumo de oxígeno (Boell, 1985), en la actividad de la adenilil ciclasa (Stein y Fraser, 1984), en el aumento de los niveles de cAMP (Visconti y Tezon, 1989; Fraser, 1990), en la actividad de proteína quinasas dependientes de cAMP (Visconti y cols., 1995a; Visconti y cols., 1995b; Leclerc y cols., 1996) y en la remoción o alteración de agentes estabilizadores de la membrana plasmática del espermatozoide adsorbidos durante su permanencia en el epidídimo o provenientes del plasma seminal (Weinman y Williams, 1961). Estos agentes estabilizadores incluyen por ejemplo, a los llamados factores descapacitantes

(Oliphant, 1976; Fraser y cols., 1990), a la caltrina (Coronel y Lardy, 1992), a glicoproteínas de 15, 16 y 23 kDa (Parry y cols., 1992), a espermina (Rubinstein y Breitbart, 1991) y a las proteínas estabilizadoras del acrosoma (Oliphant y cols., 1985; Wendy y cols., 1986).

A.1. Lugar donde ocurre *in vivo* la capacitación.

El criterio usado para indicar que un espermatozoide se ha capacitado es cuando es capaz de sufrir la reacción del acrosoma y ha fecundado un ovocito. La capacitación ocurre normalmente en el tracto femenino y el lugar exacto depende de donde es depositado el semen durante la cópula. Por ejemplo, en los bovinos, ovinos, primates y el conejo, el semen es eyaculado en la parte anterior de la vagina, mientras que en la mayoría de los roedores, en el cerdo, el caballo y el perro, la mayor parte del semen es forzado a través del cervix y depositado directamente en el útero. En ambos casos, casi todos los espermatozoides son eliminados del tracto femenino o no tienen acceso directo al sitio de la fecundación. En el ratón o en el hámster, la razón espermatozoide - ovocito en el momento de la fecundación es de 1:1 e inclusive menor (Zamboni, 1972; Cummins y Yanagimachi, 1982).

En las especies donde los espermatozoides son depositados en la vagina, la primera barrera física es el moco cervical del cuello uterino. La estructura del moco cervical permite seleccionar a los espermatozoides impidiendo el paso a los morfológicamente anormales (Barros y cols., 1984b). Es en el moco cervical donde los espermatozoides iniciarían el proceso de capacitación desprendiéndose, contra las fibras del moco, del material descapacitante adsorbido en la membrana plasmática durante su almacenamiento en el epidídimo y del plasma seminal durante la eyaculación.

A.2. Capacitación espermática *in vitro*.

Originalmente se demostró que espermatozoides epididimarios de hámster podían ser capacitados *in vitro* usando el contenido oviductal de hembras recién ovuladas (Yanagimachi y Chang, 1964). Actualmente, no es necesario suplementar los medios de capacitación con ningún componente del tracto genital femenino. En la mayoría de las especies de mamífero estudiadas, los medios definidos que permiten la capacitación espermática *in vitro* necesitan, aparte de un suplemento de fuente energética apropiada (lactato, piruvato) y de albúmina sérica, de al menos dos componentes en su composición, Ca^{++} y la razón $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$. El Ca^{++} es necesario no solamente para la reacción acrosómica (Barros, 1974; Fraser, 1982) sino también para la expresión de la motilidad hiperactivada

del espermatozoide, parámetro considerado para la capacitación (Yanagimachi, 1981; Fraser y Ahuja, 1988).

En los espermatozoides no capacitados los niveles de Ca^{++} intracelular se mantienen bajos, tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide, debido a la presencia de una bomba Ca^{++} ATPasa, un transportador que intercambia Na^+ por Ca^{++} y un sistema intercambiador de $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$, todos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide (Breitbart y cols., 1984; 1985; Bradley y Forrester, 1980; Rigoni y cols., 1987; Roldan y Fleming, 1989). También podrían participar en la mantención de estos niveles bajos el almacenamiento de Ca^{++} en las mitocondrias (Irvine y Aitken, 1986) o relacionarse con los niveles de calmodulina (Noland y cols., 1985). Es claro que los niveles de calcio intracelular aumentan durante la capacitación (Coronel y Lardy, 1987; Baldi y cols., 1991).

Por otro lado, la razón $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ causa rápidos cambios en la arquitectura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide (Shi y Roldan, 1995; Harrison y cols., 1996). Estos cambios están asociados con la desestabilización de la membrana plasmática que eventualmente llevan a la reacción acrosómica. Por lo tanto, actualmente al estado capacitado se le considera una ventana de la desestabilización en la cual el espermatozoide al interactuar con la zona pelúcida es inducido a sufrir la reacción acrosómica

(Harrison, 1996). Si un espermatozoide no encontrara al ovocito y prosigue su desestabilización, ocurrirá la reacción acrosómica espontánea y con el tiempo una desestabilización total de la membrana y la muerte celular.

B. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA ZONA PELÚCIDA

La zona pelúcida es la cubierta glicoproteica que rodea al ovocito y al cigoto durante su paso por el oviducto antes de implantarse en el útero. Se le adjudican varias funciones, como por ejemplo el constituir la última barrera que debe enfrentar el espermatozoide fecundante (Yanagimachi, 1994), impidiendo la poliespermia (Austin y Braden, 1956) y determinando en la mayoría de los mamíferos la barrera para la especificidad de especie (Yanagimachi, 1994). También se le atribuye la protección contra el daño físico (Nichols y Gardner, 1989) y el impedir que los blastómeros se disgreguen o se adhieran varios cigotos (Edwards, 1964) o que el embrión se adhiera e implante en el oviducto (Tarkowski, 1959; Bronson y McLaren, 1970).

La zona pelúcida se forma durante la ovogénesis y sus constituyentes son depositados entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean (Lee y Dunbar, 1993). En los roedores, las glicoproteínas que conforman la zona pelúcida son expresadas exclusivamente por el ovocito, pero en otros mamíferos

(conejo y cerdo) estas son expresadas tanto por el ovocito como por las células de la granulosa. Diversos análisis moleculares han demostrado que las proteínas de la zona pelúcida y sus respectivos mRNA se encuentran dentro de ovocitos de folículos primordiales en ovarios de conejos de 2 semanas de edad, indicando que estas se sintetizan muy temprano durante la ovogénesis (Dunbar y cols., 1994).

Se ha demostrado en ratón, rata, hámster, conejo, caballo y humano que la zona pelúcida está formada por tres familias diferentes de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassarman, 1980; Greve y Wassarman, 1985; Araki y cols., 1992; Ahuja y Bolwell, 1983; Dunbar y cols., 1980; Miller y cols., 1992; Sacco y cols., 1989). Durante el proceso de fecundación, la interacción inicial entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito es mediado por un ligando espermático en la zona pelúcida, la glicoproteína ZP3 (Wassarman, 1988). Este ligando espermático juega un papel muy importante en los primeros pasos de la interacción gamética, pues permite la unión primaria del espermatozoide al ovocito y es la molécula responsable de la inducción de la reacción acrosómica. Por otro lado, ZP2 ha sido implicada como ligando espermático secundario, que une al espermatozoide a la zona pelúcida después de haber sufrido la reacción acrosómica (Bleil y cols., 1988).

C. UNIÓN PRIMARIA DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELUCIDA.

Los espermatozoides de mamífero se unen fuertemente a la zona pelúcida antes de penetrarla e inclusive antes de haber sufrido la reacción acrosómica. Esta interacción es debida a moléculas de adhesión de la membrana plasmática del espermatozoide y ligandos en la zona pelúcida. Muchas evidencias existen sobre moléculas espermáticas con capacidad de unión a la zona pelúcida (Gwatkin y Williams, 1977). Estos autores realizaron un ensayo *in vitro* con espermatozoides capacitados de hámster preincubados con zonas pelúcidas solubilizadas, y observaron que estos eran incapaces de unirse a la superficie de zonas pelúcidas intactas sin afectar su motilidad. Actualmente se ha demostrado que ZP3 en ratón (y la proteína homóloga en las otras especies) es el ligando primario que se une específicamente a la superficie de la membrana plasmática sobre el acrosoma de espermatozoides no reaccionados (Bleil y Wassarman, 1988; Vásquez y cols., 1989). La capacidad de unión de ZP3 esta asociada sólo a sus residuos glicosídicos (Florman y cols., 1984; Wassarman, 1987). Otra característica importante de ZP3 es que es la molécula responsable de la inducción de la reacción acrosómica (Florman y Wassarman 1985; Wassarman, 1990), pero siendo en este caso la porción aminoacídica la responsable de esta actividad (Vásquez y cols., 1989).

Se han descrito muchas proteínas espermáticas como candidatos en esta interacción inicial con la zona pelúcida, aunque para ninguna de ellas existen evidencias claras de esta interacción. Así por ejemplo, se tiene a la α -1,4-galactosil transferasa que uniría residuos oligosacáridos de la ZP3 (Miller y cols., 1993) o autoantígenos espermáticos como la proteína Sp17 de conejo o sus homólogos en ratón y humano (Richardson y cols., 1994) o un grupo de proteínas espermáticas de bajo peso molecular (\sim 15 kDa), denominados "espermadesinas", que tienen capacidad de unión a la zona pelúcida (Calvete y cols., 1992; Töpfer-Petersen y cols., 1993). Por otro lado, en la rata se ha identificado al antígeno 2B1 como el ligando a la zona pelúcida (Jones y Jansen, 1993). El antígeno 2B1 se expresa postmeióticamente en el testículo como una glicoproteína de 60 kDa que se localiza en la membrana plasmática de las espermátidas redondas. Durante la elongación de las espermátidas, esta proteína es excluida de la cabeza del espermatozoide y se le observa solamente sobre la cola espermática. Durante la maduración del espermatozoide en la cola del epidídimo, la proteína 2B1 sufre un procesamiento endoproteolítico específico (Arg^{312}) para producir una proteína heterodimérica (de 40 y 19 kDa) unida por puentes disulfuro (Jones y cols., 1996). En este momento 2B1 es capaz de migrar hacia la membrana plasmática sobre el acrosoma. La proteína 2B1, también posee actividad hialuronidásica, sugiriendo que ésta podría ser otra proteína espermática bifuncional, con posibles

roles en la dispersión de la corona radiada y en la adhesión a la zona pelúcida (Hou y cols., 1996).

Estos resultados apoyan la hipótesis que de los antígenos espermáticos, que son importantes para las interacciones gaméticas, son sintetizados como precursores en el testículo o en las glándulas anexas. Estos serían adsorbidos durante la maduración epididimaria y luego activados o removidos durante la capacitación, asegurándose así que estas moléculas estén completamente funcionales en el sitio de la fecundación. Por otro lado, todas estas moléculas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide, al interactuar con la zona pelúcida, inician el proceso de interacciones gaméticas y permiten progresar al segundo paso de la fecundación: la inducción de la reacción acrosómica.

D. REACCION ACROSOMICA

La reacción acrosómica involucra la fusión en múltiples puntos entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, lo que permite la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio. Desde la primera demostración de la existencia de esta "vesiculación" en el hámster y conejo (Barros y cols., 1967), muchos investigadores lo han confirmado en estas y otras especies. La aposición de la membrana plasmática y la membrana acrosomal

externa subyacente ocurre en muchos puntos (Yanagimachi, 1994), lo que conlleva a que los múltiples poros formen un continuo y que dependiendo de la especie, se pierdan las pequeñas vesículas de membranas híbridas o que el espermatozoide se libere del capuchón acrosómico completo. Durante la reacción acrosómica el segmento ecuatorial del acrosoma no participa de esta vesiculación, ya que esta región es necesaria posteriormente para la fusión de membranas entre el espermatozoide y el ovocito (Barros y cols., 1967; Barros y Franklin, 1968).

D.1. Inducción de la reacción acrosómica *in vivo*.

La inducción de la reacción acrosómica por la zona pelúcida del ovocito fue propuesta originalmente en el espermatozoide de hámster (Franklin y cols., 1970) y con posterioridad en el ratón (Bleil y Wassarman, 1983; Florman y Wassarman, 1985). Se la ha relacionado con la interacción de proteínas de la membrana plasmática de la región acrosómica del espermatozoide con una de las glicoproteínas de la zona pelúcida, ZP3 (Bleil y Wassarman, 1983; Florman y Wassarman, 1985). En esta unión participaría una proteína espermática de 95 kDa, denominado ZRK ("zona receptor kinase"), que ha sido identificada como el posible receptor espermático en la interacción con la zona pelúcida (Leyton y Saling, 1989). Esta proteína presenta actividad tirosina quinasa y su contenido en

fosforilación en tirosina aumenta después que el espermatozoide interacciona con la zona pelúcida (Leyton y cols., 1992). La participación de esta proteína se ve apoyada por el hecho de que inhibidores de tirosina quinasas interfieren con la reacción acrosómica e inhiben la fecundación (Leyton y cols., 1992). Además, esta proteína ha sido encontrada en membranas de espermatozoides humanos y posee las mismas propiedades que su homóloga de ratón (Naz y Ahmad, 1991).

D.2. Participación de proteínas reguladoras durante la reacción acrosómica.

La presencia de proteínas reguladoras que unen GTP, o proteínas G, ha sido demostrada en espermatozoides de distintas especies; los subtipos preponderantes de proteína G son G_i y G_z , no encontrándose la presencia de G_s (Kopf y cols., 1986). En el espermatozoide de ratón la proteína G_i esta localizada en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa (Kopf y Gerton, 1991) y un potente inactivador de esta proteína, la toxina de *Bordetella pertussis*, es un potente inhibidor de la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida (Endo y cols., 1987; 1988). Los cambios en el pH y niveles de Ca^{++} intracelular que preceden la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida, también se ven bloqueados por la toxina pertussis, sugiriendo que la proteína G_i espermática estaría involucrada en la regulación de estos cambios iónicos (Kopf y Gerton, 1991). Además, se ha demostrado que zonas pelúcidas solubilizadas

activan proteínas G_i de membranas espermáticas de ratón. Esta activación es específica (Ward y cols., 1992; Wilde y cols., 1992) y selectiva para dos subtipos de proteínas G_i , G_{i1} y G_{i2} , pero no G_{i3} (Ward y cols., 1994).

La participación de la proteína quinasa C (PK-C) en la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida ha sido demostrado al usar activadores específicos de esta proteína quinasa, como son los ésteres de forbol y el diacilglicerol (Lee y cols., 1987). El calcio intracelular, activador de PK-C, juega un papel muy importante en la inducción de la reacción acrosómica por parte de la zona pelúcida. El aumento de los niveles de $[Ca^{++}]_i$, detectado con una sonda fluorescente para calcio fluo-3 (Minta y cols., 1989), es inhibido por tres inhibidores distintos de la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida (Storey, 1995).

D.3. Modelos del mecanismo molecular de la reacción acrosómica.

Existen varias evidencias y modelos de los eventos moleculares que llevan a un espermatozoide a sufrir la reacción acrosómica. Dos modelos que tratan de explicar el mecanismo molecular de la reacción acrosómica serán descritos aquí. El primero considera que un espermatozoide no capacitado e incapaz de sufrir la reacción acrosómica presenta altas concentraciones de colesterol en su

membrana, lo que la hace poco fluída. Además, presenta un factor descapacitante que ancla a los receptores para ZP3 en la membrana. Cuando un espermatozoide se ha capacitado su membrana se vuelve más fluída, debido a la pérdida de colesterol y la remoción de factores descapacitantes, lo que le permite a los receptores para ZP3 moverse libremente por la membrana. Al unirse el espermatozoide a la zona pelúcida, ZP3 se uniría a sus receptores causando la agregación y activación de éstos (Leyton y Saling, 1989). Los receptores activados gatillarían una respuesta intracelular a través de proteínas tirosina quinasas que llevan finalmente a la reacción acrosómica.

El segundo modelo involucra la participación de proteínas G en donde el receptor a ZP3 activado (aún no identificado) estimularía, a través de la proteína G, a la fosfolipasa C en la membrana espermática. La fosfolipasa C hidroliza fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) en diacilglicerol y fosfatidilinositol trifosfato (IP₃). Por un lado, IP₃ incrementaría las concentraciones de [Ca⁺⁺]_i, liberándolo desde depósitos intracelulares. El aumento del [Ca⁺⁺]_i y el diacilglicerol permitirían la activación de la PK-C. Parte del IP₃ formado es convertido en IP₄, lo que regularía la apertura de canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltaje (Florman y cols., 1992) y permitiría la entrada de grandes cantidades de calcio extracelular. Por otro lado, la proteína G activada originalmente, también estimularía a la fosfolipasa A2 la cual hidroliza fosfatidilcolina en lisofosfatidilcolina y ácido

araquidónico, ambos de características fusogénicas (Flemming y Yanagimachi, 1981; 1984).

Sin embargo, ya que la reacción acrosómica es un evento que ocurre rápidamente, es posible que los espermatozoides utilicen un sistema menos complejo de transducción de señales que las células somáticas o que estos dos modelos presentados podrían actuar en conjunto de manera de garantizar que la reacción acrosómica ocurra en el lugar y el tiempo apropiado. En resumen, los datos disponibles sugieren que durante la reacción acrosómica existe la participación de un sistema de transducción de señales que involucra: a) la activación de uno o más tipos de receptores para una glicoproteína de la zona pelúcida, ZP3; b) la activación de una proteína G_i ; c) la inducción de actividad tirosina quinasa; d) el aumento en los niveles intracelulares de diacilglicerol; e) el aumento en los niveles de calcio intracelular; y f) la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa.

D.4. El espermatozoide reaccionado pierde la capacidad de unión primaria pero aún así se mantiene unido a la zona pelúcida.

El espermatozoide después de sufrir la reacción acrosómica se desprende del capuchón acrosómico (Franklin y cols., 1970) y eventualmente queda libre de toda unión con la zona pelúcida. Sin embargo, después de ocurrida la reacción

acrosómica el espermatozoide se mantiene unido a la zona pelúcida mediante un sistema de unión secundaria. En ratón, ZP2 actúa como la molécula de unión secundaria a la zona pelúcida (Bleil y cols., 1988). La naturaleza de su ligando complementario en el espermatozoide es aún discutida, pero existen una serie de evidencias que indican que el sistema proacrosina/acrosina estaría involucrado. Primero, estas proteínas (pro-, α - y β -acrosina) presentan una gran afinidad por las glicoproteínas de la zona pelúcida (Jones y Brown, 1987; Jones, 1991; Urch y Patel, 1991). Segundo, inhibidores de serina proteasas bloquean la fecundación *in vitro* (Stambaugh y cols., 1969; Saling, 1981) e impiden la penetración espermática a través de la zona pelúcida (Fraser, 1982; Liu y Baker, 1993). Tercero, anticuerpos monoclonales anti-acrosina bloquean la penetración espermática de la zona pelúcida (De Ioannes y cols., 1990). Estos anticuerpos, permiten la unión primaria del espermatozoide y la digestión inicial de la zona pelúcida (evidenciado por la presencia de capuchones acrosómicos y muescas sobre la zona pelúcida), más no la penetración. Cuarto, el sistema proacrosina/acrosina ha sido inmunolocalizado en varios espermatozoides reaccionados de mamífero (Capote y cols., 1991; Barros y cols., 1992; Valdivia y cols., 1994).

E. SISTEMA PROACROSINA / ACROSINA

Acrosina (EC 3.4.21.10) es la principal proteasa presente en el acrosoma de los espermatozoides de mamífero. Se encuentra como zimógeno inactivo y por autoactivación se transforma en acrosina activa durante la reacción acrosómica (Baba y cols., 1989a). Es una serina proteasa con una especificidad del tipo tripsina, sin embargo, cuando se la compara con el resto de las serino proteasas, presenta características estructurales diferentes, lo que podría estar relacionado con su función en la fecundación (Hedrick y cols., 1988).

Se ha aislado el cDNA de proacrosina de varios mamíferos y de la secuencia deducida de aminoácidos se ha elaborado un modelo general de su estructura (Baba y cols., 1989a; 1989b; Adham y cols., 1989; Adham y cols., 1990; Klemm y cols., 1991; Engel y cols., 1993). La molécula de proacrosina presenta tres dominios principales: el dominio zimógeno, el catalítico y el carboxilo terminal (Figura 1). El dominio zimógeno de proacrosina de cerdo esta compuesto por el péptido señal (16 aminoácidos) y por la cadena liviana (23 aminoácidos). Los dominios catalítico (263 aminoácidos) y carboxilo terminal (113 aminoácidos) forman la cadena pesada de la molécula de proacrosina de cerdo. El dominio catalítico contiene los aminoácidos del sitio activo, His⁷⁰,

Asp¹²⁴ y Ser²²² y el dominio carboxilo terminal es particularmente rico en prolina (34%). Además, la molécula presenta dos sitios de posible N-glicosilación, Asn³ y Asn¹⁹², y doce cisteínas responsables de su plegamiento. Dos puentes disulfuro, formados por Cys¹⁰ y Cys⁶ de la cadena liviana y Cys¹³⁶ y Cys¹⁴³ de la cadena pesada, son los responsables de mantener unidas ambas cadenas de la molécula después de su activación.

En resumen, proacrosina (55 kDa) está presente en el acrosoma como una glicoproteína de una sola cadena y que después de ocurrida la reacción acrosómica se autoactiva por un solo sitio de corte en el enlace peptídico entre Arg²³ y Val²⁴. Esto resulta en la formación de una glicoproteína de dos cadenas polipeptídicas unidas por dos puentes disulfuro, llamada α -acrosina (55 kDa; Engel y cols., 1993). Posteriormente, α -acrosina sufre 2 a 3 cortes en su extremo carboxilo terminal generándose una proteína denominada β -acrosina (38 kDa) (Töpfer-Petersen y cols., 1990; Engel y cols., 1993). Se han sugerido dos funciones para acrosina durante la fecundación: participar en la unión secundaria a la zona pelúcida y facilitar enzimáticamente el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

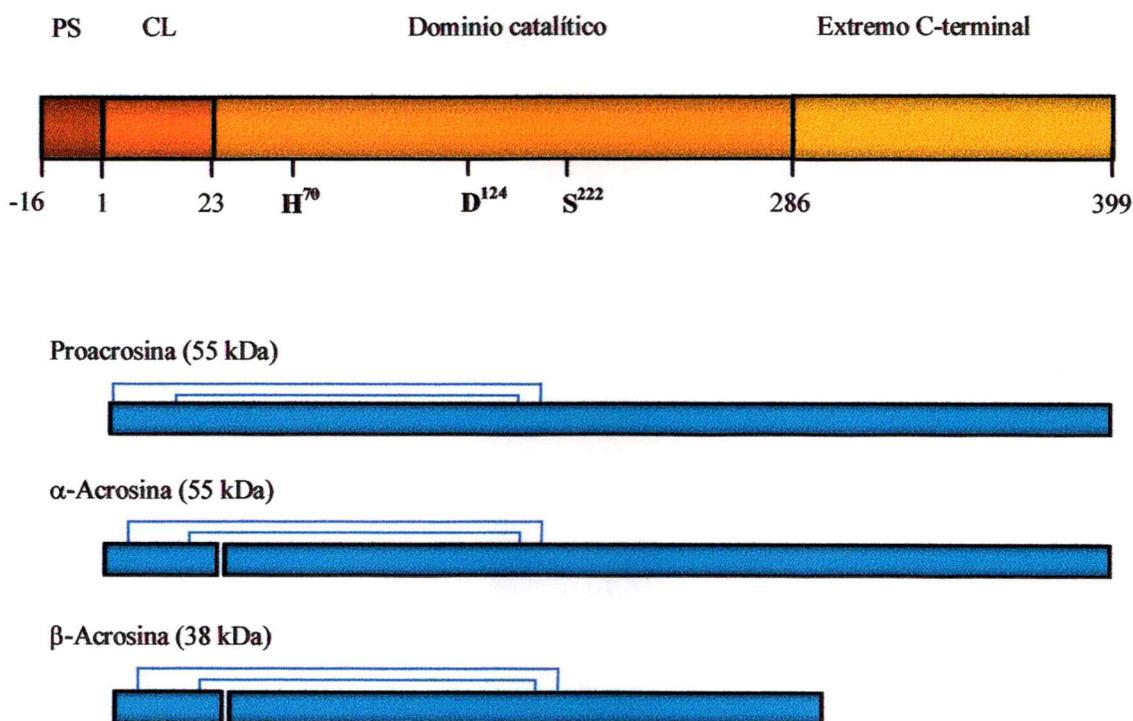


Figura 1. Esquema que representa el modelo de la estructura proteica del sistema proacrosina/acrosina. Este modelo está basado en la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína de proacrosina, en donde se representa al péptido señal (PS), la cadena liviana (CL) y a la cadena pesada (formada por el dominio catalítico y el extremo carboxilo terminal), los números indicando los aminoácidos. Además se indica en negrita a la triada catalítica, formada por los aminoácidos H⁷⁰, D¹²⁴ y S²²². En la parte inferior, en celeste, se muestran las proteínas proacrosina (55 kDa), α-acrosina (55 kDa) y β-acrosina (38 kDa), en donde la cadena liviana y pesada permanecen unidas por los aminoácidos C⁶ y C¹⁰ de la cadena liviana y C¹⁴³ y C¹³⁶ de la cadena pesada.

F. UNION SECUNDARIA A LA ZONA PELUCIDA

F.1. Participación del sistema proacrosina/acrosina.

Después de inducida la reacción acrosómica, parte de proacrosina es liberada desde el acrosoma uniéndose a la superficie de la zona pelúcida (Kopecný y Flechon, 1987; Tesarik y cols., 1988), otra parte permanece en el capuchón acrosómico (Capote y cols., 1991; Barros y cols., 1992) y el resto permanece en la matriz acrosomal remanente sobre membrana acrosómica interna del espermatozoide (Srivastava y cols., 1974; Tesarik y cols., 1988; Tesarik y cols., 1990; Capote y cols., 1991; Barros y cols., 1992).

Se ha propuesto que el sistema proacrosina/acrosina presente sobre la membrana interna del acrosoma del espermatozoide mantendría unido al espermatozoide reaccionado sobre la zona pelúcida. Una evidencia que apoya este hecho, es que las tres formas de acrosina (pro-, α - y β -) tienen una fuerte capacidad de unión a la zona pelúcida (Jones, 1991; Urch y Patel, 1991). Por otro lado, existen espermatozoides de mamífero, como es el caso del cobayo, que se unen a la zona pelúcida después de ocurrida la reacción acrosómica (Huang y Yanagimachi, 1985) y por lo tanto carecen de membrana plasmática para realizar la unión primaria. Además, Kuzan y colaboradores (1984) encontraron que

espermatozoides perivitelinos de conejo eran capaces de fecundar ovocitos frescos. Estos espermatozoides se unen a la zona pelúcida a través de la matriz acrosomal remanente sobre la membrana acrosomal interna. Por lo tanto, este tipo de espermatozoides harían uso del sistema espermático de unión secundaria a la zona pelúcida del ovocito que ha sido asociado al sistema proacrosina/acrosina (Wassarman, 1992; Jones y Jansen, 1993; Valdivia y cols., 1994, Valdivia, 1996). Existen evidencias inmunocitoquímicas que apoyan este modelo, ya que se detectó la presencia del sistema proacrosina/acrosina en la matriz acrosomal remanente sobre la membrana acrosómica interna de espermatozoides reaccionados humanos, de cobayo (Capote y cols., 1991; Barros y cols., 1992), de conejo (Barros y cols., 1993b; Valdivia y cols., 1994), entre otros.

F.2. Mecanismo de la unión secundaria a la zona pelúcida.

Se ha demostrado que la interacción espermatozoide - zona pelúcida involucra interacciones entre carbohidratos y proteínas, ya que el uso de diversos azúcares inhibe esta unión en diferentes grados. Se ha propuesto que este proceso es esencialmente una interacción entre carbohidratos de ZP2 y proacrosina (Jones y cols., 1988). El mecanismo de unión involucra grupos sulfatados en las glicoproteínas de la zona pelúcida con una orientación

estereoquímica muy restringida (Jones, 1991). Fucoídano, un heteropolisacárido de fucosa sulfatada, inhibe la unión espermatozoide - zona pelúcida en diferentes mamíferos, a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Miller y Ax, 1990). Por lo tanto, fucosa sulfatada podría ser parte de la señal de reconocimiento de la interacción de gametos en humano y en otros mamíferos (Sepúlveda y cols., 1993; Moreno y cols., 1998). Estos resultados sugieren la presencia de un sitio de unión de polisulfatos en el espermatozoide y la presencia de glicoproteínas ricas en fucosa sulfatada en la zona pelúcida. Töpfer-Petersen (Töpfer-Petersen y Henschen, 1987; Töpfer-Petersen y cols., 1990) demostró que la proteína del espermatozoide que se une a columnas de afinidad de fucoídano corresponde a acrosina. Además, se ha propuesto que aminoácidos básicos en la superficie de la molécula de β -acrosina de cerdo son los responsables de la unión a ZPGPs (Jones, 1991; Urch y Patel, 1991). La participación de los aminoácidos básicos ha sido recientemente confirmada mediante modificaciones químicas de grupos específicos de aminoácidos básicos de proacrosina de cerdo (Jansen y cols., 1995). Al incubar proacrosina con fenilgloxal 10 mM o 2,3-butanodiona 100 mM (que modifica argininas), DEPC 5 mM (que modifica histidinas) o anhídrido citracónico 9 mM (que modifica lisinas) se inactivó cuantitativamente la capacidad de proacrosina de unirse a ^{125}I -ZPGPs. Los experimentos de protección, realizados por el mismo grupo, usando ZPGPs preunidas a proacrosina y luego incubando este complejo con los agentes modificadores,

confirmaron sus conclusiones, ya que no se logró desplazar la unión previa de las ZPGPs.

Recientemente, y junto con la realización de esta tesis, se han publicado tres trabajos que confirman la participación de β -acrosina de cerdo en la unión a ZPGPs. En el primero (Jansen y cols., 1995), mediante el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de β -acrosina de cerdo, se encontró que un fragmento que cubre los residuos 3 a 275, era capaz de unir a ^{125}I -ZPGPs al igual que la proteína nativa. Sin embargo, proteínas recombinantes de menor tamaño se unían en mucho menor proporción. En el segundo trabajo (Crosby y cols., 1998, que involucra parte de los resultados de esta tesis), se confirmó mediante la expresión de proteínas recombinantes que era necesaria la molécula completa de β -acrosina de cerdo para obtener unión a ZPGPs equivalente a la proteína nativa, más aún se demostró que la actividad catalítica de β -acrosina no forma parte de las condiciones necesarias para mantener la unión a ZPGPs. El tercer trabajo demostró por mutación sitio dirigida que dos grupos de aminoácidos que comprenden His⁴⁷, Arg⁵⁰ y Arg⁵¹ junto con Arg²⁵⁰, Lys²⁵² y Arg²⁵³ son cruciales para mantener la unión a las ZPGPs, ya que la delección o el reemplazo de estos aminoácidos básicos reduce severamente su afinidad (Jansen y cols., 1998). El modelaje molecular de proacrosina muestra que estos residuos están localizados en la superficie de la proteína y en dos asas expuestas que se proyectan sobre el sitio catalítico.

Otro grupo de investigadores también localizó en acrosina de conejo el supuesto sitio de unión a la zona pelúcida, mediante la expresión de varias proteínas recombinantes de β -acrosina (Richardson y O'Rand, 1996). Estos autores, expresaron una proteína recombinante de β -acrosina de conejo conteniendo solamente 48 aminoácidos, capaz de unir a ZPGPs con un 50,4 % del máximo de unión (Richardson y O'Rand, 1996). Usando mutación sitio dirigida, estos autores identificaron tres argininas ($\text{Arg}^{47, 50 \text{ y } 51}$) como residuos críticos para la unión a la zona pelúcida. Además, por modelaje de la proteína de β -acrosina de conejo, también se sugiere que estos residuos básicos se encuentran en la superficie de la molécula en un asa muy cercana al sitio catalítico. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que los sitios de unión a polisulfatos en proacrosina están formados por un restringido número de aminoácidos básicos en la superficie de la proteína, con una orientación específica que es complementaria a los grupos sulfato en las glicoproteínas de la zona pelúcida.

G. PENETRACIÓN ESPERMÁTICA DE LA ZONA PELUCIDA

En mamíferos el mecanismo de penetración espermática a través de la zona pelúcida aún no está totalmente claro. Por el contrario, en los

espermatozoides de las aves y algunos marsupiales, las enzimas acrosomales liberadas después de ocurrida la reacción acrosómica abren un hoyo en la zona pelúcida por donde los espermatozoides nadan libremente (Okamura y Nishiyama, 1978; Rodger y Bedford, 1982). En mamíferos parece ser mucho más complicado y se han propuesto dos mecanismos de penetración de la zona pelúcida: el mecánico y el enzimático.

G.1. Hipótesis mecánica.

La hipótesis mecánica propone que el espermatozoide es capaz de penetrar la zona pelúcida simplemente mediante su fuerza mecánica y que las enzimas acrosomales presentes no juegan ningún papel en este proceso. La única función de la reacción acrosómica, requisito indispensable para la penetración, es la de exponer el *perforatorium*. Esta estructura es simplemente la membrana acrosómica interna reforzada por el material subyacente rico en puentes disulfuro. El aguzado y puntiagudo perforatorium abre la zona pelúcida mientras el espermatozoide bate su cola vigorosamente. La fuerza de la motilidad espermática es el único requisito para la penetración a través de la zona pelúcida.

G.2. Hipótesis enzimática.

Por el contrario, en la hipótesis enzimática cada paso en la interacción de los gametos es dependiente de la actividad enzimática y la motilidad espermática es de menor importancia. Se ha propuesto que acrosina es la responsable de este proceso, ya que tiene propiedades únicas. Primero, acrosina hidroliza las glicoproteínas de la zona pelúcida de la misma manera que la tripsina, pero al contrario de la tripsina no destruye la estructura macroscópica de la zona pelúcida (Dunbar y cols., 1985; Brown y Cheng, 1985; Dunbar y cols., 1991) ni destruye los sitios de unión del espermatozoide a la zona pelúcida, por el contrario, aumenta la habilidad de unión de los espermatozoides a la zona pelúcida (Jones y cols., 1988). Segundo, los inhibidores de serino proteasas inhiben la fecundación *in vitro*, sin inhibir la unión primaria de los espermatozoides a la zona pelúcida, ni la reacción acrosómica, ni la proteólisis inicial de la zona pelúcida (De Ioannes y cols., 1990). Las huellas dejadas sobre la superficie de la zona pelúcida, vistas al microscopio electrónico de barrido, son evidencias adicionales que en presencia de inhibidores o anticuerpos anti-acrosina, los espermatozoides fueron incapaces de penetrar la zona pelúcida (De Ioannes y cols., 1990).

Por otro lado, se demostró que la autoconversión catalítica de proacrosina en la forma enzimáticamente activa, α -acrosina es disminuida por altas concentraciones de las glicoproteínas de la zona pelúcida (Töpfer-Petersen y Cechova, 1990). Por lo tanto, si el espermatozoide reaccionado se encuentra sobre o atravesando la zona pelúcida, proacrosina presente en la matriz acrosomal se convertiría progresiva y lentamente en α -acrosina. Esta forma enzimáticamente activa, α -acrosina, hidrolizaría la zona pelúcida (Urch y cols., 1985a; 1985b), abriendo camino para que el espermatozoide reaccionado pueda penetrar la zona pelúcida. La subsecuente activación de α -acrosina en β -acrosina, que aún es proteolíticamente activa, pero ahora carente del extremo carboxilo, liberaría a β -acrosina de la matriz acrosomal y permitiría al espermatozoide que estuvo unido a través de pro- y α -acrosina se suelte y prosiga avanzando a través del grosor de la zona pelúcida. Otras moléculas de proacrosina desde la matriz acrosomal continúan los mismos ciclos, y la penetración prosigue poco a poco hasta que alcanzaría el espacio perivitelino. Este es el principio del modelo llamado hipótesis de la unión - liberación (O'Rand y cols., 1986). En esta hipótesis, la motilidad espermática es considerada necesaria, pero el grado de motilidad no es importante. Mientras el espermatozoide sea mótil podría pasar a través de la zona pelúcida con la ayuda del sistema proacrosina/acrosina. Tomando todas estas evidencias, se sugiere

fuertemente que acrosina participaría en la unión secundaria y en la proteólisis de la zona pelúcida, para permitir el paso del espermatozoide a través de ella.

G.3. Evidencias en contra de la participación de acrosina en la penetración espermática a través de la zona pelúcida.

Evidencias contrarias a la participación de acrosina en la penetración espermática provienen de dos trabajos donde se generaron ratones transgénicos produciendo una mutación para el gen de proacrosina (Baba y cols., 1994; Adham y cols., 1997). Los machos homocigotos para esta mutación en experimentos de cruce natural son totalmente fértiles. Sin embargo, en los ensayos de fecundación *in vitro*, la penetración espermática tomó 30 minutos más que los controles (Baba y cols., 1994). Estos autores, concluyeron que acrosina no era esencial para la fecundación. Sin embargo, en experimentos donde se pusieron a competir espermatozoides provenientes de machos homocigotos para la mutación con espermatozoides de machos normales, todos los ovocitos fecundados provenían de estos últimos (Adham y cols., 1997). Esto permite concluir que proacrosina en espermatozoides de ratón no es indispensable para la unión de los gametos y la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, pero su presencia le confiere a los espermatozoides una ventaja significativa en el proceso de la fecundación. Estas evidencias por lo tanto, no excluyen la participación del sistema proacrosina/acrosina durante una

fecundación normal. Uno esperaría que un fenómeno tan crucial para los mamíferos, como es la fecundación, debería estar protegido con mecanismos paralelos.

Por lo tanto, debido que aún no existe un mecanismo definido para la unión del espermatozoide reaccionado a la zona pelúcida durante el proceso de fecundación en mamíferos, resulta interesante estudiar la caracterización a nivel molecular del sistema de unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida.

HIPOTESIS DE LA TESIS

La hipótesis de trabajo considera que en el proceso de fecundación en mamíferos, la acrosina participa en la unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es estudiar la participación de acrosina recombinante de cerdo en la unión secundaria a la zona pelúcida y determinar las regiones de esta proteína que son necesarias para esta función.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Subclonar el cDNA de β -acrosina de cerdo en el vector de expresión procarionte y expresar en bacterias ésta proteína recombinante así como una proteína mutada y tres proteínas truncas derivados de este cDNA.
2. - Determinar la capacidad de unión *in vitro* de las proteínas recombinantes de β -acrosina a las glicoproteínas de la zona pelúcida y a la zona pelúcida intacta.

3. - Determinar si las proteínas recombinantes de β -acrosina tienen la capacidad de competir con el espermatozoide fecundante, por la unión secundaria a la zona pelúcida durante ensayos de fecundación *in vitro*.

4. - Determinar la especie - especificidad de las proteínas recombinantes de cerdo en la penetración de espermatozoides humanos a través de zonas pelúcidas cadavéricas humanas.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS

De *Sigma Chemicals Co.*, se obtuvo Trombina, EDTA, DEPC, MOPS, BAEE, Percol, Sigmacote, Triton X-100, Hoescht, BSA, HSA, MgCl₂, NaCl, aceite mineral, citrato y acetato de sodio.

De *Amersham Int.* se obtuvo la emulsión autoradiográfica Hypercoat LM-1[®].

De *Fluka Biochemica*, se obtuvo isopropanol, D-(+)-sacarosa.

De *Merck*, se obtuvo ácido bórico, NaOH, acetona, ácido acético glacial, etanol absoluto, cloruro de magnesio.

De *Life Technologies*, se obtuvo acrilamida, persulfato de amonio, agarosa, urea, Tris, TEMED, proteinasa K, los medios de cultivo HTF y TCM 199[®], los kit para marcación del DNA por el método del "Random Primer Labelling System"[®] y para el de secuenciación de DNA "dsDNA Cycle Sequencing System"[®].

De *Pharmacia*, se obtuvo la resina Glutathion Sepharose[®].

De *Pierce Chem. Co.* Se obtuvo Iodogen[®].

De *FMC BioProducts*, se obtuvo agarosa SEAKEM GTG[®] (N° 50072), SEAKEM ME[®] (N° 50012) y NUSIEVE GTG[®].

De *Promega. Inc.*, se obtuvo *Taq* DNA polimerasa, fosfatasa alcalina de ternera (CIP[®]), T4 DNA Ligasa[®], desoxinucleótidos dATP, dGTP, dTTP, dCTP y los kit para transcripción reversa "AMV-RT"[®], para la purificación de

DNA "Wizard™ PCR Preps Purification Systems"® y para Western blot "ProtoBlot II AP system"®.

De *Bio-Rad Laboratories*, se obtuvo la bisacrilamida y el SDS.

De *Schleicher & Schuell*, se obtuvo la membrana Nytran de 0,45 µ.

De *Stratagene*, se obtuvo el bromuro de etidio.

De *New England Biolabs*, se obtuvieron las endonucleasas de restricción *Hinf* I, *Hin* DIII, *Bam* HI, *Nar* I, *Alw*n I, los vectores Lambda y pBR322, T₄ polinucleótido quinasa.

De *Whatman Ltd.*, se obtuvo papel filtro número 3.

De *DuPont*, se obtuvo película autorradiográfica Reflection NEF-495™ de 20,3×25,4 cm. y 35,6×43,2 cm., Na[¹²⁵I], [³²P]ATP con una actividad específica de 6000 Ci/mmol y [³²P]dATP de actividad específica 3000 Ci/mmol.

De *Polaroid*, se obtuvo película instantánea en blanco y negro tipo 667.

En el centro de síntesis y análisis de biomoléculas *Oligopéptido* del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se sintetizaron los oligonucleótidos usados como partidores para amplificar por PCR y secuenciar.

B. OLIGONUCLEOTIDOS

Se diseñaron doce partidores de acuerdo a la secuencia nucleotídica de cerdo según Adham y cols. (1989) y Baba y cols. (1989a). Los partidores P1, P2, P3, P4, P5 y P6 se crearon con el fin de poder subclonar diferentes fragmentos del gen, por lo que presentan en uno de sus extremos, sitios de restricción para la enzima Bam HI. Los partidores M1 y M2 fueron diseñados con una mutación que genera un cambio en el codón 222 del cDNA, reemplazando la serina del sitio catalítico por una alanina. Esta mutación se generará con el fin de eliminar la actividad proteásica de acrosina. Los oligonucleótidos P8, P9, P10, P13 se crearon para ser utilizados como partidores de secuenciación. En la Tabla 2 se describe cada uno de los partidores indicando su secuencia, T_m, tamaño y ubicación, además en la Figura 2 se puede apreciar donde se ubican estos partidores en la secuencia del DNA complementario de proacrosina. Se diseñaron estos partidores para generar cinco fragmentos de DNA de proacrosina, los cuales se muestran en la Tabla 3.

	Tamaño	Ubicación
Partidor P1: Tm = 62°C 5' TAT GGATCC GCC AGA GAT AAC GCC ACG TC 3'	28mer	-3 a 16
Partidor P2: Tm = 62°C 5' AATT GGATCC TTA ACC AAT CTT GGA AGC AAT CCA 3'	34mer	816 a 796
Partidor P3: Tm = 60°C 5' TAT GGATCC ATG CGT GTG GTT GGC GGC 3'	27mer	63 a 81
Partidor P4: Tm = 62°C 5' TAT GGATCC AGA ACT GCC CGC CTC CTG A 3'	28mer	1200 a 1181
Partidor P5: Tm = 60°C 5' AG ATT GGATCC AAT GCC TTG CAG 3'	23mer	810 a 833
Partidor P6: Tm = 66°C 5' TATA GGATCC ATG CTG CCA ACT GCC GTT CTG 3'	31mer	-48 a -28
Partidor P8: Tm = 60°C 5' CGC ACT GGG TGC TCA CTG 3'	18mer	185 a 202
Partidor P9: Tm = 60°C 5' GGC TGC CTG CCC CAG TTT 3'	18mer	427 a 444
Partidor P10: Tm = 60°C 5' CCT GGA CCC TCC CAG CAA 3'	18mer	926 a 943
Partidor P13: Tm=70°C 5' TAT GGA TCC TCA GCG GGA CCC AGG TTG CTG 3'	30 mer	1024 a 1041
Partidor M1: Tm = 60°C 5' GGG GAC GCC GGC GGG CCT 3'	18mer	627 a 675
Partidor M2: Tm=66°C 5' AGG CCC GCC GCT GTC CCC 3'	18 mer	675 a 627

TABLA 2. Partidores utilizados en la amplificación de los distintos fragmentos de β -acrosina de cerdo. Se indica la secuencia, Tm, tamaño y ubicación dentro del cDNA de proacrosina.

Partidor en sentido	Partidor antisentido	Tamaño del fragmento	Fragmento de DNA de:
P1	P4	1203 pb	Proacrosina
P1	P2	819 pb	β -acrosina
P3	P2	754 pb	Cadena pesada de β -acrosina
M2	P2	190 pb	Extremo 3' de β -acrosina con la mutación Ser/Ala ²²²
P1	M1	674 pb	Extremo 5' de β -acrosina con la mutación Ser/Ala ²²²

TABLA 3. Estrategia de uso de los distintos partidores para generar los fragmentos de β -acrosina de cerdo. Se indica la pareja de partidores usados para generar un determinado fragmento y su tamaño en pares de bases.

ATG CTG CCA ACT GCC GTT CTG CTG GTC CTG GCA GTG TCT GTG GCG GCC AGA GAT AAC GCC	12
<i>Met Leu Pro Thr Ala Val Leu Leu Val Leu Ala Val Ser Val Ala Ala Arg Asp Asn Ala</i>	4
-----Partidor P6-----	
ACG TGT GAT GGC CCC TGC GGG TTA CGG TTC AGG CAG AAA TTA GAG TCA GGC ATG CGT GTG GTT	75
Thr Cys Asp Gly Pro Cys Gly Leu Arg Phe Arg Gln Lys Leu Glu Ser Gly Met Arg Val Val	25

GGC GGC ATG AGT GCA GAA CCG GGC GCC TGG CCC TGG ATG GTC AGC CTC CAG ATC TTT ATG TAC	138
Gly Gly Met Ser Ala Glu Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Val Ser Leu Gln Ile Phe Met Tyr	46
P3-----	
CAC AAC AAC CGG AGG TAC CAC ACG TGC GGG GGC ATC TTG CTG AAC TCG CAC TGG GTG CTC ACT	201
His Asn Asn Arg Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Ile Leu Leu Asn Ser His Trp Val Leu Tyr	67
-----Partidor P8-----	
GCT GCT CAC TGC TTC AAG AAC AAA AAA AAA GTT ACT GAC TGG AGA CTG ATT TTC GGA GCA AAC	264
Ala Ala His Cys Phe Lys Asn Lys Lys Lys Val Thr Asp Trp Arg Leu Ile Phe Gly Ala Asn	88
-	
GAA GTT GTG TGG GGA AGC AAT AAG CCG GTG AAG CCA CCC CTG CAG CAG AGA TTT GTT GAG GAG	327
Glu Val Val Trp Gly Ser Asn Lys Pro Val Lys Pro Pro Leu Gln Gln Arg Phe Val Glu Glu	109
ATC ATC ATT CAT GAA AAA TAC GTT TCA GGG TTA GAG ATA AAT GAC ATT GCT CTC ATA AAG ATC	390
Ile Ile Ile His Glu Lys Tyr Val Ser Gly Leu Glu Ile Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ile	130
ACC CCT CCT GTT CCA TGC GGG CCC TTC ATC GGA CCA GGC TGC CTG CCC CAG TTT AAG GCA GGC	453
Thr Pro Pro Val Pro Cys Gly Pro Phe Ile Gly Pro Gly Cys Leu Pro Gln Phe Lys Ala Gly	151
-----Partidor P9-----	
CCG CCC AGA GCG CCC CAG ACA TGC TGG GTG ACT GGC TGG GGC TAC TTA AAA GAG AAA GGC CCC	516
Pro Pro Arg Ala Pro Gln Thr Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Pro	172
AGG ACG TCA CCT ACA CTG CAG GAG GCA CGT GTG GCC CTC ATC GAC CTC GAA TTA TGT AAC TCG	579
Arg Thr Ser Pro Thr Leu Gln Glu Ala Arg Val Ala Leu Ile Asp Leu Glu Leu Cys Asn Ser	193
ACC CGC TGG TAC AAT GGG CGA ATT CGT TCA ACT AAT GTG TGC GCA GGG TAT CCT AGA GGC AAG	642
Thr Arg Trp Tyr Asn Gly Arg Ile Arg Ser Thr Asn Val Cys Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Lys	214

Figura 2. Ubicación de los partidores en la secuencia del cDNA de proacrosina de cerdo. Las líneas discontinuas representan los distintos partidores. Los aminoácidos en cursiva definen al péptido señal de la preproenzima y los aminoácidos en negrita indican a la triada catalítica del sitio activo. Los números a la derecha de la secuencia indican las posiciones de los nucleótidos y aminoácidos.

ATT GAC ACC TGC CAG GGG GAC AGC GGC GGG CCT CTC ATG TGC AGA GAC AGA GCG GAA AAC ACC	705
Ile Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Arg Asp Arg Ala Glu Asn Thr	235
-----Partidor M1 -----	
-----Partidor M2 -----	
TTT GTG GTC GTG GGC ATC ACA AGC TGG GGG GTA GGC TGC GCC CGA GCT AAG CGC CCT GGA GTC	768
Phe Val Val Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Val Gly Cys Ala Arg Ala Lys Arg Pro Gly Val	256
TAC ACG TCT ACC TGG CCC TAT CTG AAC TGG ATT GCT TCC AAG ATT GGT TCT AAT GCC TTG CAG	831
Tyr Thr Ser Thr Trp Pro Tyr Leu Asn Trp Ile Ala Ser Lys Ile Gly Ser Asn Ala Leu Gln	277
-----Partidor P2 -----	
-----Partidor P5 -----	
ATG GTT CAA CTG GGC ACC CCT CCC CGT CCT TCT ACT CCA GCA CCC CCT GTC AGA CCC CCC TCT	894
Met Val Gln Leu Gly Thr Pro Pro Arg Pro Ser Thr Pro Ala Pro Pro Val Arg Pro Pro Ser	298
GTT CAG ACT CCT GTT CGC CCA CCT TGG TAC TTC CAA CGC CCT CCT GGA CCC TCC CAG CAA CCT	957
Val Gln Thr Pro Val Arg Pro Pro Trp Tyr Phe Gln Arg Pro Pro Gly Pro Ser Gln Gln Pro	319
-----Partidor P10 -----	
GGG TCC CGC CCC CGC CCC CCA GCT CCC CCC CCT CCC CCG CCC CCC CCG CCC CCC CCA CCC CCA	1020
Gly Ser Arg Pro Arg Pro Pro Ala Pro	340
Partidor P13 --	
CCG CCT CCA CCA CCC CCA CCC CCA CCC CCA CAG CAA GTT TCC GCT AAA CCT CCC CAA GCA CTT	1083
Por Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Val Ser Ala Lys Pro Pro Gln Ala Leu	361
TCC TTT GCC AAG CGA CTG CAG CAG CTC ATA GAG GCC CTG AAG GGG ACG GCA TTC TCT AGT GGA	1146
Ser Phe Ala Lys Arg Leu Gln Gln Leu Ile Glu Ala Leu Lys Gly Thr Ala Phe Ser Ser Gly	382
AGG AGC TAT TAT GAA ACG GAG ACC ACA GAC CTC CAA GAA CTG CCC GCC TCC TGA	1200
Arg Ser Tyr Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Asp Leu Gln Glu Leu Pro Ala Ser Stop	399
-----Partidor P4 -----	

Figura 2. (continuación).

C. EXTRACCION Y ANALISIS DE RNA TOTAL

C.1. Extracción de RNA total. Se toma el testículo de cerdo recién sacrificado y con la ayuda de un bisturí se retira la túnica albuginea y la capa externa del tejido. Se cortan trozos de tejido de aproximadamente 1 mm^3 , se depositan en tubos de 1,5 ml y se congelan directamente en Nitrógeno líquido. Luego de esto, el tubo se guarda en un congelador a -80°C .

Se aisló el RNA total según Chomczynski & Sacchi (1987) que consiste en lo siguiente. Se colocan 100 mg de tejido de testículo congelado en 1 ml de Solución D (tiocianato de guanidinio 4 M, sarcosyl 0,5 %, β -mercaptoetanol 100 mM, citrato de sodio 25 mM, pH 7.0 en agua DEPC) en una placa de Petri y con la ayuda de dos bisturíes se troza fino. Se homogeniza el tejido en un homogenizador Potter y se alicuotan 500 μl en tubos de 1,5 ml a los cuales se agrega secuencialmente mezclando por inversión: 50 μl de acetato de sodio 2 M, 500 μl de fenol saturado en agua DEPC y 100 μl de cloroformo:isoamílico (49:1). Se mezcla en un vortex por 10 segundos y se coloca en hielo por 15 min. Se centrifuga a 10.000 xg por 20 min a 4°C y la fase acuosa superior se transfiere a un tubo limpio. Se agrega 0,5 ml de isopropanol, se mezcla y se incuba a -20°C por 45 min. Se centrifuga a 10.000 xg por 15 min, se descarta el isopropanol y se lava el precipitado con etanol 75%. Se seca el precipitado 5 min al aire y se resuspende en

0,3 ml de Solución D. Se agrega 0,3 ml de isopropanol e incuba por 45 min a -20°C. Se centrifuga a 10.000 xg por 15 min, se lava el precipitado con etanol 75% (frío), se seca y resuspende en 20 a 50 µl de agua DEPC. El RNA se almacena a -80°C.

C.2. Análisis por electroforesis del RNA. El RNA extraído del testículo se analiza por electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepara un gel de agarosa 0,8% que contiene formaldehído al 17,5% en tampón MOPS (MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH8,0). La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 25 V por 16 horas o 50 V por 3 horas. El RNA se visualiza en un transiluminador UV.

C.3. Análisis por Northern. Se realiza una electroforesis con 10 µg de RNA total en un gel de formaldehído agarosa al 0,8%. Una vez realizada la electroforesis el RNA se transfiere a una membrana de nylon utilizando el tampón SSC 10X (NaCl 0,2 M, citrato de sodio 0,2 M, pH 7,0) toda la noche. Una vez transferida la muestra, la membrana se lava en tampón SSC 2X (NaCl 30 mM, citrato de sodio 30 mM, pH 7,0) y luego se fija el RNA a la membrana colocándola en un horno a 80°C por 2 horas. La membrana se prehibrida por 15 min a 65°C y luego se hibrida por 24 horas a 65°C con la sonda marcada radiactivamente en un tampón de hibridación (NaH₂PO₄ 0,5 M pH 7,0, EDTA 1,0 mM pH 7,0, SDS 7,0

%, BSA 0,5 %). Luego se lava la membrana 30 min en tampón SSC 2X con SDS 0,1 % a temperatura ambiente y luego por 30 min en tampón SSC 0,1X con SDS 0,1 % a 55°C. La membrana se envuelve en un papel plástico y se expone a una placa autoradiográfica (Reflection™ NEF-496).

C.4. Marcación de la sonda por el método del “Random Primer Labelling System”®: En un tubo de 1,5 ml se colocan 50 ng de la sonda de DNA, se desnatura colocando a 100°C por 5 min y luego se enfría rápidamente en hielo. Se agrega 6 U de la enzima Klenow, 50 µCi de [α -³²P]dATP y una mezcla de dCTP 20 µM, dGTP 20 µM, dTTP 20 µM. Se incuba a 25°C por 1 hora. Se precipita la sonda agregando acetato de sodio 0,3M y 3 volúmenes de etanol al 100% e incubando a -80°C por 30 min. El DNA se centrifuga en una microcentrífuga a 14.000 xg por 15 min y el precipitado se resuspende en 50 µl de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0). Finalmente se determina la actividad específica de una alícuota de la sonda marcada en un contador de centelleo líquido.

C.5. Transcripción Reversa - PCR. Se describe brevemente a continuación el protocolo basado en el método modificado para AMV-RT. Se desnatura 1 µg de RNA total a 95°C por 15 min y se coloca en hielo. Se agregan 1,6 U de transcriptasa reversa AMV, 20 U de RNAsin, 20 pmoles del partidor

antisentido P2 y una mezcla de dNTPs 2 μ M en el tampón AMV ($MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) en un volumen final de 20 μ l. Se incuba a 50° C por 1 hora. Luego se adiciona la "Mezcla de PCR" que consiste en: 0,5 U de Taq DNA Polimerasa[®], 20 pmoles del partidor P1, una mezcla de dNTPs 1 μ M en el tampón de PCR ($MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3). La reacción de PCR se realiza con la siguiente programación: 95° C por 5 min, 30 ciclos de 95° C por 1 min, 52° C por 1 min y 72° C por 1 min, y una extensión final de 72° C por 10 min.

D. PRODUCCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA DE β -ACROSINA.

Para la obtención de los distintos fragmentos de cDNA que cubren parcialmente la secuencia de proacrosina se realizan reacciones de PCR utilizando los partidores previamente descritos. El fragmento de cDNA correspondiente a la cadena pesada de β -acrosina se obtiene con los partidores específicos P3 y P2, con un tamaño esperado de 753 pb. Con los partidores P4 y P2 se obtiene el extremo 3' del cDNA de β -acrosina, de un tamaño esperado de 192 pb.

D.1. Reacción de amplificación por el método de PCR. Las reacciones de amplificación se realizan en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción contiene: 100 pg de cDNA, 25 pmoles de cada partidor, 2,5 U de Taq Polimerasa[®],

la mezcla de los 4 dNTPs (a una concentración final de 200 μ M cada uno) y tampón de PCR ($MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3). La reacción se realiza con la siguiente programación: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min y finalmente 72° C por 10 min. Los productos de la reacción se resuelven en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizan en un transiluminador UV.

D.2. Producción del fragmento de cDNA de β -acrosina mutante. La mutación sitio dirigida se realiza por el método de "sobreposición" ("overlap method", Ho y cols., 1989) de manera de obtener el cDNA de β -acrosina mutado y así producir una proteína mutante en el sitio catalítico, sustituyendo la Ser²²² por Ala. Para ello, se realizan dos reacciones separadas de amplificación por PCR usando los partidores P1 y M1 para obtener el extremo 5' (678 pb) y M2 y P2 para obtener el extremo 3' (159 pb) de β -acrosina. Los partidores M1 y M2 se aparean a la misma secuencia de DNA pero fueron diseñados en direcciones opuestas y llevando la mutación nucleotídica deseada. Los dos productos de PCR se purifican y se usan como molde en una tercera reacción de PCR, usando los partidores P1 y P2, de manera de obtener la secuencia de DNA de β -acrosina mutada. Para esto se agrega 1 ng de cada DNA, , 25 pmoles de cada partidor, 2,5 U de Taq Polimerasa[®], la mezcla de los 4 dNTPs (a una concentración final de 200 μ M cada uno) y tampón de PCR ($MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3). La reacción se

realiza con la siguiente programación: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min y finalmente 72° C por 10 min. El producto de DNA final se purifica y secuencia, de manera de confirmar la correcta secuencia del DNA de β -acrosina mutada.

E. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA DE β -ACROSINA.

E.1. Electroforesis en geles de agarosa. Se utiliza agarosa de grado electroforético distinto: SEAKEM GTG[®] para geles de purificación, SEAKEM ME[®] para geles de resolución o SEAKEM ME + NUSIEVE GTG[®] para fragmentos de DNA menores de 300 pares de bases. Para realizar geles de purificación se preparan usando tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM) y para realizar geles de resolución con tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Se separan los fragmentos de DNA por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE o TBE según el caso, suplementado con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Se utilizan como estándares de peso molecular el DNA del plasmidio pBR322 digerido con la enzima *Hinf*I, para fragmentos menores a 2 kb o el DNA del bacteriofago λ digerido con la enzima *Hin* DIII para fragmentos de mayor peso (Tabla 4). La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 80 V durante 1 hora. El DNA es visualizado en un transiluminador UV (312 nm) y fotografiado.

E.2. Purificación de fragmentos de cDNA. Los productos de PCR se purifican mediante el método de las columnas "Wizard PCR Preps DNA purification system"[®]. Para esto, se agrega 1 ml de resina "Wizard" a los fragmentos de DNA en solución o al trozo de agarosa conteniendo la banda del fragmento de DNA separado electroforéticamente, se mezcla e incuba a temperatura ambiente por 5 min. Con la ayuda de una jeringa de 3 ml se aplica a la columna "Wizard" todo el volumen (DNA + resina) y se lava con 2 ml de isopropanol al 80 %. La columna se centrifuga por 2 min a 14.000 xg para eliminar el isopropanol. La resina se deja secar por 15 min y luego se agrega a la columna 50 μ l de tampón TE PCR (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 0,1 mM pH 8,0). Se incuba a 65° C por 5 min y se centrifuga por 80 segundos a 14.000 xg para colectar el DNA purificado.

λ / Hin DIII 0,5 μ g		pBR322 / Hinf 0,5 μ g	
pb	ng	pb	Ng
23,130	240	1,632	185
9,416	100	517/506	130
6,682	70	396	45
4,369	45	344	39
2,322	20	298	34
2,027	20	221/220	50
546	5	154	17

Tabla 4: Estándares de peso molecular.

E.3. Secuenciación de DNA. La técnica de secuenciación se basa en el método de "dsDNA Cycle Sequencing System[®] (LIFE TECHNOLOGIES), una modificación del método de Sanger que permite secuenciar directamente fragmentos de DNA de doble hebra, sin la necesidad de realizar el subclonamiento en un vector. Este método consta de las siguientes etapas:

E.3.a. Purificación de fragmentos de DNA a ser secuenciados. Los fragmentos de DNA a ser secuenciados se purifican utilizando el kit "Wizard"[®] (Promega Co.) como se describe anteriormente.

E.3.b. Marcación del partidor. El partidor se marca en su extremo 5' por transferencia de un fosfato radioactivo. Para esto, en un tubo de 0,5 ml se coloca 1 pmol de partidor, 1 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa y 2 pmoles [γ -³²P]ATP en un tampón que contiene (MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, Tris-HCl 60 mM, pH 7,8) en un volumen final de 5 μ l. Se incuba por 10 min a 37° C. Posteriormente se inactiva la enzima por calor a 55°C por 5 min. El partidor marcado se conserva en hielo.

E.3.c. Mezcla de reacción: A un tubo de 0,5 ml se adiciona 50 a 100 ng del fragmento de cDNA que queremos analizar, 1 pmol de partidor marcado, 1,25 U

de la enzima Taq DNA polimerasa[®] (LIFE TECHNOLOGIES) en el tampón de secuenciación (MgCl₂ 5 mM, KCl 30 mM, W-1 0,5%, Tris-HCl 30 mM, pH 9,0) y alcanzando un volumen final de 36 µl. Se mezcla y conserva en hielo.

E.3.d. Reacción de secuenciación. La mezcla de reacción se distribuye equitativamente en cuatro tubos rotulados con las letras A, T, G y C, a los que previamente se les agrega 2 µl de la mezcla de terminación correspondiente a cada base (dNTPs 100 µM cada uno más ddATP 2 mM o ddCTP 1mM o ddGTP 0.2 mM o ddTTP 2 mM). Se mezcla, se cubre con una gota de aceite mineral y se mantiene en hielo. Finalmente los tubos se colocan en el termociclador precalentado a 95°C y se somete al siguiente programa: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 70°C por 1 min.

E.3.e. Terminación. Una vez terminado el programa, los tubos se colocan en hielo y se les agrega 5 µl de la solución de detención (95% formamida, 0,1% azul de bromofenol, 0,1% cianol xileno, EDTA 10 mM, pH 8,0). Se mezcla y se almacenan a -20°C. El producto de la secuenciación se resuelve en un gel de alta resolución en condiciones desnaturantes (poliacrilamida 6 %, urea 8M) y luego se visualiza con una autoradiografía.

E.3.f. Electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución en condiciones desnaturantes. Para resolver las reacciones de secuenciación de DNA se realizan geles de poliacrilamida 6 % (acrilamida:bis-acrilamida, 19:1), urea 8M en tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). El gel se precalienta 30 min a 1800 V para obtener una temperatura de 50°C uniforme en todo el gel. Las muestras se desnaturan por 5 min a 95°C y se carga 4 µl de las muestras por carril. La electroforesis se realiza a 55 W (~1800 V) durante 3 a 7 horas. Finalmente el gel se seca sobre papel Whatman 3 M y se expone sobre una película autoradiográfica (Reflection NEF-495®).

F. PREPARACIÓN DEL DNA PLASMIDIAL Y SUCBLONACION.

F.1. Digestión y desfosforilación. Todos los fragmentos de DNA de β-acrosina se purifican y se subclonan en el vector de expresión pGEX2T (Figura 3) en marco de lectura con el gen de la glutatión S-transferasa. Para ello, se digiere cada producto de PCR y el vector pGEX2T con la enzima Bam HI en las condiciones recomendadas por el proveedor. La desfosforilación del extremo 5' del vector se realiza incubando 10 µg del vector pGEX2T en presencia de 10 U de fosfatasa alcalina de ternera (CIP®) en tampón CIP (MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, espermidina 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 9,3) por 20 min a 37° C. La reacción se detiene incubando a 65° C por 15 min. Finalmente se realiza una extracción con

fenol:cloroformo y se precipita el DNA agregando 0,3 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes de etanol al 100%. La mezcla se incuba a -20°C por 2 horas, se centrifuga a 12.000 xg por 10 min y el sedimento se lava con etanol al 70%. Finalmente el DNA se resuspende en agua estéril a una concentración final de 0,1 a 1 mg/ml.

F.2. Ligación de fragmentos de DNA al vector pGEX2T. Los fragmentos del gen de β -acrosina obtenidos se purifican utilizando el kit "Wizard" descrito anteriormente. Para la realización de la reacción de ligación, en un tubo de 0,5 ml se incuban 10 ng del vector y 100 ng del cDNA a subclonar en presencia de 10 U de T4 DNA Ligasa[®] en tampón L (MgCl_2 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 30 mM, pH7,8) por aproximadamente 18 horas a 15°C . Luego de la incubación la mezcla de ligación se usa directamente para transformar las bacterias competentes.

F.3. Preparación de bacterias competentes.

F.3.a. Método del CaCl_2 : Se toma una alícuota 50 μl de bacterias DH5 α (almacenadas a -20°C en LB-glicerol 50%; genotipo: supE44, $\Delta\text{lacU169}$ ($\phi\text{lacZ}\Delta\text{M15}$) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) y se cultivan en 3ml de medio LB (Bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,171 M) a 37°C durante 16 horas con agitación vigorosa. Se toman 0,5 ml de este cultivo, se agregan 12,5 ml de LB y se incuba aproximadamente por 3 horas, hasta obtener una

densidad óptica de 0,35 – 0,4 a 600 nm. Las células se centrifugan a 500 xg por 2 min y el sedimento se resuspende suavemente en 6,5 ml de un medio hiposmótico, Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM). Se deja reposar por 1 a 2 horas en hielo. Las bacterias se sedimentan por centrifugación a 500 xg por 2 min y el sedimento se resuspende en 1,25 ml de Tris-CaCl₂. Así, las bacterias competentes pueden ser guardadas por 24 horas a 4° C.

F.3.b. Método de Hanahan: Se siguen los primeros pasos del protocolo anterior hasta obtener un cultivo de una D.O. de 0,35 – 0,4 a 600 nm. El cultivo se centrifuga a 500 xg por 5 min y las bacterias se resuspenden en 4 ml de medio TFB (K-MES 10 mM pH 6,3, RbCl₂ 100 mM, MnCl₂·4H₂O 45 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM, CoCl₃ 3 mM). Se incuba en hielo por 15 min. Las bacterias se sedimentan por centrifugación a 500 xg por 2 min y el sedimento se resuspende en 1 ml de medio TFB. Se agrega 35 µl de la solución DD (DTT 15,3 % en DMSO) gota a gota y se incuba 10 min en hielo. Se agregan 35 µl de la solución DD y se incuba en hielo por 20 min. En este momento las bacterias pueden ser transformadas.

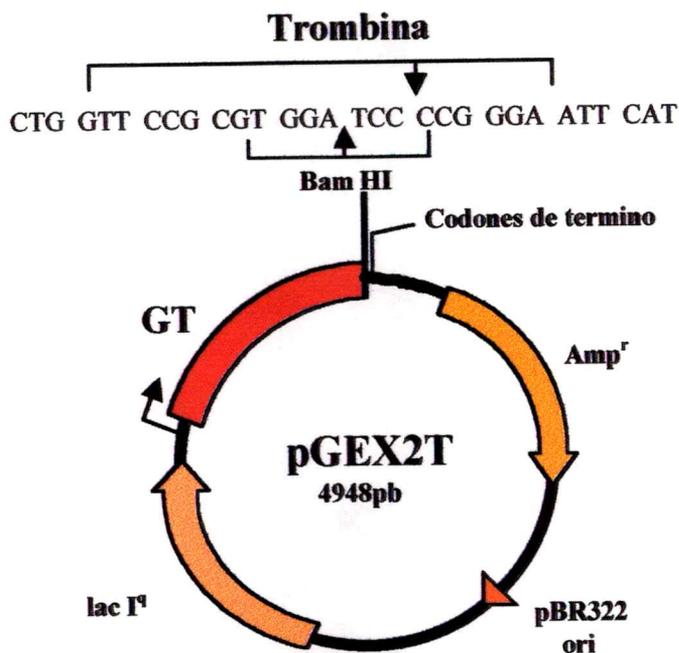


Figura 3. Esquema del vector de expresión pGEX2T. Se indica el origen de replicación del plasmidio pBR322 y los genes para la proteína que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r), la proteína que permite la inducción de la expresión por IPTG (lac I^q) y la proteína glutatión S-transferasa (GT), la cual formará parte de la quimera con la proteína que se exprese de los fragmentos subclonados. Además, se muestra en la parte superior del esquema la secuencia de nucleótidos de la caja de clonaje, indicándose la secuencia de reconocimiento de la enzima Bam HI y los codones que permitirán el reconocimiento de la trombina.

F.4. Transformación de bacterias competentes. Alícuotas de 0,2 ml de bacterias competentes se incuban con 20 μ l de la mezcla de ligación por 1 hora en hielo. Se realiza un "shock" térmico durante 90 segundos a 42° C y luego se colocan en hielo por 5 min. Se agrega 0,8 ml de medio LB y las bacterias se dejan recuperar durante 1 hora en un baño a 37° C sin agitación. La suspensión bacteriana se centrifuga por 30 segundos en una picofuga y el sedimento se resuspende en 0,2 ml de medio LB.

F.5. Selección de bacterias transformadas. Se siembra una fracción de la preparación de bacterias transformadas (50 μ l o 200 μ l) en placas de Petri con LB-agar 1% sólido, autoclavado y suplementado con ampicilina 100 μ g/ml. Se deja 12 horas incubando en estufa a 37° C. Se pican al azar algunas de las colonias crecidas, se adicionan 3 ml de LB-ampicilina 100 μ g/ml y se incuban de 3 a 6 horas. Se realiza una minipreparación de plasmidio para confirmar la presencia del inserto.

F.6. Minipreparación de DNA plasmidial. Las bacterias se centrifugan a 500 xg por 2 min y el sedimento se resuspende en 0,3 ml de tampón P1 (0,1 μ g/ml de RNAsa, Tris-HCl 50mM, pH 7,5). Se agrega 0,3 ml de tampón P2 (NaCl 200 mM, SDS 1%) y se incuba 5 min. Se agrega 0,3 ml de tampón P3 (acetato de potasio 3 M, pH 5.5) frío y se incuba 10 min en hielo. Se centrifuga a 10.000 xg por 15 min a 4° C, se remueve el sobrenadante que contiene el DNA plasmidial. Se

precipita el DNA agregando 0,7 volúmenes de isopropanol puro. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 30 min a 4° C y el sedimento se lava con 1 ml de etanol frío al 70 %. Se deja secar al aire por 15 min y se resuspende en 10 a 30 µl de agua o tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8,0).

F.7. Determinación de la presencia y orientación del inserto. La presencia del inserto en el plasmidio purificado se determinó digiriendo el vector con Bam HI, que corresponde al sitio de restricción donde fue subclonado el cDNA. Para determinar la orientación del inserto se pueden realizar dos tipos diferentes de ensayos. Uno de ellos consiste en la digestión del plasmidio purificado con una enzima de restricción que corte solo una vez en el plasmidio y solo una vez en el inserto, de tal forma que al realizar una electroforesis de los productos de la digestión en un gel de agarosa 1% se observan dos bandas, que dependiendo de la orientación del inserto son de distintos tamaños. En este caso se usa la enzima Nar I, que corta el vector en la posición 4286 y el inserto de β -acrosina en la posición 149. Si el inserto está en sentido correcto las dos bandas que se generan son de 4033 pb y 1741 pb. Por el contrario, si el inserto está sentido inverso, las bandas que se observan son 3505 pb y 2269 pb.

El segundo ensayo consiste en realizar una amplificación por PCR de parte del vector utilizando un partidador sentido (5' GGCGACCATCCTCCAAAA 3') que

corresponde a la posición 894 a 911 del plasmidio y el partidor II antisentido del inserto complementario al cDNA de β -acrosina (ver Tabla 2). Esto permite solo la amplificación de aquellos insertos que se encuentren en sentido correcto. La reacción de amplificación se lleva a cabo según el siguiente programa: a) 5 minutos a 95°C; b) 30 ciclos de 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 60°C; 1 minuto a 72°C; y c) 10 minutos a 72°C. Por último, y con el fin de determinar posibles errores de la Taq DNA polimerasa, se confirma la secuencia correcta del inserto por secuenciación de DNA.

G. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

G.1. Expresión de las proteínas recombinantes. Las bacterias transformadas se incuban en medio LB suplementado con 100 μ g/ml ampicilina por tres horas o hasta que alcance una D.O. de 0.5- 0.6 a 600 nm. Se agrega IPTG 1 mM y se cultiva por 2 horas a 37°C y agitación. Se centrifuga el cultivo a 4.000 xg por 5 min y se resuspende el sedimento en 50 volúmenes de tampón TT100 (Tritón X-100 1%, PMSF 0,0025%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). La suspensión se sonica 10 veces por 5 segundos a 250 Wats en hielo. Se centrifuga a 4.000 xg por 15 min a 4°C y se congela el sobrenadante a -20°C. Una fracción se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en presencia de SDS.

G.2. Electroforesis de las proteínas recombinantes en geles de poliacrilamida. El análisis electroforético de las proteínas recombinantes de β -acrosina se realiza en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las proteínas expresadas son tratadas con el tampón que contiene: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 1%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,02% como colorante. La electroforesis se realiza a temperatura ambiente a un voltaje constante de 100 V. Para el cálculo de los pesos moleculares se usan como estándares las siguientes proteínas: fosforilasa B (P.M.= 97.000), albúmina sérica de bovino (P.M.= 66.200), glutamato deshidrogenasa (P.M.= 55.000), ovoalbúmina (P.M.= 42.700), aldolasa (P.M.= 40.000), anhidrasa carbónica (P.M.= 31.000) y el inhibidor del poroto de soya (P.M.= 21.500). Una vez terminada la electroforesis, los geles son teñidos en una solución que contiene: ácido acético al 10%, metanol al 50% y azul de Coomassie al 0,1% durante 1 hora. Los geles son destañidos en una solución de ácido acético al 10% y secados.

G.3. Purificación de la proteína recombinante. Se descongela en hielo el sobrenadante del extracto bacteriano que contiene la proteína recombinante sobrepresada y se lleva a pH 8,0. El sobrenadante se somete a una cromatografía en una columna de 2 ml de Glutathion Sepharose[®]. Se cargan 100 μ g de la proteína total, se lava con 30 ml de tampón TT100 y se eluye con 20 ml de tampón Tris-

glutación (glutación 25 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) colectando fracciones de 1ml. Cada fracción se analiza electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12 %.

G.4. Separación de la proteína quimérica por digestión con trombina. A cada fracción eluída de la columna de Glutathion Sepharose[®] y que contiene la proteína recombinante, se le agrega 5 U de trombina en tampón TNC (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y CaCl₂ 2,5 mM) y se incuba a 37°C por 2,5 horas. Luego, se dializa contra Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se purifica nuevamente a través de una columna de glutatión-sefarosa. Las proteínas recombinantes así purificadas fueron usadas en todos los ensayos posteriores de actividad enzimática, unión a las ZPGPs y zonas pelúcidas intactas y competencia de la fecundación *in vitro*.

H. PURIFICACIÓN DE PROACROSINA Y DE ZONAS PELUCIDAS DE CERDO

H.1. Purificación de proacrosina de espermatozoides de cerdo. Con el fin de utilizar a la proacrosina obtenida de espermatozoides de cerdo como control en los ensayos de actividad enzimática y en los ensayos de unión y competencia a las glicoproteínas de la zona pelúcida y a zonas pelúcidas *in toto*, la proacrosina se extrajo desde espermatozoides de verraco según lo descrito por Polakoski & Parrish (1977). Para esto, se toman 2 ml de un concentrado de espermatozoides

epididimarios de cerdo, se colocan sobre 10 ml de la solución SBA (sacarosa 1 M, benzamidina 50 mM y azida de sodio 0,02 %) y se centrifuga por 30 min a 600 xg a temperatura ambiente. El sedimento de espermatozoides se resuspende en HCl 1 mM, glicerol 10 %, benzamidina 50 mM y azida de sodio 0,02 % a pH 2,8 y se incuba toda la noche a 4° C. La muestra se centrifuga a 10000 xg por 30 min a 4° C. El sobrenadante se dializa contra HCl 1 mM y se almacena a -40°C. Este extracto ácido analizados electroforéticamente presenta varias bandas proteicas, encontrándose el sistema proacrosina/acrosina enriquecido en aproximadamente un 90 %. Por otro lado, se ha determinado que este tipo de extracto ácido espermático presenta la misma capacidad de unión específica a las ZPGPs que la proteína nativa proacrosina purificada (Jones, 1991).

H.2. Purificación de las glicoproteínas de la zona pelúcida. Para determinar la capacidad de unión de las formas recombinantes de β -acrosina a la ZPGPs se obtienen zonas pelúcidas a partir de ovarios de cerdo. Para ello, se colectan los ovarios en el matadero Lo Valledor y se llevan al laboratorio en el lapso de dos horas. Las zonas pelúcidas se aíslan a través de mallas plásticas de distintos tamaños de poro como lo describe Hedrick y Wardrip (1986). Las zonas pelúcidas se purifican por una gradiente de Percol (SIGMA) y se solubilizan a 70° C por 30 min (Jones, 1991). Finalmente, las ZPGPs se almacenan a -40°C.

I. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PROTEÁSICA, INMUNOREACTIVIDAD Y CAPACIDAD DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

I.1. Actividad proteolítica. La actividad esterásica de las proteínas recombinantes y de la proacrosina de espermatozoides de cerdo se determina espectrofotométricamente siguiendo la hidrólisis del N-benzoil-L-arginina-etil-ester (BAEE) a 253 nm (Sillerico y cols., 1996). Para esto, el ensayo se realiza en un volumen final de 0,5 ml conteniendo al sustrato BAEE 0,5 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y CaCl_2 50 mM a 25° C. La absorción molar del BAEE es $1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Whitaker & Bender, 1965). Una mU de actividad se define como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 nmol de BAEE por min a 25° C.

I.2. Inmunodetección de las proteínas recombinantes de β -acrosina. Las proteínas recombinantes purificadas o los extractos crudos bacterianos se separan electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12% y se electrotransfieren a membranas de nitrocelulosa (0.45 μm) según el método descrito por Towbin y cols. (1979). Las membranas se incuban con una solución de PBS suplementada con BSA 1%, se lavan en PBS tres veces por 10 min cada vez y se incuban por una hora con el anticuerpo policlonal anti-acrosina de cerdo α -38 (donado gentilmente por el Dr. Umberto Urch, UC - Davis). Luego, se lavan e incuban con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. Finalmente, la inmunoreactividad se visualiza con el kit comercial "ProtoBlot II AP system"[®].

I.3. Unión de proteínas recombinantes a ^{125}I -ZPGPs y ensayo de competencia. La cuantificación de la unión específica de las proteínas recombinantes de β -acrosina a las ^{125}I -ZPGPs se realiza usando un ensayo de dot blot modificado (Jones, 1991). Para esto, concentraciones crecientes de las proteínas recombinantes se inmovilizan dejándolas secar sobre círculos de membrana de nitrocelulosa ($0,4\text{ cm}^2$ de diámetro), se incuban por 3 horas a temperatura ambiente con una solución estéril de PBS suplementada con BSA 5 %. Luego, se lavan 3 veces en PBS por 10 min cada vez. En los ensayos de competencia, una cantidad constante (10 pmoles) de la proteína recombinante inmovilizada y bloqueada se incuba por una hora con concentraciones crecientes de competidor (ZPGPs no marcadas, fucoidano, dextran sulfato 500 K y 5K). Aproximadamente, 10 μg de ZPGPs se yodan con $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ y Iodogen $\text{\textcircled{R}}$ según lo descrito por Jansen y cols. (1995). Las proteínas recombinantes inmovilizadas se incuban por una hora con 100.000 cpm de la sonda radioactiva (^{125}I -ZPGPs; $4,1 \times 10^6$ cpm/ μg) en 100 μl de PBS estéril. Se lavan tres veces en PBS y la radioactividad unida se detecta en un contador gama (LKB Wallac 1261 Multigamma Counter).

La unión no específica se define como la cantidad de sonda remanente en los círculos de nitrocelulosa en ausencia de la proteína blanco. La unión específica se define como la cantidad de sonda unida menos la unión inespecífica. La unión

máxima se define como la cantidad de sonda unida a la membrana en la presencia de la proteína blanco pero en la ausencia del agente competidor. Los resultados se grafican como la cantidad de unión específica (cpm) a niveles saturantes de la sonda, o como el porcentaje de unión máxima. Todos los experimentos se realizan en duplicado y al menos tres veces.

I.4. Unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto* y ensayo de competencia. Aproximadamente, 10 ng de las proteínas recombinantes se yodan con Na^{[125]I} y Iodogen ® según lo descrito por Jansen y cols. (1995). La cuantificación de la unión específica de β -acrosina recombinante yodada a las zonas pelúcidas *in toto* se realiza incubando concentraciones crecientes de la proteína recombinante yodada con 100 zonas pelúcidas colectadas por el método de Hedrick y Wardrip (1986). El ensayo se realiza en tubos pretratados, por 3 horas a temperatura ambiente, con una solución estéril de PBS suplementada con BSA 5 %. En los ensayos de competencia, 100 zonas pelúcidas se incuban por una hora con proacrosina no marcada 10 μ g/ml o fucoidano 100 μ M. Las muestras se incuban por una hora con concentraciones crecientes de la proteína recombinante de β -acrosina yodada ($35,8 \times 10^3$ cpm/ μ g) en 100 μ l de PBS estéril, se lava tres veces y la radioactividad unida se detecta en un contador gama (LKB Wallac 1261 Multigamma Counter).

La unión específica se define como la cantidad de sonda unida menos la unión inespecífica. La unión máxima se define como la cantidad de sonda unida a las zonas en la presencia de la proteína blanco pero en la ausencia del agente competidor. Los resultados se grafican como la cantidad de unión específica (cpm) a niveles saturantes de la sonda. Todos los experimentos se realizaron en duplicado y al menos tres veces.

I.5. Ensayos autoradiográficos de la unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto*. Para determinar la localización de β -acrosina recombinante yodada unida a zonas pelúcidas *in toto* se diseñó un sistema de microautoradiografía de las muestras procesadas como se menciona en el párrafo anterior. Para esto, las zonas pelúcidas son incubadas con 100.000 cpm de la proteína recombinante yodada (en presencia o no de competidor) y se fijan con glutaraldehído al 2,5% por 15 min. Luego, se lavan y las zonas pelúcidas se fijan a porta objetos cubiertos previamente con polilisina 0,05%. Finalmente, los porta objetos se cubren con la emulsión autoradiográfica Hypercoat LM-1[®], se exponen y se revelan según indicación del fabricante. Las imágenes autoradiográficas se analizan con un microscopio de campo claro Olympus BH-2A acoplado a una cámara de video CCD IRIS/FGB Sony. Las imágenes se digitalizan a través del programa Xclaim[™] Video Player 1.0 (ATI Technologies Inc.) y utilizando el

programa Scion Image (Scion Corporation) se realiza una densitometría tridimensional de las imágenes para evidenciar la intensidad de la unión.

J. ENSAYOS DE PENETRACION ESPERMATICA Y DE FECUNDACIÓN *in vitro*.

J.1. Medios de cultivo. El medio MT de lavado de ovocitos y espermatozoides (Suzuky y cols., 1994) consiste en NaCl 120 mM, Hepes 20 mM, pH 7,58 a 25° C, KH₂PO₄ 0,3 mM, KCl 3,1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 0,4 mM, glucosa 5 mM, lactato de sodio 21,7 mM, piruvato de sodio 1 mM, rojo fenol 20 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y BSA 3 mg/ml (Fracción V, Sigma A4378). Para realizar la capacitación espermática se usa el medio de capacitación MC (Suzuky y cols., 1994) que consiste de NaCl 90 mM, NaHCO₃ 15 mM, pH 7,4 a 38° C, Hepes 20 mM, KH₂PO₄ 0,3 mM, KCl 3,1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 0,4 mM, glucosa 5 mM, lactato de sodio 21,7 mM, piruvato de sodio 1 mM, rojo fenol 20 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y BSA 3 mg/ml (Fracción V, Sigma A4378).

La coincubación de los espermatozoides y las zonas pelúcidas se lleva a cabo en el medio de fecundación MCC (Suzuky y cols., 1994) que está compuesto del medio de capacitación suplementado con cafeína 2 mM. Para capacitar y coincubar gametos humanos se usa el medio BWW (Biggers y cols., 1971) que consiste de NaCl 94,88 mM, KCl 4,78 mM, lactato de calcio 1,71 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM,

MgSO₄ 1,19 mM, piruvato de sodio 0,25 mM, lactato de sodio 21,56 mM, glucosa 5,56 mM, NaHCO₃ 25,07 mM, rojo fenol 5 µg/ml, penicilina 60 µg/ml, estreptomicina 50 µg/ml y BSA 3 mg/ml (Fracción V, Sigma A4378) para lavar los ovocitos o con albúmina sérica humana 35 mg/ml (HSA, Sigma) para la coincubación de los gametos.

El medio de maduración M-199 consiste de TCM 199® suplementado con suero fetal de bovino al 10 %, piruvato de sodio 0,2 mM, estradiol 1µg/ml y las hormonas HCG y FSH 1,5 mU/ml cada una. La osmolaridad de todos los medios es de aproximadamente 300 mOsmoles/kg. Los medios con bicarbonato se equilibran con CO₂ 5% en aire, de manera que los medios mantienen el pH a 7,4 a 37° C.

J.2. Colecta de semen y lavado de espermatozoides de cerdo. Con el fin de realizar los ensayos de penetración de zonas pelúcidas y de fecundación *in vitro* en cerdo, se colecta la fracción rica en espermatozoides del semen de verracos de raza Large White de probada fertilidad desde el criadero de la Sociedad Agrícola El Monte. El semen se filtra a través de una gasa y se determina la concentración espermática. Se juntan tres eyaculados de distintos verracos y se diluye la muestra a una concentración de 300×10^6 espermatozoides/ml con el diluyente MR-A® (Kubus S.A.). Esta suspensión se mantiene a 15° C y a oscuras hasta por tres días. Para obtener espermatozoides vivos y móviles, alícuotas de 2 ml de semen diluido

se colocan sobre una gradiente de percol (2ml de percol 35%, 1 ml de percol 70%) y se centrifuga por 5 min a 200 xg seguido de 15 min a 500 xg (Harrison y cols., 1992). Después de la centrifugación, se aspira el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 0,2 ml de percol 70%, donde los espermatozoides son fácilmente resuspendidos.

J.3. Colecta de zonas pelúcidas de cerdo. Las zonas pelúcidas de cerdo a ser utilizadas en los ensayos de penetración espermática, se extraen desde ovarios de cerdo como lo describe Hedrick y Wardrip (1986). Para esto, se colectan los ovarios en el matadero Lo Valledor y se llevan al laboratorio en el lapso de dos horas. Las zonas pelúcidas se aíslan a través de mallas plásticas de distintos tamaños de poro, se purifican por una gradiente de Percol (SIGMA), se lavan en PBS y se almacenan a -40° C hasta su uso (no mayor de 15 días).

J.4. Ensayo de penetración de zonas pelúcidas y de competencia de las proteínas recombinantes. Para investigar el efecto de las proteínas recombinantes en el proceso de penetración espermática a través de la zona pelúcida, los espermatozoides lavados se capacitan a una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml en el medio de capacitación MC a 38° C y 5% de CO_2 en aire por 3 horas. La motilidad de los espermatozoides se evalúa y se continúa el experimento sólo si es que ésta es superior al 80%. Las zonas pelúcidas de cerdo se

lavan tres veces en medio de fecundación MCC y se colocan 20 a 30 zonas en gotas de 50 μ l. En los ensayos de competencia, las zonas se preincuban por al menos 3 horas con 15 pmoles de proteína recombinante y luego se lavan tres veces en medio de fecundación. La coincubación se realiza a 38° C y 5% de CO₂ en aire por 12 horas a una concentración de 5x10⁶ espermatozoides/ml. Finalmente, las zonas se lavan en PBS usando una pipeta Pasteur adelgazada, de manera de eliminar todos aquellos espermatozoides débilmente unidos y se fijan en glutaraldehído 2,5 % para ser evaluados por microscopía electrónica de barrido o se tiñen con 1 μ g/ml de Hoescht supravital N° 33258 y se analizan en un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot-2.

J.5. Ensayos de penetración espermática y competencia de las proteínas recombinantes con espermatozoides humanos y zonas pelúcidas cadavéricas humanas. Para investigar la especie especificidad del efecto de las proteínas recombinantes en el proceso de penetración espermática a través de la zona pelúcida, espermatozoides humanos lavados por el método de "swim up" (Barros y cols., 1988) se incuban en el medio BWW a 37° C y 5% de CO₂ en aire por 3 horas a una concentración de 1x10⁶ espermatozoides/ml. La motilidad de los espermatozoides se evalúa y se continúa el experimento sólo si es que ésta es superior al 80%. Las zonas pelúcidas cadavéricas humanas se lavan tres veces en medio de fecundación y se colocan 2 a 4 zonas en gotas de 50 μ l. En los ensayos de

competencia, las zonas se preincuban por al menos 3 horas con 15 pmoles de proteína recombinante y luego se lavan tres veces en medio de fecundación. La coincubación se realiza a 37° C y 5% de CO₂ en aire por 3 horas a una concentración de 1x10⁶ espermatozoides/ml. Finalmente, las zonas se lavan PBS usando una pipeta Pasteur adelgazada, de manera de eliminar todos aquellos espermatozoides débilmente unidos y se fijan en glutaraldehído 2,5 % para ser evaluados a microscopía electrónica de barrido o se tiñen con 1 µg/ml de Hoescht y se analizan en un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot-2.

J.6. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos ováricos de cerdo. Con el fin de realizar los ensayos de fecundación *in vitro*, se colectan ovarios de cerdo desde el matadero Lo Valledor y se llevan al laboratorio en el lapso de dos horas. Los ovarios se lavan 3 veces con PBS a 30°C y se aspiran los folículos de 3 a 5 mm de diámetro. El líquido folicular absorbido se deposita en tubos de 15 ml. El líquido folicular se transfiere a una placa de cultivo y bajo un microscopio estereoscópico se recuperan los ovocitos que muestran una capa de células foliculares compacta. Se colocan los ovocitos seleccionados en una placa de cultivo con medio de lavado MT y luego se lavan dos veces más tratando de retirar los restos celulares. Finalmente se colocan 10 a 20 ovocitos inmaduros en gotas de 50 µl de medio de maduración M-199 bajo aceite mineral y se incuban a 38° C y 5 % de CO₂ en aire. Después de 48 horas de incubación, los ovocitos con las células del

cúmulo expandidas se retiran de la gota de maduración y se colocan en un tubo de 1,5 ml en 300 μ l de medio de lavado MT. El tubo conteniendo los ovocitos se agita 5 min en vortex para retirar las células del cúmulo ooforo. Finalmente, se seleccionan todos los ovocitos y se colocan en grupos de 20 ovocitos en gotas de 50 μ l de medio de fecundación HTF bajo aceite mineral y se incuban a 38° C y 5% de CO₂ en aire, estando listos para ser inseminados.

J.7. Fecundación *in vitro* y competencia de las proteínas recombinantes con espermatozoides de cerdo y ovocitos madurados *in vitro*. Para investigar el efecto de las proteínas recombinantes en el proceso de fecundación *in vitro* de cerdo, se agregan los espermatozoides de cerdo lavados y capacitados a una concentración de 5×10^6 células/ml en una gota de 50 μ l de medio fecundación HTF conteniendo los ovocitos maduros sin células del cúmulo. Se coincuban los gametos a 38° C y 5% de CO₂ en aire por 18 a 24 horas. Finalmente, se fijan en glutaraldehído al 2,5 %, se tiñen con 1 μ g/ml de Hoescht y se analizan en un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot-2 o en un microscopio Confocal.

J.8. Análisis de la unión, reacción acrosómica y penetración espermática por microscopía electrónica de barrido. Para analizar el estado acrosomal de los espermatozoides que se encuentran sobre la zona pelúcida en los ensayos de penetración espermática y para determinar la penetración espermática en las zonas

pelúcidas cadavéricas de cerdo y humano, se deshidratan las zonas pelúcidas fijadas en una batería creciente de acetona (30°, 50°, 70°, 90°, 3 x 100°, 15 min cada paso) y se secan en un aparato de secado al punto crítico (Sorvall, modelo 49300) en CO₂. Las muestras se montan en un porta muestras, se cubren con una película de 300 Å de oro paladio en un sombreador (SEM Coating Unit, PELCO) y se examinan en el microscopio electrónico de barrido Jeol-JSM-25 SII.

RESULTADOS

A. ANALISIS DEL mRNA DE PROACROSINA POR NORTHERN

Se extrajo RNA total a partir de testículo de cerdo como se indica en métodos y se analizó por la técnica de Northern. Como sonda se utilizó un fragmento de cDNA del gen de proacrosina obtenido por RT-PCR utilizando los partidores P1 y P2 diseñados en base a la secuencia descrita (Baba y cols., 1989b) y posteriormente marcado con [α - 32 P]ATP. La sonda producida presentó un tamaño de 819 pb y fue secuenciada para confirmar su identidad. La Figura 4 muestra una banda única de 1,8 Kb, correspondiente al mensajero de proacrosina, como era de esperar (Baba y cols., 1989b).

B. TRANSCRIPCION REVERSA Y AMPLIFICACION DEL cDNA DE β -ACROSINA

A partir de 0,25 μ g de RNA total de cerdo, se amplificó por RT-PCR utilizando los partidores P1 y P2 un fragmento de cDNA de 819 pb. Análisis de la secuencia de este fragmento confirmó su identidad como β -acrosina. Además, utilizando los partidores P1 y P4 se amplificó un fragmento de aproximadamente 780 pb, correspondiente a parte del cDNA de proacrosina. La Figura 5 muestra la amplificación de estos dos fragmentos (carriles 2 y 3).

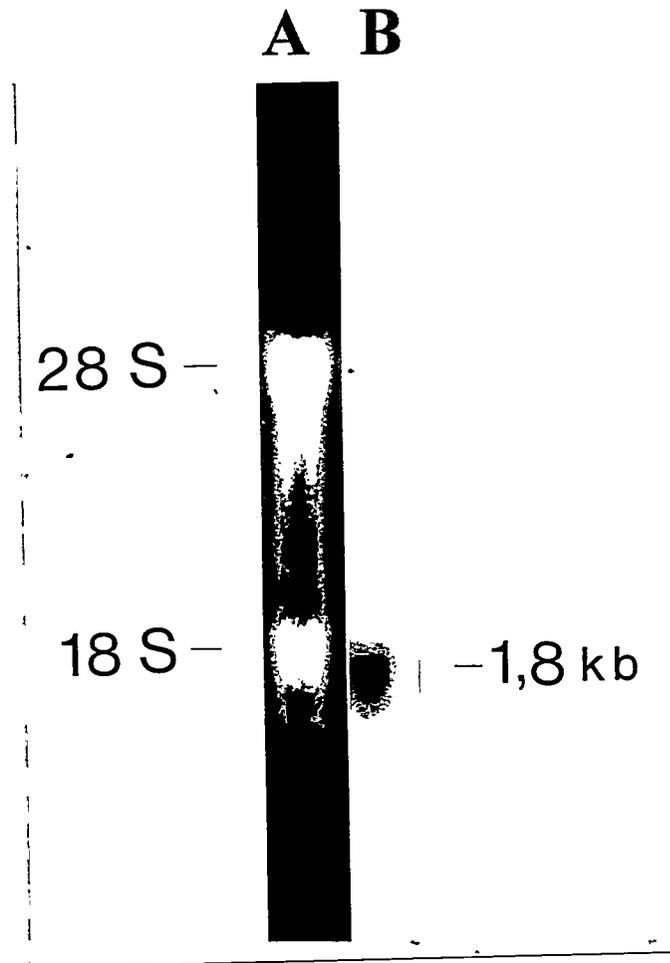


Figura 4. Análisis por Northern del RNA total de testículo de cerdo. A) RNA total de testículo de cerdo separado electroforéticamente en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio; B) Autoradiografía para detectar el mensajero de proacrosina utilizando una sonda previamente verificada por secuenciación. Nótese una sola banda de hibridación de 1,8 kilobases.

Los partidores P1 y P4 debían generar un fragmento de 1200 pb correspondiente a proacrosina. Sin embargo, se obtuvo un fragmento de 780 pb que al ser secuenciado se determinó que correspondía a parte del cDNA de proacrosina que excluía zonas ricas en citosina (656-672) y guanina (960-1051) en la secuencia nucleotídica del mensajero de proacrosina. La explicación probable es que estas regiones forman una horquilla muy estable en el mRNA que impiden una adecuada amplificación del cDNA completo de proacrosina. Luego de ensayar diferentes condiciones se llegó a la conclusión que no era posible amplificar el cDNA de proacrosina. Estos ensayos involucraron la utilización de: 1) tres diferentes fuentes de la enzima transcriptasa reversa, 2) diferentes concentraciones de partidores, 3) diferentes concentraciones de glicerol, 4) la presencia de distintas concentraciones de agentes desnaturantes como formaldehído y formamida, 5) diferentes temperaturas durante la reacción de transcripción reversa y durante la desnaturación del mRNA.

Con el fin de obtener suficiente muestra para ser purificada y subclonada se realizaron reamplificaciones del cDNA de 819 pb obtenido por RT-PCR. Se purificó este cDNA según lo descrito en Métodos y después se analizó en un gel de agarosa al 1% (Figura 6). Este fragmento de cDNA de β -acrosina se utilizó para su subclonamiento.

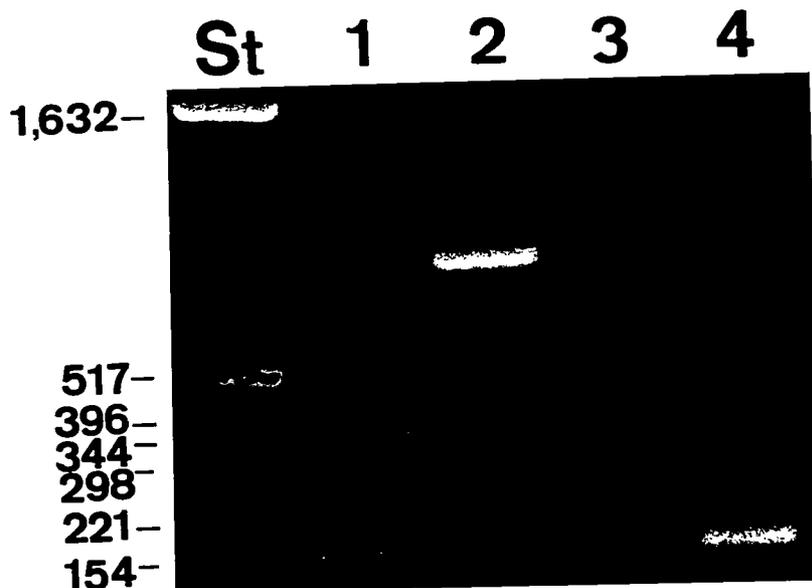


Figura 5. Análisis de dos productos obtenidos por transcripción reversa y PCR. Los productos obtenidos del RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. St: estándar pBR322 digerido con Hinf I. Carril 1: Control positivo del RT-PCR de una muestra control. Carril 2: RT-PCR de β-acrosina (819 pb) amplificado usando los partidores P1 y P2. Carril 3: RT-PCR de proacrosina (780 pb) amplificado usando los partidores P1 y P4. Carril 4: control positivo del PCR de una muestra control.

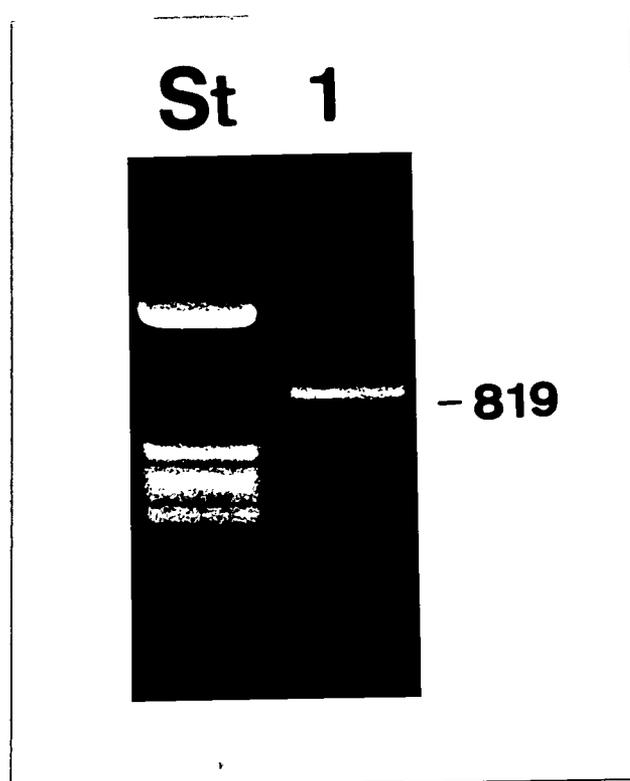


Figura 6. Análisis del cDNA de β -acrosina purificado. El cDNA de β -acrosina purificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. St: estándar pBR322 digerido con Hinf I. Carril 1: cDNA de β -acrosina (819 pb).

<i>cca aaa tcg ctg gtt ccg cgt GGA TCC</i>																			
<i>Pro Lys Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser</i>																			
GCC AGA GAT AAC GCC ACG TGT GAT GGC CCC TGC GGG TTA CGG TTC AGG CAG AAA TTA GAG TCA	60																		
Ala Arg Asp Asn Ala Thr Cys Asp Gly Pro Cys Gly Leu Arg Phe Arg Gln Lys Leu Glu Ser	20																		
GGC ATG CGT GTG GTT GGC GGC ATG AGT GCA GAA CCG GGC GCC TGG CCC TGG ATG GTC AGC CTC	123																		
Gly Met Arg Val Val Gly Gly Met Ser Ala Glu Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Val Ser Leu	41																		
CAG ATC TTT ATG TAC CAC AAC AAC CGG AGG TAC CAC ACG TGC GGG GGC ATC TTG CTG AAC TCG	186																		
Gln Ile Phe Met Tyr His Asn Asn Arg Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Ile Leu Leu Asn Ser	62																		
CAC TGG GTG CTC ACT GCT GCT CAC TGC TTC AAG AAC AAA AAA AAA GTT ACT GAC TGG AGA CTG	249																		
His Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asn Lys Lys Lys Val Thr Asp Trp Arg Leu	83																		
ATT TTC GGA GCA AAC GAA GTT GTG TGG GGA AGC AAT AAG CCG GTG AAG CCA CCC CTG CAG CAG	312																		
Ile Phe Gly Ala Asn Glu Val Val Trp Gly Ser Asn Lys Pro Val Lys Pro Pro Leu Gln Gln	104																		
AGA TTT GTT GAG GAG ATC ATC ATT CAT GAA AAA TAC GTT TCA GGG TTA GAG ATA AAT GAC ATT	375																		
Arg Phe Val Glu Glu Ile Ile Ile His Glu Lys Tyr Val Ser Gly Leu Glu Ile Asn Asp Ile	125																		
GCT CTC ATA AAG ATC ACC CCT CCT GTT CCA TGC GGG CCC TTC ATC GGA CCA GGC TGC CTG CCC	438																		
Ala Leu Ile Lys Ile Thr Pro Pro Val Pro Cys Gly Pro Phe Ile Gly Pro Gly Cys Leu Pro	146																		
CAG TTT AAG GCA GGC CCG CCC AGA GCG CCC CAG ACA TGC TGG GTG ACT GGC TGG GGC TAC TTA	501																		
Gln Phe Lys Ala Gly Pro Pro Arg Ala Pro Gln Thr Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Leu	167																		
AAA GAG AAA GGC CCC AGG ACG TCA CCT ACA CTG CAG GAG GCA CGT GTG GCC CTC ATC GAC CTC	564																		
Lys Glu Lys Gly Pro Arg Thr Ser Pro Thr Leu Gln Glu Ala Arg Val Ala Leu Ile Asp Leu	188																		
GAA TTA TGT AAC TCG ACC CGC TGG TAC AAT GGG CGA ATT CGT TCA ACT AAT GTG TGC GCA GGG	627																		
Glu Leu Cys Asn Ser Thr Arg Trp Tyr Asn Gly Arg Ile Arg Ser Thr Asn Val Cys Ala Gly	209																		
TAT CCT AGA GGC AAG ATT GAC ACC TGC CAG GGG GAC AGC GGC GGG CCT CTC ATG TGC AGA GAC	690																		
Tyr Pro Arg Gly Lys Ile Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Arg Asp	230																		
AGA GCG GAA AAC ACC TTT GTG GTC GTG GGC ATC ACA AGC TGG GGG GTA GGC TGC GCC CGA GCT	753																		
Arg Ala Glu Asn Thr Phe Val Val Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Val Gly Cys Ala Arg Ala	251																		
AAG CGC CCT GGA GTC TAC ACG TCT ACC TGG CCC TAT CTG AAC TGG ATT GCT TCC AAG ATT GGT	816																		
Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Ser Thr Trp Pro Tyr Leu Asn Trp Ile Ala Ser Lys Ile Gly	272																		
TAA <i>Gga tcc ccg gga att cat</i>																			
Stop																			

Figura 7. Secuencia nucleotídica del fragmento de 819 pares de bases del gen de acrosina clonado dentro del vector de expresión pGEX2T y la secuencia amino acídica deducida. Fragmento correspondiente a la proteína β -acrosina en marco de lectura con el del gen de glutatión transferasa (GST). En minúscula se indica parte de la secuencia del gen GST y sus amino ácidos en cursiva. Los nucleótidos en negrita indican la secuencia de los partidores usados para amplificar el fragmento: partidor P1 y partidor P2. El sitio de corte de la enzima de restricción Bam HI que se usó para subclonar se indica en subrayado. La triada catalítica, H⁷⁰, D¹²⁴ y S²²² se muestran en negrita.

C. AMPLIFICACIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

El fragmento de 819 pb correspondiente a β -acrosina fue subclonado en el vector de expresión pGEX2T y su inserción determinada por PCR y secuenciación (Figura 7). Se utilizó este mismo cDNA clonado para la obtención de otros dos fragmentos de este cDNA: la cadena pesada (753 pb) y el extremo carboxilo terminal (192 pb) de β -acrosina. Estos diferentes fragmentos obtenidos por amplificación por PCR se muestran en un esquema en la Figura 9A. En la Figura 9B (carriles 1,3 y 4) se muestran los fragmentos amplificados y purificados, analizados en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Cada uno de estos fragmentos fueron secuenciados y subclonados en el vector de expresión pGEX2T, para luego ser expresados como proteínas de fusión con la proteína glutatión S-transferasa en bacterias *E. coli* DH5 α .

Una cuarta proteína recombinante, el extremo amino terminal de β -acrosina, se obtuvo por una mutación no intencional que ocurrió en la posición 297, generando un codón de termino (TGA) y que fue detectada al secuenciar uno de los clones analizados de β -acrosina. Como no presentaba ninguna otra mutación en su secuencia se también se expresó como proteína de fusión.

D. PRODUCCIÓN DE LA MUTANTE Ser/Ala²²² DE β -ACROSINA

Mediante el método de “sobreposición” (Overlap method; Ho et al., 1989) de mutagénesis sitio dirigida se generó una mutante en el sitio catalítico (Ser/Ala²²²) de β -acrosina como se indica en Métodos. La Figura 8A muestra un esquema de la estrategia seguida para la obtención de este mutante. La Figura 8B muestra los fragmentos del cDNA obtenidos en las primeras reacciones de PCR, el extremo el extremo 5' de 678 pb (carril 2), el extremo 3' de 159 pb (carril 1) y el producto de la tercera reacción de PCR correspondiente al cDNA de β -acrosina mutada de 819 pb (carril 3). El fragmento de β -acrosina mutada fue secuenciado y subclonado en el vector de expresión pGEX2T, para luego ser expresado como proteína de fusión con la proteína glutatión S-transferasa en bacterias *E. coli* DH5 α .

E. EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS DISTINTAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

Extractos crudos de *E. coli* conteniendo las proteínas quiméricas recombinantes sobrepresadas fueron analizados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. La Figura 10 muestra las proteínas del extracto crudo obtenido en cada caso, destacando la sobreexpresión de las proteínas de fusión. En cada extracto se observa una banda más intensa que corresponde al tamaño esperado para la proteína recombinante respectiva: carril 2: β -acrosina 53

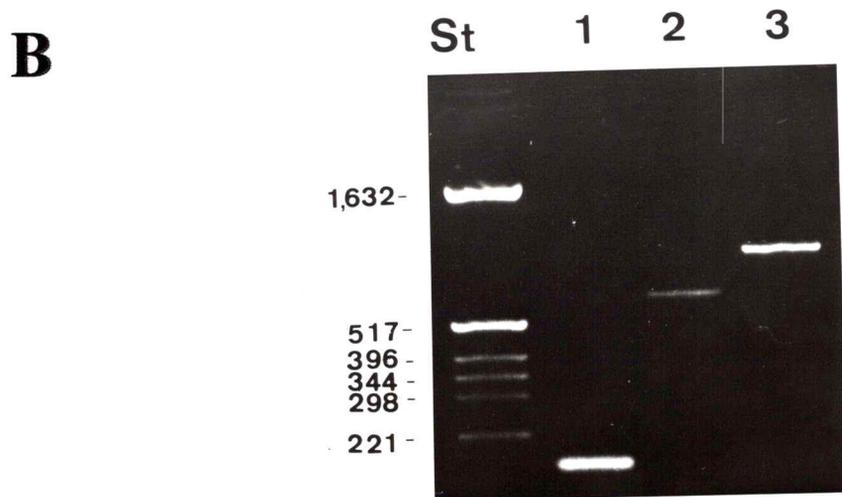
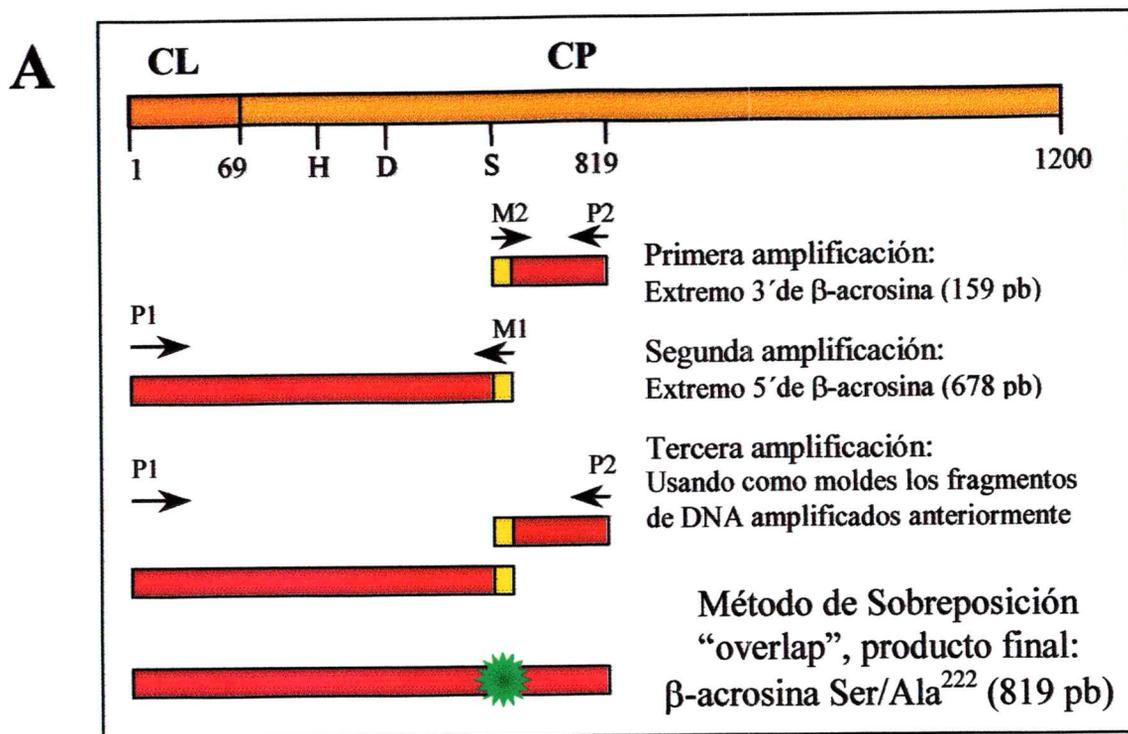
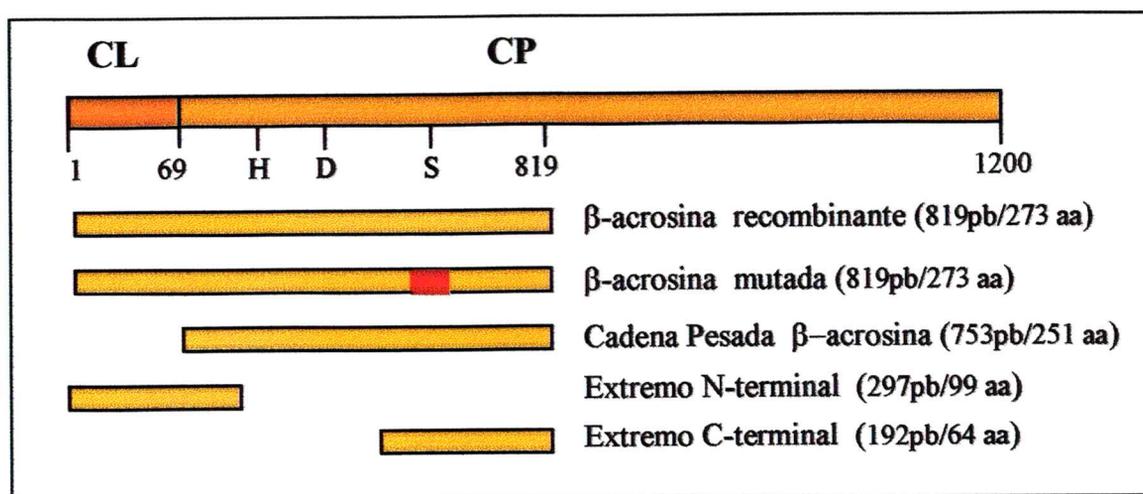


Figura 8. Generación de una mutante del sitio catalítico de β -acrosina. A) Representación esquemática de la estrategia utilizada para la generación de esta mutante. En la parte superior se representa el cDNA de proacrosina, en donde se indica la cadena liviana (CL) y pesada (CP), la triada catalítica His⁷⁰ (H), Asp¹²⁴ (D) y Ser²²² (S) y los números representan a los nucleótidos. En la parte inferior se indican los distintos fragmentos amplificados y en paréntesis el largo en pares de bases (pb); B) Estos fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. St: estándar pBR322 digerido con Hinf I. Carril 1: Extremo 3' de β -acrosina (159 pb). Carril 2: Extremo 5' de β -acrosina (678 pb). Carril 3: β -acrosina Ser/Ala²²² (819 pb).

A



B

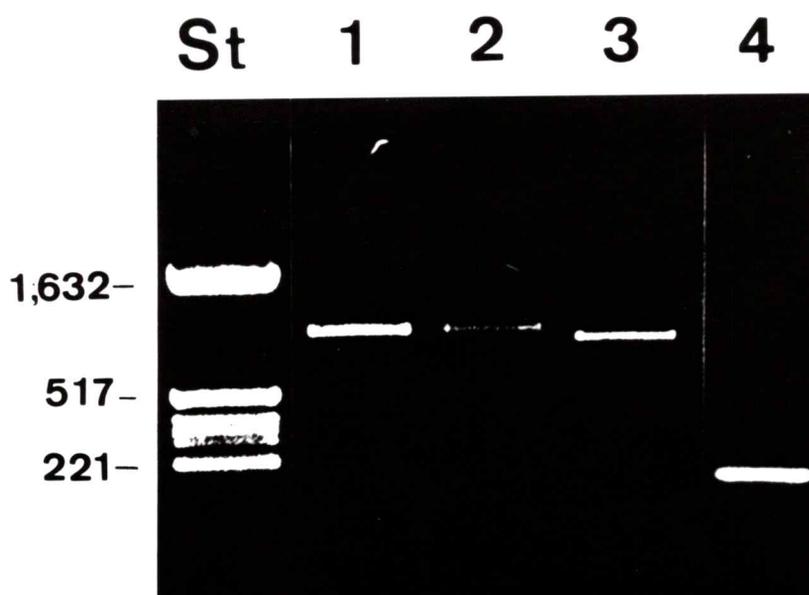


Figura 9. Amplificación de los distintos fragmentos de DNA de β -acrosina. A) Representación esquemática de los diferentes fragmentos de DNA de β -acrosina amplificados desde el cDNA de β -acrosina: En la parte superior se representa el cDNA de proacrosina, en donde se indica la cadena liviana (CL) y pesada (CP), la triada catalítica His⁷⁰ (H), Asp¹²⁴ (D) y Ser²²² (S) y los números representan a los nucleótidos. En la parte inferior se indican los distintos fragmentos amplificados y en paréntesis el número de amino ácidos de la proteína recombinante. B) Estos fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. St: estándar de peso molecular: pBR322 digerido con Hinf I. Carril 1: β -acrosina (819 pb). Carril 2: mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina (819 pb). Carril 3: cadena pesada de β -acrosina (753 pb). Carril 4: extremo carboxilo terminal de β -acrosina (192 pb).

kDa; carril 3: mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina 53 kDa; carril 4: cadena pesada de β -acrosina 51,7 kDa; carril 5: extremo amino terminal de β -acrosina 39,6 kDa; y carril 6: extremo carboxilo terminal de β -acrosina 36.5 kDa.

F. IMMUNODETECCIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

Con el fin de confirmar la identidad de las proteínas expresadas se realizó la inmunodetección de las proteínas de fusión de β -acrosina con un anticuerpo policlonal anti-acrosina de cerdo. Como se muestra en la Figura 11A este anticuerpo reacciona intensamente contra tres de las proteínas recombinantes sobrepresadas: β -acrosina (carril 1), mutante del sitio catalítico de β -acrosina (carril 2) y cadena pesada de β -acrosina (carril 3), que comparten epítopes con acrosina de cerdo. Los extremos amino (carril 4) y carboxilo (carril 5) terminal de β -acrosina no son reconocidos por este anticuerpo, así como tampoco la proteína glutatión S-transferasa ni ninguna proteína bacteriana.

Las cinco proteínas de fusión de β -acrosina se digirieron con trombina como se describe en Métodos con el fin de obtener las proteínas recombinantes puras. La Figura 11B muestra la inmunodetección de la proteína recombinante de β -acrosina antes y después de la incubación con trombina que permite la liberación de la proteína recombinante de β -acrosina.

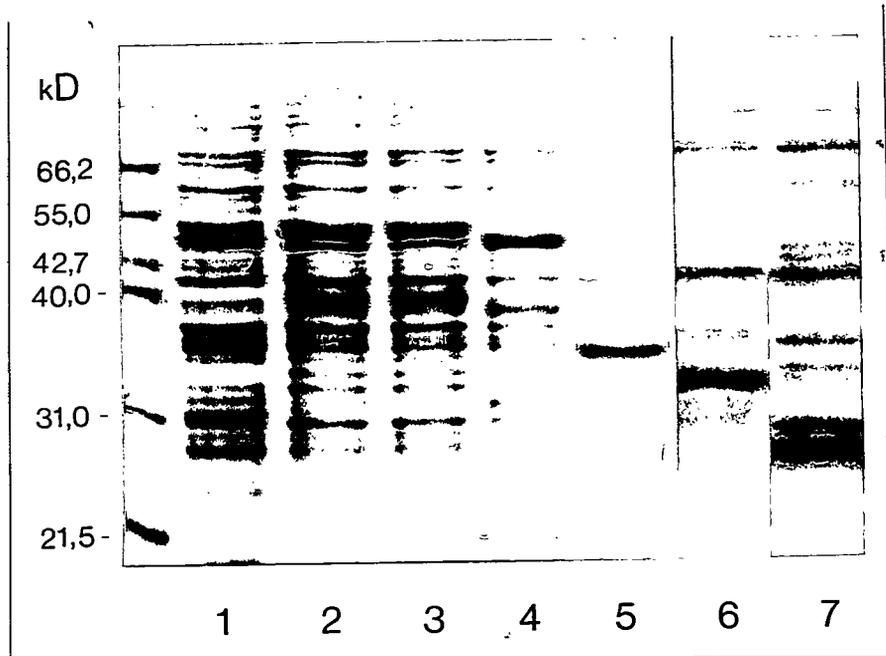


Figura 10. Análisis de la expresión de las formas recombinantes de β -acrosina. 50 μ g de extracto crudo proveniente de bacterias *E. coli* DH5 α fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, por 1 hora a 100 V. El gel se tiñó con azul de Coomasie. El carril 1 representa el control, proveniente de bacterias no transformadas. El resto de los carriles muestran extractos provenientes de bacterias transformadas con el vector pGEX2T que contiene el gen para GST junto al inserto para: Carril 2: β -acrosina (53 kDa). Carril 3. Mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina (53 kDa). Carril 4: Cadena pesada de β -acrosina (51,7 kDa). Carril 5: extremo amino terminal de β -acrosina (39,6 kDa). Carril 6: extremo carboxilo terminal de β -acrosina (36,5 kDa). Carril 7: vector solo (GST) sin inserto.

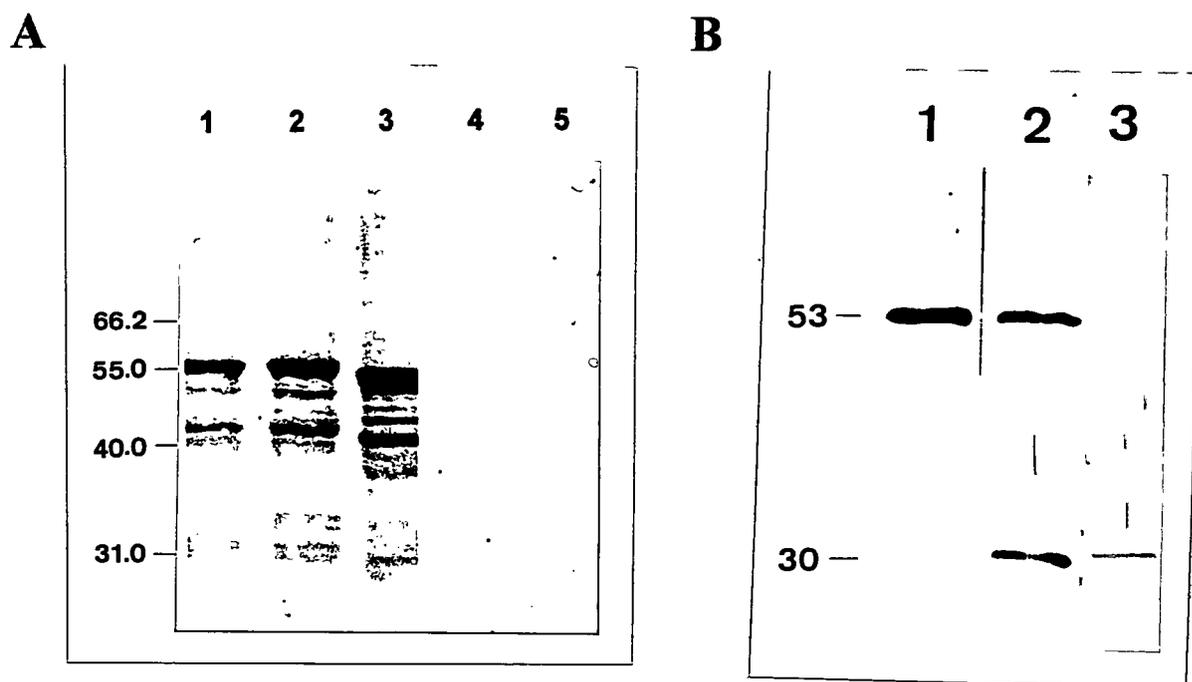


Figura 11. Inmunodetección de las proteínas recombinantes de β -acrosina con el anticuerpo policlonal anti-acrosina α -38. 20 μ g de extracto crudo (A) o 5 μ g de β -acrosina (B) en diferentes etapas de su purificación, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-acrosina α -38. En (A) se muestra: carril 1: β -acrosina (53 kDa); carril 2: mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina (53 kDa); carril 3: cadena pesada de β -acrosina (51,7 kDa); carril 4: extremo amino terminal de β -acrosina (39,6 kDa); carril 5: extremo carboxilo terminal de β -acrosina (36,5 kDa). En (B) se muestra: carril 1: quimera β -acrosina (53 kDa). Carril 2: quimera β -acrosina después de la digestión con trombina. Carril 3: β -acrosina recombinante (30 kDa) después de una segunda purificación.

G. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

Con el fin de estudiar la actividad proteásica de las proteínas recombinantes, se incuban estas proteínas en presencia del sustrato artificial BAEE como se indica en Métodos. En el caso de la proteína recombinante de β -acrosina los ensayos de actividad proteolítica mostraron una curva hiperbólica de activación enzimática, típica de un zimógeno (Figura 12 A). En la Figura 12 A se observa que la velocidad de la hidrólisis del sustrato aumenta con respecto a la concentración de la proteína recombinante y que a concentraciones de 40 pmoles o menores de la proteína recombinante no se logra observar hidrólisis del sustrato. Por otro lado, en el caso de la proteína nativa se observa un progreso lineal (Figura 12 B). La actividad específica de β -acrosina es de 3800 U/mg de proteína, 20 veces superior a la obtenida generalmente en la proteína nativa (155 U/mg). Por el contrario, las proteínas recombinantes de la cadena pesada, extremo amino terminal, carboxilo terminal y β -acrosina mutada en el sitio catalítico no presentaron ningún tipo de actividad proteolítica en los ensayos enzimáticos. La actividad enzimática de la proteína recombinante de β -acrosina fue completamente inhibida con p-amino-benzamidina 5 mM (Figura 12 B), TLCK 0,5 mM o benzamidina 5 mM (datos no mostrados), tal como ocurre para la proteína nativa proacrosina.

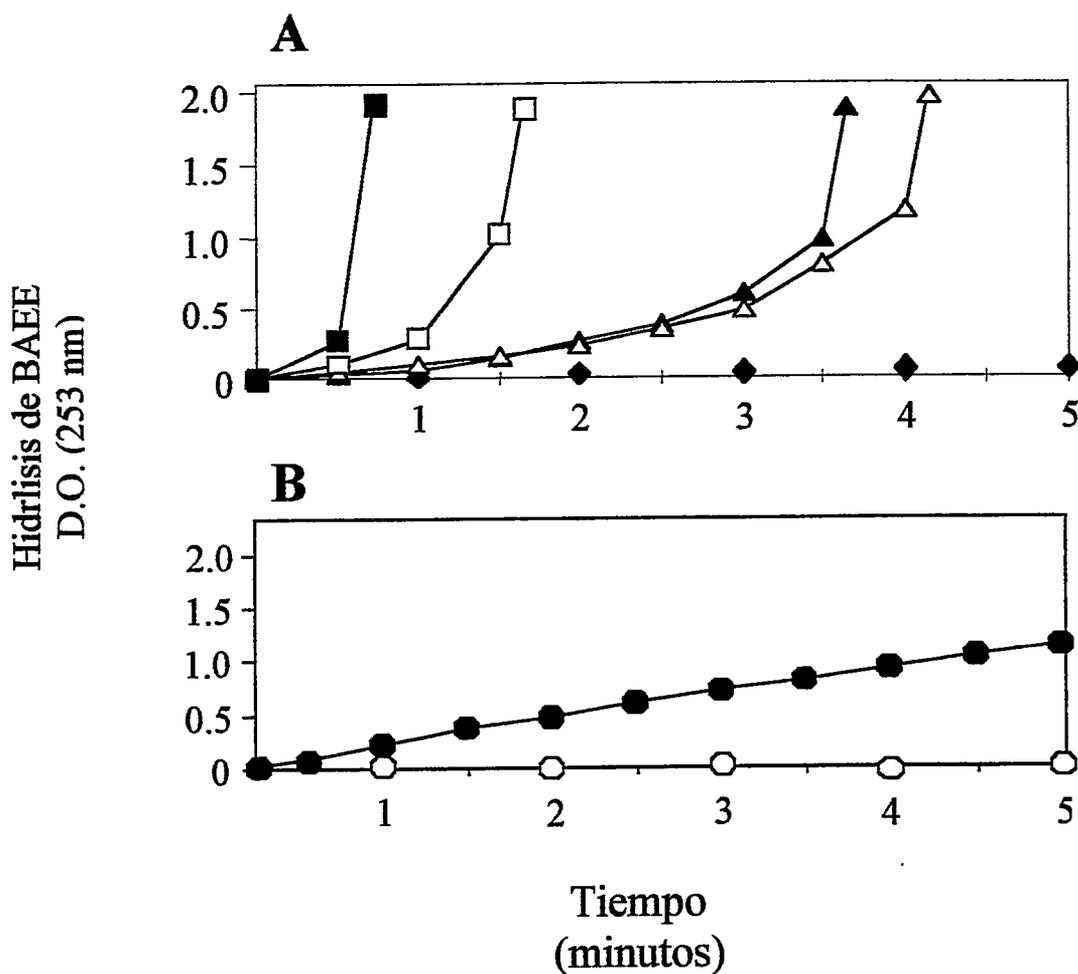


Figura 12. Activación enzimática de la β -acrosina recombinante y de la proteína nativa proacrosina. A. Concentraciones crecientes de β -acrosina recombinantes (40 pmoles ◆, 80 pmoles △, 100 pmoles ▲, 200 pmoles □ o 400 pmoles ■) se incubaron por diferentes tiempos a 25° C en presencia del sustrato BAEE 0,5 mM. B. 10 µg de extracto ácido espermático (●) o 80 pmoles de β -acrosina recombinante en presencia de p-amino-benzamidina 5 mM (○) se incubaron por diferentes tiempos a 25° C, en presencia del sustrato BAEE 0,5 mM. La actividad esterásica se determinó siguiendo la hidrólisis del sustrato BAEE a 253 nm.

H. UNIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A ^{125}I -ZPGPs

Con el fin de determinar la capacidad de unión a ^{125}I -ZPGPs, las proteínas recombinantes de β -acrosina se sometieron a un ensayo unión de dot blot y se usó como control la proteína nativa proacrosina de cerdo (proveniente de un extracto ácido espermático). Para esto se inmovilizaron las proteínas recombinantes purificadas o la proteína nativa, en una membrana de nitrocelulosa y se incubó en presencia de 100,000 cpm de ^{125}I -ZPGP ($4,1 \times 10^6$ cpm/ μg). En los experimentos control ni la proteína glutatión S-transferasa sola ni ninguna otra proteína bacteriana se unen a la sonda yodada. Como se observa en la Figura 13, tanto la proteína nativa y tres de las proteínas recombinantes de β -acrosina (normal, mutante Ser/Ala²²² y la cadena pesada de β -acrosina) unen a ^{125}I -ZPGPs, y su unión aumenta en proporción a su concentración. Las proteínas recombinantes de β -acrosina y la mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina muestran el mismo comportamiento en su capacidad de unión, con un máximo de 1,2 ng de ZPGPs unida por 0,5 μg de la proteína recombinante. La proteína recombinante de la cadena pesada de β -acrosina sólo alcanza el 52% de la unión de las recombinantes de β -acrosina normal o mutante Ser/Ala²²², mientras que las recombinantes del extremo amino- o carboxilo terminal de β -acrosina no tienen la capacidad de unir a la ZPGP.

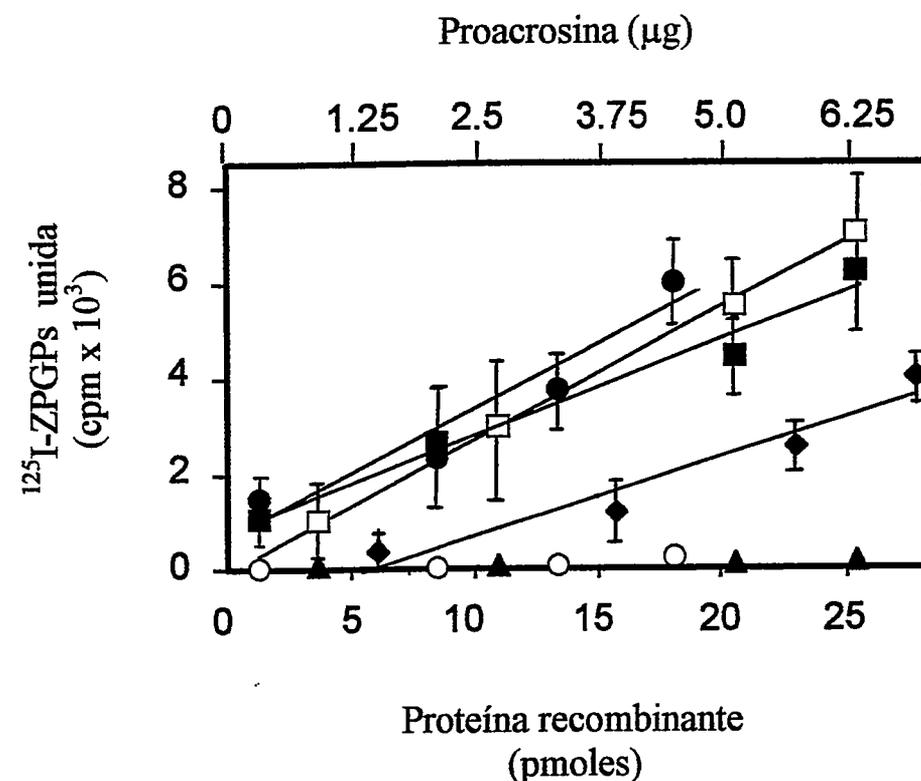


Figura 13. Unión de ^{125}I -ZPGPs a las formas recombinantes de β -acrosina. Cantidades crecientes de las proteínas recombinantes de β -acrosina y de la proteína nativa proacrosina se inmovilizaron sobre membranas de nitrocelulosa y se incubaron con 100,000 cpm de ^{125}I -ZGP (4,1 x 10⁶ cpm/ μg). La unión se determinó como se describe en Métodos. Se grafica los cpm de ^{125}I -ZPGPs unida versus la cantidad de cada proteína recombinante o de la proteína nativa proacrosina (■). Las proteínas recombinantes se representan como: □ β -acrosina normal, ● mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina, ◆ cadena pesada de β -acrosina, ○ extremo amino terminal de β -acrosina y ▲ extremo carboxilo terminal de β -acrosina. La unión máxima de β -acrosina recombinante normal fué de 7918 cpm (11392 cpm/ μg de proteína) y la unión inespecífica fue de 1960 cpm.

I. ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNIÓN A ¹²⁵I-ZPGPS CON POLISACÁRIDOS SULFATADOS.

La unión específica de las proteínas recombinantes de β -acrosina a las ZPGPs fue evaluada mediante ensayos de competencia como se indica en Métodos. La unión de ¹²⁵I-ZPGPs a la proteína nativa, a la proteína recombinante de β -acrosina y a la mutante del sitio catalítico fue inhibida por ZPGPs no marcada, fucoidano y dextran sulfato (500 kDa y 5 kDa) pero no por dextrano (Figura 14 y Tabla 5). Las curvas de inhibición específica de estos compuestos polisulfatados a ambas recombinantes así como a la proteína nativa son muy similares, por lo tanto, podemos concluir que todos los compuestos competidores inhiben de la misma forma a las proteínas recombinantes de β -acrosina como a la proteína nativa y que la mutación puntual presente en la mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina, no modifica la especificidad de unión. Solamente polímeros altamente sulfatados compiten en la unión de ZPGPs a las recombinantes de β -acrosina y al control proacrosina. Dextrano no sulfatado no inhibe la unión de ZPGPs a la proteína nativa ni a las formas recombinantes de β -acrosina (Figura 14 y Tabla 5). Fucoidano y dextran sulfato (500 kDa) fueron los competidores más efectivos y las ZPGPs no marcadas presentaron un IC₅₀ aproximado de 35, 34.3 y 19.8 μ g/ml para proacrosina y para las recombinantes de β -acrosina y mutante del sitio catalítico de β -acrosina, respectivamente (Tabla 5).

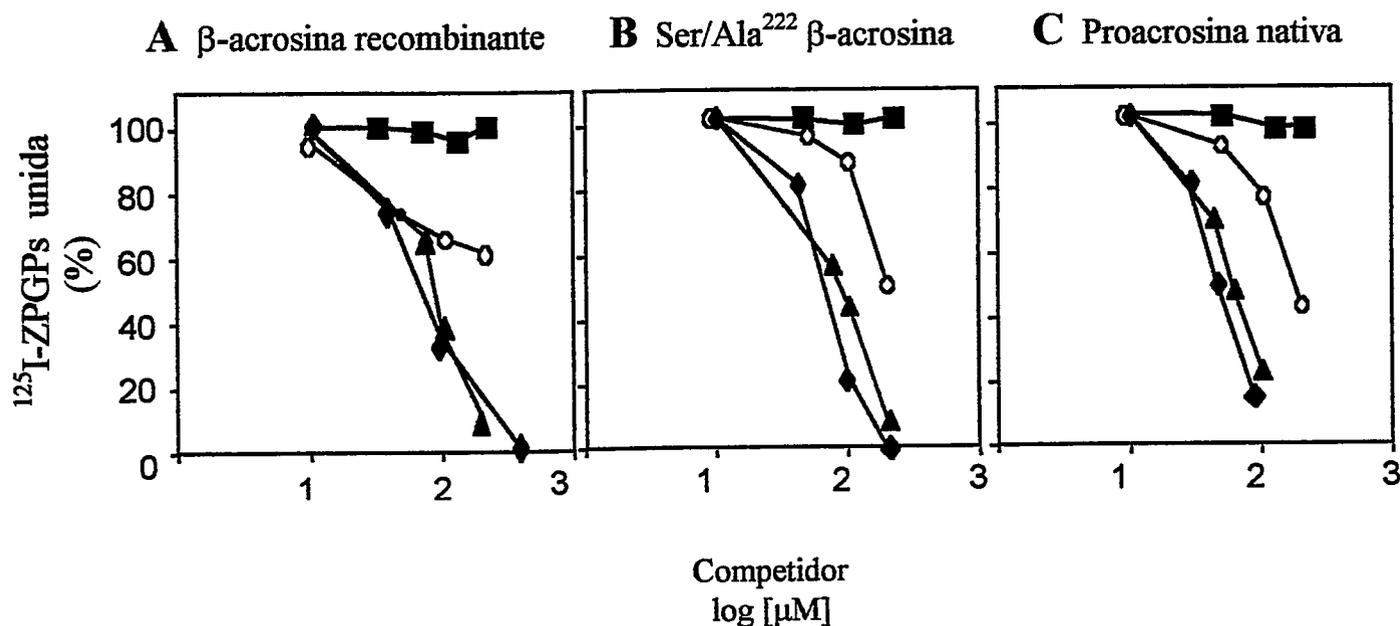


Figura 14. Ensayos de competencia entre la unión de ^{125}I -ZPGPs a las formas recombinantes de β -acrosina. Un total de 100 pmoles de β -acrosina (A), de Ser/Ala²²² β -acrosina (B), o 50 μg de la proteína nativa (C) se inmovilizaron sobre membranas de nitrocelulosa y se realizó el ensayo de competencia asumiendo saturación como se describe en Métodos. Se gráfica el porcentaje de unión específica máxima versus el log10 de la concentración (μM) de cada competidor. Los competidores se representan como: ▲ fucoidano, ◆ dextran sulfato (500 K), O dextran sulfato (5 K) y ■ dextrano.

Competidor (Mr)	β -acrosina	Ser/Ala ²²² β -acrosina	Cadena Pesada β -acrosina	Proacrosina nativa
Fucoidano (~ 100 K)	71.7 μ M	65.7 μ M	168 μ M	50.1 μ M
Dextran SO ₄ (500 K)	69.5 μ M	53.7 μ M	36.7 μ M	63.0 μ M
Dextran SO ₄ (5 K)	>200 μ M*	200 μ M	98.0 μ M	199.5 μ M
Dextrano (500 K)	>200 μ M*	>200 μ M*	>200 μ M*	>200 μ M*
ZPGPs no marcada	34.3 μ g/ml	19.8 μ g/ml	N.D.	35.0 μ g/ml

TABLA 5. IC₅₀ aproximado dado las condiciones de no saturación de los competidores de la unión de ¹²⁵I-ZPGPs a las formas recombinante de β -acrosina y a la proteína nativa proacrosina. El símbolo * indica la concentración más alta analizada sin llegar a un 50% de inhibición. N.D.: no determinado.

J. UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A ZONAS PELUCIDAS *in toto*

Al haberse demostrado que las proteínas recombinantes se unen a las glicoproteínas de la zona pelúcida solubilizadas, se quiso demostrar si la proteína recombinante de β -acrosina era capaz de unirse específicamente a las zonas pelúcidas intactas y cual era el tiempo mínimo para obtener la unión máxima. Para determinar el tiempo mínimo necesario para obtener la unión máxima, se agregó 100.000 cpm de ^{125}I - β -acrosina a 100 zonas pelúcidas intactas por 30 minutos, 3 horas o 12 horas. Las zonas se lavaron y la unión se detectó en un contador gamma. La Figura 15 muestra que la unión es máxima a las tres horas de incubación. Con el fin de determinar si esta unión fue estable, las zonas pelúcidas usadas en el ensayo anterior se incubaron por 12 horas a 37° C. Luego de lavar las zonas pelúcidas se concluyó que esta unión se mantiene hasta por 12 horas después de ocurrida la interacción (datos no graficados).

Para determinar la capacidad de unión de las proteínas recombinantes a las zonas pelúcidas intactas, se incubaron en suspensión 100 zonas pelúcidas en presencia de concentraciones crecientes de la proteína recombinante yodada. Como se observa en la Figura 16, se determinó que la proteína recombinante de β -acrosina es capaz de unirse a la zona pelúcida intacta y esta unión aumenta en forma proporcional a su concentración. Se calculó que 0,22 pmoles de proteína recombinante de β -acrosina

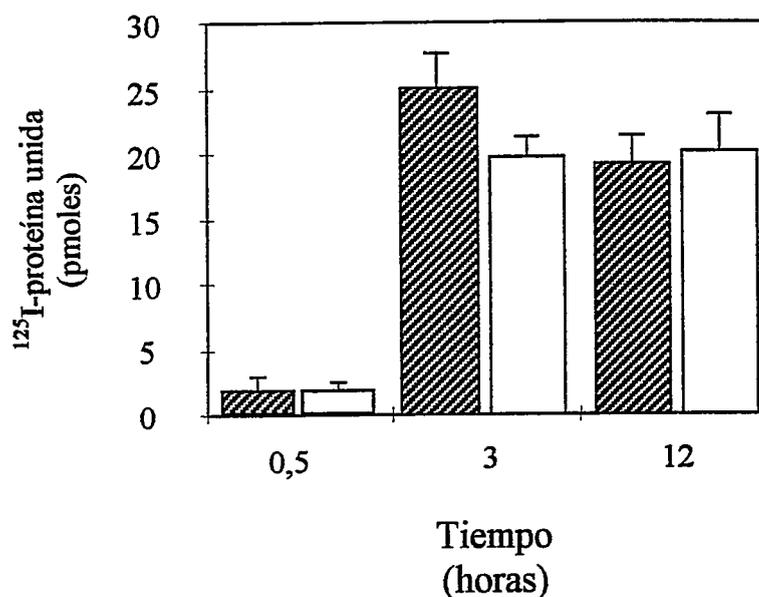


Figura 15. Unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto* a tres tiempos distintos. 100 zonas pelúcidas se incubaron por distintos tiempos con 9.259 pmoles de la proteína recombinante de β -acrosina yodada (10,8 cpm/pmol; barras achuradas) o con 2.985 pmoles de la proteína nativa proacrosina yodada (33,5 cpm/pmol; barras blancas). Las zonas pelúcidas se lavaron y la cantidad de proteína unida se estimó midiendo la radiactividad en un contador gamma. Se grafica la cantidad en pmoles de proteína yodada unida versus el tiempo de coincubación. Nótese que ya a partir de las tres horas de incubación tanto la proteína recombinante como la nativa se unen establemente a las zonas pelúcidas.

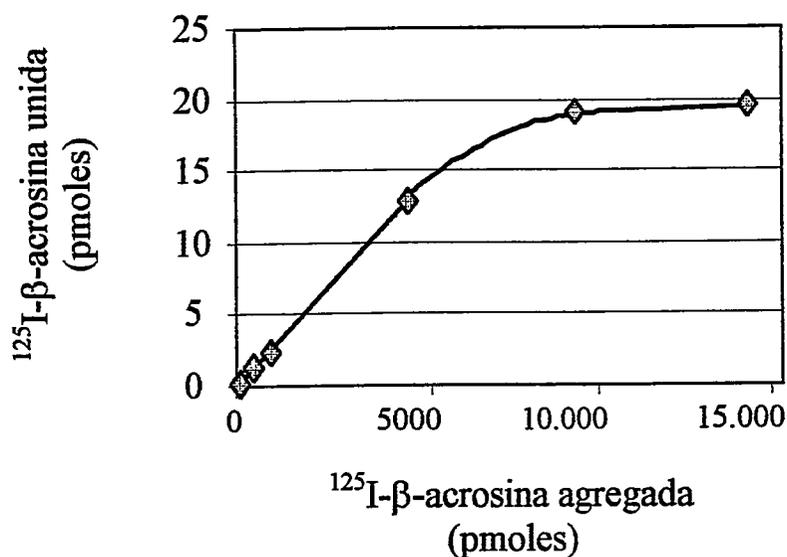


Figura 16. Capacidad de unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto*. 100 zonas pelúcidas se incubaron por 3 horas a concentraciones crecientes de la proteína recombinante de β -acrosina yodada. Las zonas pelúcidas se lavaron y la cantidad de proteína unida se estimó midiendo la radiactividad con un contador gamma. Se grafica el promedio de la cantidad en pmoles de ^{125}I - β -acrosina unida versus la cantidad en pmoles de ^{125}I - β -acrosina agregada. Este experimento fue realizado una sola vez en duplicado. La dispersión máxima de los valores fue del 5 %. Nótese que la unión es saturable.

se unen por zona pelúcida. Por último, para determinar la especificidad de esta unión, las zonas pelúcidas se preincubaron en dos condiciones distintas. Como se observa en la Figura 17, tanto la unión de β -acrosina yodada como de la proteína nativa proacrosina yodada a la zona pelúcida es desplazada por la proteína nativa proacrosina no marcada como por fucoidano. Proacrosina a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, es capaz de inhibir en un 55 % la unión de la proteína recombinante y en un 76 % a la proteína nativa. Por otro lado, fucoidano 100 μM inhibe a ambas proteínas en aproximadamente un 44 %.

Con el fin de localizar la unión de las proteínas recombinantes a la zona pelúcida *in toto*, se montó el ensayo de micro-autorradiografía. Para esto, 100.000 cpm de la proteína recombinante yodada de β -acrosina y zonas pelúcidas intactas fueron coincubadas por 1 hora, fijadas a portaobjetos y finalmente recubiertas con una emulsión autoradiográfica. La detección de la unión de la proteína recombinante de β -acrosina yodada a la zona pelúcida se realizó por autoradiografía según se explica en Métodos: Como se muestra en la Figura 18A la marca radioactiva se encuentra localizada en toda la superficie de la zona pelúcida, en forma heterogénea. Si las zonas pelúcidas son incubadas por 3 horas con la proteína recombinante yodada, la marca se observa sobre toda la superficie y grosor de la zona (datos no mostrados). Para demostrar la especificidad de esta marca, se realizó un ensayo de competencia, en donde, se preincubaron las zonas pelúcidas con

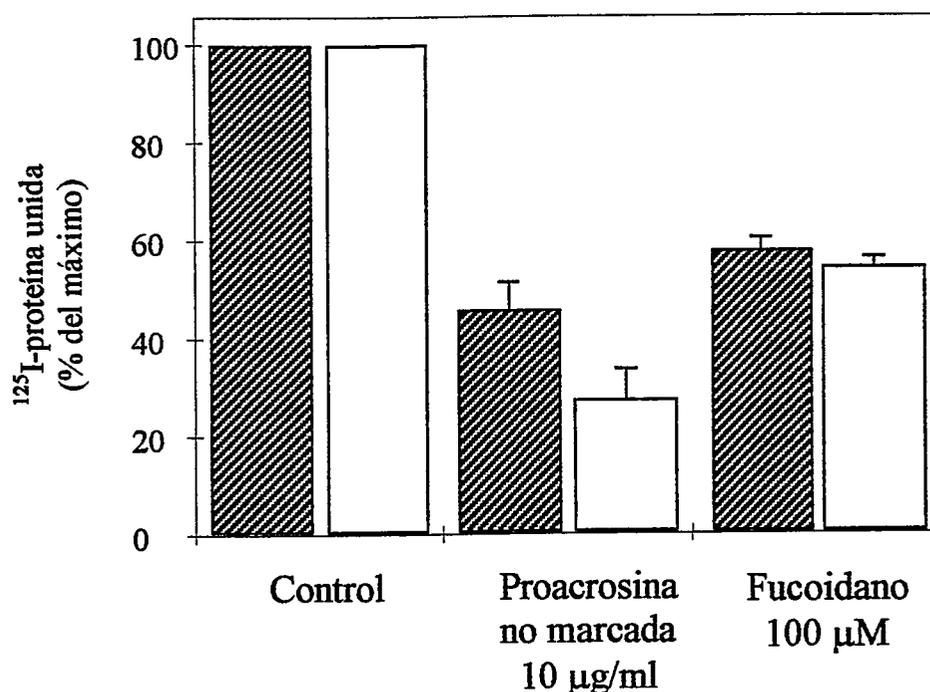


Figura 17. Especificidad de la unión de β -acrosina recombinante yodada a zonas pelúcidas *in toto*. 100 zonas pelúcidas se incubaron por 3 horas con 100.000 cpm de la proteína recombinante de β -acrosina yodada (10,8 cpm/pmol; barras achuradas) o la proteína nativa proacrosina yodada (33,5 cpm/pmol; barras blancas) en ausencia (control) o en la presencia de un competidor. Las zonas pelúcidas se lavaron y la cantidad de proteína unida se estimó midiendo la radiactividad con un contador gamma. Se grafica el porcentaje de unión específica máxima versus la presencia o ausencia del competidor. La unión máxima en las muestras control fue de 2063 cpm para β -acrosina recombinante y 3030 cpm para proacrosina.

proacrosina no marcada (10 $\mu\text{g/ml}$). En la Figura 18C, se observa que la marca radiactiva es casi totalmente desplazada por la presencia del competidor. Con el fin de observar con mayor claridad la unión, se realizó una densitometría tridimensional de las imágenes digitalizadas (Figuras 18 B y D).

K. ENSAYOS DE PENETRACIÓN ESPERMÁTICA HOMÓLOGA A ZONAS PELÚCIDAS DE CERDO

K.1. Ensayos de penetración espermática a zonas pelúcidas de cerdo. Con el fin de determinar el efecto de la presencia de las proteínas recombinantes de β -acrosina de cerdo en la penetración de espermatozoides de cerdo a zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo, se procedió a montar el ensayo de penetración espermática homóloga. Para esto, zonas pelúcidas de cerdo se incubaron por 3 horas con 15 pmoles de la respectiva proteína recombinante y se lavaron. Por otro lado, se incubó espermatozoides de cerdo en medio de cultivo capacitante y se coincubaron por 3 horas (Serie I) o por 12 horas (Serie II) con las zonas pelúcidas pretratadas. Los ensayos de penetración realizados con zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo fueron negativos en todos los casos, inclusive los controles. Pero se pudo determinar que bajo estas condiciones, los espermatozoides de cerdo son capaces de unirse en gran número a las zonas pelúcidas, inclusive en la presencia de las proteínas recombinantes (Figura 19) y sin afectar su motilidad. La tabla bajo la Figura 19 muestra el número de zonas pelúcidas analizadas, el número de replicas y el número

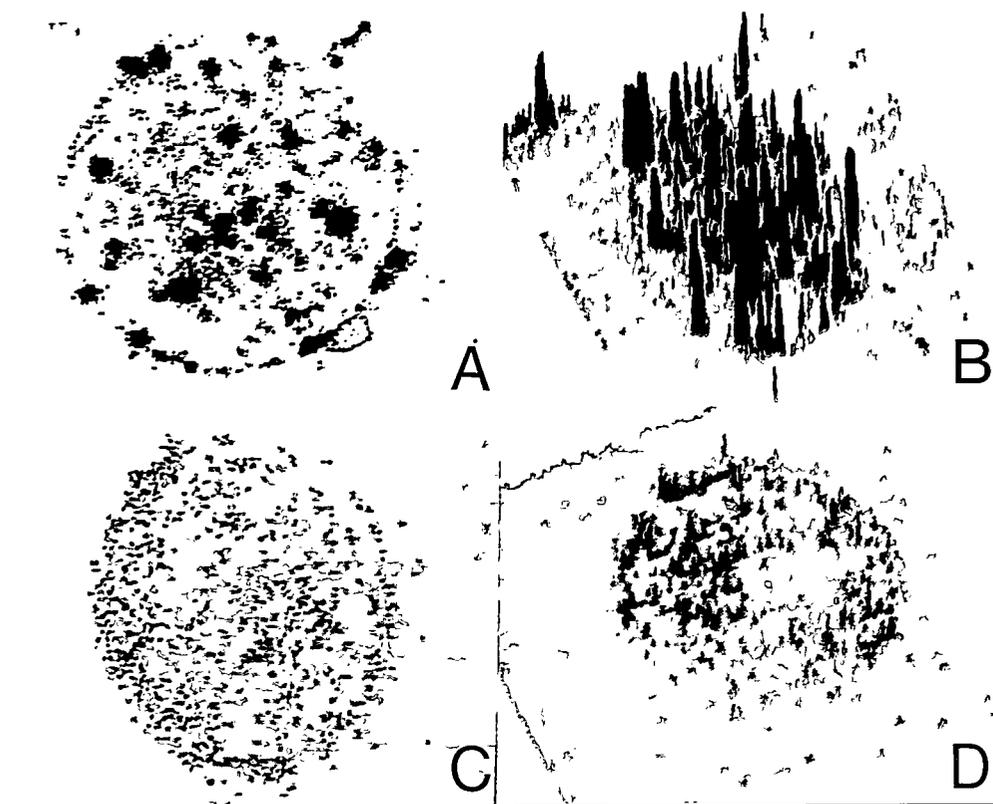
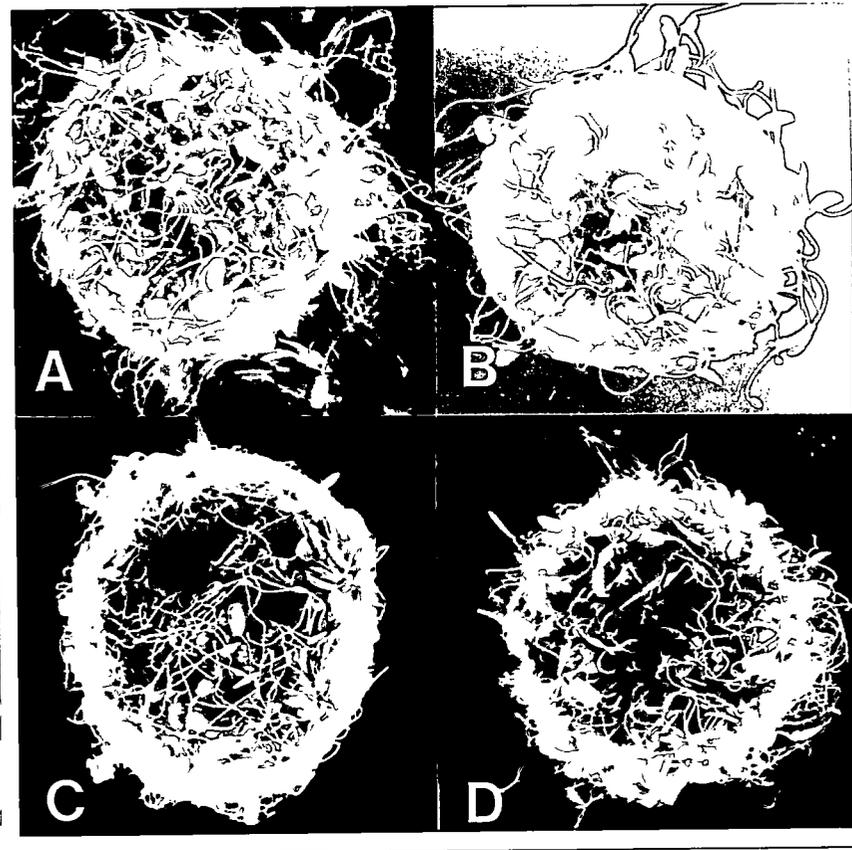


Figura 18. Localización de la unión de ^{125}I - β -acrosina a la zona pelúcida *in toto*. Zonas pelúcidas incubadas con 100.000 cpm de ^{125}I - β -acrosina en ausencia (A) o en presencia de proacrosina no marcada (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (C), se lavaron e inmovilizaron en porta objetos. Luego, se cubrieron con emulsión autoradiográfica, expusieron, revelaron y se digitalizaron las imágenes según se describe en Métodos. En (B) y (D) se realizó una densitometría tridimensional de las imágenes digitalizadas a la izquierda, a través del programa Scion Image (Scion Corporation, USA) con el fin de evidenciar la intensidad de la unión.



Tratamiento (hrs. de coincubación)	Nº de zonas inseminadas (réplicas)	Nº de zonas penetradas (%)
Serie I (3 horas)	663 (8)	0
Serie II (12 horas)	294 (4)	0

Figura 19. Análisis de la unión de espermatozoides de cerdo a zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina. Fotomicrografías al MEB de zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo luego del ensayo de penetración espermática. A) control, y en presencia de las proteínas recombinantes de B) β -acrosina C) mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina D) cadena pesada de β -acrosina. La tabla indica el número de zonas analizadas y la falla en la penetración espermática. Aumento X 560.

de zonas penetradas. Un análisis más detallado a microscopía electrónica de barrido indicó que existen, en todos los casos, espermatozoides sobre la superficie de la zona pelúcida que han sufrido la reacción acrosómica (Figura 20).

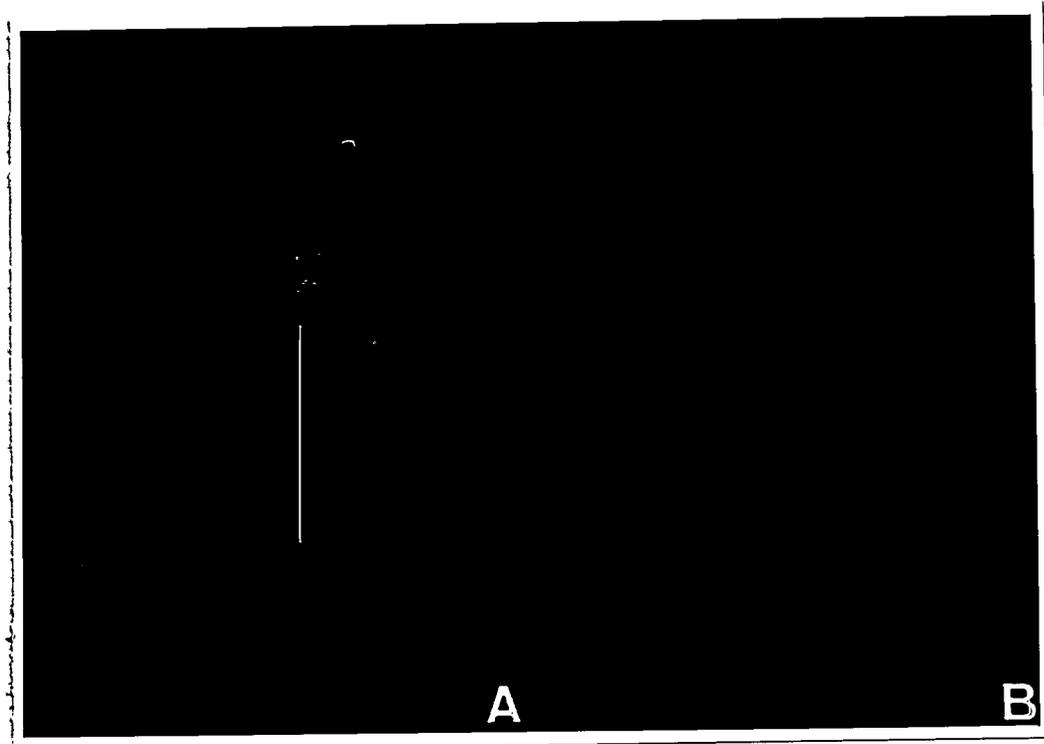
K.2. Ensayos de fecundación *in vitro* en cerdo. Al no poder obtener penetraciones espermáticas en zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo, se procedió a realizar ensayos de fecundación *in vitro* madurando ovocitos ováricos de cerdo. Para esto, se procedió a madurar ovocitos ováricos de cerdo, en donde, ovocitos cubiertos por más de dos capas de células foliculares compacta se incubaron por 48 horas en medio de maduración. En la Figura 21A se muestra un ovocito de cerdo inmaduro, con sus células foliculares compactadas. La Figura 21B muestra un ovocito de cerdo luego de 48 horas de incubación en medio de maduración. Este ovocito presenta sus células foliculares expandidas, primer indicador de maduración ovocitaria. En la Figura 21C se observa un ovocito de cerdo maduro luego de haber sido removidas sus células foliculares. Es en estas condiciones, que los ovocitos se usan para los ensayos de fecundación *in vitro* o se fijan para el análisis del estado de maduración nuclear. La maduración se determinó bajo microscopía de epifluorescencia analizando la desaparición de la vesícula germinativa (Figura 22A) y la presencia de cromosomas en prometafase y metafase II o por la presencia del primer corpúsculo polar (Figura 22B). La tabla bajo la Figura 22 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de maduración de ovocitos de cerdo. En todos los ensayos el porcentaje de maduración fue siempre sobre 90% (Figura 22).



Figura 20. Análisis de la reacción acrosómica de espermatozoides de cerdo sobre la superficie de las zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina. Fotomicrografías al MEB de espermatozoides de cerdo sobre la superficie de zonas pelúcidas cadavéricas de cerdo luego del ensayo de penetración espermática. A) control, y en presencia de las proteínas recombinantes de B) β -acrosina C) mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina D) cadena pesada de β -acrosina. Se muestra en todos los casos la presencia de espermatozoides reaccionados. Aumento (A) X 5.400; (B, C y D) X 12.000.



Figura 21. Maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo. Fotomicrografías al microscopio de contraste de fases donde se observa: A) ovocito de cerdo inmaduro con las células foliculares que lo rodean compactas; B) ovocito de cerdo maduro y con las células foliculares que lo rodean expandidas; C) ovocito de cerdo maduro, liberado de sus células foliculares. Aumento (A y B) X 240; (C) X 480.



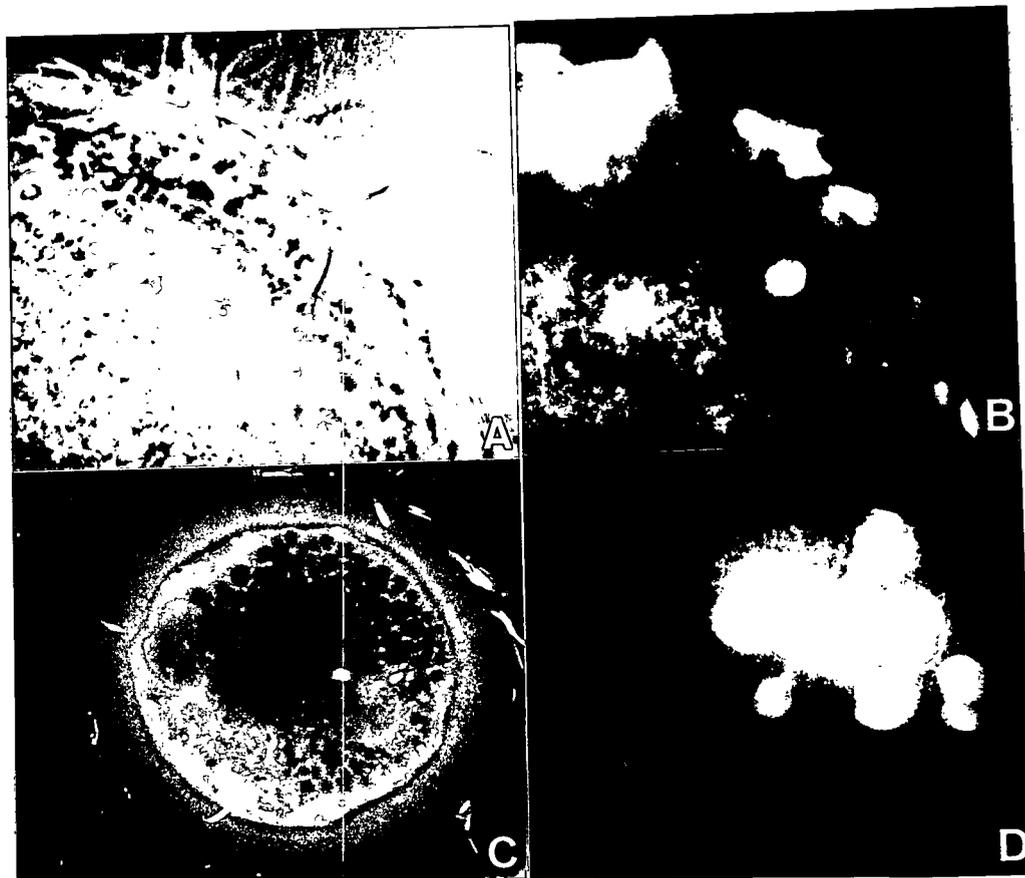
N° de ovocitos puestas a madurar (réplicas)	N° de ovocitos maduros	Porcentaje de ovocitos maduros (D.S.)
203 (6)	196	96,5 ± 4,6

Figura 22. Análisis microscópico de la maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo. Fotomicrografías al microscopio de epifluorescencia de ovocitos de cerdo libre de las células del cúmulo ooforo teñidos con Hoescht 1µg/ml donde se observa: A) ovocito inmaduro con la presencia de la vesícula germinativa. B) ovocito maduro con la presencia de la placa metafásica y el primer polocito (fuera del plano de observación). La tabla indica el número de ovocitos analizados y el porcentaje de maduración. Aumento X 580.

El ensayo de fecundación *in vitro*, consistió en incubar espermatozoides de cerdo en un medio capacitante por 3 horas y luego coincubarlos en presencia de ovocitos madurados *in vitro* sin células del cúmulo ooforo pretratados con las proteínas recombinantes. Los resultados de la fecundación *in vitro* en cerdo son muy variables y con una alta tasa de poliespermia. Los ovocitos fecundados se distinguen por la presencia de cabezas de espermatozoides en el grosor de la zona pelúcida o en el espacio perivitelino (Figura 23A,B y C), la presencia del pronúcleo masculino mas el complemento cromosómico femenino o por la presencia de dos blastómeros de la primera segmentación (Figura 23D). Bajo estas condiciones, el porcentaje de fecundación control fue de 72,3% y al preincubar los ovocitos con zona pelúcida con β -acrosina recombinante y con β -acrosina Ser/Ala²²², la fecundación alcanzó un 56,2% y 63,6%, respectivamente (Figura 23).

L. ENSAYOS DE PENETRACIÓN ESPERMÁTICA HOMÓLOGA A ZONAS PELÚCIDAS CADAVERICAS HUMANAS

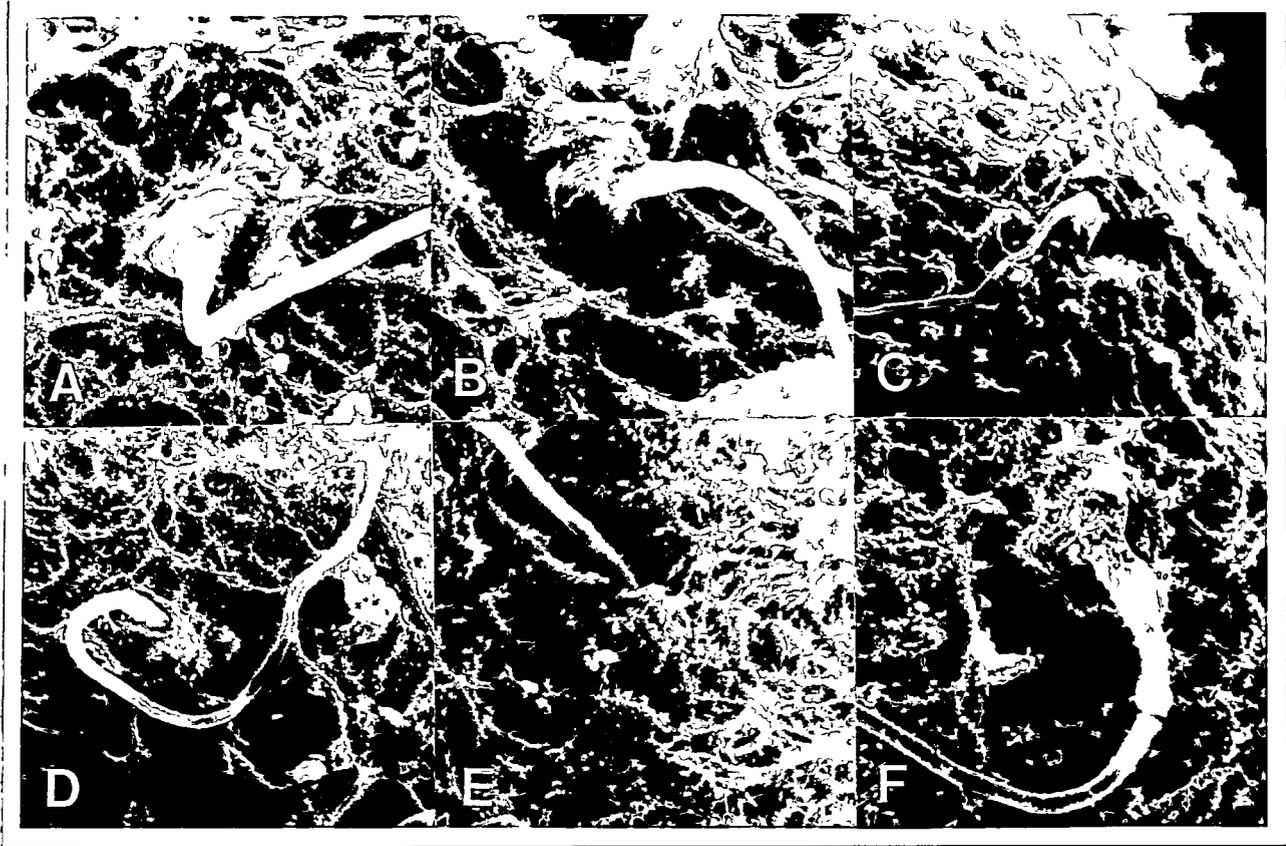
Con el fin de determinar la especie especificidad del efecto de las proteínas recombinantes en el proceso de penetración espermática a través de la zona pelúcida, nos propusimos realizar ensayos de penetración espermática homóloga a zonas pelúcidas cadavéricas humanas en presencia de las formas recombinantes de



Tratamiento	Nº de ovocitos inseminados (réplicas)	Nº de ovocitos fecundados	Porcentaje de fecundación (D.S.)
Control	65 (4)	47	72,3 ± 31,3
β-Acrosina recombinante	32 (4)	18	56,2 ± 12,0
β-Acrosina Ser/Ala ²²²	22 (4)	14	63,6 ± 17,2

Figura 23. Análisis de la fecundación *in vitro* de ovocitos de cerdo en presencia de las formas recombinantes de β-acrosina. Fotografías al microscopio de contraste de fases (A) y de epifluorescencia (B) teñido con Hoescht no vital mostrando un espermatozoide en el espacio perivitelino de un ovocito maduro. Además se observa en microscopía confocal (C) tres espermatozoides penetrando la zona pelúcida y (D) una fotografía al microscopio de epifluorescencia de un embrión de dos células, donde se puede apreciar la presencia de ambos núcleos. La tabla indica para los distintos tratamientos, el número de ovocitos analizados y el porcentaje de penetración espermática. Aumento (A y B) X 700; (C y D) X 350.

β -acrosina con capacidad de unión. Para esto, espermatozoides humanos se incubaron en medio de cultivo capacitante por 3 horas y luego se coincubaron por tres horas más con zonas pelúcidas cadavéricas humanas pretratadas con las proteínas recombinantes de β -acrosina. La Figura 24 muestra el análisis de las zonas pelúcidas en el microscopio electrónico de barrido, mostrándose que, tanto en los ensayos de penetración control, como en aquellos realizados con ovocitos cadavéricos humanos preincubados con las distintas formas recombinantes de β -acrosina se observa al menos un espermatozoide en el proceso de penetración de la zona pelúcida. Por lo tanto, se puede concluir que, las proteínas recombinantes de β -acrosina de cerdo no afectan un proceso heterólogo de fecundación *in vitro*, usando gametos humanos.



Tratamiento	Nº de zonas inseminadas	Nº de zonas penetradas	Porcentaje de penetración
Control	6	6	100
β -acrosina recombinante	8	8	100
β -acrosina mutada Ser/Ala ²²²	7	7	100
Cadena Pesada β -acrosina	6	6	100

Figura 24. Ensayos de penetración de zonas pelúcidas cadavéricas humanas en presencia de las formas recombinantes de β -acrosina. Fotomicrografías con el MEB de zonas pelúcidas cadavéricas de humanas luego del ensayo de penetración espermática. A) control, y en presencia de las proteínas recombinantes de β -acrosina (B y C), mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina (D y E), cadena pesada de β -acrosina (F). En todos los casos se observa espermatozoides humanos penetrando total o parcialmente la superficie de la zona. La tabla muestra los datos del porcentaje de fecundación en los distintos tratamientos. Aumento X 12.000.

DISCUSIÓN

A. EXPRESIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

A partir del mRNA de proacrosina de cerdo se amplificó el cDNA de β -acrosina y distintos fragmentos de ella para determinar la participación de estas proteínas en la unión secundaria a la zona pelúcida y determinar las regiones de proacrosina/acrosina que estarían involucrados en esta unión. Además se produjo una forma de β -acrosina mutada en el sitio catalítico para determinar la participación del sitio activo de esta enzima en la unión secundaria a la zona pelúcida. Estos fragmentos de DNA se subclonaron en el vector de expresión pGEX2T en marco de lectura con el gen de la glutatión S-transferasa. Luego, estas quimeras recombinantes de β -acrosina se expresaron en bacterias *E. coli* DH5 α , se purificaron y se separaron de la proteína de fusión. Las proteínas recombinantes expresadas corresponden a los residuos 1 a 273 (β -acrosina y un mutante del sitio catalítico - Ser/Ala²²²- de β -acrosina), residuos 22 a 273 (cadena pesada de β -acrosina), residuos 1 a 99 (extremo amino terminal de β -acrosina) y residuos 209 a 273 (extremo carboxilo terminal de β -acrosina) como se muestra en las Figuras 9 y 10.

Las cinco proteínas recombinantes expresadas presentaron una movilidad electroforética según lo esperado y las cantidades obtenidas después de su purificación fueron suficientes para la realización de los estudios siguientes.

B. INMUNODETECCIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA

Las tres formas recombinantes de mayor peso molecular: β -acrosina, mutante Ser/Ala²²² de β -acrosina y la cadena pesada de β -acrosina, fueron reconocidas por un anticuerpo policlonal dirigido contra acrosina de cerdo. Esto confirma la presencia de epítopes inmunológicos similares a los de la proteína nativa en las tres recombinantes. Las otras dos recombinantes correspondientes a los extremos amino y carboxilo terminal de β -acrosina no fueron reconocidas por el anticuerpo. La razón de porque este anticuerpo no reconoce el fragmento amino terminal de acrosina por sí solo se debe a que los anticuerpos usados se prepararon extrayendo de un gel una banda correspondiente a β -acrosina. Esta banda no contiene la cadena liviana de β -acrosina por lo tanto gran parte del extremo amino de la proteína no se usó como inmunógeno. La proteína recombinante del extremo carboxilo terminal no se reconoce probablemente debido al reducido número de aminoácidos que lo conforman.

C. ACTIVIDAD ESTERÁSICA DE β -ACROSINA RECOMBINANTE

Uno de los resultados importantes de esta tesis es que la recombinante de β -acrosina presenta actividad esterásica. Esto fue comprobado en un ensayo enzimático usando el sustrato específico para serino proteasas, BAEE. La recombinante purificada de β -acrosina presenta una actividad específica de 3800 U/mg y es completamente inhibida por distintos inhibidores característicos de serino proteasas (TLCK, p-amino benzamidina y benzamidina).

Estos resultados demuestran que la actividad proteásica de β -acrosina recombinante no depende del estado glicosilado de esta proteína y que su actividad se adquiere solamente después de incubarla con trombina para separarla de la proteína de fusión. Además, este tratamiento con trombina podría catolizar la proteólisis de una fracción menor de total de las proteínas recombinantes, liberando la cadena liviana de la pesada, imitando la activación que normalmente sufre el zimógeno nativo. En un trabajo previo, se expresó una proteína recombinante de β -acrosina similar a la de esta tesis (Jansen y cols., 1995; Figura 25). Esta proteína recombinante fue purificada desde cuerpos de inclusión, a diferencia de las proteínas recombinantes obtenidas durante el desarrollo de esta tesis que fueron purificadas desde sobrenadantes sonicados de bacterias. En el trabajo de Jansen y cols. (1995), los cuerpos de inclusión se solubilizaron y las proteínas de interés fueron purificadas

por electroelución desde geles de poliacrilamida en ausencia de agentes reductores. Finalmente, las proteínas fueron desnaturadas en presencia de cloruro de guanidinio 6 M y renaturadas mediante una dilución rápida con ácido clorhídrico 1 mM. Este tratamiento, permitía que las proteínas recombinantes mantuvieran la actividad de unión a ZPGPs en forma similar al zimógeno nativo, pero carecían de actividad enzimática. Esta última característica, sin embargo, sugiere que existe cierto grado de plegamiento erróneo en el sitio activo de las proteínas recombinantes obtenidas por Jansen y cols. (1995) o que al no ser tratadas con otra proteasa, como trombina, no se activan por separación de la cadena liviana de la pesada.

La actividad enzimática que presenta la proteína recombinante de β -acrosina después de cuatro minutos de incubación aumenta abrupta y significativamente en comparación a la proteína nativa (Figura 12). Una explicación podría ser que la proteína recombinante al no estar glicosilada y no tener el extremo carboxilo terminal, se autoactive más rápidamente que la proteína nativa o bien haya perdido su capacidad de inactivarse. Una segunda interpretación se basa en el hecho que la proteína nativa es inestable en el tiempo al ser incubada sobre 28° C (Polakoski y Parrish, 1977), por lo que esta podría inactivarse más rápidamente que la proteína recombinante. Por último, en el extracto ácido, fuente de la proteína nativa, podrían existir inhibidores específicos que regulen la actividad de β -acrosina.

D. UNIÓN DE LAS FORMAS RECOMBINANTES DE β -ACROSINA A LAS ZPGPs

En esta tesis se demostró que la actividad enzimática de β -acrosina no está directamente involucrado en la unión a las ZPGPs. La mutación realizada en el sitio catalítico de β -acrosina (Ser²²² por Ala) no modificó ni la capacidad ni la especificidad de unión a ZPGPs, al compararla con la proteína recombinante normal (Figura 13 y 14). Además, se confirma el hecho que la proteína nativa no necesita estar activa para tener capacidad de unión, ya que ella presenta las mismas características de unión que la proteína recombinante mutada en el sitio catalítico. Puesto que tanto las proteínas recombinantes de β -acrosina (expresadas en bacterias) como la proteína nativa presentan capacidad y especificidad de unión similares (Figura 14 y Tabla 5) la glicosilación no sería importante en la unión secundaria.

Por otro lado, se ha propuesto que aminoácidos básicos en la superficie de la molécula de β -acrosina de cerdo son los responsables de la unión a ZPGPs (Jansen y cols., 1998). Estos aminoácidos básicos deben tener una determinada orientación en la superficie de β -acrosina que se complemente con la orientación que presentan los grupos polisulfatos de las ZPGPs (Jones, 1991; Urch y Patel, 1991). Usando péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de β -acrosina de cerdo, Jansen y cols. mostraron que sólo una proteína recombinante (residuos 3 a 275) era capaz de unirse

a ZPGPs con la misma capacidad que la proteína nativa, mientras que las proteínas recombinantes de menor tamaño se unían en mucho menor proporción (Jansen y cols., 1995; Figura 25). Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos en esta tesis, puesto que la proteína recombinante que corresponde a la cadena pesada de β -acrosina de cerdo (residuos 21 a 272) sólo une un 52 % del máximo alcanzado por β -acrosina recombinante, sugiriendo que los residuos 1 a 21, de la cadena liviana serían importantes para definir la capacidad de unión máxima de β -acrosina a ZPGPs. Sin embargo, la proteína recombinante que corresponde al extremo amino terminal de β -acrosina no tiene capacidad de unirse a ZPGPs. Por lo tanto, la cadena liviana, a pesar de la presencia de 4 argininas y una lisina (R^1 , R^{13} , R^{15} , K^{17} , y R^{23}), por sí sola no mediaría la unión a ZPGPs. Estas observaciones sugieren que la cadena liviana no participaría directamente en la unión a ZPGPs, como fue propuesto recientemente (Jansen y cols., 1998), sino que sería necesaria para un correcto plegamiento de la proteína recombinante de β -acrosina permitiendo que dos o más regiones de la molécula converjan formando el dominio de unión. Esta hipótesis se apoya además en los resultados que muestran la incapacidad de unión de las proteínas recombinantes del extremo amino y carboxilo terminal de β -acrosina y que concuerdan con resultados anteriores (Jansen y cols., 1995), donde fragmentos menores a aquellos que representan a la molécula completa de β -acrosina tienen una marcada disminución en la unión a ZPGPs.

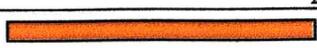
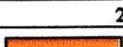
Polipéptido	Esquema	% de Unión
Proacrosina silvestre		100
PS P2 (F44-C55)		0,2
PS P3 (R1-R23)		0,4
PS P4 (W64-L83)		0,7
PS P6 (V24-M45)		0,2
PR (-2-275)		100
PR (51-275)		25
PR (93-275)		22
PR (179-275)		2,0
PR (-2-250)		43
PR (-2-179)		19
PR (102-179)		5,0
PR β-acrosina		100
PR Ser/Ala ²²² β-acrosina		100
PR Cadena pesada de β-acrosina		52
PR Extremo amino terminal de β-acrosina		2,5
PR Extremo carboxilo terminla de β-acrosina		1,4

Figura 25. Unión relativa a ¹²⁵I-ZPGPs de proacrosina, péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de β-acrosina. Datos obtenidos de esta tesis (en celeste) y según Jansen y cols., (1995) en amarillo y rojo. Se indica el tipo de polipéptido: proteína silvestre de proacrosina, péptidos sintéticos (PS), y proteínas recombinantes (PR) con los residuos que los limitan entre paréntesis. Además se esquematiza la ubicación que abarcan los polipéptidos dentro de la proteína de proacrosina y el porcentaje de unión a ¹²⁵I-ZPGPs, relativa a proacrosina silvestre.

Por último, recientemente se han identificado dos grupos de aminoácidos que comprenden His⁴⁷, Arg⁵⁰ y Arg⁵¹ junto con Arg²⁵⁰, Lys²⁵² y Arg²⁵³ dentro de la molécula completa de β -acrosina como los responsables de la unión secundaria (Jansen y cols., 1998). Por mutación sitio dirigida se ha demostrado que estos aminoácidos son cruciales para mantener la unión a las ZPGPs, ya que la delección o el reemplazo de estos aminoácidos reduce severamente la afinidad de las proteínas recombinantes a las ZPGPs.

E. ANÁLISIS DE MODELAJE DE β -ACROSINA

Se realizó un análisis de modelaje tridimensional de la proteína de β -acrosina de cerdo con el fin de determinar el posible dominio de unión o superficies de posible interacción con la zona pelúcida. Se realizó el modelaje para la secuencia de aminoácidos de β -acrosina usando el servidor de modelaje automático (ProMod) Swiss Model (código de pedido: SMID AAAa27998), seguido de un refinamiento del modelo por CHARMM (Peitsch y Jongeneel, 1993; Pietsch, 1995). El modelo generado se basó en los datos cristalográficos de distancias atómicas de las proteínas: tripsina, protrombina 2 y α -trombina según la información proporcionada por el sistema (Tabla 6).

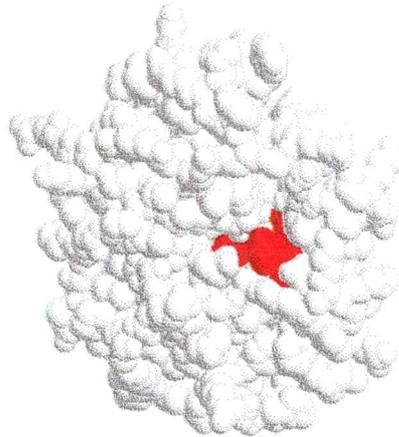
Este análisis resultó en un modelo tridimensional de β -acrosina de cerdo en donde todas sus cisteínas se encuentran alineadas para formar los respectivos puentes disulfuro. Esto permite además, un adecuado plegamiento de la molécula para aproximar a la triada catalítica (His⁷⁰, Asp¹²⁴, Ser²²²) en un bolsillo (Figura 26A). En las figuras 26B y 26C, se muestra la ubicación de los fragmentos amino y carboxilo terminal en la estructura de β -acrosina. En la Figura 27 se muestran ejemplos del análisis de la estructura tridimensional de β -acrosina. En el esquema superior (A) se observa que esta molécula, representada como cintas, presenta dos grupos de hojas beta (flechas amarillo) formando un barril. Además, se observa la cadena liviana formando un segmento de alfa hélice (en rojo) y se representa como bastones en azul a la triada catalítica. En los esquemas inferiores (Figura 27B y C) se observa desde otro ángulo a la misma molécula, donde se ha modificado la presentación de los aminoácidos básicos.

Del modelaje de la proteína de β -acrosina se puede concluir que los aminoácidos básicos que se han identificado como los responsables de la unión secundaria se encuentran expuestos en la molécula y cercanos al bolsillo del sitio catalítico. Estos corresponden a dos grupos de amino ácidos: His⁴⁷, Arg⁵⁰ y Arg⁵¹ junto con Arg²⁵⁰, Lys²⁵² y Arg²⁵³ de la molécula de β -acrosina (Jansen y cols., 1998)

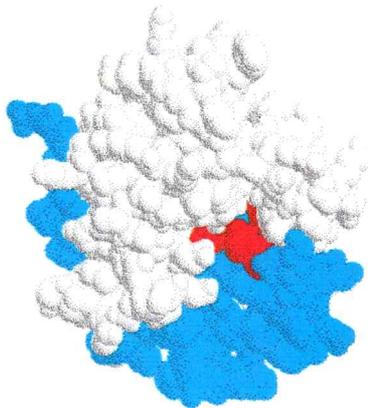
<p>Complejo (Serino proteasa/inhibidor) 27-JUN-94 1HAG 1HAG 2 Protrombina 2 (E.C.3.4.21.5) conjugada a Hirugen 1HAG 3</p>
<p>Serino proteasa 31-MAR-92 1AAO MAST CELL TRYPTASE Modelo teórico</p>
<p>Hidrolasa (Serino proteasa) 21-APR-93 1FPH α-Trombina (E.C.3.4.21.5) conjugada con Hirudina</p>
<p>Complejo (Serino proteasa/inhibidor) 26-MAY-94 1TMU 1TMU 2 α-Trombina (E.C.3.4.21.5) conjugada con Hirudina 1TMU 3</p>
<p>Serino proteasa/receptor 18-JAN-94 1NRO 1NRO 2 α-Trombina (E.C.3.4.21.5) no covalentemente unida con 1NRO 3</p>
<p>Serino proteasa /receptor 18-JAN-94 1NRP 1NRP 2 α-Trombina (E.C.3.4.21.5) no covalentemente unida a 1NRP 3</p>
<p>Serino proteasa 10-JUL-92 1TBS Tripsina, Serino proteasa inhibida por benzamidina</p>

Tabla 6. Entradas usadas para el modelaje del Direct Swiss-Model pedido para Acro-cerdo. Se indica el nombre y tipo de proteína, fecha y código de entrada, y si se encuentra conjugada a algún inhibidor.

A



B



C

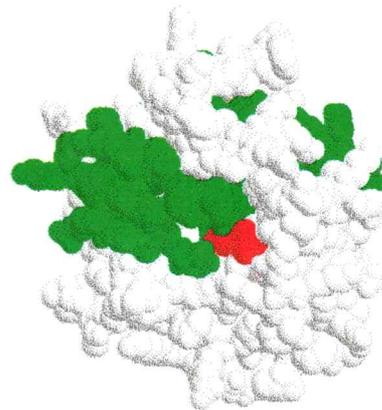


Figura 26. Diagrama esquemático de la estructura de β -acrosina de cerdo producido en RasMol donde la molécula se representa como espacio lleno. A. Se muestra a la triada catalítica (His⁷⁰, Asp¹²⁴, Ser²²²) en rojo y el resto de los residuos en blanco. B. Se muestra la posición dentro de β -acrosina que involucra el extremo amino terminal de la molécula en color turquesa. C. Se muestra la posición dentro de β -acrosina que involucra el extremo carboxilo terminal de la molécula en color verde.

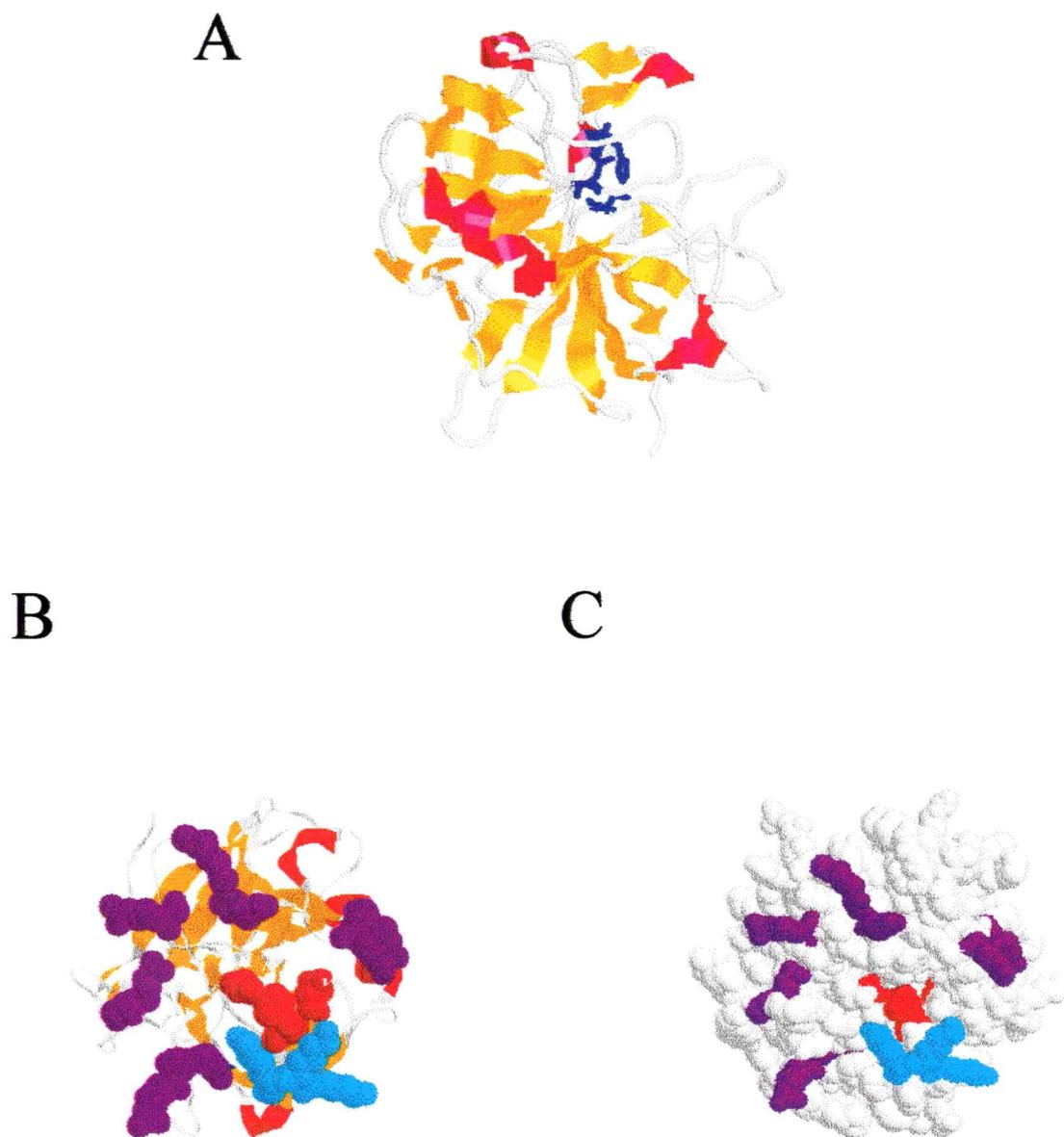


Figura 27. Diagrama esquemático de la estructura de β -acrosina de cerdo producido en RasMol. A. La molécula se representa como cintas, en donde, las flechas amarillas representan a las hojas plegadas beta, las cintas rojas representan las formaciones en alfa hélice, la triada catalítica (His⁷⁰, Asp¹²⁴, Ser²²²) se muestra en forma de bastones azules y el resto de los residuos en blanco. B. La misma presentación que en A pero la triada catalítica se representa en forma llena roja y los amino ácidos básicos se representan llenos (Arg en morado, Lis en turquesa e His en Amarillo). C. La misma presentación que en B pero toda la molécula se representa en forma llena, observándose así mejor la ubicación real de los amino ácidos.

y que para formar el dominio de unión la proteína necesita adoptar su estructura secundaria y terciaria adecuadamente. Aunque este modelo de la molécula de β -acrosina no es exacto en todas sus distancias atómicas, nos permite visualizar los distintos aminoácidos básicos que se encontrarían expuestos en la superficie de la proteína.

F. HOMOLOGIA DE SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE β -ACROSINA DE SIETE ESPECIES DE MAMÍFEROS

En cerdo, la unión de proacrosina a las ZPGPs parecería requerir de más de un punto de contacto entre las dos proteínas, a diferencia de conejo en donde se requiere un único punto de contacto formado por sólo tres aminoácidos básicos. Esta diferencia podría deberse a características de especificidad de especie, a pesar de la alta identidad aminoacídica de las dos secuencias de β -acrosina. En vista de las sugerentes diferencias reportadas se analizó la homología de secuencias de aminoácidos de β -acrosina entre siete especies de mamíferos, de manera de observar las distancias genéticas entre estas especies que podrían correlacionarse con la complejidad del sitio o dominio de unión secundaria de β -acrosina a la zona pelúcida (Figura 28). La homología fue analizada a través del programa computacional Clustal W 1.6 (Thompson y cols., 1994) basado en el método de “unión de vecinos” o “neighbour-joining” (Saitou y Nei, 1987), en donde el porcentaje de divergencia es calculado entre cada par de secuencias alineadas, y

estos datos usados para construir un árbol filogenético. En la Figura 29 se muestra un dendograma radial de la homología de secuencias de β -acrosina de las 7 especies analizadas. La secuencia de β -acrosina de bovino no se incorporó al análisis debido a que esta no tiene el extremo amino terminal de la molécula completo, lo que introduce al sistema de análisis una alta penalidad en el alineamiento múltiple de secuencias. Como era de esperar, las secuencias de aminoácidos de β -acrosina humana y del orangután presentan la menor divergencia (0,014 unidades) y están ubicados en el dendograma al otro extremo de las secuencias de los roedores, los cuales están agrupados todos juntos (ratón, rata y cobayo). Por su parte, la secuencia de β -acrosina de cerdo está más cerca de la rama de los primates que la de los lagomorfos, los cuales están más cerca de los roedores. Las secuencias de aminoácidos de β -acrosina de conejo y cerdo presentan la más alta divergencia (0,259 unidades).

Esta divergencia de las secuencias de aminoácidos de β -acrosina entre las especies de mamíferos analizada apoya la hipótesis que la unión secundaria se podría mantener diferencialmente de acuerdo a la especie. Las diferencias reportadas con respecto al sitio de unión entre conejo y cerdo concuerdan con los resultados de divergencia de las secuencias de aminoácidos de estas dos especies, la más alta entre las especies analizadas. El porcentaje de homología de las siete

ACRO-CONEJO	---MLPTAVLLVLVSVVAKDNATCDGPCGLRFRQNPQGGFRVVGQAQQGAWPMMVSL
ACRO-RATA	MVEMLPTVVALVLAVSVVAKDNTTCDGPCGLRFRQNPQAGIRIVGGQTSRRAWPMMVSL
ACRO-CERDO	---MLPTAVLLVLAVSVAARDNATCDGPCGLRFRQKLES GMRVVGMSAEPGAWPMMVSL
ACRO-RATON	MVEMLPTVAVLVLAVSVVAKDNTTCDGPCGLRFRQNSQAGTRIVSGQSAQLGAWPMMVSL
ACRO-HUMANO	MVEMLPTAILLVLAVSVVAKDNATCDGPCGLRFRQNPQGGVRIVGGKAAQHGAWPMMVSL
ACRO-COBAYO	--EMLPTAALLILAVSVIARDNTTCDGPCGLRFRQNLQGSVRIIGGQTAQPGAWPMMVSL
ACRO-ORANGUTAN	MVEMLPTAILLVLAVSVVAKDNATCDGPCGLRFRQNPQGGVRIVGGKAAQHGAWPMMVSL **** *.* *** *.**.****** . *..*..*****
ACRO-CONEJO	QIFTPRNNRRYHACGGVLLNAHWVLTAAHCFNNKQKVYEWRMVFGAQEI EYGTDKPVRPP
ACRO-RATA	QIFTSHNSRRYHACGGSLLNSHWVLTAAHCFDNKKKVYDWRLVFGAHEIEYGRNKPVKEP
ACRO-CERDO	QIFMYHNNRRYHTCGGILLNSHWVLTAAHCFKNKKKVTDWRLIFGANEVVWGSNKPVKPP
ACRO-RATON	QIFTSHNSRRYHACGGSLLNSHWVLTAAHCFDNKKKVYDWRLVFGAQEI EYGRNKPVKEP
ACRO-HUMANO	QIFRYN-SHRYHTCGGILLNSRWVLTAAHCFVGNVNDWRLVFGAKEITYGNKPKVAP
ACRO-COBAYO	QIFMAHNNRRYHACGGILLNSHWVLTAAHCFDSKKKVYDWRLVFGAEEIEYGNKPKVRAP
ACRO-ORANGUTAN	QIFTY--SHRYHTCGGILLNSRWVLTAAHCFVGNVNDWRLVFGAKEITYGNKPKVAP *** .***.*** ***.***** * * .**.*.*** * * ***. *
ACRO-CONEJO	LQERYVEKVVTHDQNYMTEGNDIALLLKITPPVPCGPFIPGCLPNSKAGPPKAAQTCYV
ACRO-RATA	QQERYVQKIVIHEKYNAVTEGNDIALLLKVTTPVTCGDFVGPGLPHFKSGPPRI PHTCYV
ACRO-CERDO	LQERFVEEIIIEKYSVSGLEINDIALIKITPPVPCGPFIPGCLPQFKAGPPRAPQTCWV
ACRO-RATON	QQERYVQKIVIHEKYNVVTEGNDIALLLKITPPVTCGNFIGPCCLPHFKAGPPQIPHTCYV
ACRO-HUMANO	LQERYVEKIIIEKYSATEGNDIALVEITPPISCGRFIGPCLPHFKAGLPRGSQSCWV
ACRO-COBAYO	LQERYVEKIVIHEKYNI VNEGNDIALLLKITPPVSCGPFIPGCLPTFRAGPPKIPQTCYV
ACRO-ORANGUTAN	VQERYVEKIIIEKYSATEGNDIALVEITPPISCGRFIGPCLPHLKAGLPRGSQSCWV ***.*. . *..* * *****. .***. ** *..** *** ..* * . . * *
ACRO-CONEJO	AGWGYVKENAPRPSPTLMEARVDLINLELCNSTQWYNGRITASNL CAGYPSGKIDTCQGD
ACRO-RATA	TGWGYIKDNAPRPSVPLMEARVDLIDLDCNSTQWYNGRVTSTNVCAGYPEGKIDTCQGD
ACRO-CERDO	TGWGYLKEKGPRTSPTLQEARVALIDLDCNSTRWYNGRIRSTNVCAGYPRGKIDTCQGD
ACRO-RATON	TGWGYI KEKAPRPSVPLMEARVDLIDLDCNSTQWYNGRVTSTNVCAGYPEGKIDTCQGD
ACRO-HUMANO	AGWGYIEEKAPRPSIILMEARVDLIDLDCNSTQWYNGRVQPTNVCAGYPVGKIDTCQGD
ACRO-COBAYO	AGWGYIREKAPRPSVPLLEARVELIDLDCNSTQWYNGRVMSTNVCAGYPEGKIDTCQGD
ACRO-ORANGUTAN	AGWGYIEEKAPRPSIILMEARVDLIDLDCNSTQWYNGRVQPTNVCAGYPVGKIDTCQGD .****. . ** * * ***** * *.*****.*****. .*.***** *****
ACRO-CONEJO	SGGPLMCRENQGEFVVGITSWGVCARAKRPGIYTATWPF LDWIASRIGSN--
ACRO-RATA	SGGPLMCRDTRRQPFVIVGITSWGVCARAKRPGVYTATWDYLDWIASKIGP-T-
ACRO-CERDO	SGGPLMCRDRAENTFVVVGITSWGVCARAKRPGVYTSTWPLYNWIASKIGSN--
ACRO-RATON	SGGPLMCRDNVDSFVVVGITSWGVCARAKRPGVYTATWDYLDWIASKIGPN--
ACRO-HUMANO	SGGPLMCKDSKESAYVVVGITSWGVCALAKRPGIYTATWPLYNWIASKIGS--N
ACRO-COBAYO	SGGPLMCRDNANSFVVVGITSWGVCARAKRPGIYTATWDYLDWIASKIGPS--
ACRO-ORANGUTAN	SGGPLMCKDSKESAYVVVGITSWGVCARAKRPGIYTATWPLYNWIASKIGSN-- *****. . * . ***** ***** .**.* * * ****.*

Figura 28. Comparación de las secuencias de aminoácidos de β -acrosina de siete mamíferos. Siete secuencias de aminoácidos de β -acrosina de distintos mamíferos fueron analizadas a través del programa de homología de secuencias y alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL W(1.60). Los aminoácidos idénticos se indican con asteriscos y los cambios conservados con puntos. Las palabras a la izquierda indican a la especie de mamífero que corresponde la secuencia: conejo, rata, cerdo, ratón, humano, cobayo y orangután.

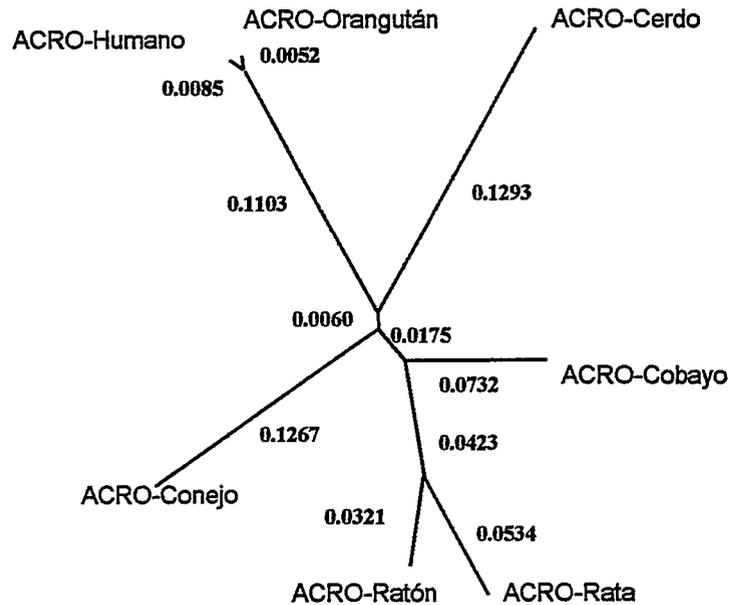


Figura 29. Relaciones filogenéticas de secuencias de aminoácidos de β-acrosina de algunos mamíferos. Siete secuencias de aminoácidos de β-acrosina de distintos mamíferos fueron analizadas a través del programa de homología de secuencias y alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL W(1.60) usando el método de apareamiento de vecinos para construir un dendrograma radial filogenético. Los números de cada rama representan unidades de divergencia arbitrarias. Las secuencias de cada proteína y sus respectivas referencias están almacenadas en el banco de datos Swiss-Prot bajo los siguientes códigos: Acro-rata P29293, Acro-ratón P23578, Acro-cobayo S29599, Acro-conejo P48038, Acro-cerdo P08001, Acro-orangután A61022, Acro-humano P10323.

secuencias de β -acrosina es de 58,8 %, incrementándose a 74,56 % si se compara la secuencia humana con la de cerdo.

G. UNION DE β -ACROSINA RECOMBINANTE A LAS ZONAS PELUCIDAS *in toto*

Se demostró que las proteínas yodadas β -acrosina recombinante y proacrosina nativa se unen a las zonas pelúcidas *in toto* con la misma capacidad de unión. Esta unión se satura a las tres horas de coincubación y ocurre en forma dosis dependiente de la concentración de la proteína recombinante, al igual que en los ensayos de unión usando zonas pelúcidas solubilizadas. Además, esta unión es inhibida por 10 $\mu\text{g/ml}$ de proacrosina nativa no marcada, y por 100 μM de fucoidano, confirmando los resultados de competencia realizados por dot blot obtenidos anteriormente. Sin embargo, en estos ensayos la inhibición no fue total como en los ensayos de dot blot. Esto podría deberse a que en este ensayo la interacción ocurre entre una matriz estructurada y proteínas en solución y por lo tanto al competidor le sería más difícil disociar esta unión que entre dos proteínas en solución.

Se determinó que la proteína recombinante de β -acrosina se mantenía unida a las zonas pelúcidas intactas hasta por 12 horas luego de realizado el ensayo de unión. Esto indica que bajo las condiciones experimentales usadas la β -acrosina recombinante no se activaría proteolíticamente después de entablar la unión

secundaria y no sería capaz de liberarse de su interacción con las glicoproteínas de la zona pelúcida. Esto puede deberse a que la proteína recombinante no se encuentra anclada en la matriz acrosomal o al hecho que le falte un gatillador de la activación presente normalmente en el acrosoma. Esta observación no invalida el modelo de unión – liberación que explica el proceso de penetración a través de la zona pelúcida ya que el proceso de activación proteolítica inducido por la unión a las glicoproteínas de la zona pelúcida es sobre el zimógeno proacrosina, el cual se encuentra unido a la matriz del acrosoma a diferencia de la proteína recombinante que es soluble.

La localización de la unión de las proteínas recombinantes de β -acrosina a la zona pelúcida intacta, mediante los ensayos de unión y autoradiografía, demuestran que esta unión ocurre en la superficie y en todo el grosor de la zona pelúcida y que además su distribución inicial es heterogénea (Figura 18). Una mayor exposición de las muestras confirma que la marca se distribuye cubriendo toda la superficie de la zona pelúcida. Este hecho sugiere que en la zona pelúcida existirían ligandos para β -acrosina distribuidos heterogéneamente, de alta afinidad que se marcarían primero, y además, ligandos de menor afinidad que permitirían que se marque el resto de la zona pelúcida.

De todos estos resultados se concluye que β -acrosina recombinante se une específica y selectivamente en la superficie y todo el grosor de las zonas pelúcidas

intactas. Estos hechos validan los ensayos para determinar el papel de β -acrosina en la penetración espermática a través de la zona pelúcida.

H. PAPEL DE β -ACROSINA RECOMBINANTE EN LA PENETRACIÓN ESPERMÁTICA *in vitro*

En los ensayos de maduración de ovocitos ováricos de cerdo se determinó mediante microscopía de epifluorescencia analizando el estado de maduración nuclear o la presencia del primer corpúsculo polar que más del 90 % de los ovocitos alcanzan la maduración. Sin embargo, los porcentajes de fecundación *in vitro* en cerdo son muy variables de ensayo a ensayo y en promedio no superan el 70 %. Esto concuerda con las cifras publicadas en la literatura (Betancourt y cols., 1993; Nagai, 1994; Suzuki y cols., 1994; Abeydeera y cols., 1998; Lynham y Harrison, 1998), en donde se mencionan porcentajes de alrededor de 70% y un número alto de poliespermia. Cuando el ensayo de fecundación *in vitro* se realizó en presencia de la proteína recombinante de β -acrosina o la recombinante mutada en el sitio catalítico o preincubando los ovocitos maduros por tres horas con ellas, los porcentajes de fecundación fueron inferiores a los controles pero que no resultaron ser estadísticamente significativos.

Debido a que los porcentajes de fecundación son muy variables, aún en los controles, no es factible concluir irrefutablemente respecto al probable efecto que

pudieran o no producir la presencia de las proteínas recombinantes de β -acrosina durante la coincubación de los gametos homólogos de cerdo. Sin embargo, teniendo en cuenta la falta de significancia estadística de los porcentajes obtenidos, la presencia de las proteínas recombinantes parecería afectar en forma muy discreta o no afectar del todo el proceso de fecundación *in vitro*. Esto podría explicarse al menos de tres formas: primero, estando bloqueados todos los sitios de unión para acrosina, la proacrosina nativa presente en el acrosoma del espermatozoide reaccionado, posea mayor afinidad por sus ligando en la zona pelúcida y desplace a la recombinante previamente unida. Segundo, proacrosina al ser capaz de activarse proteolíticamente, podría abrirse paso degradando a la proteína recombinante unida. Tercero, que otras moléculas presentes en la matriz del espermatozoide reaccionado permiten la unión secundaria y penetración del espermatozoide hacia el espacio perivitelino. Esto último es apoyado por los resultados obtenidos con ratones knock-out del gen de proacrosina (Baba y cols., 1994; Adham y cols., 1997), cuyos espermatozoides son capaces de fecundar aunque no presentan esta proteína. Además, recientemente se han descrito en estos mismos espermatozoides dos nuevas serino proteasas acrosomales que son liberadas después de la reacción acrosómica (Kohn y cols., 1998). Al menos una de ellas sería proteolíticamente activa y su activación sería dependiente de alguna otra proteasa del tipo tripsina aún no descrita.

Por último, a pesar de la alta homología de aminoácidos encontrada entre β -acrosina de cerdo y humana en ningún experimento las proteínas recombinantes de

β -acrosina de cerdo interfirieron en el proceso de penetración de espermatozoides humanos a zonas pelúcidas cadavéricas humanas (Figura 24). A pesar que en los ensayos de fecundación *in vitro* de cerdo en presencia de las proteínas recombinantes (ensayos homólogos) no fue significativamente inhibida, el efecto nulo de las proteínas recombinantes sobre la fecundación heteróloga sugiere que los resultados obtenidos en los ensayos homólogos serían biológicamente importantes y que el 25% de no-identidad entre las secuencia aminoacídicas de las dos especies sería suficiente para determinar la especificidad de especie de la fecundación.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas recombinantes normal y Ser/Ala²²² de β -acrosina presentan unión específica a las glicoproteínas de la zona pelúcida, la cual no difiere de la proteína nativa.
2. Se demostró que la actividad catalítica de la proteína recombinante de β -acrosina no es necesaria para la unión secundaria a la zona pelúcida.
3. Se confirmó que la unión de β -acrosina de cerdo a la zona pelúcida requiere de la secuencia completa de β -acrosina y depende de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la molécula. Por lo tanto, el sitio de unión estaría formado por aminoácidos localizados en diferentes porciones de la molécula que convergen formando el dominio de unión.
4. La proteína recombinante de β -acrosina no sólo es capaz de unir zonas pelúcidas intactas, sino que se une en forma específica, sobre toda la superficie y grosor de esta.

5. Todas las anteriores conclusiones nos permiten sugerir que el sistema proacrosina/acrosina participa en la unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida.

6. Por último, se concluye que en la unión secundaria a la zona pelúcida además de acrosina participarían otra u otras moléculas de unión, ya que acrosina a pesar de unirse a las zonas pelúcidas intactas no es capaz de impedir la penetración espermática ni la fecundación *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

- Abeydeera L.R., Wang W., Prather R.S. & Day B.N. (1998) Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 58:1316-1320.
- Adham I.M., Grzeschik K.H., Geurts van Kessel A.H.M. & Engel W. (1989) The gene encoding the human preproacrosin (ACR) maps to the q13-qter region on chromosome 22. *Hum Genet* 84:59-62.
- Adham I.M., Klemm U., Maier W.M. & Engel W. (1990) Molecular cloning of human preproacrosin cDNA. *Hum Genet* 84:125-128.
- Adham L.M., Nayernia K. & Engel W. (1997) Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 46:370-376.
- Ahuja K.K. & Bolwell C.P. (1983) Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 69:49-55.
- Araki Y., Orgebin-Crist M.C. & Tulsiani D.R.P. (1992) Qualitative characterization of oligosaccharides chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol. Reprod.* 46:912-919.
- Austin C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B* 4:581-596.
- Austin C.R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170:326.
- Austin C.R. & Braden A.W.H. (1956) Early reaction of the rodent egg to spermatozoa penetration. *J. Exp. Biol.* 33:358-365.
- Baba T., Watanabe K., Kashiwabara S.I. & Arai Y. (1989a) Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.* 244:296-300.
- Baba T., Kashiwabara S.I., Watanabe K., Itho H., Michikawa Y., Kimura K., Takada M., Fukamizu A. & Arai Y. (1989b) Activation and maturation mechanism of boar acrosin zimogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.* 264:11920-11927.
- Baba T., Azuma S., Kashiwabara S. and Toyoda Y. (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 269:31845-31849.
- Baldi E., Casano R., Falsetti C., Krausz C., Maggi M. & Fortu G. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12:323-330.

- Barros C. (1974) Capacitation of mammalian spermatozoa. In: Coutinho E.M., Fuchs F., eds. *Physiology and Genetics of Reproduction*, Vol. 2, Chapter 27. New York. Plenum Press. pp. 3-24.
- Barros C. & Franklin L.E. (1968) Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *J. Cell Biol.* 37:C13-C18.
- Barros C., Bedford M., Franklin L.E., Austin C.R. (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34:C1.
- Barros C., Jedlicki A., Bize I. and Aguirre E. (1984a) Relationship between the lengths of sperm preincubation in the golden hamster: A scanning electron microscope study. *Gamete Res.* 9:31-43.
- Barros C., Vigil P., Herrera E., Arguello B. & Walker R. (1984b) Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Archs. Androl.* (Suppl.) 12:95-107.
- Barros C., Jedlicki A., Fuenzalida I., Herrera E., Arguello B., Vigil P., Villaseca P. & Leontic E. (1988) Human sperm-cervical mucus interaction and the ability of spermatozoa to fuse with zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 82:477-484.
- Barros C., Capote C., Pérez C., Crosby J.A., Becker M.I. and De-Ioannes A. (1992) Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biol. Res.* 25:31-40.
- Barros C., Valdivia M., Yunes R. & Meléndez J. (1993) Acrosina en la penetración espermática en mamíferos. En: *Progresos en Biología Celular*, J Becerra & JM Pérez-Figares (eds), Universidad de Málaga, Málaga, pp 113-119.
- Betancourt M., Fierro R. & Ambriz D. (1993) In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 40:1155-1160.
- Biggers JD, Whitten WK & Whittingham DG (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniels JC (ed.) *Methods in mammalian embryology*. WH Freeman, San Francisco. pp 86-116.
- Bleil J.D. & Wassarman P.M. (1980) Structure and function of the zona pellucida. Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76:185-203.
- Bleil J.D. & Wassarman P.M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95:317-324.

- Bleil J.D. & Wassarman P.M. (1988) Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:6778-6782.
- Bleil J.D., Greve J.M. & 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 egg. *Dev. Biol.* 128:376-385.
- Boell E.J. (1985) Oxygen consumption of mouse sperm and its relationship to capacitation. *J. Exp. Zool.* 234:105-116.
- Bradley M.P. & Forester I.T. (1980) A sodium-calcium exchange mechanism in plasma membrane vesicles isolated from ram sperm flagella. *FEBS Letters* 121:15-18.
- Breitbart H., Darshan R. & Rubinstein S. (1984) Evidence for the presence of ATPase-dependent calcium pump and ATPase activities in bull sperm head membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:479-489.
- Breitbart H., Rubinstein S. & Nass-Arden L. (1985) The role of calcium and Ca^{2+} -ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 260:11548-11553.
- Bronson R.A. & McLaren A. (1970) Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 22:129-137.
- Brown C.R. & Cheng W.T.K. (1985) Limited proteolysis of the porcine zona pellucida by homologous sperm acrosin. *J. Reprod. Fertil.* 74:257-260.
- Calvete J.J., Sanz L., Töpfer-Petersen E. (1992) Carbohydrate binding proteins involved in gamete interaction in the pig. In: Nieschlag E, Habenicht UF (eds.) *Spermatogenesis, Fertilization, Contraception*. Berlin: Springer Verlag; pp355-417.
- Capote C., Pérez C., Crosby J.A., Becker M.I., De Ioannes A. & Barros C. (1991) Acrosome Reaction, Acrosin, and Sperm Penetration. In: Baccetti, B. (ed) *Comparative Spermatology 20 Years After*. Serono Symp Publi. 75:113-118.
- Chang M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the Fallopian tubes. *Nature* 168:997-998.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Coronel C.E. & Lardy H.A. (1987) Characterization of Ca^{2+} uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37:1097-1107.

- Coronel C.E. & Lardy H.A. (1992) Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *Mol. Reprod. Fertil.* 33:74-80.
- Crosby J.A., Jones R., Barros C. & Carvalho P. (1998) Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* 49:426-434.
- Cummins J.M. & Yanagimachi R. (1982) Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res.* 5:239-256.
- De Ioannes A.E., Becker M.I., Pérez C., Capote C. and Barros C. (1990) Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. In: Alexander N., Griffin D., Spieler J. and Waites G. (eds.) *Gamete Interactions. Prospects for immunocontraception.* New York. pp 185-195.
- Dunbar B.S., Liu C. and Sammons D.W. (1980) Identification of the three major proteins of the porcine and rabbit zonae pellucidae by two-dimensional gel electrophoresis: comparison with follicular fluid, sera and ovarian proteins. *Biol. Reprod.* 24:1111-1124.
- Dunbar B.S., Budkiewics A.B. & Bundman D.S. (1985) Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol. Reprod.* 32:619-630.
- Dunbar B.S., Prasad S.V. & Timmons T.M. (1991) Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. In: Dunbar B.S., O'Rand M.G., ed. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization.* New York. Plenum Press. pp:97-114.
- Dunbar B.S., Avery S., Lee V., Prasad S., Schwahn D., Schwoebel E., Skinner S. and Wilkins B. (1994) The mammalian zona pellucida its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:331-347.
- Edwards R.G. (1964) Cleavage of one- and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 7:413-415.
- Endo Y., Lee M.A. & Kopf G.S. (1987) Evidence for the role of a guanidine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev. Biol.* 119:210-216.
- Endo Y., Lee M.A. & Kopf G.S. (1988) Characterization of islet activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev. Biol.* 129:12-24.

- Engel W., Adham I.M., Keime S., Kremling H., Schlösser M. and Nayernia K. (1993) The acrosin gene: structure, regulation and function. In Dondero F and Johnson PM (eds.): Reproductive Immunology. Serono Symposia Publications from Raven Press. New York. Vol 97 pp 87-93.
- Flemming A.D. & Yanagimachi R. (1981) Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa, with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.* 4:253-273.
- Flemming A.D. & Yanagimachi R. (1984) Evidence suggesting the importance of fatty acids and fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229:485-489.
- Florman H.M., Bechtol K.B. and Wassarman P.M. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106:243-255.
- 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., Corron M.E., Kim T.D. & Babcock D.F. (1992) Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 152:304-314.
- Franklin L.E., Barros C. & Fussell E.N. (1970) The acrosomal region and the acrosome reaction in sperm of the golden hamster. *Biol. Reprod.* 3:180-200.
- Fraser L.R. (1982) Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J. Androl.* 3:412-419.
- Fraser L.R. (1990) Sperm capacitation and its modulation. In: Bavister B.D., et al., ed. *Mammalian Fertilization*. Norwell, Massachusetts: Serono Symposia USA. pp:141-153.
- Fraser L.R. & Ahuja K.K. (1988) Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res.* 20:491-519.
- Fraser L.R., Harrison R.A.P. & Herod J.E. (1990) Characterization of a decapacitation factor associated epididymal mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 89:135-148.
- Greve J.M. & Wassarman P.M. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 181:253-264.
- Gwatkin R.B.L. & Williams D.T. (1977) Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fertil.* 49:55-59.

- Harrison R.A.P. (1996) Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:581-594.
- Harrison R.A.P., Jacques M.L., Pascal Minguez M.L. & Miller N.G.A. (1992) Behavior of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. *J. Cell Sci.* 102:123-132.
- Harrison R.A.P., Ashworth P.J.C. & Miller N.G.A. (1996) Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 45:378-391.
- Hedrick J.L. & Wardrip N.J. (1986) Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal. Biochem.* 157:63-70.
- Hedrick J.L., Urch U.A. & Hardy D.M. (1988) The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In *Enzymes in Agricultural Biotechnology*. Schoemaker, Sonnet & Whitaker editors. Washington DC. ACS Books. pp. 55-73.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pulen J.K. & Pease L.R. (1989) Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
- Hou S.T., Ma A., Jones R. & Hall L. (1996) Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol. Reprod. Dev.* 45:193-203.
- Huang T.T.F. Jr. & Yanagimachi R. (1985) Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am. J. Anat.* 174:249-268.
- Hyne R.V., Edwards K.P. & Smith J.D. (1985) Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophore. *Gamete Res.* 12:65-73.
- Irvine D.S. & Aitken R.J. (1986) Measurement of intracellular calcium in human spermatozoa. *Gamete Res.* 15:57-71.
- Jansen S., Quigley M., Reik W & Jones R. (1995) Analysis of polysulfate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 39:501-510.
- Jansen S., Jones R., Jennekens I., Marschall B., Kriegesman B., Cadwell J. & Brening B. (1998) Site-directed mutagenesis of boar proacrosin reveals residues involved in binding of zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* 51:184-192.

- Jones R. (1991) Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin the putative egg-binding proteins from mammalian spermatozoa. *Development* 11: 1155-1163.
- Jones R. & Brown C.R. (1987) Identification of a zona-binding protein from boar spermatozoa as proacrosin. *Exp. Cell Res.* 171:503-508.
- Jones R. & Jansen S. (1993) Mechanism of gamete recognition and adhesion during fertilization in mammals, *J.Reprod. Devel.* 39 (suppl):47.
- 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.
- Jones R., Parry R., Lo Leggio L. & Nickel P. (1996) Inhibition of sperm-zona binding by surimin, a potent 'lead' compound for design of new anti-fertility agents. *Mol. Human Reprod.* 2:597-605.
- Katz D.F.; Yanagimachi R.; Dresdner R.D. (1978) Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J. Reprod. Fertil.* 52:167-72.
- Klemm U., Miller-Esterl W. & Engel W. (1991) Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum Genet* 87:635-641.
- Kohno N., Yamagata K., Yamada S., Kashiwabara S., Sakai Y. & Baba T. (1998) Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:658-65.
- Kopecny V. & Flechon J.E. (1987) Ultrastructural localization of labeled acrosomal glycoproteins during in vitro fertilization in the rabbit. *Gamete Res.* 17:35-42.
- Kopf G.S. and Gerton G.L. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In *Elements of mammalian fertilization* (ed. P.M. Wassarman) pp.153-203. Boca Raton. FL:CRC Press.
- Kopf G.S., Woolkailis M.J. & Gerton G.L. (1986) Evidence for a guanidine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J. Biol. Chem.* 261:7327-7331.
- Kuzan F.B., Fleming A.D. and Seidel G.E. (1984) Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil. Steril.* 41:766-770.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Leclerc P., Lamirande E. & Gagnon C. (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.* 55:648-692.
- Lee M.A., Trucco G.S., Bechtol K.B., Wummer N., Kopf G.S., Blasco L. & Storey B.T. (1987) Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 48:649-658.
- Lee V. and Dunbar B. (1993) Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and mRNA in ovarian follicles. *Dev. Biol.* 155:371-382.
- Leyton L. and Sailing P. (1989) Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 108:2163-2168.
- Leyton L., LeGuen P., Bunch D. and Sailing P. (1992) Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 89:11692-11692.
- Liu D.Y. & Baker G. (1993) Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48:340-348.
- Lynham J.A. & Harrison R.A.P. (1998) Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions in vitro. *Biol. Reprod.* 58:539-550.
- Miller D. & Ax R. (1990) Carbohydrates and fertilization in animals. *Mol. Reprod. Dev.* 26:184-198.
- Miller D.J., Macek M.B. & Shur B.D. (1992) Complementarity between sperm surface B-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm egg binding. *Nature* 357:589-593.
- Miller D.J., Gong X. & Shur B.D. (1993) Sperm require b-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118:1279-1289.
- Minta A., Kao J.P.Y. & Tsien R.Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264:8171-8178.
- Mrsny R.J., Siiteri J.E. & Meizel S. (1984) Hamster sperm Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase: increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol. Reprod.* 30:573-584.
- Moreno R.D., Sepúlveda M.S., de Ioannes A. & Barros C. (1998) The polysulphate binding domain of human proacrosin/acrosin is involved both in the enzyme activation and spermatozoa-zona pellucida binding. *Zygote* 6(1):75-83.

- Nagai T. (1994) Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* 41:73-78.
- Naz R.K. and Ahmad K. (1991) Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J. Cell. Biol.* 99:157-165
- Nichols J. & Gardner R.L. (1989) Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum. Reprod.* 4:180-187.
- Noland T.D., Van Eldik L.J., Garbers D.L. & Burgess W.H. (1985) Distribution of calmodulin-binding proteins in membranes from bovine spermatozoa. *Gamete Res.* 11:297-303.
- Okamura F. & Nishiyama H. (1978) The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res.* 188:497-508.
- Oliphant G. (1976) Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the rabbit acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 27:28-38.
- Oliphant G., Reynolds A.B. & Thomas T.S. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174:269-289.
- O'Rand M.G., Welch J.E. & Fisher S.J. (1986) Sperm membrane and zona pellucida induction during fertilization. In: Dhindsa D.S., Bahl O.P., eds. *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction*. New York. Plenum Press. pp. 131-144.
- Parry R.V., Baker P.J. & Jones R. (1992) Characterization of low Mr zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 33:108-115.
- Pietsch M.C. (1995) Protein modeling by email. *Bio/technology* 13:258.
- Peitsch M.C. & Jongeneel V. (1993) A 3-dimensional model for the CD40 ligand reveals a 2 close similarity to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.* 5:233-238.
- Polakoski K.L. & Parrish R.F. (1977) Boar proacrosin: purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. *J. Biol. Chem.* 252:1888-1894.
- Richardson R.T. & O'Rand M.G. (1996) Site-directed mutagenesis in rabbit proacrosin. *J. Biol. Chem.* 271:24069-24074.
- Richardson R.T., Yamasaki N. and O'Rand M.G. (1994) Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 165:688-701.

- Rigoni F., Dell'Antone P. & Deana R. (1987) Evidence for a pH-driven Ca^{2+} uptake in EGTA-treated bovine spermatozoa. *Eur. J. Biochem.* 169:417-422.
- Rodger J.C. & Bedford J.M. (1982) Separation of sperm pairs and sperm-egg interaction in the opossum *Didelphis virginiani*. *J. Reprod. Fertil.* 64:171-179.
- Roldan E.R.S. & Fleming A.D. (1989) Is a Ca^{2+} -ATPase involved in Ca^{2+} regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 85:297-308.
- Rubinstein S. & Breitbart H. (1991) Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochem. J.* 278:25-28.
- Sacco A.G., Yurewicz E.C., Subramanian M.G. & Matzat P. (1989) Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the alpha-glycoprotein component of the Mr=55000 family. *Biol. Reprod.* 41:523-532.
- Saito N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Saling P.M. (1981) Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zona pellucida. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:6231-6235.
- Sepúlveda M.S., Becker M.I., Barros C & De Ioannes A. (1993) Interference of gamete interactions by monoclonal antibodies to acrosin. In Dondero F & Johnson PM (eds.): *Reproductive Immunology*. Serono Symposia Publications from Raven Press. New York. Vol. 97 pp 335-338.
- Sillerico T., Valdivia M., de Ioannes A. & Barros C. (1996) Proacrosin and acrosin determination during capacitation and acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Biocell* 20:133-142.
- Shi Q.X. & Roldan E.R.S. (1995) Bicarbonate/ CO_2 is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa, but is essential for capacitation. *Biol. Reprod.* 52:540-546.
- Stambaugh R., Brackett B.G. & Mastroiani L. (1969) Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. *Biol. Reprod.* 1:223-227.
- Stein D.M. & Fraser L.R. (1984) Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* 10:283-299.
- Storey B.T. (1995) Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:927-942.

- Suzuky K., Ebihara M., Nagai T., Clarke N.G.E. & Harrison R.A.P. (1994) Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes and synergism with caffeine. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:221-227.
- Tarkowski A.K. (1959) Experiments on the transplantation of ova in mice. *Acta Theriogenol.* 2:251-267.
- Tesarik J., Drahorad J. & Peknicova J. (1988) Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona penetration. *Fertil. Steril.* 50:133-141.
- Töepfer-Petersen E. & Henschen A. (1987) Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties of a serine proteinase. *FEBS Letters* 226:38.
- Töpfer-Petersen E. & Cechova D. (1990) Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int. J. Androl.* 13:190-196.
- Töepfer-Petersen E., Steinberg M., von Eschenbach C. and Zucker C. (1990) Zona pellucida-binding of boar sperm acrosin is associated with the N-terminal peptide of the acrosin B-chain (heavy chain). *FEBS Letters* 265:51-54.
- Töepfer-Petersen E., Calvete J., Sanz L. and Sinowatz F. (1993) spermadhesin: A Novel Group of Carbohydrate-Binding Proteins that Function in Fertilization. *J. Reprod. Dev.* 39 (Suppl.) 45pp.
- Thompson J.D., Higgin D.G. & Gibson T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22:4673-4680.
- Towbin H., Staehelin T.T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Urch U.A., Wardrip N.J. & Hedrick J.L. (1985a) Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis product. *J. Exp. Zool.* 233:239-243
- Urch U.A., Wardrip N.J. & Hedrick J.L. (1985b) Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233:479-483..
- Urch U.A. and Patel H. (1991) The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida and with polysulfated polysaccharides. *Development* 11: 1165-1172.
- Valdivia M., Yunes R., Meléndez J., De Ioannes A., Becker M.I. & Barros C. (1994) Immunolocalization of proacrosin/acrosin in the rabbit sperm during the acrosome

- reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Mol. Reprod. Dev.* 37:216-222.
- Valdivia M. (1996) Participación de acrosin en el paso a través de la zona pelúcida del ovocito de coneja. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología de la Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- Vásquez M., Phillips D. and Wassarman P. (1989) Interaction of mouse sperm with purified sperm receptors covalently linked to silica beads. *J. Cell Sci.* 92: 713-722.
- Visconti P. & 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.
- Visconti P.E., Bailey J.L., Moore G.D., Pan D., Olds-Clarke P. and Kopf G.S. (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121:1129-1137.
- Visconti P.E., Moore G.D., Bailey J.L., Leclerc P., Connors, S.A., Pan D., Olds-Clarke P. and Kopf G.S. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121:1139-1150.
- Ward C.R., Storey B.T. and Kopf G.S. (1992) Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Cell.* 267:14061-14067.
- Ward C.R., Storey B.T. & Kopf G.S. (1994) Selective activation of G_{i1} and G_{i2} in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 269:13254-13258.
- Wassarman P.M. (1987) The Biology and Chemistry of Fertilization. *Science* 235:553-560.
- Wassarman P.M. (1988) Zona Pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 7:417-522.
- Wassarman P.M. (1990) Profile of mammalian sperm receptor. *Development* 108: 1-17.
- Wassarman P.M. (1992) Mouse gamete adhesion molecules. *Biol. Reprod.* 46:186-191.
- Weinman D.E. & Williams W.L. (1961) Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature*:203.423-424.

- Wendy T.S., Wilson L., Reynolds A.B. & Oliphant G. (1986) Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor. *Biol. Reprod.* 35:691-703.
- Wilde M.W., Ward C.R. & Kopf G.S. (1992) Activation of a G protein in mouse sperm by the zona pellucida, an egg-associated extracellular matrix. *Mol. Reprod. Dev.* 31:297-306.
- Whitaker J.R. & Bender H.L. (1965) Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of a N-benzoyl-L-arginine ethyl ester and a N-benzoyl-L-arginamide. *J. Am. Chem. Soc.* 87:2728-2737.
- Yanagimachi R. (1981) Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroiani L., Biggers J.D., eds. *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York. Plenum Press. pp. 81-187.
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E., Niell J.D., eds. *The physiology of reproduction*, 2^o edition. New York. Raven Press. pp.189-317.
- Yanagimachi R. & Chang M.C. (1964) *In vitro* fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.* 156:361.
- Zamboni L. (1972) Fertilization in the mouse. In: Moghissi K.S., Hafez E.S.E., eds. *Biology of mammalian fertilization and implantation*. Springfield, Illinois. Charles C. Thomas. Pp.213-262.