



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**TESIS DE DOCTORADO**

**“Caracterización bioquímica y funcional de enzimas glucosídicas  
involucradas en la fecundación de vertebrados”**

Presentada por Enrique Salvador Morales

Rosario, Argentina

2014

Caracterización bioquímica y funcional de enzimas glucosídicas  
involucradas en la fecundación de vertebrados.

Enrique Salvador Morales

Licenciado en Biotecnología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario.

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR), dependiente de la Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), durante el período comprendido entre Junio de 2009 y Diciembre de 2013, bajo la dirección de la Dra. Silvia E. Arranz.

A mis dos amores: Camilo y Soledad.

## DIVULGACIÓN

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido publicados en la siguiente revista internacional:

- Morales, E. S.; Krapf, D.; Botta, P. E.; Cabada, M. O. y Arranz, S. E. (2012)  $\beta$ -hexosaminidase from *Xenopus laevis* eggs and oocytes: from gene to immunochemical characterization. J Cell Biochem. 113,3709-20.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- Morales, Enrique S.; Martínez, María L. y Cabada, Marcelo O. Caracterización y purificación parcial de la Hexosaminidasa de ovocitos de *Bufo arenarum*. VII Congreso, XXV Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 2005, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Morales, Enrique S.; Arranz, Silvia; Cabada, Marcelo O. Clonado y expresión parcial de la N-Acetil glucosaminidasa de embriones de *Xenopus laevis*. VIII Congreso, XXVI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 2006, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Enrique Morales, Silvia Arranz and Marcelo Cabada. Cloning and expression of N-Ac Glucosaminidase of *Xenopus laevis*. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, 2006, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Morales, E.S.; Arranz, S. Cabada, M.O. Expresión en sistemas procariotas de la NAc Glucosaminidasa de *Xenopus laevis* e inmunolocalización en ovocitos. Primera Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, 2007, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- Morales, E.S., Cabada, M.O. and Arranz, S.E.  $\beta$ -Hexosaminidase of *X. laevis*: isoforms and characterization in oocytes. XLV Reunión anual – Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, 2009, Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Morales, E.S. y Arranz, S.E.  $\beta$ -Hexosaminidasa de ovocitos de *X. laevis*: su caracterización bioquímica. XII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

- Morales, E.S. y Arranz, S.E. Localización sub-celular de la Hexosaminidasa de gametos de *B. arenarum*. XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 2011, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Enrique S. Morales, Darío Krapf, Pablo Botta y Silvia E. Arranz. Caracterización molecular de la Hexosaminidasa de *Xenopus*: desde el gen a sus polipéptidos estructurales. XIV Congreso y XXXII Reunión anual de la sociedad de biología de Rosario, 2012, Casilda, Santa Fe, Argentina.
- Morales, E.S.; Banchio, C.; Krapf, D y Arranz, S.E. Splicing alternativo: mecanismo ancestral para la síntesis de las Hexosaminidasas? XV Jornadas Anularas de la Sociedad Argentina de Biología. 2013, Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

**ÍNDICE**

Divulgación.....	i
Índice.....	iii
Abreviaturas.....	vii
Lenguaje especial.....	ix
Resumen.....	x

**CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

Reproducción.....	1
El modelo anfibio.....	1
El modelo de estudio.....	2
Fecundación: la generación de un nuevo individuo.....	4
Fecundación externa.....	5
Gametos.....	5
Gameto Masculino: el espermatozoide.....	5
Gameto Femenino: el óvulo.....	8
Fecundación en anfibios.....	11
Oviducto de anfibios.....	11
Transporte de los ovocitos desde el ovario hacia el exterior del cuerpo de la hembra.....	11
Secreciones del oviducto de anfibios.....	12
Estructura y función de la cubierta gelatinosa.....	12
Envolturas de los ovocitos de anfibios.....	15
Aspectos funcionales de los gametos durante la fecundación.....	16
Quimiotaxis.....	17
Quimiotaxis en espermatozoides.....	17
Quimiotaxis en espermatozoides de anfibios.....	17
Interacción entre gametos de anfibios anuros.....	18
Interacción del espermatozoide con la EV.....	19
Reacción acrosómica.....	23
Fusión de membranas y activación del metabolismo del cigoto.....	24
Prevención de la polispermia.....	24
Importancia de las glucosidasas y carbohidratos en la fecundación.....	26
N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa.....	27
Características bioquímicas y estructurales de la N-acetil- $\beta$ -D glucosaminidasa.....	28
Glucosidasas y carbohidratos en la fecundación de los anfibios.....	31

**OBJETIVOS**.....33**CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

Reactivos.....	35
Buffers y soluciones utilizadas.....	35
Medios de cultivo para células bacterianas.....	35
Animales.....	36
- HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS	
Análisis, alineamientos de secuencias y búsquedas por homología en bases de datos de libre acceso.....	36
Obtención de cebadores para PCR.....	37

Obtención de la secuencia completa del ADNc JN127371.....	37
Obtención del gen de la Hex de <i>X. tropicalis</i> .....	37
- TÉCNICAS APLICADAS A ÁCIDOS NUCLEICOS	
Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.....	38
Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.....	38
Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN desde gel de agarosa.....	38
Digestión con enzimas de restricción.....	39
Ligado de moléculas de ADN.....	39
Reacción de la polimerasa en cadena.....	39
- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i>	
Inducción del estado de competencia y transformación con plásmidos.....	39
- SOUTHERN BLOT	
Obtención de ADN genómico de <i>X. laevis</i> .....	40
Obtención de la membrana de hibridación.....	41
Obtención de la sonda de hibridación.....	42
Hibridación, lavado de la membrana y detección de bandas.....	42
- EXPRESIÓN TRANSCRIPTO DE LA Hex DE <i>X. laevis</i> AEJ87970 EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO	
Adecuación del ORF JN127371 para su expresión en células eucariotas.....	42
Transfección de las células por el método de lipofectamina.....	43
Obtención de los extractos celulares totales.....	44
- TÉCNICAS APLICADAS A PROTEÍNAS	
Determinación de la concentración de proteínas.....	44
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	44
Detección de proteínas en gel de poliacrilamida.....	45
Experimentos de Western blot.....	45
Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.....	46
Elución de proteínas a partir de geles nativos.....	47
- OBTENCIÓN DEL ANTISUERO $\alpha$ -GST/Hex	
Obtención y purificación de la proteína GST/Hex a partir de cultivos de células de <i>E. coli</i> transformadas con el vector pGEX-Hex.....	47
Electroelución de GST/Hex pura.....	48
Obtención de anticuerpos policlonales $\alpha$ -GST/Hex.....	48
- MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
Medición espectrofotométrica de la actividad de distintas glucosidasas.....	49
Medidas de actividad Hex total o Hex A/S en gel nativo.....	49
Ensayos continuos de actividad Hex total o Hex A/S.....	50
Ensayos de actividad Hex total o Hex A/S discontinuos.....	50
- TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA	
Experimentos de inmunohistoquímica en cortes de ovocitos de <i>X. laevis</i> y <i>R. arenarum</i> .....	50
Detección de gránulos corticales con la lectina de <i>Dolichos biflorus</i> .....	51
- OBTENCIÓN DE GAMETOS DE <i>R. ARENARUM</i>	
Obtención de espermatozoides vivos.....	51
Obtención de fracciones subcelulares espermáticas.....	52
Obtención de extracto crudo de espermatozoides.....	52
Obtención de ovocitos.....	53
Obtención de los factores difusibles de la cubierta gelatinosa (EW).....	53

Obtención de ovocitos sin cubierta gelatinosa.....	53
Obtención de extracto crudo de ovocitos.....	54
Obtención de producto de gránulos corticales.....	54
Obtención de envolturas vitelinas aisladas.....	55
- ENSAYOS BIOLÓGICOS	
Experimentos de fecundación <i>in vitro</i> .....	55
Ensayos de unión de espermatozoides a envolturas vitelinas aisladas.....	56
<b><u>CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA HEXOSAMINIDASA DE ANFIBIOS</u></b>	
- INTRODUCCIÓN.....	58
- RESULTADOS.....	59
<b>A- OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE LA HEX DE ANFIBIOS</b>	
Identificación del ADNc codificante para la Hex de <i>X. laevis</i> por similitud de secuencias.....	59
Obtención del marco de lectura abierto completo de la Hex de <i>X. laevis</i> .....	62
Obtención del codón AUG que señala el inicio de la traducción de la putativa Hex de <i>X. laevis</i> .....	64
<b>B- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POLIPÉPTIDOS CON IDENTIDAD HEX EN XENOPUS</b>	
Asignación de identidad Hex por métodos bioinformáticos.....	66
Identificación y caracterización del gen codificante para la Hex en <i>Xenopus</i> .....	70
Determinación del número de genes codificantes para las Hexs identificadas en <i>X. laevis</i> .....	83
<b>C- EXPRESIÓN DE LA HEX DE X. LAEVIS CODIFICADA EN EL ADNc JN127371 EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO</b>	
Adecuación del marco de lectura abierto de la Hex de <i>X. laevis</i> codificada en el ADNc JN127371 para su expresión en células eucariotas.....	86
Transfección de células de ovario de hámster chino con el ADNc JN127371.....	89
Análisis de la actividad Hex en las células de ovario de hámster chino transfectadas con el ADNc JN127371.....	92
- DISCUSIÓN.....	94
<b><u>CAPITULO IV: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HEX</u></b>	
- INTRODUCCIÓN.....	100
- RESULTADOS.....	101
Síntesis de la Hex AEJ87970 de <i>X. laevis</i> en <i>E. coli</i> .....	101
Síntesis de un fragmento N-terminal de la Hex AEJ87970 de <i>X. laevis</i> en <i>E. coli</i> .....	101
Obtención de anticuerpos policlonales anti-Hex.....	106
- DISCUSIÓN.....	108
<b><u>CAPITULO V: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GLUCOSIDASAS PRESENTES EN LOS GAMETOS DE ANFIBIO</u></b>	
- INTRODUCCIÓN.....	112
- RESULTADOS.....	113

<b>A- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HEX DE OVOCITOS DE <i>X. LAEVIS</i></b>	
Caracterización electroforética de las Hexs de ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	113
Localización subcelular de la Hex de ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	116
<b>B- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HEX DE GAMETOS DE <i>R. ARENARUM</i></b>	
<b>B1-CARACTERIZACIÓN DE LA HEX DE OVOCITOS DE <i>R. ARENARUM</i></b>	
Actividades glucosídicas en ovocitos de <i>R. arenarum</i> .....	122
Actividad Hex de ovocitos de <i>R. arenarum</i> a distintos pH.....	123
Caracterización electroforética de las Hexs de ovocitos de <i>R. arenarum</i> .....	124
Localización subcelular de la Hex de ovocitos de <i>R. arenarum</i> .....	127
Isoforma de la Hex presente en los gránulos corticales de ovocitos de <i>R. arenarum</i> .....	133
<b>B2- CARACTERIZACIÓN DE LA HEX DE ESPERMATOZOIDES DE <i>R. ARENARUM</i></b>	
Localización subcelular de la Hex de espermatozoides de <i>R. arenarum</i> .....	134
Isoformas de la Hex presentes en las distintas fracciones subcelulares de los espermatozoides de <i>R. arenarum</i> .....	137
- DISCUSIÓN.....	139
<b><u>CAPÍTULO VI: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE GLUCOSIDASAS INVOLUCRADAS EN LA FECUNDACIÓN DE <i>R. ARENARUM</i></u></b>	
- INTRODUCCIÓN.....	150
- RESULTADOS.....	151
<b>A- ROL DE LA HEX EN LA FECUNDACIÓN DE <i>R. ARENARUM</i></b>	
Efecto de la 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona sobre la Hex de gametos de <i>R. arenarum</i> .....	151
Efecto de la adición de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona en la fecundación de <i>R. arenarum</i> .....	153
Efecto de la adición de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona en la unión de los espermatozoides a la EV de los ovocitos de <i>R. arenarum</i> .....	154
Efecto del pretratamiento de la EV de los ovocitos de <i>R. arenarum</i> con Hex pura en la unión de los espermatozoides.....	156
<b>B- ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE OTRAS GLUCOSIDASAS EN LA FECUNDACIÓN DE <i>R. ARENARUM</i></b>	
Competencia de la unión espermatozoide-EV con distintos azúcares.....	157
Efecto de la adición de manosa o fucosa en la fecundación de <i>R. arenarum</i> .....	159
- DISCUSIÓN.....	161
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	168
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	173
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	174
<b>FE DE ERRATAS.....</b>	187

**ABREVIATURAS**

ADNc:	ADN (ácido desoxirribonucleico) complementario
Abs:	absorbancia
Arg o R:	arginina
ARNm:	ARN (ácido ribonucleico) mensajero
ARNt:	ARN (ácido ribonucleico) de transferencia
Arg o R:	arginina
Asn o N:	asparagina
Asp o D:	aspartato
BSA:	albúmina sérica bovina
$\alpha$ -GST:	anticuerpos anti glutatión S-transferasa
$\alpha$ -GST/Hex:	anticuerpos anti GST/Hex
$^{\circ}$ C:	grados centígrados
c.c.:	concentración
CF:	cubierta de fecundación
cpm:	cuentas por minuto
ConA:	concanavalina A
C-terminal:	extremo carboxilo terminal
CV:	cubierta vitelina
Cys o C:	cisteína
DAB:	3,3'diaminobencidina
D.O.:	densidad óptica
DTT:	ditiotreitól
EBP:	(del inglés: egg binding protein) proteína de unión al ovocito
EC:	envoltura celómica
EST:	(del inglés: expressed sequence tag) secuencia expresada
EV:	envoltura vitelina
EF:	envoltura de fecundación
EW:	(del inglés: egg water) solución conteniendo los factores difusibles de la cubierta gelatinosa de los ovocitos
fl:	femtolitro
g:	aceleración gravitatoria terrestre (9,8 m/seg <sup>2</sup> )
GST:	glutatión S-transferasa
Hex:	Hexosaminidasa o N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa
HexA:	isoforma A de la Hexosaminidasa
HexB:	isoforma B de la Hexosaminidasa
HexS:	isoforma S de la Hexosaminidasa
HPLC:	(del inglés: high pressure liquid chromatography) cromatografía líquida de alta presión
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> :	agua destilada
IPTG:	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido
kDa:	kilodalton
K <sub>m</sub> :	constante de Michaelis-Menten
kpb:	kilopares de bases
l:	litro
Lactona:	2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona
$\lambda_{em}$ :	longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$ :	longitud de onda de excitación
LB:	medio de cultivo de células Luria Bertani

---

Leu o L:	leucina
Met o M:	metionina
mA:	miliamperio
ml:	mililitro
mg:	miligramo
MUG:	4-metil-umbelliferil-N-acetil-glucosaminida
MUGS:	4-metil-umbelliferil-N-acetil-glucosaminida-6-sulfato
NacGlc:	N-acetil glucosamina
NacGal:	N-acetil galactosamina
ng:	nanogramo
nm:	nanómetro
nt:	nucleótido
N-terminal:	extremo amino terminal
µg:	microgramo
µm:	micrómetro
mM:	milimolar
mV:	milivoltio
pb:	pares de bases
PGC:	producto de gránulos corticales
p.i.:	suero preinmune
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p/v:	peso en volumen
RE:	retículo endoplásmico
RER:	retículo endoplásmico rugoso
SDS:	dodecil sulfato de sodio
T o Temp.:	temperatura
Tyr o Y:	tirosina
UTR:	(del inglés: untranslated region) región no traducida
V <sub>máx</sub> :.....	..velocidad enzimática máxima
v/v:	volumen en volumen
ZP:	zona pelúcida

## **LENGUAJE ESPECIAL**

Splicing: corte y empalme

## RESUMEN

La fecundación es un proceso complejo que requiere de múltiples eventos coordinados que llevan a la fusión del espermatozoide con el ovocito. Algunos de estos eventos requieren de interacciones proteína-carbohidrato. Una amplia evidencia experimental, obtenida en distintas especies, sugiere que glucosidasas de la superficie del espermatozoide podrían actuar a modo de lectina reconociendo azúcares específicos de la envoltura de los ovocitos (zona pelúcida en mamíferos o envoltura vitelina en anfibios) facilitando la unión de los gametos durante la fecundación. Además de este rol, se ha propuesto que glucosidasas del ovocito, que son liberadas luego de la fecundación, actuarían sobre los azúcares de las glucoproteínas que conforman su envoltura, modificando los sitios de unión al espermatozoide y contribuyendo de este modo con el bloqueo de la polispermia.

La presencia de glucosidasas se ha reportado en los gametos de casi todas las especies de vertebrados estudiadas. Entre ellas, la enzima de origen lisosomal N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (EC 3.2.1.52), que metaboliza residuos de N-acetil glucosamina y/o N-acetil galactosamina terminales desde glucoconjugados, ha sido ligada tanto a la unión de los gametos como a la prevención de la polispermia en diversas especies de animales. En los anfibios, se ha informado que una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos de *X. laevis* es liberada durante la reacción cortical (Greve y col., 1985), y que hidroliza residuos N-acetil glucosamina terminales de ZPC (Vo y col., 2003), una de las glucoproteínas que componen la envoltura vitelina (EV) de los ovocitos. La hidrólisis de estos residuos inhibe la fecundación, sugiriendo que los mismos actuarían como receptores espermáticos y que la Hex estaría asociada al bloqueo de la polispermia (Hedrick, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la estructura molecular de ninguna Hex de anfibio, ni se han caracterizado las isoformas presentes en sus gametos. Por otra parte, son escasas las evidencias experimentales sobre el rol de la Hex en la fecundación en otras especies de anfibios.

En este trabajo de tesis, utilizando secuencias conservadas de la región N-terminal, central y C-terminal de Hexs caracterizadas en mamíferos, se logró identificar la secuencia de ADNc de una putativa Hex de *X. laevis* a partir de una biblioteca de transcriptos. El ORF completo contenido en este ADNc se secuenció a

partir del clon XL250c11ex obtenido del Instituto Nacional de Biología Básica de Japón (NIBB) y la secuencia se anotó en el GenBank (n° acceso JN127371).

El ORF secuenciado (1662 pb) codificó un polipéptido de 553 residuos de aminoácidos. Estudios realizados *in silico* permitieron verificar que este polipéptido presenta una alta homología con las subunidades de Hexs previamente caracterizadas (>56 % identidad aminoacídica) y que conserva todos los residuos de aminoácido que conforman el sitio activo de las Hexs. La identidad Hex de esta proteína fue confirmada por la transfección del ADNc JN127371 en células de ovario de hámster chino (CHO). Estudios de Western blot, utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Hex desarrollados en esta tesis, permitieron verificar la expresión de un polipéptido del tamaño esperado en los extractos celulares totales provenientes de las células transfectadas. Además, estos extractos mostraron un aumento de su actividad Hex cuando fueron comparados con los extractos provenientes de cultivos transfectados con un plásmido control.

El gen codificante para la Hex caracterizada fue identificado en *X. tropicalis*. El estudio de su secuencia y la comparación por homología con ADNcs de ORF completo, tanto de *X. laevis* como de *X. tropicalis*, permitió predecir que dos Hexs distintas podrían ser originadas desde él, por medio del splicing alternativo de dos de sus exones.

En los mamíferos, tres isoformas de la Hex (HexA, HexB y HexS) han sido caracterizadas, cada una compuesta por la homo o heterodimerización de dos subunidades distintas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas subunidades pueden diferenciarse por sus sitios activos (Lemieux y col, 2006) y fue encontrado que están codificadas en genes separados que se cree que evolucionaron desde un gen ancestral común (Proia, 1988). El estudio de los sitios activos de las dos Hexs generadas por splicing alternativo a partir del gen caracterizado en *Xenopus*, y su comparación con los de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano, mostró que una de estas Hex presenta un sitio activo de tipo  $\alpha$ , mientras que la otra presenta un sitio activo de tipo  $\beta$ . Esto sugiere que en los anfibios las distintas isoformas de la Hex podrían generarse por splicing alternativo desde un mismo gen; a diferencia de los mamíferos donde se generan por subunidades codificadas en genes separados. Este hallazgo nos permitió hipotetizar, que el splicing alternativo pudo ser un mecanismo ancestral para la generación de las distintas isoformas de la Hex antes de que el gen ancestral de la Hex se duplicara y divergiera durante el curso de la evolución.

Utilizando anticuerpos específicos obtenidos a partir de la expresión transgénica en *E. coli* de un fragmento N-terminal de la Hex codificada en el ADNc JN127371 se inmunocaracterizaron las Hexs presentes en los ovocitos de *R. arenarum*. La Hex fue encontrada tanto en el interior del citosol como en los gránulos corticales de los ovocitos. Esta localización fue confirmada por estudios de actividad enzimática realizados con p-nitrofenil azúcares sustrato. La Hex de gránulos corticales fue liberada al espacio perivitelino durante la reacción cortical permitiendo suponer su participación en el bloqueo de la polispermia.

En los espermatozoides de *R. arenarum* la Hex fue encontrada en las membranas apicales (plasmática y/o acrosomal externa) provenientes de la cabeza, en el contenido acrosomal y en los espermatozoides reaccionados. Estos hallazgos permiten suponer que la Hex de espermatozoides podría estar vinculada a la unión inicial de los gametos, y que podría participar en el pasaje del espermatozoide reaccionado a través de la EV del ovocito.

El rol biológico de la Hex, y de otras glucosidasas, en la fecundación de *R. arenarum*, fue estudiado mediante ensayos de fecundación *in vitro* y experimentos de unión de espermatozoides a EVs aisladas. En estos ensayos se demostró que la inhibición de la Hex con el inhibidor específico competitivo 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona disminuyó la tasa de fecundación de los ovocitos, de manera concentración dependiente. Además, tanto este inhibidor, como el pretratamiento de las EVs aisladas con una Hex comercial pura, fueron capaces de inhibir la unión de los espermatozoides a la EV, demostrando que la Hex presente en los espermatozoides de *R. arenarum* está involucrada en la unión primaria con el ovocito, reconociendo alguno de sus azúcares sustrato en la EV.

Experimentos realizados con p-nitrofenil azúcares sustrato, mostraron que la fucosidasa es la principal actividad glucosídica en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum*, permitiendo suponer su participación en la prevención de la polispermia. La adición de fucosa como azúcar competidor en los ensayos de fecundación *in vitro* redujo significativamente la tasa de ovocitos fecundados. Sin embargo, la adición de fucosa no interfirió la unión de los espermatozoides a las EVs aisladas. Estos resultados sugieren que la fucosidasa participa en alguna de las etapas

---

del proceso de fecundación de *R. arenarum*, pero no en la unión de los gametos a nivel de la EV.

### **Conclusiones**

En este trabajo de tesis se caracterizó, por primera vez, el gen y la secuencia primaria de Hexs de dos especies de anfibios: *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*. Fue encontrado que en estos anfibios, las subunidades de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs podrían sintetizarse por splicing alternativo desde un mismo gen, marcando una notoria diferencia con los mamíferos, donde ambas subunidades son sintetizadas desde genes separados. Este hallazgo sugiere que el splicing alternativo pudo haber sido un mecanismo ancestral para la síntesis de las Hexs antes de que el gen ancestral de la Hex se duplicara y divergiera durante el curso de la evolución.

La Hex fue encontrada, tanto en los espermatozoides como en los ovocitos de *R. arenarum*, y en localizaciones subcelulares que sugieren su participación en la fecundación de esta especie. Fue demostrado que la Hex de espermatozoides participa en la unión con los ovocitos reconociendo algunos de sus azúcares sustrato (probablemente N-acetil galactosamina) sobre la EV.

La fucosidasa fue encontrada en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum*, y fue liberada durante la reacción cortical. Fue demostrada su participación en la fecundación, pero no en la etapa de unión entre los gametos a nivel de la EV de los ovocitos.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **Reproducción**

La fecundación, tanto animal como vegetal, ha captado la atención del hombre desde la más remota antigüedad, ya sea por el interés práctico en la obtención de alimentos como en la perpetuación de las especies. Con el desarrollo de la investigación científica, el interés se enfocó también en el estudio de los mecanismos por los cuales se llevan a cabo dichos procesos. Diferentes organismos modelo han sido utilizados por la ciencia para estudiar la fecundación en animales, pudiéndose mencionar al erizo de mar, invertebrado equinodermo entre los primeros utilizados. Hace pocas décadas, el gran interés médico y económico que presentan ciertas especies de mamíferos, impulsó el estudio de la fecundación en ratones y humanos, fundamentalmente.

### **El modelo anfibio**

Los trabajos realizados en Anfibios Anuros (sapos y ranas) han aportado notables avances en el conocimiento actual de la biología de la reproducción y del desarrollo embrionario.

Es posible citar una serie de particularidades que hacen de los Anuros un modelo de elección para la realización de estudios experimentales en estos campos:

- Son vertebrados primitivos, los primeros en vivir fuera del agua (Duellman y Trueb, 1986), lo que permite un estudio comparativo con procesos que ocurren en invertebrados y vertebrados inferiores, y con vertebrados superiores, permitiendo delinear un análisis evolutivo de los procesos.
- La facilidad con la que se obtienen los gametos: La ovulación puede inducirse mediante la inyección de un homogenado de hipófisis homóloga o de gonadotrofinas. En ciertas especies (*Rhinella arenarum*, *Xenopus laevis*, etc.) las hembras sexualmente maduras ovulan una gran parte del año y pueden llegar a depositar hasta 30000 ovocitos en un solo evento, lo que permite contar con una gran cantidad de material para los estudios experimentales. Las suspensiones de espermatozoides pueden ser obtenidas fácilmente mediante la dilaceración de los testículos en soluciones adecuadas, aportando un gran número de gametos viables.

- Los ovocitos maduros presentan un gran tamaño (entre 1,5mm y 15mm) facilitando su manipulación y los trabajos experimentales.
- Poseen fecundación externa. En la mayoría de las especies la fecundación ocurre en el agua de charcos cuando el macho abraza dorsalmente a la hembra (amplexus) y ambos depositan sus gametos de forma conjunta en el medio externo.
- Los embriones son grandes, pueden ser fácilmente obtenidos y mantenidos *in vitro* y son muy resistentes a la manipulación y a las infecciones. Esto representa una gran ventaja para el diseño y la realización de experimentos en el campo de la fecundación y el desarrollo embrionario.
- La mayoría de ellos son fáciles de capturar, de tamaño pequeño, y pueden ser mantenidos en cautiverio sin mayores dificultades y en pequeños espacios.

### **El modelo de estudio**

En el presente trabajo de tesis se ha utilizado como modelo de estudio al sapo *Rhinella arenarum* (Fig. 1, que a principios del trabajo de esta tesis era nombrado *Bufo arenarum*), un Anfibio Anuro ampliamente distribuido en nuestro país. Para los trabajos bioinformáticos se utilizaron los anfibios *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* debido a la gran cantidad de secuencias nucleotídicas (ADNc y genómicas) que presentan estas especies en bases de datos de libre acceso, lo que facilitó la identificación de las secuencias de las glucosidasas caracterizadas en este trabajo.

Los ejemplares adultos de *R. arenarum* varían entre 10 y 14 cm de longitud, con un peso que oscila entre 120 a 180 gramos, siendo las hembras por lo general de mayor tamaño que los machos. Entre las características morfológicas sobresalientes se encuentran su piel gruesa verde oliva con manchas de distinta tonalidad y de aspecto rugoso en la superficie dorsal, siendo más suave y de color grisáceo amarillento en la superficie ventral. Los miembros posteriores y anteriores poseen cinco y cuatro dedos respectivamente. Los machos poseen miembros anteriores de mayor robustez que las hembras, y callos nupciales de color negro, que facilitan su reconocimiento.

Los hábitos alimenticios cambian con la metamorfosis. En el estado larval acuático (renacuajo) se alimenta de algas y diatomeas. El adulto se alimenta sólo en los meses de actividad, durante la noche, de insectos y lombrices. En los meses

invernales hiberna en cuevas o entre piedras con absoluta inactividad. En cautiverio son mantenidos en cajas con tierra, aclimatadas a 16 °C y alta humedad.



**Figura 1.** Ejemplar adulto de *R. arenarum* (sapo argentino).

La tabla I muestra un ordenamiento sistemático que permite ubicar taxonómicamente a *R. arenarum* y observar su relación con otras especies utilizadas como modelo de estudio en el campo de la reproducción.

Metazoa (Reino)
Chordata (Phylum)
Craniata (Subfilum)
Mammalia (Clase)
Primate (Orden)
Haplorrhini (Suborden)
Hominoidea (Superfamilia)
<b><i>Homo sapiens</i> (especie)</b>
Rodentia (Orden)
Sciurognathi (Suborden)
Muroidea (Superfamilia)
<b><i>Mus musculus</i> (especie)</b>
Amphibia (Clase)
Anura (Orden)
Mesobatrachia (Suborden)
Pipoidea (Superfamilia)
<b><i>Xenopus laevis</i> (especie)</b>
<b><i>Xenopus tropicalis</i></b>
Neobatrachia (Suborden)
Hyloidea (superfamilia)
<b><i>Rhinella (Bufo) arenarum</i></b>
<b><i>Anaxyrus (Bufo) americanus</i></b>
<b><i>Bufo japonicus</i></b>
Ranoidea (superfamilia)
<b><i>Rana pipiens</i></b>
<b><i>Rana temporaria</i></b>

**Tabla I.** Clasificación taxonomía del anfibio *R. arenarum* junto a otros modelos animales comúnmente utilizados en los estudios de reproducción (Base de datos de Taxonomía del Centro Nacional para Información Biotecnológica NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy)).

## **Fecundación: la generación de un nuevo individuo**

Antiguamente se pensaba que los seres vivos surgían espontáneamente a partir de la materia inanimada (abiogénesis). Así, los gusanos surgían del fango, las larvas y moscas de la carne en descomposición, los sapos del limo de los ríos, etc. Actualmente se sabe que un ser vivo sólo puede provenir de otro preexistente. En las formas de vida más simples como las bacterias, y en ciertos animales pluricelulares como las *Hydras* y algunas esponjas, la reproducción es asexual; es decir, sin la participación de distintos sexos y generando una descendencia que, en la mayoría de los casos, es genéticamente idéntica a sus progenitores. Por el contrario, en la reproducción sexual se produce la unión de genomas procedentes de dos individuos distintos para producir descendientes genéticamente diferentes entre sí y de sus progenitores. Esta forma de reproducción aporta grandes ventajas adaptativas frente a la reproducción asexual y ha sido adoptada por la gran mayoría de los animales y plantas (Alberts y col., 2010). La unión de los genomas se lleva a cabo por la fusión de dos células haploides especializadas llamadas gametos (óvulo y espermatozoide en los animales) en un proceso denominado fecundación (Alberts y col., 2010). Si bien existen diferencias especie-específicas, los estudios experimentales sugieren que los principales eventos que ocurren en la fecundación son comunes todas ellas (Gilbert; 2005):

- reconocimiento e interacción de gametos
- regulación de la entrada del espermatozoide al ovocito
- fusión del material genético portado por los gametos
- activación del metabolismo del cigoto recientemente formado para comenzar con el desarrollo del embrión

Algunas de las diferencias observadas en la fecundación entre distintas especies están relacionadas con el lugar donde ocurre el encuentro entre los gametos para formar el huevo o cigoto. La fecundación puede tener lugar en el medio externo, es decir, fuera del organismo materno (fecundación externa), o dentro del sistema reproductor femenino (fecundación interna).

## Fecundación externa

Esta forma de fecundación es propia de la mayoría de los animales acuáticos y de los anfibios anuros. En condiciones naturales, la fecundación en Anuros se lleva a cabo tan pronto los ovocitos son expulsados del cuerpo de la hembra durante el amplexus (Fig. 2). En ese momento, el macho descarga los espermatozoides sobre los ovocitos mientras éstos son expulsados a través de la cloaca de la hembra al medio acuoso externo. La fecundación tiene lugar, generalmente, en aguas estancadas de baja profundidad, donde se completa el desarrollo del embrión (Duellman y Trueb, 1986).



**Figura 2. Amplexus.** Se observa un ejemplar macho de *R. arenarum* abrazando dorsalmente a una hembra durante la puesta de los ovocitos. La flecha indica la tira doble de ovocitos recién depuestos (Stephen Dalton; [www.nhpa.co.uk](http://www.nhpa.co.uk)).

## Gametos

Los gametos son células especializadas para la fusión y generación de un nuevo individuo. En la mayoría de los animales pluricelulares, incluidos los vertebrados, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal, diferenciada en etapas tempranas del desarrollo. Existen dos tipos de gametos, denominados espermatozoides (gameto masculino) y óvulo (gameto femenino).

### Gameto masculino: el espermatozoide

Anton van Leeuwenhoek (microscopista Holandés, 1632-1723) observó por primera vez espermatozoides en 1678, junto a Nicolás Hartsoeker. Inicialmente creyó que eran animales parásitos que vivían en el semen y que no tenían relación con la reproducción; de allí el término espermatozoide (animales del esperma). Años después se creyó que los espermatozoides contenían un embrión humano preformado en su interior (teoría del homúnculo; 1694). No fue hasta el año 1824 cuando J. L. Prevost y J.

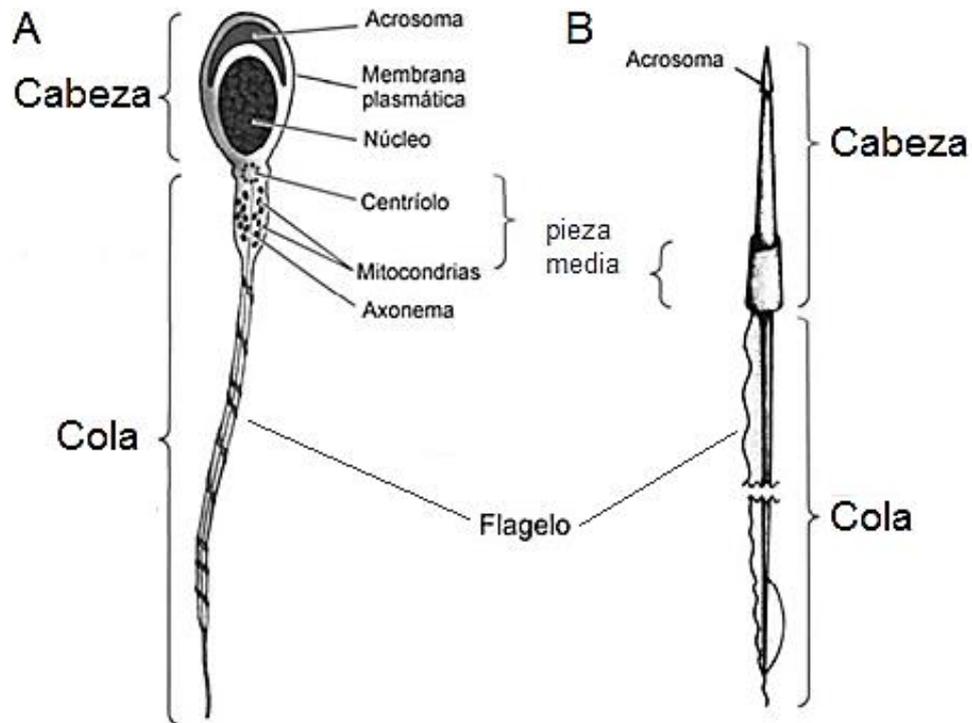
B. Dumas afirmaron por primera vez que los espermatozoides no eran parásitos sino que estaban asociados a la fecundación (Gilbert, 2005). Sin embargo, hubo que esperar hasta el año 1876 para que Oscar Hertwig y Herman Fol demostraran de manera independiente y fehacientemente que la fecundación se daba como consecuencia de la unión de los espermatozoides con los ovocitos (Gilbert, 2005).

Los espermatozoides son células pequeñas y móviles que poseen un diseño general común que consta de dos regiones morfológica y funcionalmente distintas:

- Una cabeza: contiene al núcleo donde se aloja un conjunto haploide de cromosomas altamente condensados, un centriolo y el acrosoma. El acrosoma está ubicado generalmente por delante del núcleo y está ausente en algunas especies, como los peces teleósteos. Es una vesícula de simple membrana derivada del aparato de Golgi y que contiene enzimas que son fundamentales para la penetración de las cubiertas del ovocito.
- Una cola que permite el desplazamiento del espermatozoide: conformada por un flagelo de tamaño variable (10 - 100  $\mu\text{m}$ ) dependiendo de la especie. Es utilizada para su impulsión y posee un ordenamiento de microtúbulos 9+2 característico de los flagelos y los cilios de las células eucariotas. En algunos casos, como en los anfibios anuros, la cola adopta el aspecto de una membrana ondulante (Fig. 3).

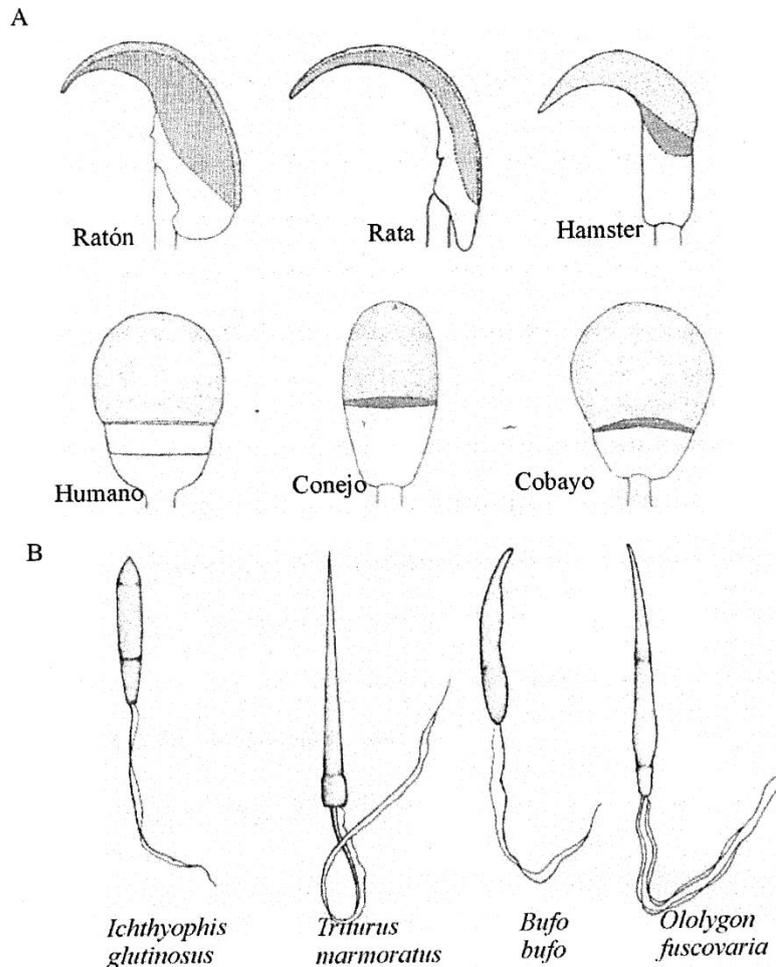
Entre la cabeza y la cola se encuentran una o varias mitocondrias muy voluminosas que proveen de la energía necesaria para el movimiento flagelar. Éstas pueden ubicarse dentro de la cabeza del espermatozoide, como en equinodermos y anfibios, o estar espiralmente dispuestas en una pieza media como en los espermatozoides de mamíferos.

El volumen citoplasmático del espermatozoide es relativamente pequeño; los volúmenes internos de espermatozoides de erizos de mar y humano han sido estimados en 35 y 15fl respectivamente (Kleinhans y col., 1992; Schackmann y col., 1984). Los espermatozoides carecen de otros orgánulos como retículo endoplasmático y complejo de Golgi, y son transcripcionalmente y traduccionalmente inactivos, aunque existen contradicciones en la literatura al respecto (Gur y Breitbart, 2006; Gur y Breitbart, 2007). Su diseño está optimizado para encontrar, fusionarse y entregar su material genético al ovocito.



**Figura 3. Estructura del espermatozoide.** (A) Esquema general de un espermatozoide de mamífero (adaptado de *Biología del Desarrollo*; Gilbert, 2005) o (B) de anfibio (adaptado de *Biology of Amphibians*; Duellman y Trueb, 1986) mostrando las principales características morfológicas y estructurales de cada uno.

A pesar de que la mayoría de los espermatozoides comparten la misma estructura básica (cabeza y cola), la morfología de los mismos varía según la especie (Fig. 4).



**Figura 4. Morfología de espermatozoides de distintas especies. A-** Espermatozoides de mamíferos. Se distinguen las cabezas falciformes de los espermatozoides de ratón, rata y hámster y las cabezas en forma de espátula de los espermatozoides de humano, conejo y cobayo. **B-** Espermatozoides de anfibios. Adaptado de Duellman y Trueb, 1986.

### Gameto Femenino: el óvulo

Los óvulos son células haploides, generadas por división meiótica de células de la línea germinal, que están especializadas en recibir al espermatozoide e iniciar el desarrollo de un nuevo individuo. Son las únicas células animales que presentan esta extraordinaria y asombrosa capacidad.

En la mayoría de los animales son células grandes si se comparan con células somáticas, con diámetros que varían desde varios  $\mu\text{m}$ s hasta centímetros según la especie (100  $\mu\text{m}$  en erizo de mar y humano; 1 a 2 mm en peces y anfibios; varios centímetros en reptiles y aves). A diferencia de los espermatozoides el citoplasma de los óvulos acumula una gran cantidad de sustancias de reserva energética y de factores maternos necesarios para el desarrollo embrionario. Entre ellas, una gran cantidad de ribosomas, ARNt, ARNm y factores morfogenéticos. Los óvulos, además, presentan en

su citoplasma grandes cantidades de reservas nutritivas en forma de vitelo (rico en fosfato, lípidos, proteínas y polisacáridos) que habitualmente se encuentra en forma de estructuras discretas denominadas plaquetas vitelinas. La cantidad de vitelo y, consecuentemente, el tamaño del óvulo, está directamente relacionado con el tiempo de desarrollo requerido antes de que el embrión pueda alimentarse a partir del medio externo o de su madre. En los óvulos que darán origen a embriones que se desarrollan fuera del cuerpo de la hembra el vitelo puede representar hasta el 95% del volumen celular.

Rodeando a este gran citoplasma se encuentra la membrana plasmática del óvulo. Esta membrana está especializada para regular el flujo de ciertos iones durante la fecundación y para la fusión con la membrana celular del espermatozoide.

En la periferia del óvulo y por debajo de la membrana plasmática se encuentra una región del citoplasma de mayor densidad denominada córtex, rica en actina globular. La polimerización de esta actina será necesaria para generar los microfilamentos utilizados, entre otras cosas, para la división del citoplasma desencadenada por la fecundación.

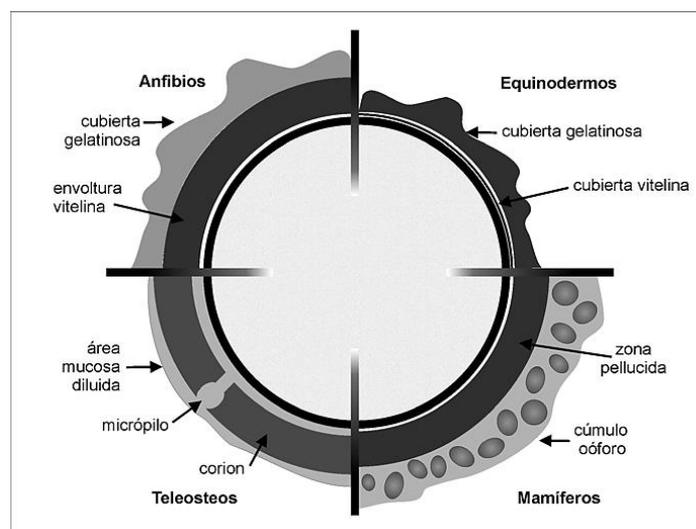
Dentro del córtex, e inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, muchos óvulos (incluidos los ovocitos de mamíferos) presentan una serie de vesículas secretoras especializadas (derivadas del complejo de Golgi) denominadas gránulos corticales. El contenido de los gránulos corticales (proteasas, glucosidasas, mucopolisacáridos, adhesinas, hialinas, etc.; Gilbert, 2005) es liberado durante la fecundación por la fusión entre la membrana plasmática del óvulo y la membrana de los gránulos corticales en un proceso denominado *reacción cortical*. Una vez liberado, el contenido cortical modifica las cubiertas externas del cigoto. La envoltura modificada previene la entrada de múltiples espermatozoides (prevención de la polispermia) y aísla y protege al embrión en desarrollo (Gilbert, 2005).

Los ovocitos poseen una cubierta externa constituida por glucoproteínas. Dicha cubierta recibe distintos nombres según la especie: en anfibios y erizos de mar, *envoltura vitelina* (EV) (Dumont, 1972; Hedrick y Hardy, 1991), en aves, *membrana perivitelina* (Bain y Hall, 1969; Bausek y col., 2000) y *zona pelúcida* (ZP) en mamíferos (Bleil y Wassarman, 1980a). En el caso de peces recibe el nombre de *corion* (Anderson, 1967; Cotelli y col., 1982), y se la menciona de forma separada debido a que su rol en la fecundación no coincide plenamente con el rol de las primeras. Esto podría deberse a que los espermatozoides de peces teleósteos no se

unen a dicha cubierta si no que la atraviesan por un orificio denominado micropilo (Coward y col., 2002).

La EV de anfibios está constituida por cuatro glucoproteínas (gp) mayoritarias de ~120 kDa (gp120 o ZPAX), ~69 kDa (gp69 en *X. laevis* o ZPA; ~75 kDa en *R. arenarum* (gp75)), ~41 kDa (gp 41 o ZPC), y ~37 kDa (gp37 o ZPB) (Vo y Hedrick, 2000; Barisone y col., 2002). Estas glucoproteínas presentan homología con las extensamente caracterizadas glucoproteínas que componen la *zona pelúcida* de los ovocitos de mamíferos: ZP1 (homóloga a ZPB), ZP2 (homóloga a ZPA) y ZP3 (homóloga a ZPC) (Vo y Hedrick, 2000; Hedrick, 1996; Barisone y col., 2007; Scarpeci y col., 2008). Se le atribuye a la EV (o la ZP en los mamíferos) un rol crucial durante la fecundación en el reconocimiento y la unión de los espermatozoides de manera específica de especie; que será abordado mas adelante.

Sumado a las envolturas antes mencionadas, existen cubiertas adicionales en la mayoría de los ovocitos (fig. 5). En mamíferos, los ovocitos son liberados del ovario rodeados de un grupo de células foliculares denominado cúmulo oóforo. Los óvulos de vertebrados no mamíferos y de muchos invertebrados poseen cubiertas acelulares adicionales. Los huevos de aves son recubiertos por albúmina y por una cubierta calcárea protectora durante su tránsito por el oviducto. En anfibios y equinodermos, una vez liberados del ovario y durante su tránsito por el oviducto, los ovocitos son recubiertos por una cubierta gelatinosa. El rol de estas cubiertas adicionales en la fecundación será abordado posteriormente en mayor detalle.



**Figura 5. El ovocito.** Diagrama mostrando los distintos tipos de cubiertas extracelulares que recubren a los óvulos u ovocitos de algunos deuterostomados (tomado de Mengerink y Vacquier, 2001).

El estado de maduración del óvulo en el momento en el que ocurre la fecundación varía según la especie. En el caso de los erizos de mar y los cnidarios (ej. anémonas de mar), el óvulo ya ha completado la meiosis antes del encuentro con el espermatozoide y su núcleo es haploide. Sin embargo, en el caso de los anfibios, peces teleósteos y mamíferos (excepto caninos), los ovocitos maduros se encuentran detenidos en la segunda división meiótica, y la meiosis sólo se completa después de la fecundación. Por lo tanto, se utiliza el término ovocito (y no óvulo) para referirse al gameto femenino que es fecundado, en estos casos.

### **Fecundación en anfibios**

Dada la relevancia del proceso de fecundación en Anfibios Anuros en el presente trabajo de tesis, a continuación se examinarán con mayor detalle los aspectos de su biología haciendo particular énfasis en la fecundación de *R. arenarum*. Se presentan también, a modo comparativo, algunos detalles de otras especies.

### **Oviducto de anfibios**

A diferencia del oviducto de los mamíferos, cuya función básica es proveer un medio óptimo para la fecundación y el desarrollo embrionario, el oviducto de anfibios Anuros debe transportar los ovocitos hasta el medio externo y elaborar y modificar la matriz extracelular de los mismos.

### **Transporte de los ovocitos desde el ovario hacia el exterior del cuerpo de la hembra**

El primer paso para la fecundación requiere del transporte de los gametos desde el lugar donde ocurre su desarrollo en los órganos reproductores hasta el sitio de su encuentro. Este transporte está influenciado por las hormonas sexuales que controlan el comportamiento de los progenitores y de los conductos asociados al transporte de los gametos de manera de asegurar la reproducción (Masui y Clarke, 1979).

En especies de fecundación externa los ovocitos deben viajar distancias relativamente largas desde el ovario hasta alcanzar el medio acuoso fuera del cuerpo de la hembra; sitio donde ocurrirá la fecundación. En *R. arenarum*, los ovocitos maduran y son liberados del ovario mediante inducción hormonal, cayendo en la cavidad pleuroperitoneal (celoma). Desde allí son conducidos por el movimiento ciliar que

presentan las células superficiales de dicha cavidad hacia la apertura del oviducto (*ostium*). Este transporte se describe como migración externa (peritoneal). Una vez en el *ostium* comienza el transporte de los ovocitos a través del oviducto mediado por el movimiento de los cilios de las células epiteliales y por movimientos peristálticos en el último tercio del órgano (migración interna) (Rugh, 1935).

### **Secreciones del oviducto de anfibios**

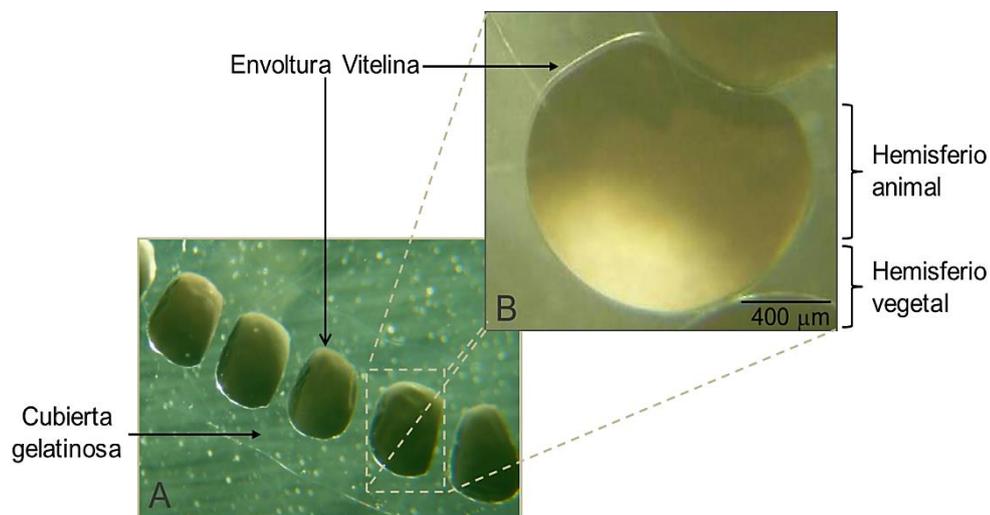
La primera porción del oviducto, denominada *pars recta*, produce una secreción de baja viscosidad con propiedades biológicas similares en la mayoría de los anfibios estudiados hasta el momento. El rol de esta secreción está directamente relacionado con la penetrabilidad de la envoltura vitelina por el espermatozoide, proceso que es facilitado por el ataque de las enzimas acrosomales liberadas por el espermatozoide en la reacción acrosómica (Raisman y Barbieri, 1969; Miceli y col., 1977; Cabada y col., 1978; Katagiri y col., 1982; Krapf y col., 2007; Krapf y col., 2009; O'Brien y col., 2011). Los ovocitos del celoma (ovocitos celómicos), cuya envoltura no fue aún modificada por los productos secretados por el oviducto, no son fecundables. Sin embargo, ovocitos celómicos tratados *in vitro* con secreción de *pars recta* adquieren sensibilidad a las enzimas acrosomales y se tornan fecundables (Miceli y col., 1978; Cabada y col., 1978; Miceli y col., 1987; Cabada, 1975). Los cambios estructurales y moleculares que la secreción de *pars recta* produce en la envoltura celómica del ovocito son causados por la enzima oviductina (Miceli y col., 1978; Gerton y Hedrick, 1986; Bakos y col.; 1990; Hardy y Hedrick, 1992; Hiyoshi y col., 2002). Esta enzima actúa sobre uno de los componentes estructurales de la envoltura celómica (denominado ZPC) transformándola en envoltura vitelina (Yoshizaki y Katagiri, 1981; Katagiri y col., 1982; Mariano y col., 1984; Gerton y Hedrick, 1986; Takamune y col., 1986; Omata y Katagiri, 1996)

Las otras dos porciones morfológica y fisiológicamente diferenciables del oviducto se denominan *pars preconvoluta* y *pars convoluta* y secretan un material altamente viscoso que recubre los ovocitos formando la *cubierta gelatinosa* característica de los ovocitos de anfibios.

### **Estructura y función de la cubierta gelatinosa**

La cubierta gelatinosa de los anfibios se organiza en capas; denominadas J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, ...J<sub>n</sub>. El número de capas varía desde tres en *X. laevis* (Yurewicz y col., 1998) hasta

seis en *Rana pipiens* (Steinke y Benson, 1970). En *R. arenarum* se han descrito cuatro capas (Cajal, 1972). La capa J1 es delgada, no muy hidratable y se encuentra en íntimo contacto con la envoltura vitelina de forma tal que hace muy difícil su diferenciación. J2 es más ancha e hidratable, de apariencia fibrilar. Ambas son concéntricas y radiales respecto al ovocito. La capa J3 es similar a J2 pero con una disposición longitudinal, lo que da a las tiras de ovocitos de *R. arenarum* la apariencia de un collar de cuentas. La capa más externa es J4, muy densa y no hidratable, siendo más delgada que J3, pero con igual disposición (Cajal, 1972). La figura 6 muestra la disposición estructural de los ovocitos depuestos de *R. arenarum*.



**Figura 6. Ovocitos depuestos de *R. arenarum*.** A- Micrografía mostrando un segmento de una tira depuesta de ovocitos de *R. arenarum*. La cubierta gelatinosa es indicada. B- Ovocitos maduros de *R. arenarum*. Se indican la envoltura vitelina que los rodea y sus hemisferios animal (pigmentado) y vegetal (no pigmentado). Las micrografías fueron tomadas con una lupa estereoscópica Olympus MVX10.

Dos glucoproteínas de cubierta gelatinosa tipo mucinas han sido identificadas en *R. arenarum*; denominadas HGP (del inglés **H**ighly **G**lycosilated **P**rotein) y L-HGP (del inglés **L**ow molecular mass - **H**ighly **G**lycosilated **P**rotein) (Arranz y col., 1997). HGP es una glucoproteína de 300 kDa que posee un 70% de carbohidratos unidos mediante enlace O-glucosídicos y se la considera la proteína estructural mayoritaria de la cubierta gelatinosa. A medida que HGP es secretada a la luz oviductal por el oviducto, polimeriza a través de la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, conformando la estructura de la cubierta gelatinosa. Se ha propuesto que esta estructura serviría de malla para la unión no covalente de otros factores secretados por el oviducto, que tendrían especial relevancia en el proceso de fecundación. L-HGP

posee una movilidad electroforética de 200 a 270 kDa y presenta en su estructura un 50% de carbohidratos unidos. L-HGP está presente en todas las capas de la cubierta gelatinosa y presenta la capacidad de difundir al medio acuoso representando hasta un 30% de las proteínas que difunden al medio cuando se incuban las tiras de ovocitos en soluciones salinas (Arranz y Cabada, 2000). Esta solución conformada por los factores difusibles de la cubierta gelatinosa se denomina Difundido total o EW (del inglés **E**gg **W**ater). Tan pronto como la cubierta gelatinosa se hidrata (15 minutos en medio de fecundación) los espermatozoides son incapaces de atravesarla (Cabada, 1975). Por otra parte, es sabido que los ovocitos de anfibios desprovistos de su cubierta gelatinosa sólo son fecundables luego de la reintroducción de EW en el medio de fecundación (Barbieri y Villeco, 1966; Elinson, 1971; Barbieri y Oterino, 1972; Katagiri, 1973; Barbieri, 1976), o alternativamente, si se tratan espermatozoides durante un breve período en medio conteniendo EW (Krapf y col., 2007).

A diferencia del erizo de mar, una condición necesaria para que los espermatozoides de *Bufo*, y de *R. arenarum*, fecunden al ovocito es que alcancen la EV con su acrosoma intacto (Raisman y col., 1980; Yoshizaki y Katagiri, 1982; Omata y Katagiri, 1996). La integridad acrosomal de los espermatozoides de *R. arenarum* se pierde rápidamente en medios hipotónicos semejantes al medio natural en el que ocurre la fecundación (Martinez y Cabada, 1996). Fue encontrado que una de las 2 isoformas existentes de L-HGP, sintetizada en la región más caudal del oviducto, tiene la capacidad de prevenir la ruptura acrosomal espontánea inducida por el estrés hipotónico (Arranz y Cabada, 2000; Krapf y col., 2006); lo que favorecería la llegada del espermatozoide a la EV de los ovocitos con su acrosoma intacto (Barisone y col., 2007).

Si la cubierta gelatinosa es removida químicamente y no se agrega al medio de fecundación EW, los espermatozoides de *R. arenarum* son aún capaces de unirse a la EV de los ovocitos (Barisone y col., 2007) pero no sufren reacción acrosómica y como consecuencia no son capaces de fecundar al ovocito (Darío Krapf, tesis doctoral 2008, FBioyF, UNR). Descubrimientos recientes realizados en *R. arenarum* mostraron que factores presentes en EW inducen cambios fisiológicos en los espermatozoides homólogos y los capacitan para la fecundación (Krapf y col., 2007; O'Brien y col., 2011). Estos cambios son semejantes a los que ocurren durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos (aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y remoción de colesterol de la membrana plasmática) y estarían relacionados

con la adquisición de la capacidad de desencadenar la reacción acrosómica en respuesta a la unión a la EV de los ovocitos (Krapf y col., 2009).

Otro factor crucial para lograr una fecundación exitosa es que el espermatozoide alcance y atraviese las cubiertas de los ovocitos. Para ello es esencial la activación del flagelo. Ha sido informado en diferentes especies que la activación del flagelo de los espermatozoides es una etapa regulada, y que esta regulación depende de factores medioambientales presentes en el medio de fecundación (Morisawa y col., 1983a; Morisawa y col., 1983b; Okamura y col., 1985; Morisawa, 1994). En anfibios (Anuros y Urodelos) la activación flagelar sería una consecuencia del cambio de osmolaridad entre el medio de fecundación (Inoda y Morisawa, 1987; Hardy y Dent, 1986) y el plasma seminal. En *R. arenarum* se determinó que cuando se incuban espermatozoides en soluciones de menor osmolaridad que el plasma seminal se produce la activación flagelar, y que la motilidad progresiva aumenta significativamente cuando se incuban los espermatozoides en EW (O'Brien y col., 2011; Krapf y col., 2014).

### **Envolturas de los ovocitos de anfibios**

La envoltura de los ovocitos de anfibios es una entidad única y discreta, que se presenta en cuatro formas relacionadas que derivan una de la otra (Hedrick y Hardy, 1991): la envoltura ovárica (presente alrededor de los ovocitos durante su crecimiento en el ovario), la envoltura celómica (EC) (asociada a los ovocitos de la cavidad celómica del cuerpo de la hembra), la envoltura vitelina (EV) (presente en los ovocitos depuestos luego de su tránsito por el oviducto) y la envoltura de fecundación (EF) (asociada a los ovocitos fecundados). Estas envolturas presentan características únicas en al menos tres aspectos:

- su ultraestructura;
- su composición molecular (excepto para las envolturas ovárica y celómica que tienen idénticos componentes), y;
- sus propiedades biológicas relacionadas a su rol durante la fecundación.

Los espermatozoides de anfibios pueden unirse y penetrar la EV pero no la envoltura celómica de la cual deriva (Cabada y col., 1978; Grey y col., 1977). Como mencionamos anteriormente (ver secreciones del oviducto de anfibios) fue demostrado que los cambios en las propiedades biológicas de estas envolturas son adquiridos durante el tránsito de los ovocitos por el oviducto, y estarían relacionados con una

actividad proteasa (oviductina) presente en la secreción oviductal (Cabada y col., 1978; Miceli y col., 1978; Yoshizaki y Katagiri, 1981; Mariano y col., 1984). La actividad de esta proteasa sobre la EC causaría la exposición de los sitios de unión a los espermatozoides y un marcado aumento de la sensibilidad al contenido acrosomal (Hedrick y Nishihara, 1991; Katagiri y col., 1982) convirtiéndola en la EV. En *R. arenarum* fue reportado que la conversión de la EC en EV involucra la conversión proteolítica de glucoproteínas de entre 40 y 55 kDa en glucoproteínas de 41 kDa y 38 kDa (Barisone y col., 2003).

Luego de la fecundación, la EV es convertida en la EF. Este proceso es llevado a cabo por los componentes de los gránulos corticales luego la reacción cortical. Como consecuencia de estos eventos la EF se distancia de la membrana plasmática. En cuanto a su composición molecular, la EF de *X. laevis* muestra tres cambios con respecto a la EV (Hedrick y Hardy, 1991): aparece un nuevo componente con masa molecular aparente de 40-45 kDa, el componente gp69/64 (ZPA) sufre proteólisis limitada convirtiéndose en una banda de 66/61 kDa, y residuos de N-acetil glucosamina son removidos de ZPC (Vo y col., 2003). Cambios proteolíticos similares se han observado en las envolturas de los ovocitos de *B. japonicus* (Lindsay y col., 1988) y *R. arenarum* (Scarpeci y col., 2008). Los cambios químicos y estructurales en la EF se reflejan en significativas modificaciones de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. La envoltura de fecundación es menos susceptible a lisinas espermáticas que la EV en *R. arenarum* (Cabada y col., 1989), *B. japonicus* (Yamasaki y col., 1988) y *X. laevis* (Hedrick y Nishihara, 1991). Ha sido reportado en numerosas especies, incluyendo a mamíferos y anfibios, que la hidrólisis provocada por las glucosidasas y las proteasas del contenido cortical sobre la EV (o ZP) ocasionan modificaciones en sus oligosacáridos y cambios en su estructura tridimensional perdiendo la EF la capacidad de unir espermatozoides (Miller y col., 1993b; Kiefer y Saling, 2002; Vo y Hedrick; 2003; Jovine y col., 2004; Lindsay y Hedrick, 2004; Scarpeci y col., 2008).

### **Aspectos funcionales de los gametos durante la fecundación**

El encuentro entre gametos obedece las reglas de una cita a ciegas, ya que éstas nunca han tomado contacto con anterioridad. Sin embargo, este encuentro debe cursar de una forma coordinada en tiempo y espacio. Estas características son las que se discuten a continuación.

## **Quimiotaxis**

Los espermatozoides deben recorrer distancias relativamente largas hasta alcanzar al ovocito. Este trayecto se encuentra guiado por la atracción que el ovocito ejerce sobre el espermatozoide.

### **Quimiotaxis en espermatozoides**

La quimiotaxis espermática o direccionamiento de la trayectoria del espermatozoide en respuesta a un gradiente químico, es una característica ampliamente distribuida en el reino animal; desde los erizos de mar hasta los humanos (Miller, 1985; Cosson, 1990; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1994). La actividad quimiotáctica de los ovocitos sobre los espermatozoides de especies marinas fue establecida y aceptada hace 40 años. En mamíferos, la existencia de quimiotaxis durante la fecundación fue propuesta hace sólo 10 años. Sin embargo, ha sido muy cuestionada hasta nuestros tiempos. Los motivos de estos cuestionamientos se han basado principalmente en que una gran cantidad de espermatozoides (del orden de  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^9$ ) son directamente depositados en el tracto reproductor de la hembra; lo que originaría que algunos espermatozoides pudieran alcanzar al ovocito por aleatoriedad, aún en ausencia de quimiotaxis (Williams y col., 1993). Otro tipo de cuestionamientos han estado relacionados a la dificultad en la interpretación de los resultados vinculados con diferencias entre quimiotaxis y otros procesos que resultan en la acumulación localizada de espermatozoides (Eisenbach, 1999).

### **Quimiotaxis en espermatozoides de anfibios**

En el caso de los anfibios, los estudios experimentales realizados a la fecha sugieren que la actividad quimiotáctica sobre los espermatozoides sería ejercida por factores difusibles asociados a la cubierta gelatinosa de los ovocitos. Tanto en *X. laevis* como en *X. tropicalis* se ha purificado una proteína de origen oviductal denominada allurin (~20 kDa), que mostró tener propiedades quimioattractantes de espermatozoides homólogos. Allurin fue encontrada tanto en la cubierta gelatinosa de los ovocitos como en EW y fue capaz de unirse a receptores situados en la pieza media y en la cabeza del espermatozoide (al-Anzi y Chandler, 1998; revisado en Lindsey y col., 2008). En concordancia con lo esperado para estos factores, estudios llevados a cabo por Olson (2001), han demostrado que allurin rápidamente difunde al medio de fecundación luego de la deposición de los ovocitos generando un gradiente de concentración

(revisado en Lindsey y col., 2008). Sin embargo, aún no se ha determinado si esta proteína es indispensable para la fecundación.

### **Interacción entre gametos de anfibios anuros**

En los animales con fecundación externa la primera interacción entre los gametos se establece entre el espermatozoide y moléculas que difunden desde la cubierta gelatinosa (Barbieri y Cabada, 1969).

Entre los roles propuestos para los factores difusibles de la cubierta gelatinosa podemos mencionar:

- el direccionamiento de los espermatozoides hacia el ovocito o quimiotaxis (Al-Anzi y Chandler, 1998);
- la capacitación espermática (Krapf y col., 2007; Krapf y col., 2009);
- la protección del acrosoma del espermatozoide frente a cambios de osmolaridad del medio (Arranz y Cabada, 2000);
- el incremento en la motilidad progresiva del espermatozoide (O'Brien y col., 2011; Krapf y col., 2014).

Junto a las funciones arriba mencionadas, la cubierta gelatinosa de los ovocitos cumple un rol de protección mecánica del embrión y de defensa frente a infecciones por microorganismos (Katagiri, 1987); un papel que es compartido con las matrices extracelulares de los ovocitos de todo el reino animal (Hedrick y Nishihara, 1991).

Por otra parte, se ha propuesto que otra de las funciones de la cubierta gelatinosa sería la de proveer  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  al medio circundante. En el momento en que los ovocitos son depuestos, ocurre una importante difusión de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  al medio, y en menor medida de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , provenientes de la cubierta gelatinosa que acondicionan el medio para la fecundación. Estas características del medio (baja osmolaridad y la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ) fueron necesarias para obtener altas tasas de fecundación en *Bufo japonicus* (Ishihara y col., 1984) y *R. arenarum* (Medina y col., 2010). En favor de esta hipótesis, se aisló una glucoproteína ácida (JGP) capaz de retener  $\text{Ca}^{++}$  y mantenerlo en niveles adecuados para la fecundación (Shimoda y col., 1994), y recientemente se identificó una bomba de  $\text{Ca}^{++}$ , de alta actividad, presente en el epitelio oviductal que contribuiría a la alta concentración de  $\text{Ca}^{++}$  presente en la cubierta gelatinosa (Crespo y col, 2014). Otra hipótesis funcional ha sido que la cubierta gelatinosa regularía el pH en las inmediaciones del ovocito (Fonovich De

Schroeder y col., 1993). Esta hipótesis se basa en el hecho de que las cubiertas gelatinosas producen una alcalinización del medio de inseminación que activaría a los espermatozoides (Barbieri y Cabada, 1969). En relación con estos hallazgos, fue recientemente demostrado que el  $\text{HCO}_3^-$ , utilizado en los experimentos de activación espermática para regular el pH, es un elemento clave en la adquisición de la capacidad fecundante de espermatozoides de *R. arenarum* (Krapf y col., 2007).

### **Interacción del espermatozoide con la EV**

La interacción entre gametos es bien conocida en erizos de mar. Los óvulos de estos animales están rodeados por la EV y una cubierta gelatinosa. Una vez que los gametos son liberados al medio acuoso, el contacto del espermatozoide con polisacáridos sulfatados de la cubierta gelatinosa de los ovocitos (Alves y col., 1997) desencadena la reacción acrosómica. Esta interacción, junto a la especificidad de especie encontrada en los factores quimiotácticos que guían a los espermatozoides hacia el ovocito, constituiría la primera barrera específica de especie, mecanismo que es compartido en la fecundación de muchos animales acuáticos (Ward y col., 1985). Una vez ocurrida la reacción acrosómica en los espermatozoides de erizo de mar, no sólo se liberan enzimas hidrolíticas que permiten el avance del espermatozoide a través las cubiertas del ovocito, sino que además se genera una extensión del proceso acrosomal en la región anterior de la cabeza del espermatozoide provocada por la polimerización de actina globular. Fue demostrada la existencia de proteínas acrosomales denominadas bindinas (Vacquier y Moy, 1977) que luego de la reacción acrosómica se agregarían y serían expuestas sobre la membrana que recubre a los filamentos de actina del proceso acrosomal (Moy y Vacquier, 1979). Estas proteínas mediarían una segunda interacción específica de especie (Glabe y Vacquier, 1977; Glabe y Lennarz, 1979) uniéndose a receptores glucoproteicos (~350 kDa) ubicados en la superficie del óvulo, contribuyendo a la unión de los gametos (Ohlendieck y col., 1993; Giusti y col., 1997; Stears y Lennartz, 1997; Hirohashi y Lennarz, 2001). Ha sido sugerido que tanto los residuos de azúcar como la región polipeptídica de los receptores de bindina estarían involucrados en la interacción especie selectiva con el espermatozoide (Ohlendieck y col., 1993).

En los mamíferos, la zona pelúcida está compuesta por glucoproteínas altamente conservadas; aún en no mamíferos (Litscher y Wassarman, 2007). Estas glucoproteínas

son sintetizadas por el ovocito y fueron denominadas, en ratón, mZP1 (200 kDa), mZP2 (120 kDa) y mZP3 (83 kDa) (Bleil y Wassarman, 1980a; Wassarman, 1999). Hay un elevado consenso entre la comunidad científica sobre la participación de la ZP en la interacción primaria o inicial, específica de especie, del espermatozoide con el ovocito (Wassarman y col., 2005), y sobre el rol de la interacción del espermatozoide con la ZP en el gatillado de la reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982; Bleil y Wassarman, 1983; Cherr y col., 1986; Macek y col., 1991; Miller y col., 1992). Estudios realizados en ratón, señalan que los oligosacáridos O-unidos a los residuos de serina 332 y 334 de ZP3 serían de suma importancia en la interacción inicial del espermatozoide con el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980b; Florman y Wassarman, 1985; Bleil y Wassarman, 1986; Rosiere y Wassarman, 1992; Kinloch y col., 1995; Litscher y Wassarman, 1996; Chen y col., 1998). A pesar de la reconocida importancia de los carbohidratos en la interacción de los gametos, Florman y col. (1984) mostraron que esta interacción no sería suficiente para desencadenar la reacción acrosómica; sugiriendo que la región polipeptídica de ZP3 también sería de importancia en la fecundación. Trabajos posteriores realizados por Williams y col. (2006), reemplazando regiones del extremo C-terminal de ZP3 de hámster por los correspondientes de ratón, mostraron que la región polipeptídica codificada por el exón 7 del gen de ZP3 es reconocida y se une *in vitro* al espermatozoide. Otros investigadores también mostraron la importancia de esta región polipeptídica en el reconocimiento e interacción de los gametos de ratón. (Li y col., 2007; Rosiere y Wassarman 1992; Millar y col., 1989). Llamativamente, fue encontrado que esta zona de ZP3 presenta una elevada variabilidad evolutiva respecto del resto de la proteína, sugiriendo su rol en la restricción específica de especie (Kinloch y col., 1995; Swanson y col., 2001).

A pesar de la existencia de un gran volumen de literatura que soporta la importancia de los carbohidratos en la interacción del espermatozoide con los ovocitos de ratón (Benoff, 1997; Tulsiani y col., 1997) existen críticas al modelo anteriormente descrito. Varios estudios experimentales sugieren que los oligosacáridos de la zona pelúcida no son suficientes para explicar el 100% de la unión de los espermatozoides a la ZP, y que el 20-25% de estas uniones podría ocurrir por mecanismos carbohidrato-independientes llevando a una fecundación exitosa (Mori y col., 1997; Litscher y col., 1995; Johnston y col., 1998). Sin embargo, la existencia de redundancia entre ambos mecanismos y las bases moleculares de los mecanismos carbohidrato independiente aún

son desconocidas y aguardan futuras investigaciones (Wassarman y Litscher, 2008; Clark y Dell, 2006).

Varias proteínas espermáticas (EBPs) (del inglés: **egg binding proteins**) han sido propuestas como mediadoras de la unión específica de especie con el ovocito, abarcando desde enzimas a proteínas tipo lectina (tabla II). Sin embargo, muchas de las funciones propuestas para estas proteínas han perdido sustento por hallazgos recientes. A modo de ejemplo, Lu and Shur (1997) encontraron que ratones “nocaut” para la  $\beta$ -galactosiltransferasa, una de las EBPs propuestas, son fértiles. Fue encontrado, a su vez, que sp56, propuesta como receptor de ZP3, está presente en matriz acrosomal y no en la membrana plasmática del espermatozoide (Foster y col., 1997).

Actualmente existe cierto consenso entre la comunidad científica sobre la existencia de más de una clase de proteína involucrada en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito, y sobre que especies diferentes podrían usar diferentes EBPs en esta interacción (Wassarman y col., 2001). Ha sido propuesto, además, que la especificidad global de la interacción espermatozoide-ovocito en las distintas especies de mamíferos podría ser alcanzada por la suma de diferentes etapas de moderada especificidad (Florman y col., 1999).

**Tabla II.** Proteínas de unión a ovocitos encontradas en los espermatozoides de mamíferos.

<b>EBP</b>	<b>Comentario</b>	<b>Referencia</b>
$\beta$ -galactosiltransferasa	Proteína de la mp del sp que une residuos NacGlc sobre ZP3 (ratón).	Miller y col., 1992; Lu y Shur, 1997.
ZRK (del inglés: <b>Zona Receptor Kinasa</b> )	Proteín tirosin quinasa que uniría la mZP3 (ratón; humano).	Burks y col., 1995.
Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA2)	Proteína de la mp del sp vinculada a la fusión de los gametos (humano).	Fry y col., 1992.
Proteína de unión a manosa	Proteína de la mp del sp que uniría residuos manosa sobre ZP (ratón, humano, etc.).	Cornwall y col., 1991.
Espermadhesinas	Proteína tipo lectina que uniría O-oligosacáridos de la ZP (jabalí).	Dostalova y col., 1995.
Zonadhesina	Proteína de la mp del sp que mediaría la unión a la ZP (cerdo; ratón).	Hardy y Garbers, 1995; Gao y Garbers, 1998.
sp56	Proteína del acrosoma del sp que uniría oligosacáridos de mZP3; entre otras (ratón).	Cheng y col., 1994; Foster y col., 1997.
$\beta$ -fertilina	Proteína implicada en la interacción de las mp de los gametos (ratón).	Cho y col., 1998.
ciritestina	Proteína de la mp del sp implicada en la interacción con la ZP (ratón).	Shamsadin y col., 1999.
Izumo1	Proteína de la mp del sp implicada en la fusión de los gametos (ratón).	Inoue y col., 2005.
P-selectina	Proteína de la mb acrosomal que interacciona con ZP (porcino).	Geng y col., 1997.
PH20	Hialuronidasa de la mb acrosomal interna del sp que interacciona con ZP2 (cobayo).	Hunnicutt y col., 1996.
P17	Proteína del acrosoma del sp con afinidad por la ZP (conejo).	Richardson y col., 1994.

mp: membrana plasmática; sp: espermatozoide; NacGlc: N-acetil glucosamina. Adaptada de Wassarman, 1999; Miller y col., 2002.

En los mamíferos, se ha encontrado, además, que varias proteínas del espermatozoide reaccionado son capaces de interactuar con la ZP (Richardson y col., 1994; Hunnicutt y col., 1996; Cheng y col., 1997). Es sugerido, que una vez desencadenada la reacción acrosómica, proteínas de la membrana acrosomal interna interactuarían con ZP2 impidiendo que los espermatozoides fecundantes se suelten del ovocito, ayudando en la penetración de la ZP (Bleil y col., 1988b).

En los anfibios, tanto las modificaciones químicas que ocurren en la EC de los ovocitos durante su tránsito por el oviducto, como la interacción de los espermatozoides con los componentes difusibles de la cubierta gelatinosa, son necesarias para que los espermatozoides reconozcan y fecunden a los ovocitos.

En *X. laevis* fue encontrado que ZPC (homóloga a ZP3) es el principal componente de la EV que interactúa con los espermatozoides no reaccionados. ZPA (homóloga de ZP2) también mostró capacidad de unión a estos espermatozoides pero en menor medida (Vo y Hedrick, 2000). El pretratamiento de ZPC con PNGasa-F, una enzima que remueve oligosacáridos unidos a polipéptidos mediante unión N-glucosídica, eliminó su capacidad de unir espermatozoides, mostrando la importancia de estos oligosacáridos en la interacción de los gametos (Vo y Hedrick, 2000). Tian y col. (1997) también mostraron que los carbohidratos de ZPA serían importantes en la interacción inicial de la EV con los espermatozoides. Los carbohidratos de una de las glucoproteínas de la EV (gp 36-39 kDa) fueron señalados como los principales componentes involucrados en la interacción con los espermatozoides en *B. japonicus* (Omata y Katagiri, 1996). Estos hallazgos demuestran, en su conjunto, la importancia que tienen los carbohidratos en el reconocimiento y la unión de los gametos en los anfibios. Sin embargo, en *X. laevis* sólo una mezcla de ZPA, ZPB y ZPC en la misma proporción que la encontrada en la EV logró alcanzar los niveles de unión de espermatozoides encontrados cuando se utilizó EV aislada. Esto sugiere, que el contexto estructural de la EV también podría ser importante en la presentación del receptor espermático, o que la unión estable de los espermatozoides requiere el reconocimiento de un complejo hetero-oligomérico formado por todas las glucoproteínas de la EV (Vo y Hedrick, 2000).

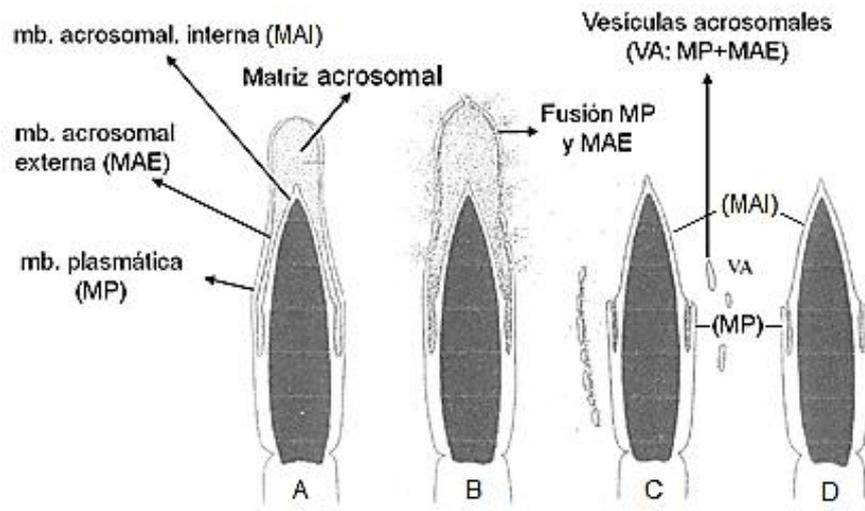
A diferencia de lo encontrado en los mamíferos, los espermatozoides reaccionados de anfibios no mostraron capacidad de interacción con la EV (Vo y Hedrick, 2000).

En *R. arenarum*, modelo de estudio en este trabajo de tesis, se demostró que gp41 (homóloga a ZPC) se une *in vitro* a espermatozoides homólogos, mientras que gp75 (homóloga de ZPA) y gp38 interaccionaron en menor proporción (Barisone y col., 2007). Trabajos realizados por otros autores también mostraron la interacción de estas glucoproteínas con los espermatozoides de *R. arenarum* (Scarpeci y col., 2008; Barrera y col., 2012). Sin embargo, el rol de los carbohidratos de la EV en la interacción de los gametos aún no es claro en esta especie.

### **Reacción acrosómica**

En Mamíferos, la estimulación de espermatozoides capacitados con ZP solubilizada, dispara la reacción acrosómica (para una revisión ver Buffone y col., 2014). Esto llevó a interpretar que, *in vivo*, el contacto del espermatozoide con la ZP era el evento desencadenante de la reacción acrosomal. Sin embargo, evidencias recientes discuten este paradigma, indicando que el espermatozoide fecundante sería aquel que contacta a la ZP con su acrosoma ya reaccionado (Jin y col., 2011). Por otro lado, en anfibios, el contacto del espermatozoide intacto con la EV desencadenaría la reacción acrosómica (Ward y Storey, 1984; Barisone y col., 2002; Hedrick, 2008). Como fue descrito, el acrosoma es una gran vesícula membranosa secretoria ubicada en la región apical de la cabeza del espermatozoide (Eddie y O'Brien, 1994; Yanagimachi, 1994). La membrana acrosomal que subyace por debajo de la membrana plasmática es denominada membrana acrosomal externa mientras que la membrana acrosomal ubicada por encima del núcleo es denominada membrana acrosomal interna.

Durante la reacción acrosómica, la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática en múltiples puntos. Como consecuencia, se libera el contenido de la matriz acrosomal (mayormente hidrolasas) y se generan vesículas híbridas (vesículas acrosomales) formadas por fragmentos de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y de la membrana acrosomal externa; quedando expuesta la membrana acrosomal interna (Cardullo y Florman, 1993) que se fusiona con la membrana plasmática remanente (Fig. 7).



**Figura 7. Esquema de los cambios morfológicos que ocurren en un espermatozoide de mamífero durante la reacción acrosómica.** El curso de la reacción acrosómica se indica de **A** a **D**. **A-** Cabeza de un espermatozoide con su acrosoma intacto. **B-** Fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) con la membrana plasmática (MP) en múltiples puntos y liberación del contenido de la matriz acrosomal. **C-** Vesículas acrosomales generadas, compuestas por la MAE y la MP. **D-** Cabeza del espermatozoide reaccionado exponiendo la membrana acrosomal interna (MAI).

### Fusión de membranas y activación del metabolismo del cigoto

Una vez que el espermatozoide reconoce e interacciona con el ovocito, las enzimas acrosomales liberadas durante la reacción acrosómica actúan sobre la ZP o EV permitiendo el avance del espermatozoide y la fusión de su membrana plasmática con la del ovocito. Trabajos recientes realizados en mamíferos (ratón) demostraron que Izumo-1, una proteína integral de la membrana plasmática del espermatozoide, es indispensable para la unión de los gametos a nivel de sus membranas plasmáticas facilitando su fusión (Wassarman, 2014).

Luego de ocurrida la fusión de los gametos los siguientes eventos durante la fecundación son dirigidos hacia la reconstitución de un núcleo diploide y hacia la activación del metabolismo del cigoto para generar un nuevo organismo (Gilbert, 2005). Debido a que estos procesos no tienen relevancia en este trabajo de tesis sus aspectos moleculares no serán detallados.

### Prevención de la polispermia

La polispermia, entrada de más de un espermatozoide al ovocito, lleva a consecuencias letales para el embrión en la mayoría de los organismos estudiados. De este modo, la mayoría de las especies han evolucionado desarrollando mecanismos para garantizar la fecundación del ovocito por un único espermatozoide. En el óvulo de erizo

de mar existen dos mecanismos que previenen la polispermia: uno rápido y transitorio, que ocurre entre 1 a 3 segundos luego de la entrada del primer espermatozoide, y uno lento y permanente, que ocurre dentro del minuto de fecundado el óvulo.

El bloqueo rápido de la polispermia se produce por un cambio en el potencial de la membrana plasmática del ovocito (de -70 mV, citoplasma negativo, a +20 mV) provocado por un influjo regulado de iones sodio hacia su interior, que impide a los espermatozoides fusionarse con su membrana plasmática (Jaffe, 1976).

El bloqueo lento de la polispermia es llevado a cabo por la reacción cortical, luego de la fusión exitosa entre los gametos. Como ya mencionamos, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del óvulo se encuentra múltiples gránulos corticales que se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido al espacio periplásmico. Entre las moléculas liberadas se encuentran proteasas, glucosidasas, lectinas y mucopolisacáridos que modificarían de forma permanente la cubierta del cigoto de manera que ningún otro espermatozoide pueda fecundarlo (Gilbert, 2005).

En los mamíferos la estrategia para el bloqueo de la polispermia varía según la especie (Jaffe y Cross, 1984). Mientras que en hámster sólo tiene lugar el bloqueo lento de la polispermia (Austin, 1955), en conejos sólo ocurre el bloqueo rápido (Braden y col., 1954). En ratón, ambos mecanismos, rápido y lento, aseguran el bloqueo de la polispermia (Braden y col., 1954; Wolf, 1978).

En los Anuros, la fecundación es monospérmica, y tienen lugar ambos mecanismos de bloqueo de la polispermia (Cross y Elinson, 1980).

Particularmente, en *X. laevis*, tres mecanismos moleculares han sido descritos que contribuyen al bloqueo lento de la polispermia:

- Greve y col. (1985) reportaron que durante la reacción cortical se libera una enzima con actividad N-acetil-glucosaminidasa al espacio perivitelino. Estudios posteriores (Prody y col., 1985) demostraron que el pretratamiento de ovocitos con esta enzima los transforma en no fecundables. Vo y col. (2003) demostraron que la N-acetil-glucosaminidasa de los gránulos corticales remueve residuos de N-acetil-glucosamina terminales de ZPC (el principal receptor espermático de la EV en esta especie) que serían esenciales para la unión de los espermatozoides con la EV.

- Linsay y Hedrick (2004) aislaron una proteasa del exudado de los gránulos corticales de ovocitos activados con ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$  que fue capaz de replicar los cambios proteolíticos ocurridos en ZPA durante la transformación de la EV en la EF. Es actualmente aceptado que la ruptura proteolítica de ZPA provoca cambios conformacionales globales en las glucoproteínas que componen la EV, que llevarían a un enmascaramiento u ocultamiento de los sitios de unión a los espermatozoides de la EV y a su endurecimiento. De este modo, la ruptura proteolítica de ZPA contribuiría tanto física como químicamente a la prevención de la polispermia. Resultados similares han sido reportados en *R. arenarum* (Barisone y col., 2003; Scarpeci y col., 2008).
- Nishihara y col. (1986) reportaron la existencia de una lectina en los gránulos corticales de *X. laevis* que es también liberada durante la reacción cortical. Fue mostrado que esta lectina difunde a través del espacio perivitelino y de la EV para unirse a su glucoproteína ligando en la capa mas interna de la cubierta gelatinosa de los ovocitos (J1). Esta interacción lleva a la formación de un heteropolímero lectina-ligando insoluble (capa de fecundación o capa F) que previene que los espermatozoides se unan a la superficie de la EV (Wyrick y col., 1974; revisado en Hedrick, 2008). Ha sido propuesto que la capa F bloquearía físicamente el acceso al receptor espermático en las glucoproteínas de la EV.

### **Importancia de las glucosidasas y carbohidratos en la fecundación**

La importancia de los carbohidratos y las glucosidasas en la fecundación ha sido largamente documentada. En distintas especies, abarcando desde los humanos hasta las ascidias, se ha reportado que las glucosidasas no sólo participan en la interacción inicial entre los gametos, sino además en el avance del espermatozoide a través de las cubiertas del ovocito y en la prevención de la polispermia.

En ascidias, el modelo actualmente aceptado y respaldado por los hallazgos de diferentes laboratorios (Rosati y De Santis, 1980; Honegger, 1982; Hoshi y col., 1985; Honegger, 1986; Lambert, 1986; Lambert, 1989a; Godknecht y Honegger, 1991; Godknecht y Honegger, 1995) propone que glucosidasas de la membrana plasmática de los espermatozoides reconocerían residuos glucosídicos en la cubierta vitelina del óvulo formando un complejo que uniría a ambos gametos. La actividad de las glucosidasas, como enzima o como lectina, sería modulada por el pH de su microentorno. Al pH del

agua de mar (pH~8), las glucosidasas, que poseen un pH óptimo ácido (pH~4), tendrían muy poca actividad catalítica y actuarían a modo de lectinas facilitando la unión de gametos.

Las glucosidasas de ascidias también fueron vinculadas a la prevención de la polispermia, ya que modifican químicamente, o bloquean físicamente, los ligandos glucosilados del óvulo que interactúan con los espermatozoides (Pinto y col., 1981; Hoshi y col., 1985; Honegger y Koyanagi, 2008). Fue demostrado, que ovocitos de *Ascidia nigra* liberan una N-acetil glucosaminidasa al agua de mar luego de la fecundación. Esta glucosidasa inactiva residuos de N-acetil glucosamina sobre la envoltura vitelina de los óvulos impidiendo la unión supernumeraria de espermatozoides y contribuyendo a la prevención de la polispermia (Lambert 1986; Lambert, 1989b).

En ratón, estudios realizados en diversos laboratorios sugieren que residuos terminales de N-acetil glucosamina, galactosa y manosa (Shur y Hall, 1982; Bleil y Wassarman, 1988a; Cornwall y col., 1991; Miller y col., 1992) presente en los oligosacáridos de ZP3 estarían involucrados en una interacción tipo lectina con las EBPs. En humanos residuos de N-acetil glucosamina, manosa, fucosa y galactosa han sido vinculados a la unión de los espermatozoides con la ZP (Miranda y col., 1997). En la membrana plasmática de los espermatozoides de las moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* y *Ceratitis capitata* tres glucosidasas potencialmente involucradas en la fecundación han sido reportadas: N-acetil glucosaminidasa,  $\alpha$ -manosidasa y  $\alpha$ -L-fucosidasa (Cattaneo y col., 1997; Intra y col., 2006; Intra y col., 2011). De este modo, las glucosidasas parecen estar presentes en los gametos de muchas de las especies de vertebrados e invertebrados estudiadas y muchas de ellas fueron vinculadas a la fecundación.

### **N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa**

Entre las glucosidasas, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (EC 3.2.1.52) ha sido vinculada a la fecundación en numerosas especies de animales y merece particular atención en este trabajo de tesis.

En humanos la N-acetil glucosaminidasa fue implicada en la interacción de los espermatozoides con la ZP (Miranda y col., 2000; Perez Martinez y col., 2008).

Miller y col. (1993a) reportaron la existencia de N-acetil glucosaminidasa en el acrosoma de los espermatozoides de ratón, que es liberada durante la reacción acrosómica, y que facilita el pasaje del espermatozoide a través de la ZP removiendo las uniones estables espermatozoides-ZP. La N-acetil glucosaminidasa fue también encontrada en los gránulos corticales de los ovocitos de ratón (Miller y col. 1993b). Esta enzima es liberada durante la reacción cortical y participaría del bloqueo de la polispermia inactivando residuos de N-acetil glucosamina en los oligosacáridos de ZP3 que serían reconocidos por el espermatozoide. En hámster, una N-acetil glucosaminidasa de espermatozoides estaría implicada en la interacción inicial con residuos N-acetil glucosamina de la ZP (Zitta y col., 2004; Zitta y col., 2006).

En los géneros *Ascidia* y *Phallusia* la N-acetil glucosaminidasa es señalada como la glucosidasa responsable en la unión de los gametos y de la prevención de la polispermia (Lambert, 1986; Lambert, 1989a; Lambert, 1989b; Matsuura y col., 1993; Godknecht y Honegger, 1991; Godknecht y Honegger, 1995).

En *D. melanogaster* fue encontrado que una N-acetil glucosaminidasa de la membrana plasmática del espermatozoide ubicada en la zona que cubre al acrosoma es indispensable para la fecundación. Machos mutantes para esta N-acetil glucosaminidasa (mutantes casanova) son infértiles (Perotti y col., 2001).

### **Características bioquímicas y estructurales de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa**

A pesar de su rol asociado a la fecundación, la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa es una glucosidasa de origen lisosomal. Es clasificada como una  $\beta$ -N-acetil hexosaminidasa o  $\beta$ -hexosaminidasa (Hexosaminidasa o Hex) debido a muchas de ellas pueden catalizar la remoción eficiente tanto de residuos de N-acetil glucosamina (NacGlc) como de residuos N-acetil galactosamina (NacGal) terminales desde los extremos no reductores de glucoconjugados; como ser glucolípidos, glucoproteínas, proteoglucanos, etc. (Beeley, 1985).

En los mamíferos 3 isoformas de la Hex han sido caracterizadas; cada una de ellas compuesta por la homo o heterodimerización no covalente de dos subunidades proteicas distintas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas isoformas son denominadas HexA (heterodímero  $\alpha\beta$ ), Hex B (homodímero  $\beta\beta$ ) y Hex S (homodímero  $\alpha\alpha$ ).

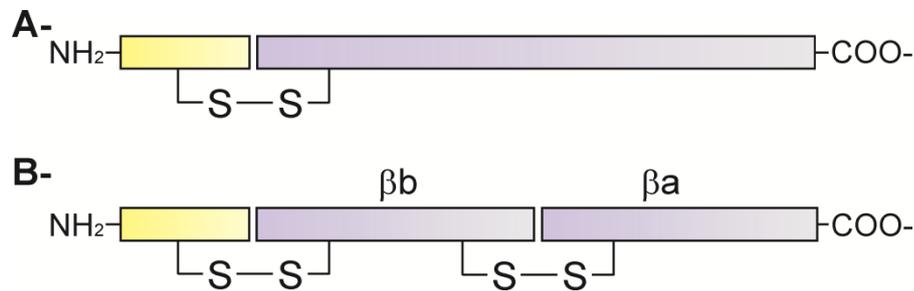
En humanos la Hex ha sido profundamente estudiada dado que su deficiencia causa un conjunto de enfermedades neurodegenerativas letales denominadas GM2

gangliosidosis (Tay-Sachs, Sandhoff y variante AB). Los genes que codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  fueron identificados y caracterizados en humanos (Proia y Soravia; 1987; Proia, 1988). Fue encontrado que *HEXA* (codificante para la subunidad  $\alpha$ ) y *HEXB* (codificante para la subunidad  $\beta$ ) se encuentran ubicados en distintos cromosomas (*HEXA* en el cromosoma 15 y *HEXB* en el cromosoma 5) y que presentan la misma estructura exón-intrón (14 exones interrumpidos por 13 intrones). El análisis de las secuencias genómicas reveló la conservación, en ambos genes, de los sitios en donde las secuencias intrónicas interrumpen a las secuencias codificantes. Estos hallazgos, junto a la elevada homología de secuencia encontrada entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (>50% de identidad de aminoácidos), hacen suponer que ambos genes tienen un origen evolutivo común a partir de la duplicación y divergencia de un gen ancestral (Proia, 1988).

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son sintetizadas como pre-pro-precursores glucosilados que dimerizan en el aparato de Golgi (Proia y col., 1984) y alcanzan el lisosoma por la ruta de la manosa-6-fosfato (Sonderfeld-Fresko y Proia, 1989). La obtención de las subunidades maduras requiere primero la ruptura proteolítica del péptido señal de anclaje al retículo endoplásmico rugoso (RER) y luego la proteólisis de regiones estructuralmente expuestas en el lisosoma. Estudios realizados en humano demuestran (Mahuran y col., 1988) que la subunidad  $\alpha$  es sintetizada como un pre-pro-polipéptido de 60,5 kDa. Luego de la ruptura de su péptido señal (~2,3 kDa), el pro-polipéptido  $\alpha$  es finalmente procesado mediante la ruptura proteolítica de un pro-péptido N-terminal de ~7,8 kDa dando origen a la subunidad  $\alpha$  madura (~50,4 kDa).

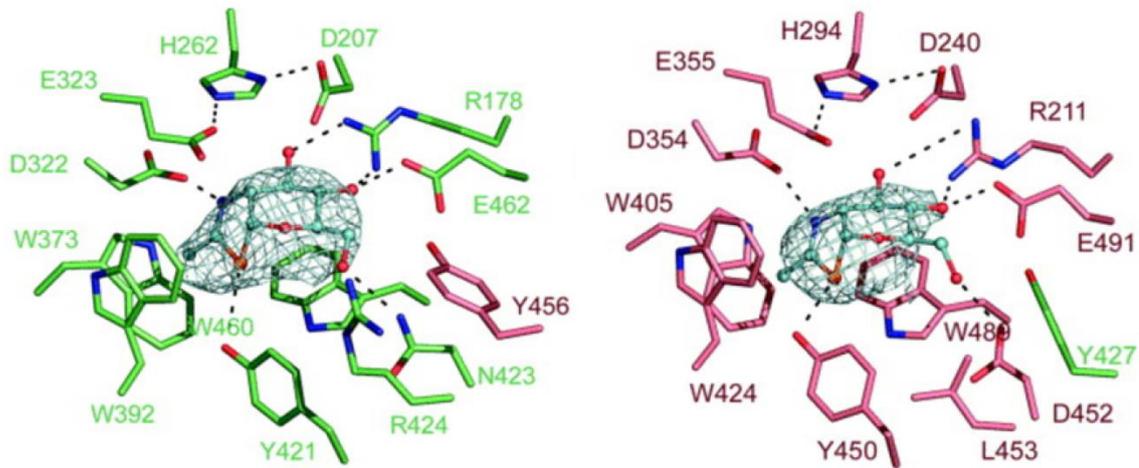
El precursor de la subunidad  $\beta$  (61,8 kDa) sufre dos modificaciones proteolíticas importantes luego de la eliminación de su péptido señal (~2,3 kDa) en el RER. Al igual que en la subunidad  $\alpha$ , el pro-polipéptido  $\beta$  sufre la ruptura proteolítica de un pro-péptido de ~10 kDa en su extremo N-terminal. Además, el precursor de la subunidad  $\beta$  sufre la proteólisis adicional de un tri (en HexB) o tetrapéptido (en HexA) interno dando origen a dos mitades, denominadas  $\beta_b$  (mitad amino terminal) y  $\beta_a$  (mitad carboxilo terminal), que se mantienen unidas por enlace disulfuro (Mahuran y col., 1988; Hubbes y col., 1989). Schuette y col. (2001) demostraron que los pro-péptidos removidos de las precursores de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se mantienen unidos covalentemente por enlace disulfuro en las subunidades maduras.

En la figura 8 se muestra un diagrama de los procesamientos proteolíticos que sufren los precursores de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de humano.



**Figura 8. Esquema de los polipéptidos estructurales que componen las distintas isoformas de la Hex de humano. A-** subunidad  $\alpha$  madura. **B-** subunidad  $\beta$  madura. En canela se indican los pro-peptidos.

La estructura molecular de las isoformas A y B de la Hex fueron obtenidas por difracción de rayos X (Mark y col., 2003; Lemieux y col., 2006). Un análisis de estas isoformas reveló que tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$  poseen un sitio activo funcional (Kytzia y Sandhoff, 1985) compuesto por 12 residuos de aminoácidos endógenos más un residuo de tirosina (Tyr) exógeno aportado por la subunidad apareante. El análisis de los residuos de aminoácido que componen el sitio activo en ambas subunidades reveló que comparten la identidad de 10 de los 12 residuos de aminoácido endógenos que los constituyen. Entre los residuos de aminoácidos disimiles, fue encontrado que la subunidad  $\alpha$  posee un residuo de asparagina (Asn423) y uno de arginina (Arg424) que son reemplazados por un residuo de aspartato (Asp452) y uno de leucina (Leu453) en la subunidad  $\beta$ . Estos residuos de aminoácido otorgan diferenciales de cargas a los sitios activos de ambas subunidades que cambian la especificidad de los sustratos que las distintas isoformas de la Hex (A, S o B) pueden metabolizar. Mientras que las isoformas A( $\alpha\beta$ ) y S( $\alpha\alpha$ ) pueden metabolizar residuos de NacGlc y NacGal terminales tanto de sustratos neutros como de aquellos negativamente cargados (como por ejemplo los que poseen sulfatos o ácido siálico en su estructura) debido a la presencia de subunidades  $\alpha$  en su estructura, la isoforma B (homodímero  $\beta\beta$ ) sólo puede metabolizar sustratos neutros. Esto es debido a que el residuo de Asp452 le confiere carga negativa al sitio activo de la subunidad  $\beta$  haciendo que repela el ingreso de sustratos negativamente cargados. La figura 9 muestra un diagrama estructural de los sitios activos encontrados en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la HexA de humano.



**Figura 9. Estructura cristalográfica de los sitios activos de las subunidades  $\alpha$  (en verde) y  $\beta$  (en rosa) de la HexA de humano enlazados al inhibidor N-acetilglucosamina tiazolina.** Las letras simbolizan los residuos de aminoácido que los componen (W: triptófano; R: arginina; Y: tirosina; D: aspartato; L: leucina; N: asparagina; E: glutamato; H: histidina). La posición de los residuos de aminoácido en el polipéptido correspondiente se indica con números. Figura tomada de Lemieux y col., 2006.

### Glucosidasas y carbohidratos en la fecundación de los anfibios

Vo y Hedrick (2000) encontraron que los residuos N-acetil glucosamina y fucosa terminales de los oligosacáridos complejos de ZPC estarían involucrados en la interacción de los gametos en *X. laevis*. En *Bufo japonicus* residuos de N-acetil galactosamina y/o ácido siálico estarían involucrados en la interacción de la EV con los espermatozoides (Omata y Katagiri, 1996).

En *R. arenarum*, las principales proteínas que componen la EV (gp120, gp75, gp41 y gp38) mostraron la presencia de oligosacáridos en sus estructuras (Barisone y col., 2003). Estudios realizados con lectinas sobre estas glucoproteínas, tanto en EC, EV como en EF, mostraron la presencia de residuos de N-acetil galactosamina, ácido siálico y/o N-acetil glucosamina en todas ellas. Interesantemente, los residuos de N-acetil galactosamina encontrados en gp75 se pierden durante la conversión de la EV en la EF, sugiriendo que su hidrólisis podría estar catalizada por el producto de los gránulos corticales (Barisone y col., 2003).

Los mismos estudios fueron realizados con ovocitos o embriones enteros. En ellos se observó que los residuos de manosa (o glucosa), galactosa y N-acetil galactosamina estarían expuestos sobre su superficie. Los residuos de ácido siálico o N-acetil glucosamina y fucosa no fueron accesible a las lectinas en estos experimentos (Barisone y col., 2003).

La Hexosaminidasa ha sido vinculada a la fecundación también en los anfibios. En *X. laevis*, una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos fue vinculada a la prevención de la polispermia (ver prevención de la polispermia en anfibios) (Grave y col., 1985; Prody y col., 1985; Vo y Hedrick, 2003).

En *R. arenarum* la Hex fue la principal glucosidasa presente en el contenido acrosomal de los espermatozoides. Además, un pequeño porcentaje se encontró asociada a las membranas de los espermatozoides reaccionados (Martinez y col. 2000). La adición de los azúcares NacGlc o NacGal (inhibidores competitivos de la Hex) a concentraciones 100mM en el medio de fecundación redujo la tasa de fecundación a ~1% en este anfibio. Resultados similares fueron encontrados cuando la Hex fue competida con otra Hex exógena a modo de lectina o con anticuerpos  $\alpha$ -Hex (Martínez y col., 2000). Estos hallazgos fuertemente sugirieron la participación de esta glucosidasa en la fecundación de *R. arenarum*. Sin embargo, la etapa de la fecundación en la que interviene (unión inicial de los gametos, pasaje de la cubierta vitelina o prevención de la polispermia), la participación de otras glucosidasas en la fecundación de este anfibio, y los residuos de azúcares involucrados, aún se desconocen.

## OBJETIVOS

En los animales, incluyendo a los equinodermos, anfibios y mamíferos, el reconocimiento y la interacción entre los gametos es un paso decisivo para garantizar una fecundación exitosa que lleve a la generación de un nuevo individuo. De esta manera, la caracterización de las moléculas involucradas en estas interacciones ha sido tema de estudio en numerosas especies animales. Como se desprende de la introducción, en muchos de ellos, abarcando desde el humano hasta las ascidias, fue encontrado que las glucosidasas, los carbohidratos y sus interacciones juegan roles esenciales durante la fecundación, no sólo en la interacción entre los gametos sino, además, en el pasaje del espermatozoide a través de las cubiertas del ovocito como en la prevención de la polispermia.

Las glucosidasas son encontradas en los gametos de casi todas las especies estudiadas. De este modo, la comunicación entre los gametos mediado por interacciones proteína-carbohidrato parece ser un mecanismo ampliamente distribuido en el reino animal. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en estas interacciones, como el rol que juegan las glucosidasas en cada uno de ellos, aún no son completamente conocidos en los vertebrados.

En este trabajo de tesis se planteó como objetivo general la identificación y el estudio de glucosidasas asociadas a la fecundación de los anfibios anuros *X. laevis* y *R. arenarum* como un prerequisite para ahondar en la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la fecundación de los vertebrados. Se pondrá especial énfasis en el estudio de la Hex puesto que trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio la vinculan potencialmente a la fecundación *R. arenarum*.

Se plantearon como objetivos particulares:

- Caracterizar estructural y funcionalmente la Hex de anfibios.
- Desarrollar anticuerpos específicos anti-Hex como paso previo a la caracterización inmunológica de la Hex de gametos de *X. laevis* y *R. arenarum*.

- Evaluar la presencia de la Hex y de otras glucosidasas en los gametos de estas especies y determinar su localización subcelular como un prerrequisito para vislumbrar su posible rol en la fecundación.
- Determinar la existencia de diferentes isoformas de la Hex en los gametos de Anfibio y si alguna de ellas está relacionada con la fecundación.
- Identificar glucosidasas de *R. arenarum* que participen en la fecundación y las etapas en la que estarían involucradas.

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a menos que de otro modo se diga. Los reactivos 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG) y 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida-6-sulfato (MUGS) fueron obtenidos de la empresa Calbiochem (San Diego, CA). Los adyuvantes de Freund completo e incompleto fueron adquiridos de Bio-Rad (Hercules, CA). La membrana de nitrocelulosa, los anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y las placas de rayos X fueron compradas en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). La resina de Glutation Sepharose<sup>TM</sup> 4 fast flow fue adquirida de Amersham Biosciences (Uspalla, Suecia). Los filtros de centrifuga Centricon YM-10 fueron comprados a Amicon (Bedford, MA). Los anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a Cy3 o Alexa Fluor<sup>R</sup> 488 se obtuvieron de Chemicon International (Temecula, CA). La 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona se adquirió en Santa Cruz Biotechnology.

### **Buffers y soluciones utilizadas**

- Buffer de fosfatos salino (PBS 1X): NaCl 137mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM; pH=7,4.
- Buffer Tris Salino (TBS 1X): Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH=7,5.
- Buffer TEN: (Tris-HCl 50 mM; NaCl 200 mM; EDTA 1 mM; pH=8,0.
- Solución de tripsina/EDTA (en PBS 1X): Tripsina 0,05% p/v; EDTA 1,25 mM.
- Solución Ringer: NaCl 110 mM; KCl 2 mM; CaCl<sub>2</sub>: 1,4 mM.
- Solución Ringer-Tris: solución Ringer, Tris-HCl 10 mM, pH=7,6.
- Solución Ringer 10%: solución Ringer diluida 10 veces en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> suplementada con Tris-HCl 10mM, pH=7,6.
- Solución de extracción de envolturas vitelinas: NaCl 110 mM; KCl 2 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

### **Medios de cultivo para células bacterianas**

Los cultivos de *E. coli* fueron crecidos en medio Luria Bertani (LB): peptona de caseína (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (10 g/l). Cuando el medio se necesitó en estado sólido fue adicionado agar al 1,5% p/v.

## **Animales**

Especímenes adultos de *R. arenarum* (~150g) fueron recolectados en las cercanías de las ciudades de Rosario y Laguna Paiva (Santa Fe, Argentina), entre los meses de marzo y noviembre. Los animales fueron mantenidos en condiciones saturadas de humedad a 16 °C hasta su uso. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la guía para el uso y mantenimiento de animales de laboratorio de la facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Trozos ovario de una hembra adulta de *X. laevis* fueron obtenidos siguiendo los protocolos aprobados por la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y gentilmente suministrados por el Dr. Francisco Romero.

Los ovocitos depuestos y cigotos de *X. laevis* fueron gentilmente suministrados por el Dr. Manuel Aybar (Departamento de Biología del Desarrollo - INSIBIO; Conicet-UNT).

## **HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS**

### **- Análisis, alineamientos de secuencias, y búsquedas por homología, en bases de datos de libre acceso**

Las búsquedas por homología en bases de datos de secuencias de libre acceso (GenBank, NIBB, etc.) fueron realizadas usando los programas tblastn y blastx. Los alineamientos de secuencias fueron realizados usando el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El análisis de las secuencias fue realizado usando los programas y herramientas ofrecidas en ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>). El análisis del índice antigénico y la traducción *in silico* de las secuencias de ADNc se realizaron con los programas Protean y EditSeq (DNASTar, Inc.).

El análisis de los dominios proteicos de la Hex de *X. laevis* AEJ87970 fue realizado en la base de datos Pfam 27.0 (<http://pfam.xfam.org/>). Los péptidos señal de anclaje al retículo endoplásmico rugoso fueron predichos con el programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

**- Obtención de cebadores para PCR**

Los cebadores utilizados para la secuenciación completa del ADNc XL250c11ex y las reacciones de PCR realizadas en esta tesis fueron diseñados con el programa Primer3Plus ([www.bioinformatics.nl/primer3plus](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus)).

**- Obtención de la secuencia completa del ADNc JN127371**

El marco de lectura abierto (ORF; del inglés **O**pen **R**eadin**G** **F**rame), codificado en el ADNc JN127371, fue obtenido de manera completa secuenciando el inserto del plásmido del clon XL250c11ex provisto por el Instituto Nacional de Biología Básica de Japón (NIBB) utilizando los cebadores mostrados en la siguiente tabla:

**Tabla III.** Cebadores utilizados para obtener la secuencia completa del ORF JN127371

Cebador	Posición	Secuencia 5' 3'	pb	Tm (°C)
SP6	vector pCS2p+ (o pcDNA3)	TATTTAGGTGACACTATAG	19	42,0
Directo	Interno al ADNc	GCTGGAGACTTTCAGTCAAC	20	53,4
Reverso	Interno al ADNc	AATTGGTTGGTTCAACTCTG	20	50,8
T7	vector pCS2p+ (o pcDNA3)	TAATACGACTCACTATAGGG	20	47,0

Las secuencias obtenidas en las reacciones de secuenciación fueron analizadas y solapadas con la ayuda de los programas BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>).

Para los análisis de identidad y similitud de residuos de aminoácidos realizados con la Hex AEJ87970 (ORF JN127371) se utilizaron las siguientes Hex de vertebrados caracterizadas: subunidad  $\beta$  de humano: UniProt ID: P07686; subunidad  $\alpha$  de humano UniProt ID: P06865; subunidad  $\beta$  de ratón: UniProt ID: P20060; subunidad  $\alpha$  de ratón: UniProt ID: P29416; subunidad  $\beta$  de rata: UniProt ID: Q6AXR4; subunidad  $\alpha$  de rata: UniProt ID: Q641X3; subunidad  $\beta$  de gato: UniProt ID: P49614; subunidad  $\beta$  de cerdo: UniProt ID: Q29548; subunidad  $\alpha$  bovina: UniProt ID: Q0V8R6.

**- Obtención del gen de la Hex de *X. tropicalis***

Las búsquedas de secuencias en el genoma de *X. tropicalis* (ensamble JGI4.2/xenTro3-noviembre de 2009) y los análisis genómicos fueron realizados

utilizando las herramientas bioinformáticas (Blat search genome, etc.) ofrecidas en UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/>).

## **TÉCNICAS APLICADAS A ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico**

Para la obtención de ADN plasmídico puro a partir de células bacterianas (*E. coli*) se utilizó el kit comercial Wizard plus Minipreps DNA Purification System (Promega, EEUU), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN plasmídico obtenido fue resuspendido en H<sub>2</sub>O estéril y conservado a -20 °C hasta su uso.

### **- Electroforesis en gel de agarosa**

La separación de las moléculas de ADN se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa. Los geles se prepararon en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40mM; EDTA 2 mM). La concentración de agarosa utilizada varió de 0,7% a 2% p/v según el tamaño de las moléculas de ADN a separar. Las muestras se sembraron mezclando previamente el ADN con el siguiente buffer de siembra 6X: Tris-HCl 10mM pH=7,6, glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,25% p/v; xileno cianol 0,25%, en proporción 6:1 (ADN/buffer). Las corridas electroforéticas se realizaron a 35-80 mA en buffer TAE 1X. Los geles fueron corridos con Bromuro de Etidio o GelGreen (Biotium, EEUU), según el caso, y visualizados empleando un transiluminador UVP M-20 (302 nm) o un transiluminador Safe Imager (Invitrogen, EEUU). Los geles fueron fotografiados con una cámara digital Olympus C-60 Zoom.

### **- Estimación de la concentración de ácidos nucleicos**

La cuantificación de ADN se realizó por medidas espectrofométricas a 260 nm y se calculó la concentración según el valor leído, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN doble hebra.

### **- Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa**

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado, las muestras de ADN provenientes de reacciones de PCR o cortes con enzimas de restricción fueron resueltas por electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente. La zona del gel conteniendo el fragmento de interés se extrajo por corte con bisturí estéril y el ADN se

purificó con el kit QiaexII Gel Extraction (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo desarrollado por el fabricante.

#### **- Digestión con enzimas de restricción**

Las condiciones de corte y buffers utilizados fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. En términos generales, se utilizó 1 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir. Los digeridos fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación con marcadores conocidos.

#### **- Ligado de moléculas de ADN**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando una relación 1:3 vector inserto, y se realizaron en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  usando 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Promega, EEUU), 2  $\mu\text{l}$  de buffer específico para la enzima y las cantidades necesarias de inserto y vector requerido en cada caso. La reacción se incubó 1 h a 22 °C y luego 16 h a 4 °C.

#### **- Reacción de la polimerasa en cadena**

Para las reacciones de amplificación se utilizaron los termocicladores Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania) y Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, EEUU). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 o 50  $\mu\text{l}$  conteniendo buffer comercial 1X suplementado con la cantidad óptima de  $\text{MgCl}_2$  requerida para cada reacción (en general la concentración utilizada fue de 2,5 mM); 0,1 mM de cada uno de los dNTP, 20 pmol de cada cebador utilizado y 1U de ADN polimerasa Taq (en general Invitrogen, EEUU o Fermentas, EEUU). Los perfiles térmicos aplicados para las distintas reacciones realizadas variaron según el ADN molde y el par de cebadores utilizado.

### **TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. COLI***

#### **- Inducción del estado de competencia y transformación con plásmidos**

Las células a transformar fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio LB, se diluyeron 1/100 en el mismo medio y se cultivaron hasta llegar a fase exponencial, evaluada por medida de  $\text{Abs}_{600\text{nm}}$  hasta alcanzar una  $\text{DO} \sim 0,4$ . El cultivo posteriormente

se fraccionó (1 ml de cultivo por reacción de transformación) y las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 3.000 rpm. a 4 °C usando una centrífuga Universal 32R (Hettich-zentrifugen, Alemania). Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 1,5 ml de CaCl<sub>2</sub> frío (0,1 M) y las células se centrifugaron nuevamente 5 min a 3.000 rpm a 4 °C. Las células se resuspendieron otra vez en solución de CaCl<sub>2</sub> fría (100 µl), se añadió una cantidad adecuada de la mezcla de ligación o plásmido de interés y se incubaron por 1 h en hielo. Posteriormente, las células se sometieron a tratamiento térmico a 42 °C por 90 segundos y fueron nuevamente incubadas en hielo por 2 min. Finalmente, se les agregó 0,90 ml de medio LB fresco y se incubaron 1h a 37 °C. Alícuotas de 100 µl de cada cultivo transformado fueron sembradas en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico selector correspondiente en la concentración adecuada (en general ampicilina). En los casos que fue necesario chequear el plásmido clonado, éste fue secuenciado por el servicio de la Universidad de Maine (DNA Sequencing Facility at University of Maine).

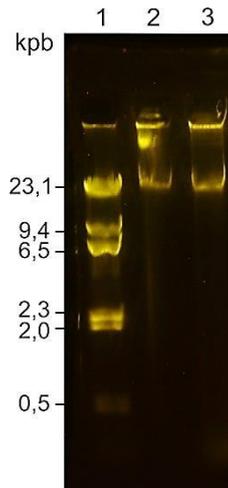
## **SOUTHERN BLOT**

### **- Obtención de ADN genómico de *X. laevis***

Para la obtención de ADNg de *X. laevis* se utilizó una hembra adulta de *X. laevis*. El animal fue sacrificado por exposición a benzocaína por 10 min (250 mg/l) siguiendo los protocolos aprobados por la facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR).

ADNg de alta calidad fue obtenido como se describe en Sambrook y Russell (2001) a partir de 1 gramo de músculo de *X. laevis*. Brevemente, el tejido fue congelado en N<sub>2</sub> (l) y homogeneizado en mortero hasta obtener un fino polvo. Seguidamente, el polvo fue disuelto e incubado por 1 h a 37 °C con 10ml de buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH=8,0; SDS 0,5%; EDTA 0,1M y ARNasa pancreática 20µg/ml). El lisado fue luego incubado con proteasa K (10 µg/ml) por 16 h a 50 °C. Finalmente, el digerido fue enfriado a temperatura ambiente y el ADNg fue extraído y purificado por tratamiento con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de precipitación con etanol en presencia de acetato de sodio 2M.

La integridad del ADNg obtenido fue determinada en gel de agarosa, y por comparación con ADNg comercial de ratón (Promega) (fig. 10).



**Figura 10. Obtención de ADNg de *X. laevis*.** La integridad del ADNg se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% p/v teñido con SYBR green. Calle 1: Marcador de tamaño molecular (ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII*). Calle 2: ADNg comercial de ratón. Calle 3: ADNg de *X. laevis*.

#### - Obtención de la membrana de hibridación

El ADNg de *X. laevis* fue digerido en forma separada con las enzimas de restricción *AvaII*, *BstXI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* y *PstI*. Para ello se utilizaron las composiciones de las mezclas de reacción, buffers y temperaturas recomendados por los fabricantes de las enzimas. La concentración de ADNg utilizada en las mezclas de reacción fue 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se utilizaron 5U de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADNg a digerir y un volumen de reacción equivalente a 20  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  ADNg. Las digestiones se realizaron por 16h. El ADNg digerido se resolvió en gel de agarosa al 0,7% p/v (18h a 20 mA). Luego de la corrida electroforética los fragmentos de ADNg generados fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup> (Amersham) como se describe en Sambrook y Russell (2001). Brevemente, luego de la corrida electroforética el gel fue incubado en una solución conteniendo NaOH 0,5 N y 1,5 M NaCl por 45 min. Posteriormente, el gel fue lavado 2 veces (30 min y 15 min) con una solución conteniendo Tris-Cl 1M y NaCl 1,5M; pH=7,4. Todas las incubaciones y lavados fueron realizados con agitación constante. La membrana fue previamente hidratada en H<sub>2</sub>O estéril y luego enjuagada por 5 min en buffer SSC 20X; el cual fue también utilizado para realizar la transferencia capilar. Luego de la transferencia (24 h) la membrana fue lavada en buffer SSC 6X y los fragmentos de ADNg transferidos fueron unidos covalentemente a la membrana por horneado a 80 °C durante 2 horas.

Como controles de especificidad se digirió 10  $\mu\text{g}$  de ADNg bacteriano (*Serratia marcescens*) con la enzima de restricción *BamHI* (control negativo de hibridación); y se

linealizó una cantidad equivalente en número a la cantidad esperada de fragmentos conteniendo el gen de la *Hex* (considerando 1 copia del gen por genoma haploide de *X. laevis*) de un plásmido (pCS2p+: 4,10 kpb) conteniendo el ADNc JN127371 (1,7 kpb) (control de hibridación y de sensibilidad).

#### **- Obtención de la sonda de hibridación**

La sonda radioactiva ( $1 \times 10^4$  cpm/ml) utilizada en el experimento de Southern blot (fig. 25; capítulo III) fue marcada con  $^{32}\text{P}$  mediante el kit Random primers DNA labeling system kit (Life technologies) según el protocolo suministrado por el fabricante. Como ADN molde se utilizó un fragmento de ADN (252 pb) correspondiente al primer exón del gen de la *Hex* de *Xenopus* caracterizado, que fue amplificado por PCR desde el ADNc JN127371 con los cebadores 5'CGAGTCGCTGTCCTAGGGAT y 5'GCATCCTGCAGCATCACACA.

#### **- Hibridación, lavado de la membrana y detección de bandas**

La membrana fue hibridada con la sonda anteriormente descrita por 16 h a 65°C. Posteriormente, la membrana fue lavada a 60 °C con buffer SSC 2X conteniendo SDS 0,1% p/v y luego a 65 °C en buffer SSC 0,1X conteniendo SDS 0,1% p/v. Finalmente, la membrana fue secada y las bandas de hibridación fueron evidenciadas con un escáner Storm<sup>TM</sup> 840 (Amersham Biosciences).

### **EXPRESIÓN TRANSCIENTE DE LA HEX DE *X. LAEVIS* AEJ87970 EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO**

#### **- Adecuación del ORF JN127371 para su expresión en células eucariotas**

El ORF contenido en el ADNc JN127371 fue acondicionado para su expresión en células eucariotas a través de su amplificación por PCR utilizando los cebadores directo y reverso mostrados a continuación:

**Directo:** 5' TGAATCGATAGATCTAAGCTTGCCACCATGGGCTCTGCGGCGAGT  
*Clal BglIII HindIII Kozak*

**Reverso:** 5' TGTTCTAGACCCGGGTGGTGC AAGAATTGCAGTGT  
*XbaI SmaI*

**Figura 11. Cebadores directo y reverso diseñados para adecuar el ORF JN127371 para su expresión en células eucariotas.** En cursiva se muestran las secuencias de restricción adicionadas en cada uno de los cebadores. Por debajo se indican las enzimas de restricción que las reconocen. La secuencia sombreada en gris en el cebador directo señala la secuencia Kozak que introduce el codón ATG (en negrita) en el sitio y contexto adecuado para señalar el comienzo de la traducción. El resto de las secuencias hacia los extremos 3' de ambos cebadores describen las secuencias de anillamiento con el ADNc JN127371.

La temperatura de anillamiento utilizada para la reacción de PCR fue 65 °C. El fragmento resultante (ORF JN127371Met; fig. 27, capítulo. III) fue aislado del gel de agarosa, purificado y ligado en el vector pGEM-T Easy según los procedimientos detallados en el apartado técnicas aplicadas para ácidos nucleicos. El plásmido resultante (pGEM-Hex) fue clonado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  siguiendo el protocolo descrito en el apartado Transformación de células de *E. coli*. El plásmido pGEM-Hex fue obtenido en forma pura desde los cultivos bacterianos transformados (sección aislamiento y purificación de ADN plasmídico) y utilizado para subclonar el ORF JN127371Met en el plásmido de expresión para células eucariotas pcDNA3 (Invitrogen). Para ello se utilizaron las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*. El vector resultante pcDNA3-Hex fue clonado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y obtenido en forma pura según los protocolos descritos anteriormente para el plásmido pGEM-Hex.

#### - Transfección de las células por el método de lipofectamina

Esta técnica permite la transferencia de material genético a células animales en cultivo. Para los experimentos de transfección se utilizó la línea celular k1 de células de ovario de hámster chino (CHO-k1). Las células se crecieron en el medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por placa de 35 mm de manera de alcanzar una confluencia de ~70%. Las células se cultivaron en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>) a 37 °C durante aproximadamente 24h previo a realizar la transfección. Se preparó una solución conteniendo 0,75  $\mu$ g de ADN plásmido (pcDNA3-Hex o pHR-GFP) en 50  $\mu$ l de medio Opti-MEM sin suero (Invitrogen, EEUU), sobre la cual se agregó una segunda mezcla conteniendo 2 $\mu$ l de Lipofectamine<sup>R</sup> 2000 (Invitrogen, EEUU) en 50  $\mu$ l de medio opti-MEM sin suero. La mezcla resultante se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla obtenida se

agregó a las células a las que se les había agregado medio fresco. Se incubó durante 6 horas, tras lo cual se agregó medio fresco. Las células se incubaron 48 h en estufa gaseada a 37 °C.

#### **- Obtención de los extractos celulares totales**

Las células fueron colectadas mediante la adición de tripsina (100 µg/ml) en buffer PBS 1X seguido de centrifugación a 4.000 rpm por 15 min (4 °C). La obtención de los extractos celulares totales fue realizada mediante 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento según se describe en Sinici y col. (2006). Brevemente, los pellet celulares fueron congelados a -70° C y luego resuspendidos en 200 µl de buffer fosfato de sodio 10 mM (pH=6,0) conteniendo 5% de glicerol y un coctel de inhibidores de proteasa (Sigma) mediante pipeteo suave y ciclos de agitación en vórtex.

### **TECNICAS APLICADAS A PROTEÍNAS**

#### **- Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Sedmak y Grossberg (Sedmak y Grossberg, 1977). Se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) como patrón proteico para realizar una curva de calibración. Brevemente, volúmenes apropiados de la muestra proteica o ASB se mezclaron con 500 µl de reactivo de Sedmak y Grossberg 0,06% (Coomasie Blue G250 0,06% p/v en ácido perclórico 3% p/v) y la mezcla se incubó durante 5 min. Posteriormente se midió la absorbancia (Abs) a 620nm y 465nm, y el cociente Abs620nm/Abs465nm fue relacionado a la cantidad de proteína en µg.

Alternativamente, la concentración de proteínas se determinó con el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### **- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Las muestras proteicas fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Se utilizaron minigeles verticales del sistema MiniProtean III (BioRad, CA, USA) de 0,75 ó 1 mm de espesor. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según Laemmli (1970). Antes de la siembra las muestras fueron desnaturalizadas por calor (100 °C) durante 5 min en buffer de siembra 1X (Tris-HCl 100mM, pH=6,8; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,002% p/v). Cuando la electroforesis se realizó

en condiciones reductoras se adicionó 2-mercaptoetanol al 5% v/v a la mezcla proteica previo a su tratamiento térmico. La concentración de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 fue de 5% p/v para el gel de concentración y de 10-15% p/v para el gel de separación dependiendo de la mezcla proteica a separar. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en buffer de corrida 1X (Tris 25 mM pH=8,4; Glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v) a temperatura ambiente y una corriente constante de 20 mA.

Los geles de SDS-PAGE preparativos fueron preparados como se describió anteriormente excepto que se colocó un peine de siembra con un solo diente abarcando casi la totalidad del ancho del gel. Este pocillo permitió la siembra de aproximadamente 0,8 ml de muestra.

#### **- Detección de proteínas en gel de poliacrilamida**

Una vez finalizadas las corridas electroforéticas, las proteínas fueron fijadas y teñidas por incubación del gel en una solución de ácido acético/etanol/agua 10:40:50 conteniendo Coomassie Blue R-250 al 0,025% p/v. Luego de la tinción, el gel fue decolorado hasta la aparición de las bandas proteicas con una solución de ácido acético/etanol/agua 10:40:50.

#### **- Experimentos de Western blot**

Las proteínas separadas por SDS/PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Life Sciences, CA, USA) según el procedimiento descrito por Towbin y col., (1979). Los geles fueron previamente equilibrados con solución de transferencia (metanol 20%, glicina 192 mM, Tris 25 mM) durante 10 minutos, y luego transferidos con intensidad de corriente constante de 150 mA durante una hora a 4°C. Alternativamente la transferencia se realizó por 16 h a 25mA a 4 °C. Luego de la transferencia la membrana fue enjuagada con agua destilada y preincubada durante 1 hora en buffer de bloqueo: PBS 1X suplementado con 5% p/v de leche descremada y Tween 20 al 0,05% v/v. Para la incubación con los antisueros primarios (en general 1h a temperatura ambiente o alternativamente 16 h a 4 °C) se aplicaron los siguientes protocolos:

- antisuero  $\alpha$ -GST/Hex con mezclas de proteínas provenientes de ovocitos de *X. laevis*, o de los extractos celulares totales de células CHO transfectadas con pcDNA3-Hex: dilución 1/2000 en buffer de bloqueo.

- antisuero  $\alpha$ -GST/Hex con mezclas de proteínas provenientes de ovocitos de *R. arenarum*: dilución 1/1000 en buffer de bloqueo.
- Suero preinmune: dilución en buffer de bloqueo en la misma proporción que la utilizada para el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex en el experimento correspondiente.
- anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados: dilución 1/20 en PBS 1X o buffer de bloqueo según corresponda.
- anticuerpos  $\alpha$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, CA): dilución 1/5000 en buffer TBS 1X suplementado con Tween 20 al 0,05%.

Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces en buffer de bloqueo e incubada con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa de rabanito (Amersham, dilución 1/5000 en buffer de bloqueo o PBS 1X) por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana fue lavada con PBS 1X y se reveló utilizando el reactivo para quimioluminiscencia SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se realizó la exposición de las membranas en placas radiográficas de baja (Kodak) o alta sensibilidad (Amersham) según la intensidad de la señal quimioluminiscente.

Cuando fue necesario inmunodetectar actina como control de carga de siembra de los ensayos de Western blot las membranas fueron reutilizadas previo lavado con 0,2 N NaOH durante 5 min (“striping”).

#### **- Electroforesis de proteínas en condiciones nativas**

Los geles nativos fueron preparados con una concentración de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 del 5% p/v para el gel de concentración y del 8% p/v para el gel separación. En ningún caso se adicionó SDS. Las muestras proteicas fueron preparadas para la siembra por mezcla con buffer de siembra nativo 1X (Tris-HCl 100mM, pH=6,8; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,002% p/v) sin someterlas a desnaturalización térmica. La corrida electroforética fue realizada en buffer de corrida nativo 1X (Tris 25 mM pH=8,4; Glicina 192 mM) con una corriente constante de 8 mA a 4 °C.

### **- Elución de proteínas a partir de geles nativos**

Las bandas proteicas con actividad Hex en los geles nativos fueron detectadas como se describe en *Medidas de actividad Hex total o Hex A/S en gel nativo* (página 49). Las bandas fueron extraídas del gel mediante corte con un bisturí estéril. Las proteínas contenidas en ellas fueron eluidas por incubación de los fragmentos del gel en 10 volúmenes de buffer de extracción de EV diluido al décimo suplementado con coctel de inhibidores de proteasas durante 16 h a 4 °C con agitación constante. El eluido obtenido fue posteriormente concentrado por ultrafiltración en tubos Centricon YM10 y guardado a -20 °C hasta su uso.

### **OBTENCIÓN DEL ANTISUERO $\alpha$ -GST/HEX**

#### **- Obtención y purificación de la proteína GST/Hex a partir de cultivos de células de *E. coli* transformadas con el vector pGEX-Hex**

Un fragmento del ADNc JN127371 (~761 pb) previamente clonado en el vector pRSET-C (Invitrogen) fue subclonado en el plásmido pGEX-3X (GE Healthcare), como fusión a la proteína glutatión S-transferasa (GST), utilizando las enzimas de restricción BamHI (perteneciente al sitio de múltiple clonado) y EcoRI (interno a JN127371) y células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Las colonias transformantes fueron seleccionadas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Para obtener GST/Hex en cantidad una colonia transformante fue inoculada en 200 ml de medio LB líquido conteniendo ampicilina. El cultivo bacteriano fue crecido a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de ~0,6. La inducción de la expresión de la proteína de fusión fue realizada mediante la adición de 0,1 mM IPTG. El cultivo fue posteriormente mantenido a 25 °C por 90 min con agitación constante y las células fueron luego colectadas por centrifugación a 5.000 r.p.m por 15 min a 4 °C. El pellet celular fue resuspendido en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, DTT 5mM; Tritón X-100 0,5% v/v; pH=8,0) y posteriormente sonicado sobre hielo en un sonicador Branson Sonifier 250 ultrasonic cell disruptor para provocar la ruptura celular (5 ciclos de 20 segundos de sonicado a 40% de amplitud interrumpidos por descansos de 60 segundos). El lisado fue centrifugado a 20.000g por 30 min (4 °C) y la proteína GST/Hex fue purificada en batch desde el sobrenadante (fracción celular soluble) con resina de glutatión Sepharose<sup>TM</sup> siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, la fracción soluble del lisado celular fue incubada por 1 h con una cantidad

adecuada de resina de glutatión Sepharose a 4 °C manteniendo agitación suave y constante. Luego la resina fue lavada con buffer TEN (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH=8,0) y la proteína GST/Hex fue eluida por incubación de la resina con un volumen adecuado de buffer TEN suplementado con glutatión reducido 10 mM.

#### **- Electroelución de GST/Hex pura**

La proteína GST/Hex purificada con resina de glutatión Sepharose fue sometida a SDS-PAGE preparativo (12% p/v) para su purificación a homogeneidad. Luego de la corrida electroforética GST/Hex fue evidenciada sin fijación previa por incubación por 20 min a temperatura ambiente con una solución conteniendo Coomassie Blue R-250 0,25% p/v y metanol al 10% p/v. La fracción del gel conteniendo a la proteína GST/Hex fue cortada con un bisturí estéril y electroeluida en un electroelutor modelo 422 (Bio Rad) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La proteína electroeluida (GST/Hex pura) fue guardada a -20 °C hasta su uso.

#### **- Obtención de anticuerpos policlonales $\alpha$ -GST/Hex**

Para obtener anticuerpos policlonales específicos anti-Hex se desarrolló un protocolo de inoculación de la proteína GST/Hex en conejo. Para ello 100  $\mu$ g de la proteína electroeluida fue emulsionada con adyuvante completo de Freund e inoculada en un conejo. Luego, a las 3, 8 y 14 semanas 50  $\mu$ g de proteína electroeluida emulsionada con adyuvante incompleto de Freund fue reinyectada cada vez en el mismo conejo. A los 10 días posteriores a cada inoculación se colectó sangre del conejo inmunizado. La sangre fue coagulada por incubación a 37 °C por 1 h y el coágulo fue retirado por centrifugación a 2.500 rpm. El suero sanguíneo conteniendo los anticuerpos anti-Hex (denominado antisuero  $\alpha$ -GST/Hex) fue guardado a -20 °C hasta su uso. El suero preinmune fue obtenido de igual modo previo a la inoculación del conejo con la proteína GST/Hex y fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

Como un control se obtuvo un antisuero  $\alpha$ -GST siguiendo el protocolo de inoculación anteriormente descrito pero inoculando un conejo distinto con la proteína GST pura.

Para obtener anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados, la proteína GST fue previamente transferida a una membrana de nitrocelulosa mediante SDS-PAGE y electrotransferencia. La membrana fue bloqueada con PBS 1X suplementado con leche

descremada al 5% p/v e incubada con el antisuero  $\alpha$ -GST. Luego de realizar lavados con PBS 1X, los anticuerpos  $\alpha$ -GST fueron eluidos desde los inmunocomplejos por exposición de la membrana a una solución conteniendo NaCl 100 mM y glicina 100 mM y pH=3,0. El eluido conteniendo los anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados fue rápidamente neutralizado con Tris-HCl 1M pH=8,0 y guardado a -20 °C hasta su uso.

## **MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

### **- Medición espectrofotométrica de la actividad de distintas glucosidasas**

Las actividades enzimáticas de las glucosidasas evaluadas en esta tesis fueron medidas usando como sustrato los p-nitrofenil glucósidos correspondientes a cada una de ellas. El medio de reacción contenía una concentración final de p-nitrofenil glucósido de 3 mM y buffer citrato 10 mM pH=3,6; a menos que otro pH sea especificado. La reacción fue iniciada por el agregado de la enzima, incubada por 30 min a 37 °C y finalizada por la adición de 2 volúmenes de solución de Glicina 0,2 M a pH=10,4. Las actividades enzimáticas fueron lineales durante el tiempo de reacción implementado. El p-nitrofenol liberado fue medido espectrofotométricamente a través de su absorbancia a 400nm. Para cada reacción se descontó la  $Abs_{400nm}$  proveniente del control realizado sin la adición de enzima.

Se definió una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por hora en las condiciones especificadas.

### **- Medidas de actividad Hex total o Hex A/S en gel nativo**

La actividad Hex total o Hex de tipo A y/o S en los geles de poliacrilamida nativos fue medida con los sustratos 4-metilumbelliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG) o 4-metilumbelliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida-6-sulfato (MUGS), respectivamente. Luego de la corrida electroforética el gel fue equilibrado a pH=4,0 con una solución amortiguadora de citrato/ácido cítrico 400 mM de ese pH, e incubado a temperatura ambiente con los sustratos MUG o MUGS a concentración 1 mM disueltos en el mismo buffer por 15 min. Las bandas con la actividad Hex fueron visualizadas con transiluminador UVP M-20 a 302 nm.

**- Ensayos continuos de actividad Hex total o Hex A/S**

Las medidas continuas de actividad Hex total o Hex A/S fueron realizadas en un espectrofluorómetro Cary Eclipse (Variant; Australia) termostatzado con los sustratos MUG o MUGS. La concentración final de sustrato fue 1 mM. La reacción fue cursada a 37 °C en buffer citrato/fosfato 10 mM, pH=5,0. La actividad Hex fue inferida midiendo la fluorescencia emitida desde la metil-umbeliferona liberada (excitación: 345nm; emisión: 450 nm) desde el sustrato correspondiente.

**- Ensayos de actividad Hex total o Hex A/S discontinuos**

La actividad Hex total o Hex A/S fue determinada con los sustratos MUG o MUGS. La reacción fue iniciada mediante el agregado de enzima en medio buffer citrato/ácido cítrico 10 mM, pH=3,6 conteniendo el sustrato MUG o MUGS a concentración final 1 mM. Luego 45 min de incubación a 37 °C la reacción fue finalizada por el agregado de 2 volúmenes de solución de glicina 0,2 M, pH=10,4. La actividad Hex total o Hex A/S fue inferida midiendo la fluorescencia proveniente desde la metil-umbeliferona liberada ( $\lambda_{ex}$ : 345nm;  $\lambda_{em}$ : 450 nm) desde el sustrato correspondiente en un espectrofluorómetro Varinat Cary Eclipse.

**TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA**

**- Experimentos de inmunohistoquímica en cortes de ovocitos de *X. laevis* y *R. arenarum***

Ovocitos de ovisaco de *R. arenarum* desprovistos de su cubierta gelatinosa, u ovocitos depuestos de *X. laevis* desprovistos de su cubierta gelatinosa, u ovocitos recientemente fecundados de *X. laevis* desprovistos de su cubierta gelatinosa (cigotos), o secciones de ovario de *X. laevis*, según corresponda, fueron lavadas/os en PBS 1X y fijadas/os en paraformaldheído (4% p/v) por 4 h. Posteriormente fueron embebidos en parafina y cortados en secciones de 5  $\mu$ m de espesor que fueron coladas sobre portaobjetos. Para realizar las inmunodetecciones los cortes fueron hidratados y permeabilizados con Tritón X-100 al 0,5% v/v en TBS 1X por 30 min. Se realizaron lavados en TBS 1X y los cortes fueron bloqueados con una solución de albúmina sérica bovina al 5% p/v en TBS 1X suplementado con Tween 20 0,02% v/v y suero de carnero por 60 min. Seguidamente, los cortes fueron incubados con una dilución del antisuero primario en solución de bloqueo ( $\alpha$ -GST/Hex 1/200, suero preinmune 1/200 o

anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados 1/50) por al menos 60 min. Los anticuerpos no adheridos fueron lavados con TBS 1X y los cortes fueron incubados con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a Cy3 o Alexa fluor 488 (dilución 1/5000) según corresponda. Finalmente se realizaron lavados con TBS 1X y los cortes se montaron con solución DABCO (Sigma).

#### - **Detección de gránulos corticales con la lectina de *Dolichos biflorus***

Las detecciones con la lectina de *Dolichos biflorus* conjugada a FITC se realizaron incubando los cortes bloqueados de ovario de *X. laevis* con la lectina (20  $\mu$ g/ml) en buffer TBS 1X suplementado con  $\text{CaCl}_2$  1mM y  $\text{MgCl}_2$  1mM por 60 min. Como control los cortes bloqueados fueron incubados con la lectina previamente tratada con N-acetil-D-galactosamina 0,2 M en el mismo buffer. Luego de la incubación con la lectina, o la lectina prebloqueada con su azúcar hapteno, los cortes se lavaron en buffer TBS 1X suplementado con los mismos cationes y se montaron.

Todos los experimentos fueron examinados por microscopía de campo claro y de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BH2 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1. En el caso de los cortes de ovocitos depuestos de *R. arenarum* se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E800 acoplado a una cámara Andor Clara.

### **OBTENCIÓN DE GAMETOS DE *R. ARENARUM***

#### - **Obtención de espermatozoides vivos**

Las suspensiones de espermatozoides fueron preparadas por dilaceración testicular como fuera previamente informado (Valz-Gianinet y col., 1991). Brevemente, testículos extirpados de un macho adulto de *R. arenarum*, previamente sacrificado por destrucción medular, fueron dilacerados en solución Ringer-Tris en una placa de Petri sobre hielo. Se verificó la motilidad de los espermatozoides bajo microscopio diluyendo una alícuota de la suspensión diez veces en agua destilada. La suspensión original se centrifugó a 130 g durante 10 min a 4 °C para descartar glóbulos rojos y restos tisulares. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 650 g durante 10 min a 4 °C y el sedimento, conteniendo los espermatozoides, se resuspendió en Ringer-Tris frío hasta concentración final de  $1 \times 10^8$ - $1,4 \times 10^8$  células/ml. La suspensión se conservó en hielo por un período máximo de hasta 4 h. La estructura del

espermatozoide no se modifica luego de 4 h de incubación en Ringer-Tris (Diaz Fontdevila y col., 1988).

#### **- Obtención de fracciones subcelulares espermáticas**

Para obtener las distintas fracciones espermáticas primero se provocó la ruptura del acrosoma de los espermatozoides por shock hipotónico (Raisman y col., 1980). Para ello los espermatozoides fueron liofilizados y luego resuspendidos en solución Ringer 10% suplementada con EDTA 5mM y coctel de inhibidores de proteasas. Luego de incubar 30 min sobre hielo, la suspensión fue centrifugada a 650 g por 10 min a 4 °C para separar el sedimento, conteniendo los espermatozoides reaccionados, del contenido acrosomal soluble y las fracciones de membrana liberadas desde la cabeza del espermatozoide (sobrenadante). Las fracciones membranosas proveniente de la cabeza de los espermatozoides (membrana plasmática apical y membrana acrosomal externa) fueron luego separadas del contenido acrosomal soluble sedimentándolas por ultracentrifugación a 100.000g durante 1 h a 4 °C (Martinez y col., 2000).

Para obtener las proteínas contenidas en las membranas de los espermatozoides reaccionados (membrana plasmática y/o acrosomal interna) y en la fracción membranosas proveniente de la cabeza de los espermatozoides (membrana plasmática apical y membrana acrosomal externa) los espermatozoides reaccionados y el sedimento de las fracciones membranosas provenientes de la cabeza del espermatozoide fueron exhaustivamente lavados en solución Ringer 10% suplementada con EDTA 5 mM y coctel de inhibidores de proteasas; y luego incubadas con un buffer conteniendo NaCl y Tritón X-100 (Tris-HCl 20mM, NaCl 0,4M; Glicerol 15%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Tritón X-100 1,5%, pH=7,6) durante 1 h sobre hielo con agitación suave y constante. Las extracciones fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min a 4 °C y los sobrenadantes conteniendo las proteínas extraídas de las membranas correspondientes fueron almacenados a -20 °C hasta su uso; al igual que el contenido acrosomal soluble.

#### **- Obtención de extracto crudo de espermatozoides**

Los espermatozoides fueron obtenidos por dilaceración testicular como se indicó anteriormente. Luego de la centrifugación a 650 g por 10 min (4 °C) en solución Ringer-Tris el sobrenadante fue descartado y el pellet con los espermatozoides sedimentados fue liofilizado. Los espermatozoides liofilizados fueron luego resuspendidos en el buffer utilizado para extraer las proteínas de las membranas de los

espermatozoides reaccionados y de la fracción de membrana provenientes de la cabeza de los espermatozoides (Tris-HCl 20mM, NaCl 0,4M; Glicerol 15%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Tritón X-100 1,5%, pH=7,6). La suspensión fue incubada sobre hielo con agitación suave y constante por 1 h, período durante el cual fue agitada cada 10 min con 10 segundos de vórtex. Finalmente, la suspensión fue centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante (extracto crudo de espermatozoides) fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

#### **- Obtención de ovocitos**

Especímenes hembra fueron mantenidos a 20-22°C en condiciones adecuadas de humedad durante 2 días antes de la estimulación por inyección del homogenado de una hipófisis homóloga en el saco linfático dorsal (Houssay y col., 1929). Luego de 10-12 horas los animales fueron sacrificados por destrucción medular y los ovocitos recogidos de ambos ovisacos (Barisone y col., 2002).

#### **- Obtención de los factores difusibles de la cubierta gelatinosa (EW)**

Los factores difusibles de la cubierta gelatinosa fueron obtenidos como se describió previamente (Diaz Fontdevila y col., 1991). Brevemente, las tiras de ovocitos obtenidas de ovisacos se incubaron tres veces, durante 20 minutos cada vez, con agua destilada (peso equivalente de agua y ovocitos), con agitación ocasional a 20-22 °C. Las fracciones conteniendo los factores que difundieron al agua fueron juntadas y guardadas a -20 °C (llamado EW: del inglés **Egg Water**). La concentración de proteínas en EW fue aproximadamente de 0.3 mg/ml (Arranz y Cabada, 2000).

#### **- Obtención de ovocitos sin cubierta gelatinosa**

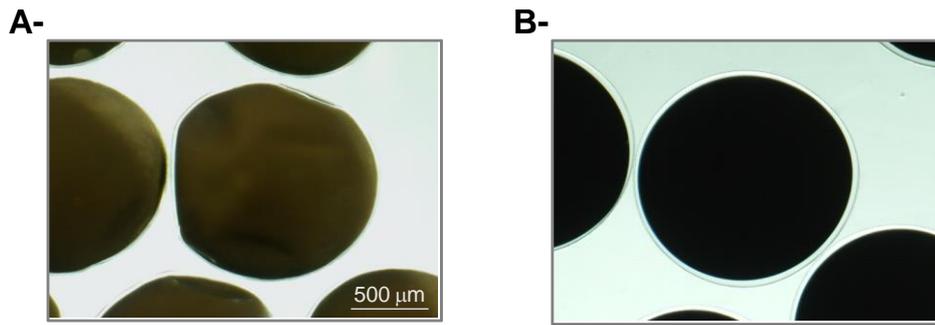
La tiras de ovocitos fueron desprovistas de la cubierta gelatinosa mediante tratamiento químico con un agente reductor (Barisone y col., 2003). En resumen, luego de las incubaciones para la obtención de EW (ver Obtención de los factores difusibles de la cubierta gelatinosa), las tiras de ovocitos fueron incubadas con agitación ocasional en solución Ringer-Tris pH 8 conteniendo 2-mercaptoetanol 0,26% v/v hasta disolución de la cubierta gelatinosa. Las células fueron luego lavadas exhaustivamente en solución de extracción de EV.

### **- Obtención de extracto crudo de ovocitos**

Los ovocitos de *R. arenarum* o *X. laevis*, según corresponda, desprovistos de su cubierta gelatinosa fueron homogeneizados sobre hielo en Potter-Elvehjem (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) en solución fría de extracción de EV 2X suplementada en el momento con PMSF 1 mM y DTT 0,050 mM. Se agregó 1 ml de esta solución por cada mililitro de ovocitos procesados. El extracto crudo de ovocitos (sobrenadante) fue obtenido luego de la centrifugación del homogenado a 10.000 rpm por 1 h a 4 °C con la finalidad de eliminar por sedimentación los gránulos de pigmento, EVs, y material no roto.

### **- Obtención de producto de gránulos corticales**

El producto de gránulos corticales (PGC) fue obtenido desde ovocitos desprovistos de su cubierta gelatinosa como se describió en Barisone y col. (2003). Brevemente, la activación de los ovocitos fue inducida por incubación durante 30 min con 2 volúmenes de solución Ringer-Tris suplementada con ionóforo de calcio A-23187 (Sigma) 1  $\mu$ M en agitación suave. Este reactivo facilita el ingreso de  $\text{Ca}^{++}$  al interior del ovocito gatillando, entre un conjunto de eventos conocidos como “activación” del ovocito, la reacción cortical. Una vez ocurrida, la reacción cortical libera el contenido de los gránulos corticales al espacio periplásmico, desde donde difunde a través de la EV al medio circundante. La activación de los ovocitos fue verificada con la ayuda de una lupa estereoscópica siguiendo el cambio consecuente que ocurre en su forma (fig. 12). Los ovocitos activados fueron luego decantados por gravedad y el sobrenadante conteniendo el exudado de los gránulos corticales fue colectado, centrifugado (40.000g; 30min; 4 °C) y finalmente concentrado por ultrafiltración en tubos Centricon YM-10. El concentrado fue denominado PGC y fue almacenado a -20 °C hasta su uso.



**Figura 12. Activación de ovocitos de *R. arenarum* con ionóforo de calcio.** **A-** Ovocitos maduros inactivos de *R. arenarum* desprovistos de su cubierta gelatinosa. En la fotografía se observa su aspecto abollado. **B-** Los ovocitos luego de media hora de incubación en buffer Ringer-Tris suplementado con ionóforo de calcio 1 μM. Se observa el aspecto redondeado y con la EV engrosada característico de los ovocitos activados. Las imágenes fueron tomadas con una lupa estereoscópica Olympus MVX10.

### - Obtención de envolturas vitelinas aisladas

La EV aislada para los ensayos de unión de espermatozoides fue obtenida a partir de ovocitos desprovistos de cubierta gelatinosa. Los mismos fueron lavados exhaustivamente en solución de lavado de EV a 4 °C y homogeneizados en Potter-Elvehjem (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) en la misma solución. Las envolturas se aislaron por filtración del homogenado a través de una malla metálica de doble hoja (poro de 30 μm) y fueron extensivamente lavadas con la solución antes indicada (Valz-Gianinet y col., 1991). Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C. Las EV aisladas fueron almacenadas a -20 °C en solución de extracción de EV conteniendo glicerol al 50% v/v.

## ENSAYOS BIOLÓGICOS

### - Experimentos de fecundación *in vitro*

Las fecundaciones *in vitro* fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente (20-25°C) con ovocitos libres de cubierta gelatinosa (~50 ovocitos por réplica). Las inseminaciones fueron realizadas con  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml en medio Ringer 10%. El medio de fecundación fue suplementado con EW 50% y el reactivo a evaluar (2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona, D-manosa o L-fucosa) en la concentración deseada. Luego de adicionados los espermatozoides se dejaron transcurrir 20 min y los ovocitos/embriones fueron transferidos a medio fresco Ringer 10%. El porcentaje de ovocitos fecundados fue determinado contando bajo lupa estereoscópica (Olympus SZH) el número de embriones en estadios de dos o cuatro células y por comparación con el experimento control (realizado en Ringer 10% y EW 50%). Los

análisis estadísticos utilizados para comparar los tratamientos, la significancia ( $p$ ) y el número de repeticiones realizadas fueron incluidos en las leyendas de las figuras.

#### **- Ensayos de unión de espermatozoides a envolturas vitelinas aisladas**

Lotes de ~50 envolturas vitelinas (EVs) aisladas fueron incubadas a temperatura ambiente (20-25 °C) con una suspensión de espermatozoides ( $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  células/ml) durante 10 minutos en medio hipotónico: Ringer 10% (control) o Ringer 10% suplementado con el reactivo a evaluar (2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona o L-fucosa o D-glucosa o D-manosa o N-acetil- $\beta$  D glucosamina o N-acetil- $\beta$  D galactosamina) en la concentración indicada en las figuras correspondientes. Las EV fueron posteriormente lavadas por caída gravitacional a través de una columna líquida de solución Ringer-Tris, y los espermatozoides no unidos y aquellos débilmente adheridos a las EVs fueron eliminados por aspiración del medio líquido hasta dejar un volumen mínimo conteniendo las EVs lavadas con los espermatozoides firmemente unidos a ellas. Durante los lavados por caída gravitacional, la concavidad de las EV hace que espongan su cara externa al medio fluido y como consecuencia los espermatozoides débilmente adheridos a ellas son arrancados por la corriente líquida. Los espermatozoides no unidos a las EVs y aquellos lavados caen a menor velocidad que las EVs por la columna líquida y entonces pueden ser fácilmente retirados por aspiración de la parte superior del fluido. Finalmente, las uniones estables espermatozoide-EV, como fue establecido que ocurre durante la unión primaria de los espermatozoides con la EV o la ZP (Darío Krapf, trabajo de tesis; Omata y col., 1996; Zitta y col., 2004), fueron fijados por la adición de formaldehído al 3,7% v/v. Alternativamente, los núcleos de los espermatozoides fueron teñidos por incubación durante 5 min con Hoechst 33258 200 $\mu$ g/ml (Sigma). Las EV fueron nuevamente lavadas por caída gravitacional y aspiración de la columna líquida y finalmente fueron montadas en portaobjetos utilizando una lupa Olympus SZH. Los espermatozoides adheridos a las EV fueron contados por microscopía de campo claro o de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BH2 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1. Experimentos similares fueron realizados para estudiar la unión de espermatozoides a ovocitos enteros de *X. laevis* (Tian y col., 1997).

Para obtener EVs aisladas tratadas con Hex pura las EVs fueron primeramente equilibradas a pH=5,0 por ciclos de resuspensión y sedimentación (500g y 4 °C) en buffer fosfato/citrato 10 mM. Luego, las EVs fueron tratadas con 2 U/ml de Hex de

*Canavalia ensiformis* (jack bean; Sigma) por los tiempos indicados en la figura 62 (capítulo VI) con agitación circular constante. Finalmente, las EVs fueron lavadas por caída gravitacional en columna líquida de Tris 10 mM (pH=7,6) seguido de aspiración y utilizadas para los experimentos de unión. Como control se utilizaron EVs que no fueron sometidas al tratamiento con Hex.

Los análisis estadísticos utilizados para comparar los tratamientos, la significancia ( $p$ ) y el número de repeticiones realizadas fueron incluidos en las leyendas de las figuras.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA HEXOSAMINIDASA DE ANFIBIOS

### INTRODUCCIÓN

Como se describió en la introducción, las glucosidasas, los carbohidratos y sus interacciones han sido relacionados con el proceso de fecundación en los anfibios.

En *Xenopus laevis* residuos de N-acetil glucosamina y de fucosa de la EV fueron vinculados a la interacción entre gametos (Vo y Hedrick, 2000). En *Bufo japonicus* residuos de N-acetil galactosamina (NacGal) y/o de ácido siálico estarían involucrados en la interacción de la EV con los espermatozoides (Omata y Katagiri, 1996). Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que, en *Rhinella arenarum*, residuos de NacGal y/o de manosa podrían estar involucrados en la fecundación (del Pino y Cabada, 1987; Barisone y col., 2003; Krapf, trabajo de tesis).

Entre las glucosidasas, la Hexosaminidasa (Hex) ha sido vinculada al proceso de fecundación tanto en *X. laevis* como en *R. arenarum*. En *X. laevis*, una Hex presente en los gránulos corticales es liberada al exterior celular luego de la fecundación, durante la reacción cortical, participando en el bloqueo de la polispermia (Grave y col., 1985; Prody y col., 1985; Vo y Hedrick, 2003). En *R. arenarum* la Hex fue encontrada tanto en la matriz acrosomal de los espermatozoides intactos como asociada a las membranas de los espermatozoides reaccionados. La Hex de espermatozoide de *R. arenarum*, además, fue capaz de interactuar a modo de lectina con EV homóloga solubilizada. En ensayos de fecundación *in vitro*, la competencia de la Hex con sus azúcares sustrato N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina, o con una Hex heteróloga pura (*Canavalia ensiformis*), redujo significativamente la tasa de fecundación (Martínez y col., 2000).

En términos generales, estos estudios sugieren la participación de la Hex en la fecundación de los anfibios. Sin embargo, aún no se conoce la estructura molecular de la Hex en ellos, su actividad sobre sustratos neutros o cargados, ni se ha precisado en *R. arenarum* la etapa de la fecundación en la que participa (interacción inicial entre los

gametos, avance del espermatozoide reaccionado a través de la EV y/o prevención de la polispermia).

En la primera etapa de este trabajo de tesis se pretende identificar secuencias de ARNm (ADNc) que codifiquen Hexs de *Xenopus*, para avanzar en la caracterización molecular y bioquímica de la Hex de anfibios.

## RESULTADOS

### A- OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE LA HEX DE ANFIBIOS

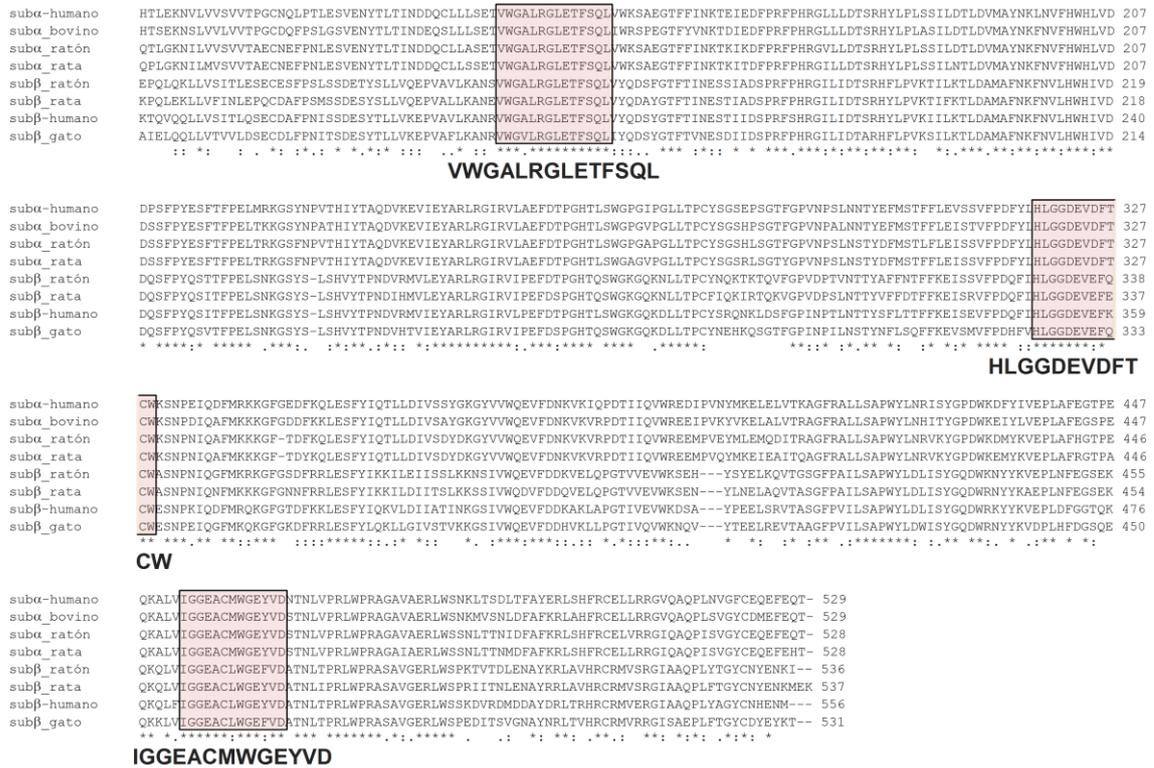
#### *A1- Identificación del ADNc codificante para la Hex de X. laevis por similitud de secuencias*

Con el objetivo de ahondar en la estructura y función de la Hex de anfibios nos propusimos como primer objetivo identificar en bases de datos de secuencias de anfibios, de libre acceso, transcritos que codifiquen para putativas Hexs, deducir su secuencia polipeptídica y su estructura génica, y realizar la caracterización molecular y bioquímica de las mismas.

Considerando que no existen proyectos de secuenciación en *R. arenarum*, y teniendo en cuenta que *X. laevis* es un modelo anfibio ampliamente difundido entre la comunidad científica internacional para estudios de fecundación y desarrollo embrionario, del cual existe una gran cantidad de secuencias nucleotídicas disponibles a través de bases de datos de libre acceso (GenBank), decidimos comenzar con la caracterización molecular de la Hex de *X. laevis*.

Para lograr este objetivo se alinearon las secuencias polipeptídicas de varias subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de Hexs de vertebrados caracterizadas (humano, bovino, ratón, rata y gato) y se seleccionaron tres pequeños péptidos, pertenecientes a la regiones N-terminal, central y C-terminal, conservados en todas ellas (fig. 13). Estos péptidos fueron luego utilizados como sondas para identificar *in silico* secuencias de ESTs de *X. laevis* que los codificasen en alguno de sus seis marcos de lectura posibles (GenBank; tblastn).

### III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios



**Figura 13. Alineamiento de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de distintas Hexs de vertebrados.** Los asteriscos indican los residuos de aminoácido conservados en todas las secuencias alineadas. Sombreados en rosa, y transcritos por debajo del alineamiento, se destacan los péptidos seleccionados para realizar la búsqueda de secuencias de ESTs codificantes para putativas polipéptidos correspondientes a Hexs de *X. laevis*. Subunidad  $\alpha$  de humano: UniProt ID P06865; subunidad  $\alpha$  bovina: UniProt ID Q0V8R6; subunidad  $\alpha$  de ratón: UniProt ID P29416; subunidad  $\alpha$  de rata: UniProt ID Q641X3; subunidad  $\beta$  de ratón: UniProt ID P20060; subunidad  $\beta$  de rata: UniProt ID Q6AXR4; subunidad  $\beta$  de humano: UniProt ID P07686; subunidad  $\beta$  de gato: UniProt ID P49614.

Los ESTs identificados fueron traducidos *in silico* y los polipéptidos resultantes fueron comparados por similitud con la secuencia polipeptídica de Hexs de vertebrados caracterizadas (dato no mostrado) para determinar cuáles codificaban para putativas Hexs. Los polipéptidos codificados en la secuencia directa y reversa de los ESTs presentes en los clones XL250c11ex y XL163o21 anotados en la base de datos del Instituto Nacional de Biología Básica de Japón (NIBB) mostraron homología con estas Hexs y fueron seleccionados como codificantes para putativas Hex de *X. laevis*. A modo de ejemplo, se muestra el alineamiento de estos polipéptidos con la secuencia polipeptídica de la subunidad  $\beta$  que constituye las isoformas Hexs A y B de humano (fig. 14).



provistas por el NIBB para ambos ESTs codifican tanto el extremo N-terminal como C-terminal de una putativa Hex de *X. laevis*, permitiendo predecir que contienen la secuencia de su ORF completa.

EL plásmido conteniendo en el clon XL250c11ex (pXL250c11ex de aquí en adelante) fue solicitado al NIBB de Japón y se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  para su preservación en nuestro laboratorio.

#### A2- Obtención del marco de lectura abierto completo de la Hex de *X. laevis*

Para obtener la secuencia del ORF completo codificante para la putativa Hex de *X. laevis* identificada se secuenció la totalidad del inserto contenido en el plásmido pXL250c11ex. Para ello se utilizaron dos cebadores internos complementarios a las secuencias directa y reversa provista por el NIBB para el inserto de pXL250c11ex, y dos cebadores externos provistos en el plásmido de clonado (tabla III; materiales y métodos). Las secuencias parciales obtenidas (~700pb cada una) fueron analizadas y solapadas *in silico* con la ayuda de los programas BioEdit y Mega 5.0. Como resultado se obtuvo la secuencia completa del EST contenido en el plásmido pXL250c11ex (1956 nucleótidos (nt)), que fue publicada para su libre acceso en la base de datos GenBank con número de acceso JN127371. El análisis del EST JN127371 mostró un ORF de 1669 nt codificante para un polipéptido de 556 residuos de aminoácido (fig. 15).

*III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios*

**A R G A L R R V A V L G I L S L S F Y L S 21**  
GGCACGAGGGGCTCTGCGGCGAGTCGCTGTCCTAGGGATTCTCTCCCTGTCCTTTTATCTGTCC 64

**P S L C L R S H S H G E L L D A E T Q L T 42**  
CCGTCCCTCTGTCTGCGCTCTCACTCGCACGGGAGCTGCTGGATGCGGAGACGCAATTGACTG 128

**V A E D S P Y G S L W P L P Q T V T F S A D 64**  
TAGCCGAGGACTCACCTACGGTTCTCTGTGGCCGCTGCCTCAAACAGTGACTTTCTCTGCCGA 192

**T F R I P P S A F S I V H G S G S T V G A 85**  
TACTTTCCGCATCCCGCCGTCGCGCTTTCAGCATTGTGCATGGCTCGGGCTCCACAGTGGGCGCT 256

**S C V M L Q D A F R R Y Y D Y I F G Y S K 106**  
TCCTGTGTGATGCTGCAGGATGCCTTCCGCAGGTATTACGATTACATATTTGGCTATTCCAAAT 320

**W K H L S K K P S D A G Q L L Q L Q V I I L 128**  
GGAAACATTTGTCTAAAAAGCCCTCTGATGCTGGCCAGTTGCTGCAGCTTTCAGGTTATAATTCT 384

**S Q D H E C H Q Y P T V K S D E S Y E L S 149**  
TTCTCAGGATCATGAATGCCATCAGTATCCCCTGTTAAATCAGATGAATCATATGAAGTACTGAGT 448

**V G E N V A V L K A K Q V W G A L R G L E 170**  
GTTGGAGAGAATGTCGCTGTCCTGAAAGCAAAGCAAGTTTGGGGCGCTCTCAGAGGGCTGGAGA 512

**T F S Q L I Y E D S F G A F L I N K T H I E 192**  
CTTTCAGTCAACTCATCTATGAAGACAGTTTTTGGAGCTTTTCTGATCAACAAGACTCATATAGA 576

**D S P R F A H R G V L L D T S R H Y L P L 213**  
GGATTCCCAAGGTTTGCACACAGAGGAGTTCTACTGGACACTTCCAGGCATTACCTGCCGCTC 640

**K T I F L N L D A M A F N K F N V F H W H 234**  
AAAACCATTTTTCTGAACTTGGACGCAATGGCGTTTAAACAAGTTTAAATGTGTTTCACTGGCATA 704

**I V D D P S F P Y Q S V T F P D L S D K G S 256**  
TTGTTGATGATCCATCTTTCCCTACCAGAGTGTACTTTTCTGATCTAAGTGACAAGGGTTC 768

**Y H P Y T H V Y T P I D V R M V I E F A R 277**  
TTATCACCACATACACACGTTTATACCCCATTTGATGTCCGGATGGTGATTGAATTTGCTAGA 832

**M R G I R V V P E F D S P G H T D S W G K 298**  
ATGAGAGGAATTCGTGTTGTACCAGAGTTTGAATCACCAGGACATACGGATTCTTGGGGTAAAG 896

**G Q Q N L L T P C F N K E K L T G T F G P V 320**  
GGCAACAAAATCTTTTAACTCCTTGCTTCAACAAAGAAAAGCTGACCGGTACATTTGGCCCTGT 960

**N P I L N D T Y N F M Y T F F Q E V S K V 341**  
CAATCCCATCCTAAATGATACTTACAATTTTTCATGTACACGTTTTTTTCAAGAAGTCAGCAAAGTT 1024

**F P D Q Y I H L G G D E V D F S C W R S N 362**  
TTCCCTGATCAATACATCCACTTAGGAGGGGATGAAGTAGACTTTTCTTGCTGGAGATCAAATC 1088

**P D V T K F M T D R G F G T D Y C K L E S Y 384**  
CGGATGTTACCAAATTTATGACTGACCGTGGCTTTGGCACAGACTACTGCAAGCTAGAATCATA 1152

**Y I Q Q I L G I V S S L K K G Y M V W Q E 405**  
TTACATCCAGCAAATCTTGGGCATAGTCTCATCTCTTAAGAAGGGCTACATGGTCTGGCAGGAG 1216

**V F D N N V K L N P D T I I E V W K E K L 426**  
GTCTTTGATAACAATGTAAAGTTGAATCCAGACACCATAATTGAAGTGTGGAAGGAGAAGCTGT 1280

**Y Q E E M A A V T A A G F Q A L L S S P W Y 448**  
ATCAAGAGGAAATGGCAGCTGTTACAGCTGCCGCTTCCAAGCCCTTCTTTCTCTCCTTGGTA 1344

**L N R I S Y G Q D W I Q V Y R V E P T N F 469**  
TCTAAATCGCATCTCATATGGTCAGGACTGGATCCAGGTCTACAGAGTTGAACCAACCAATTTT 1408

```

N G T A Q Q K Q L V I G G E A C L W G E F 490
AATGGAAC TGCCCAACAGAAGCAGCTTGTGATTGGAGGGGAAGCCTGTTTGTGGGGTGAATTTG 1472

V D A T N L T P R L W P R A S A V A E R L W 512
TGGACGCCACCAATCTTACTCCAAGACTATGGCCTCGAGCGAGTGCTGTAGCTGAAAGATTATG 1536

S S Q S V T S V G D A Y N R L V K H R C R 533
GAGCAGCCAGAGTGTGACGTGCGGTGGGAGATGCTTACAATCGGCTTGTGAAACATCGCTGCCGC 1600

M V R R G I A A E P L Y V G Y C D H E L D 554
ATGGTCAGGCGCGGAATAGCAGCTGAGCCTTTATACGTGGGCTACTGTGACCATGAGCTGGATG 1664

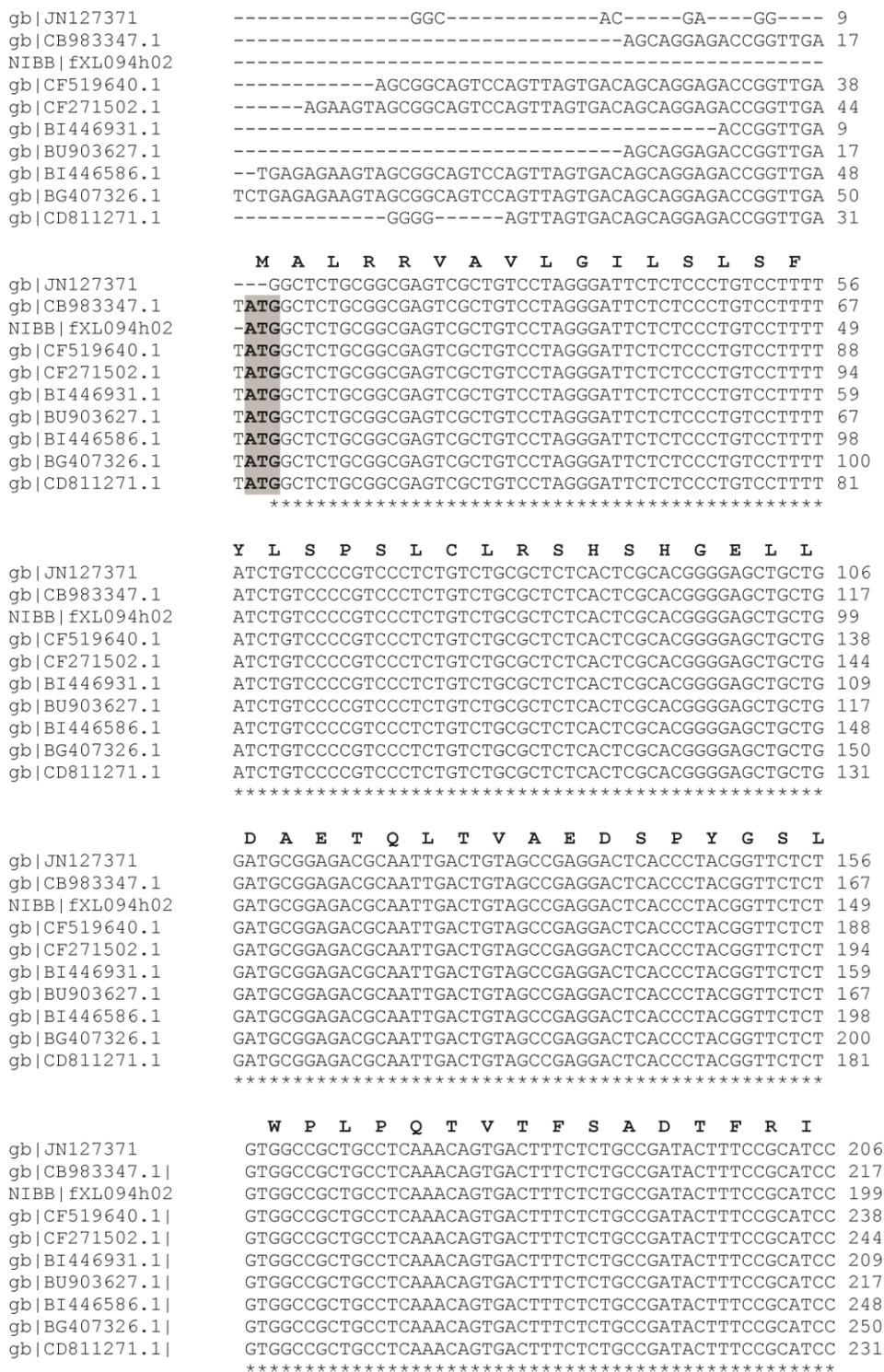
V . 555
TCTGAATTGGTTCACATGACACTGCAATTCTTGCACCAATCAGCAAGGGAGCAGCTGTGGGATGT 1728
AGAGGGCCAAACAATGCACTGAATTCTTTTCTGATCATATTGTTAAGGAGGTGTGTCTCCAAG 1792
CTGCAGCCTTTTCATGGTGGCATTGCCTTTGCCAGAGTCCCATGTCAGCTGATGAGCCACGTTTG 1856
GTGCCCTTGTGCACATTTTTTTTTTTTTTCAAATAAATCATGATCTACATAGAGCGATATTTACAT 1920
AATAAAATTCTCTATTTAAATAAAAAAAAAAAAAA 1956

```

**Figura 15. Secuencia de la putativa Hex de *X. laevis* (GenBank ID: JN127371) correspondiente al clon XL250c11ex (NIBB, Japón).** Por encima de la secuencia nucleotídica se muestra la traducción *in silico* del ORF encontrado.

### A3- Obtención del codón AUG que señala el inicio de la traducción de la putativa Hex de *X. laevis*

El polipéptido codificado en el ADNc JN127371 no muestra en su extremo amino terminal un residuo de metionina (M o Met) que indique el comienzo de la traducción, como en la mayoría de los polipéptidos eucariotas caracterizados. Ello podría deberse a errores producidos en alguna de las etapas enzimáticas necesarias para la obtención del ADNc a partir de ARNm o a errores en la interpretación de los cromatogramas obtenidos en las reacciones de secuenciación. El análisis del cromatograma de secuenciación correspondiente al extremo N-terminal del polipéptido codificado en el ADNc JN127371 no mostró indeterminaciones (dato no mostrado). De este modo, para descartar posibles errores ocurridos durante la obtención y clonado del ADNc JN127371 en el plásmido pXL250c11ex se buscaron otros ESTs de *X. laevis* que codificasen para el fragmento N-terminal de la putativa Hex identificada. Nueve ESTs con estas características fueron encontrados en bases de datos de libre acceso (NIBB; GenBank). Estos ESTs fueron luego alineados para analizar la identidad entre sus secuencias (fig. 16).



**Figura 16. Alineamiento de distintos ESTs de *X. laevis* codificantes para el extremo N-terminal de la putativa Hex codificada en el ADNc JN127371.** Los ESTs alineados son identificados por su número de acceso. Los asteriscos indican los nucleótidos conservados en todas las secuencias alineadas. Por encima de las secuencias nucleotídicas se muestra su traducción *in silico* (igual para todas ellas) para facilitar la comparación con la figura 15. En negrita y sombreado en gris se resalta el codón ATG que señalaría el inicio de la traducción. Por razones de espacio sólo se muestra el alineamiento de la región 5' de las secuencias de los ESTs.

El análisis de este alineamiento muestra que el ADNc JN127371 posee su región 5' UTR incompleta y que carece de los dos nucleótidos iniciales (AT) que componen el codón ATG que codificaría para la Met que señala el inicio de la traducción de la putativa Hex de *X. laevis* identificada.

## **B- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POLIPÉPTIDOS CON IDENTIDAD HEX EN *XENOPUS***

### *B1- Asignación de identidad Hex por métodos bioinformáticos*

La asignación de identidad al polipéptido codificado en el ADNc JN127371 se llevó a cabo en una primera instancia mediante estudios bioinformáticos.

Como mencionamos en el apartado anterior, el ADNc JN127371 presentó un ORF (1662 nt) que codifica un polipéptido de 553 residuos de aminoácido (teniendo en cuenta la asignación *in silico* de la Met que señalaría el inicio de la traducción). El análisis bioinformático de este polipéptido mostró que tiene tres regiones principales: una región N-terminal de 23 residuos de aminoácidos, predicha como péptido señal de anclaje al retículo endoplásmico, con un sitio potencial de ruptura proteolítica entre los residuos de Cys23 y de Leu24 (fig.17); un dominio  $\beta$ -acetil hexosaminidasa-like comprendido entre los residuos de aminoácido 50 y 173; y un dominio catalítico comprendido entre los residuos de aminoácido 195 y 513. Los dominios  $\beta$ -acetil hexosaminidasa-like y catalítico son comunes a todos los miembros de la familia 20 de las glucósido hidrolasas a la cual pertenecen las Hexs.

El análisis comparativo entre esta secuencia polipeptídica y las de las extensivamente caracterizadas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que componen las Hexs de humano mostró que al menos el 56% de los residuos de aminoácido son idénticos, y el 71% de los residuos son similares, en todas ellas. El 54% de los residuos de aminoácido resultó idéntico cuando se la comparó con la Hex de *Phallusia mammillata*, un animal filogenéticamente distante de *X. laevis* (Koyanagi y Honegger, 2003) (tabla IV).

**Tabla IV.** Similitud de la putativa Hex de *X. laevis* con otras Hex caracterizadas.

Organismo	% de identidad	% de similitud
subunidad $\beta$ de humano (P07686)	62 (318/507)	78 (397/507)
subunidad $\alpha$ de humano (P06865)	56 (289/510)	71 (365/510)
Hex de <i>P. mammillata</i> (Q7YTB2)	54 (281/529)	70 (369/529)

Los porcentajes de identidad y similitud aminoacídica encontrados con otras Hexs de vertebrados caracterizadas (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de ratón; subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de rata; subunidad  $\beta$  de gato; subunidad  $\beta$  de cerdo; subunidad  $\alpha$  bovina) fueron similares a los encontrados en la comparación con las subunidades que constituyen las Hexs de humano (datos no mostrados).

En la figura 17 se muestra el alineamiento del polipéptido deducido para la putativa Hex de *X. laevis* identificada (ADNc JN127371) con los precursores de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que componen las Hexs de humano y con la Hex deducida de *P. mammillata* (Koyanagi y Honegger, 2003).



subunidades  $\alpha$  (NR) y  $\beta$  (DL) de humano. Los sitios de N-glucosilación (humano) o potenciales de N-glucosilación (*X. laevis* y *P. mammillata*) se muestran sombreados en amarillo. La región polipeptídica utilizada para obtener los anticuerpos  $\alpha$ -GST/Hex (capítulo IV) se muestra sombreada en rosa.

Como fue mencionado anteriormente, y referido en la tabla IV, en el alineamiento se puede observar la similitud existente entre las secuencias polipeptídicas de las subunidades constituyentes de las Hexs de humano, la Hex deducida de *P. mammillata* y el polipéptido codificado en el ADNc JN127371. Este alineamiento también permite deducir que la región N-terminal es la región más variable de las Hexs. Sin embargo, esta región contiene un pequeño péptido de 10 a 14 residuos de aminoácido de longitud que está conservado aún en las Hexs de especies filogenéticamente distantes como *P. mammillata* (fig. 17, recuadro 1). Todos los residuos de aminoácido identificados en el sitio activo de las subunidades de humano (Lemieux y col., 2006) están conservados en la putativa Hex codificada en el ADNc JN127371 (fig. 17, flechas rojas). Además, el análisis comparativo con los dos residuos de aminoácido que varían entre los sitios activos de las subunidades  $\alpha$  (NR) y  $\beta$  (DL) de humano muestra que el polipéptido caracterizado conserva los residuos de NR correspondiéndose con un polipéptido de tipo  $\alpha$  (fig. 17; recuadro 2). Tres sitios potenciales de N-glucosilación fueron encontrados en la putativa Hex de *X. laevis* identificada (fig. 17, secuencias sombreadas en amarillo). Dos de ellos están conservados con los sitios de N-glucosilación encontrados en las subunidades de humano (Schuette y col., 2001), y predichos para otros vertebrados (datos no mostrados), mientras que el tercero está conservado sólo en la Hex de *P. mammillata* (Koyanagi y Honegger, 2003). Todos los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  maduras que constituyen las Hex de humano están conservados en la putativa Hex de *X. laevis*.

Basados en la elevada similitud del polipéptido identificado con las Hexs caracterizadas de humano y de organismos filogenéticamente distantes como *P. mammillata*, y en la conservación a nivel molecular de todas las características estructurales que poseen estas Hexs, podemos concluir con un elevado grado de certeza que el ADNc JN127371 codifica un polipéptido correspondiente a una Hex de *X. laevis* que podría ser de tipo  $\alpha$ . La secuencia polipeptídica de esta Hex fue anotada en el GenBank con número de acceso AEJ87970 y representa la primera secuencia polipeptídica de una Hex de anfibio presentada en la literatura (Morales y col., 2012). Debido a que no es conocida la estructura de ninguna Hex en anfibios los polipéptidos

caracterizados de aquí en adelante serán denominados como Hex de tipo  $\alpha$  o  $\beta$  (y no como subunidades) según lo definan los residuos de aminoácido de sus sitios activos.

#### *B2- Identificación y caracterización del gen codificante para la Hex en Xenopus*

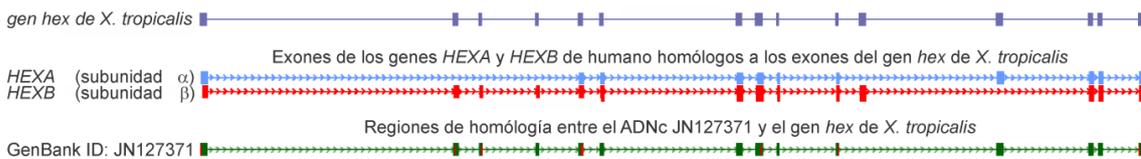
Como se describió en la introducción, los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las distintas isoformas de la Hex en humano han sido extensivamente caracterizados (Proia y Soravia, 1987; Proia, 1988). Sin embargo, a pesar del profundo conocimiento que existe sobre estos genes, ningún gen codificante para Hex había sido caracterizado en los anfibios.

Con el objetivo de identificar el gen que codifica para la Hex de *X. laevis* caracterizada (ADNc JN127371), se llevó a cabo un estudio bioinformático utilizando bases de datos genómicas de libre acceso (UCSC Genome Browser). Sin embargo, debido a que el único genoma de anfibio actualmente secuenciado y disponible para su libre acceso es el de *Xenopus tropicalis* (Hellsten y col., 2010), y teniendo en cuenta la elevada homología que existe entre las secuencias nucleotídicas y polipeptídicas de *X. laevis* y de *X. tropicalis* debido a su cercanía filogenética (>90 % de identidad), se utilizó a *X. tropicalis* como primer modelo para realizar estos estudios.

Como una primera aproximación se buscaron en el genoma de *X. tropicalis* secuencias genómicas que poseyeran fragmentos con un elevado porcentaje de identidad con el ADNc JN127371. Una única región en el scaffold 113 del genoma de *X. tropicalis* fue encontrada (posición GL172749: 1.795.244 – 1.819.981; ensamble 4.2/xenTro3; noviembre de 2009). Esta región está catalogada como codificante para una putativa Hex de *X. tropicalis* y presenta un tamaño aproximado de 24,7 kpb (UCSC Genome Browser; genoma de *X. tropicalis*). El análisis de similitud de esta secuencia genómica con la de los genes *HEXA* y *HEXB* (codificantes para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano) mostró en su estructura la existencia de 15 exones interrumpidos por 14 intrones. Sin embargo, sólo 14 de los 15 exones presentes en el gen de la Hex de *Xenopus* serían necesarios para codificar al transcripto identificado JN127371 (fig. 18A). La secuencia genómica de este gen es mostrada en la figura 18B.

A

*X. tropicalis*-ensamble JGI 4.2/xenTro3-Nov. 2009-GL172749: 1.795.244-1.819.981 (24,736 bp)



B

caagtctgtggtcccgctgttcggactgtagcggcgagtgtagctATGGCTCTGCGGCGAGTCCGACTGCTAGGGATTCTCTC  
 CCTGTGCTTTCCCTGTGTGTCTGTGAGCGCTCCACTCACACCCGGCAGTTACGGGGCAGGGAGGAGCAGCTGGATGCGGATACAAC  
 GACTGTAGCAGAAGACTCACCTTTCGGGTCTCTGTGCCGCTGCCTCAAACGTGTGATATTGTCCGCCGACTCCTTCTACATCCCGCCG  
 TCCGGCTTCAGCATGGCTCCGGCTCCAGCCGCACTCTGTGTCTTCCGAGAGCGCTTCCGCAAGtgtagtgccga  
 ctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggg  
 gtgatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcct  
 tgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccc  
 acctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgcccgggggatcctgtgccccacctgccc  
 tggggctcattcactatcaggcacaagcaactagcagcaagcaactggcagtaattccatttttagctttgttatcttctctg  
 gacaacgttaaacgctaatgt  
 gt  
 tgcagaagagt  
 atgacttttagctgt  
 cagtgtcccccaaccagtggtcaggggtaacatgt  
 tttttgaattcctggctgggaggaagt  
 cacggggtacctaatagctgattacagccctttttggcaccocaggaaatttttttttaccggtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 aacatttgaattgt  
 ttatagttcactttatctgtgcaatgcaactgt  
 cccccattttcctaacgctactcctcctcagtttttaggggtacaacccaactccccacacactcttcgcttagtgaggcag  
 gttagctgt  
 gagattttcaactgctgccacacttacagctgtgaaactacagcccccacttgaataacataatcatgggggtcacccgatga  
 agcagcaacatttgt  
 aaactgctgcaactttagctgt  
 atattggagtgggcccccaactgt  
 ctacagtaataacgctgggggtcccccaactttttacacttggctcactaggggactgtagtttaagttttaaaagtgggggag  
 ccaacagccaatcagatttccactatgtattttatgt  
 ttccaggttttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaccacaagtgggagggggcaacagcagccaatcatttgtaccatgactttt  
 atggggaaattgaaactgt  
 gaaaatagatgattgt  
 cagtcactgcatgactttgtacccaaggttagaaaaagtggcgggcgctaaaagccaatcactttcttcttcttcttcttct  
 aaaattttaactgctgccatttctacatgtttaaagt  
 tttagaaattgaaactgt  
 ctattaataatagggcttccaaactttgcagagctcatcactggtaactgcagttcaaagttagaaaaagtgggtggagccaac  
 agccaatcagattttacctatgtatttcaatgggaaattcaactgctgccattctcacagtaataacaccaggggtcactag  
 tgactttgtaggttttaaaagtgggtggagcccaacagccaatcagactcaccattaaattttttgtgtttatattaaagt  
 ttgctttgtcactcacttttagctgt  
 ttggtttatatttaactgatgccatttttaaatatttaattccaggggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 tcaaaagttagaaaaagtggcgggagcccaacagccaataacatttccactatttactttcaatgggtgaaagtgtgtgtgt  
 agctcacaatgaaatgctgagtcctcccaaaattggcaatgt  
 cactaacagcaactcagccaatcactgaatttttagctgt  
 gcccactgtttgtcactgggtgacttgcactcaaggttagaaaaagtggcggaaccaccaatcacaattcactattgactttt  
 ggtgtaatgt  
 gaaaaaggggggtggagcccaacagccaatcagatgt  
 aaaccaggttccccaaactttgcacagtggtttttactgtataactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 ctatgtttttcaacccaactgaagtttttctcaaacttccctttctagttgtttatgtctactttttatgtctatctttgt  
 aagccctctcctttcattttccagcctctcatttaaatcaggggtctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 caaagtgaagagctgtgtataactcaacagctaaataactcaagaccgcaataaaaaaacaaaaaacaaaagatcaattgca  
 atgactgaaatcccccttaatacccccttttaattgt  
 tatgaagctgt  
 gctttgtttatgtacagaacctacttttcaagtgctctctccagatgtaattgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 cctgagtagggggtatagctagagcaccaccagggctggactggcaactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 acagcagctcactatttattggctgt  
 cctgagcaccacagatgcaatagagagtggtggcagctgt  
 caaacactgtactgagcaggt  
 gtgctgtttttccagctcctgtaacactggagaattaaattatgaaactgtttttcttttgaccactccccctatgccc  
 ccaattttcactgtactgt  
 caagtgaatagtgatgttttccactttccaacaacttcttatcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 gcagtgccataatacaaggagcttgggt  
 cagaaaaatagttgctactgctcctcgggcacatattgt  
 gttctgtcctttctgt  
 tgtccagcttaaaactagcatcaagcaatgtatttttagcattggaatgcaagcggcagactaccagttcactgggtacca  
 ctctttccaaactaatcaaaagcaggtgtattttaaagggatataaggtgttaattgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
 cagactgtagcttttaaatagctaagggaagcagtggtttgt

III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios

ttaatgtgctctttatgccagttgaaaggggtgaaacctatggcttgcaagaatgtgcctagggtcgagtgttccagctgacctgtgtg  
tgcaattttccatgttatccagtgtaaaagaaaagcaaatatgatcagtgaaacatttttttaagcagctataaaataggggcta  
caaatccctctgttttcccagtgtaactatagggtaatgtgcaaggtttgctgcaaggtctagtaaacccatgcaacaaatcatca  
ggaagcatttactggctctctgttttaaaacaaacattgtattgctatgggttactgctagtgatgagtgaaatctgtctcattttgctt  
tgccgaaaaaaaatgtaaaaagtcagtggtgacatTTTTTTTTTgcaagaaaaacaccattcacacattggaatctataagcactt  
TTTTTgtggcaaaacctaatgagaaattcagttgggtgccatgggtgatattaagaaagtcctgataaaagcattataaaaaaacctgc  
cctttaaactcagttactaatcataaaaaactggtttatgtcagcgaggaagggcttattgttttggcacaagtgacacaggaatgca  
ttctacgggtcatggccacttggcatagagccatggctgacttgcctcatttctctgactgtctgcatgtgttcatagcaagaacattgg  
caatcagoccttcaacttttatatgcacagactgggattactgtatatttgaatgtgggcacaaaaatgagaatataaggcaacaggca  
ttatgggtggagcaccagataaagggccaaggtagatctttccaggtgacagcttcaactatatagtatgcaggccaacacattctccc  
ctgggaattgctacttgggagttcataaaaaataaaagtcaagtTTTcaagtagatatttggTTTTTtatataataaaatataata  
atTTTTTTTTTTTTTTTTTgcaagacatgaacatagtaattatTTTaaacattataaaatattgtcatttaacatttttatatgtgtt  
ttctctcttatctctg**ag**GTATTAGACTACATGTTTGGCTATTTCCAAGTGGAAACGTGCATCCGCAAAGCCCTCAAATGCTGGCCAGT  
TGCTGCAGCTTCAGGTTGTAATTTCTTCTAAGGACCATCAATGTCATCGTTATCCCAGTGTTCATCTGATGAATCAT**g**taggtaatt  
ttctgttactgttttattgtcAAAAatgctaggtgtattttaaagtaactcaaaaaatgaacacatttgcacacaaatgaaac  
caaacatacatcacttatttctaaatagtaattatatttattactttccatttttccgggtctccagcaacaccagcattggc  
aacataaaatgattaaaaataagttgggctttagtaggcttcaagtggtgtgcataaaaaatgaaacattgcaattatatttcaatttt  
atttataatttttccaactctgactttacagggaaagtagcctgtgtgtatatacatccagagacacccaagatttaccataaactt  
gtctctctgtacttgggagttcacaacactgcaactgcaaaactgcgccccacactgacctagctcaccctgtgatttctgtcctgta  
gcaatgtagttgagtagcaggttacttgttccagcagtagatagcatttttatcaccagttaaatgaacattttaaattgctttgtctttg  
**ag**ATGAATTAAGTGTGGAGAGAATGTAGCTGTCTTCAAAGCCAATCAAGTTTGGGGTGCCCTCAGAG**g**ttagtaaatgaaagagtg  
aaaaatctaaaaataaactattttaaaggtgtgagagctgcacaaacaggtgatttatgatattgcttttatatggcttactgtaagcc  
cagatgtacagctgctgtgacaggaatctaaagttgtccacacatgctgtggcttctctgaaaccataaaggcctgggtgctcag  
ggaactgtatagctccgcttggcttgcagtggttttactgttgcctcgggttagtacacactggggcattttttaaaccgtgc  
aagctaacatcaccggtaaatatttccatagaaccaatcagatttttatttggTTTTTcaactcgtaggtgaccattaaattgogtat  
tgggtgctattggtggcttacacactgtgtatttggggatataatcagcaggggttgggaaaaatactacataaaggatagattttt  
ttttattttatttttaaactctgtcagggctccggtaacttccaggggtccaggggctgaagatatactatttttagcctaatt  
gtcttgggtgtctgaaattgctcttcaagtaacccccctaaacttcccaagtgccagatgatttctaaacactagaaggaatattac  
tattatcctttatttccagtagcaccatataaaatattttagacattatacatgagtttgggtccattttcattatgatgatagag  
agcccaacagtttttcaatttctctcaaaataaactatgtggcagagcatttgcctttttgttttttcttactcaatggacatgat  
taaaacaccggatattggccttaagccatggcactacatgcatgtgttttgcaccogctgaacttttagcagcagcagcctcaag  
gttaacagcaaatggaataaacttaaaagcacaacactgacaattgataatacactttttaaactgataaaatcagtaggactctctttt  
cagtgctggcattttcataagattcctattgctagtaattcatagatttagatgctaaatttgggtccaggaatacattgtggcag  
gtgaaattgtgttgcataagcctaattccatctgctgatcctgtttgtttgaaactgtttaaaccatgatttgaagtagttagggag  
tctgtatggcaggttactgaaaccaatataatataattttttttcaggaaggttagtatctaggcagatataatggcaggt  
tattgttcttctgtctgtgtgtagagtagcaaatgcaacttggactgttcttagcagcaggtttaggactatgggcaatggggaag  
ttgcctcagtgctactggtaaaaaaacgtttttgacattttgttggtaactatttttaa**ag**GCTGGAGACTTTTAGTCAACTTATC  
TATGAAGACCGTTTTGGAGCT**g**taagtaattttataaaagagaatgtaataaatactgtaagtagtaggaatcatttggttcag  
cacatataatagggaggtataataaactgtaaaataactcagttatttagcagtttactttgttctcatggactaaagccaac  
gtataataatcgaatgttttaaaccacacacttggcttttaagagatattatcccccttttcttttctaatgagtgcaatgaaat  
aaggactcagctgaacatacttcttgcctggtttaattaggaatattgtatgtatgggtgatttttatacactaagctggctcga  
aagctgcaaaaatgaaagtaaaagtcacatttctacttctggcttgcataagcccaagcaaaacacatgaacagctccactgagaagcct  
ttgtataatgatttgtccttatcacaagcctaaagctggcctacacagcagataaaggctgcccctcagcccctcagcagatga  
gttggcagagcccttataaaactgacagaaattgataaaacccatcagtagagaatcgcatcaacagggccaggtgtgctcgggtg  
atgggttttcttttaaactgcccggcagatattctgtagagctgtagcagcttttatcagctcgggtatgggcagctttcggctgtgaa  
taaacagcaggtcattatacaggggcttgcagtgactgtaatttattttgatttctactggtatagcaggaagcagaatataac  
tttgggttcttattgtcagaacaactaatttaaacaaatagcacaagaaagtagttcagtgcaagccctattttatgtcttttggta  
aaaaacaaggttcttctgcaacccctcaatttgaagaaagaaatgcaaaagcaagtaacttccatcagataaacagataaagttctgtagaatata  
caactaaagtgaaatcttctgtttttaaagaaatgtgctagtaaatgtaaaattgcaatagcttctcatttctcctaaatttattt  
tatgttccgttaaa**ag**TTCCTAATCAACAAAAGTTATATAGAGGATTTCCAAGGTTTGACACAGAGGAATTTCTGTGGACACGTC  
CAGGCCTACTTACCCTGAAGACCATTTTTCTGAACCTTAG**g**taagttggctgagggaaactgtaagttgtttgtaattgctgcacctt  
aaactcgtctgtgcaaccacaagcataaaggttactttttcataaacaagtaacttccatcagataaacagataaagttctgtagaatata  
gctcccaaaaattcagtagtagggcacaagcagtagcaaaaggggctactttgtgctcgaacagttgcagttccgtaatagattttta  
aagggtctgtcccgtagacagctccagagtgccagtgcaatttcttctataccttactccttgggcttgcattgttctatgttct  
tatgtacagatagatatttactatattttatcagttatttctttaaactgatagcattctcttggcttaacctctgactctgttc  
ctgacttctcactcattattttcttcc**ag**TGCAATGGCCCTTTAACAAAATTTAATGTGTTCCACTGGCATAATTTGTTGACCCATC  
TTTTCCCTACCAGAGTGTACTTTTTCTGATCTTAGTGACAAG**g**tgagacactgaaagtgagctgagcactttgctgggactttatg  
tattctgaggtacagtggtgtgtgggtgctgctgcagatgttgggtgttgagcaactgtgatatttttattgtgggtcacagtgag  
ttcaactgtagtgactgtcagccttataaaggaacagtaaacacaaaaaatgaaagagctttaaagtaataaaaaatatacagtgccg  
gactggcccaccagataccaggaaaactcccgggtggccaggtgtcaatgggcccctctgcttctaaacttttagcctatttctcag  
gtcattccctgtttctgtatgggaagaagaaagctttagatagtaggaagaatagagtagatgtagagaaaagagactaggataaat  
aaagagttgagggaggaattcaattttgaaatgtgggcccattggccaggggttttctgggtgggcccctgccatctcagctccgacactg  
aaaataaatgcaactgttgcctgcaactggttaaaactggtgtgtttgctacagtaaacactactatagtttataataaagctgctgtg  
tagccacggggcagccattcaagctgaaaaaaagggagaaaagcaggttacaatgacagataaacagataaagttctgtagaatata  
taggttttatctgctatgtgctgtgcttttctccttgaatggctgctccatggctacatagcagcttatttataaaatata  
gtagactttctgaagtaaacacacacacttttaccagtgccagggcagcagcattatattttagttacttttatacactttcattttt  
tctgttactgttctttaaagattgggcttactaccatcattctttaaagcactcggaaattcaggtgacagagagatgttattt  
tggtaatttttttttgggatgttttagctgtctcattcagtaatttcaagttcttcttaagaatttttggatttttggattttcc  
aactgactacatttgattgcaaaatgctgttttgggaaactagcaaggccatgcaaggcccgttggctacagaccctgcacagtaa  
aatataattttgtggttataaaatttctaacagcaaaaggggagagatggcatgggtggagatgaggaactgaaaaagggctctgtgg  
agcttaataaaaatagctagtggtataaaatagctgaattcaaattaaaagggcaggttccagtaaacactatacatttaag  
tatagtgcaactgaaatatttctcattttagcttttaggaaatataatgtatttttggatttttggatttttggatttttggatttcc  
cagcaagtaaaagtcagttctacttctgggttcaatagcaaaaatcaaaacaaatcaccagctccacgggagaagcctgtataaaaca  
acccttctgctcactagatgcccacttgtgttaggcctcaagataatgatcagctcatttcaaaccccttcttagtgaattgatga  
cttgttttgaacattcagggctgtggagctggagcaatttgggtaccagctccgactcctactaaatttaaattgggaataaaaaa  
aaaaaaaataaagcaagtttaaagtccaattcacaagtagcaaaatataattacttctctgctataagaataaaagccaaatgacgca  
gtgcataaaacgaacagttgagtgaccatgaagcttttctttagctgtatgcttcaactaaatgggagctaacgcagcttaaggtgctg



### III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios

taaggtaggcagctagtttaggatgttaaattgagaccatgccatgtctcagctaatgaacaatatggtggctcacattctgc  
agtagaccagctggtccatgttcaacttaagctttgcaattgttcttaattgtaaaagggaaataaaatgtaactcagccagctggt  
ggtttgataatccaattgtcttcataaaactattctattcttttggctactttaaattggctcactcagtgccagcaggaaca  
caggagatcagcagctgttatttacttctcgggtcccagtgccgtatgtagcttctgtcaagtagatgtgtgctcattcataaaactatc  
tgaatctaattctatatgagtggtgtgatttgcagtgattgtgtgatccagcgcagccacagaaggcctactggcatacagggt  
ggtctgtctgagcttctagatattgcttccactgcagcagtggtctgtttcattttgctggacttgaccaaagtttccctacatctg  
ggccagaatctatatagaacattggtatgagcagaccaacaacagacagctgaaccagagttctccctggagccagcagctagtggt  
tgaacaaaacatgtaaaatggccactaactatacaactagaacactgattatggaggaagggttaaaccggttaaaatgctagct  
tccctggagctatgggagagggtaaaaggagaaatacaagggtctacagcacacaactcaatctaaggctgtgtaacataacgagcaga  
gaggctcccaacgaagcttccagataaaatgtccctcacagtaatgcacagtcacatcattatacctaataaaagttcatgtata  
ctaaaatctatttttatttctgctcagtggaatgacagctgttctaaactgtcatttttggcttacttgcaagaatggtccaatttagt  
gtgctgtaataatccgatcttagagctatatgggctttacatttcttaaataatccctttactgttactgtttattcttctcacttt  
gtatacatctaactcgtgaaatggtgcccagcatttattgagggcttttgtattttgtaaaattttggtaaatgaggcagtttagggtact  
gactgggttatctccagtcagtaaccaactgctgtgatttttgggtttttattttccaccattactcaaaatgccctagatcacctgtatc  
ccctcaatcagggccgaactggcaatctgtggattctggcaactctgcaactgctgtaagatgccaatagacagcagctcatttga  
gtgggctgggggggttttgggcccacttacaatgcccaactgttaggatcatgtgactgtattagcacagtttctccctgtgtttgac  
tgaagcttatgaaatccccactcagttccatttgaagaagcttccatttataaaaaaactactccttggaaatataatgtac  
ataaacattatctgtagtttccagcttattgactgcttggcaaaactttaccttccatggatgagtgacagttctattcattataaa  
caatgtcttctagtagttctgatataaagggtgaaattttaaagtattttaaattggcatttattgtgcaatggtccaatttccca  
tctctcagtggtttctatttcaataatcaaatgttttctctagtggtgtgggtgggcaggatttggccattgcaggatatagtgag  
ataccagctagtttttttttttttttttttaccataaggttaaaaaacaagatttccaataaaacagtgcaaaagtaacattttg  
tgcaaaagacttttggctccaacactgtctaactaaatctatggagttctgttaattgacataatggacatcttcttccatacacaga  
tggttggcgcaggagttccgggagcactttatatttttttttttccccaaaccaattcaataactagacctttttagttttcag

gtgaggttaattggatttgatttccaatgtcattgattaataaaagcgtgtggttaaattccccag**L N P D T I I**  
**TTGAATCCAGACACCATAAT**

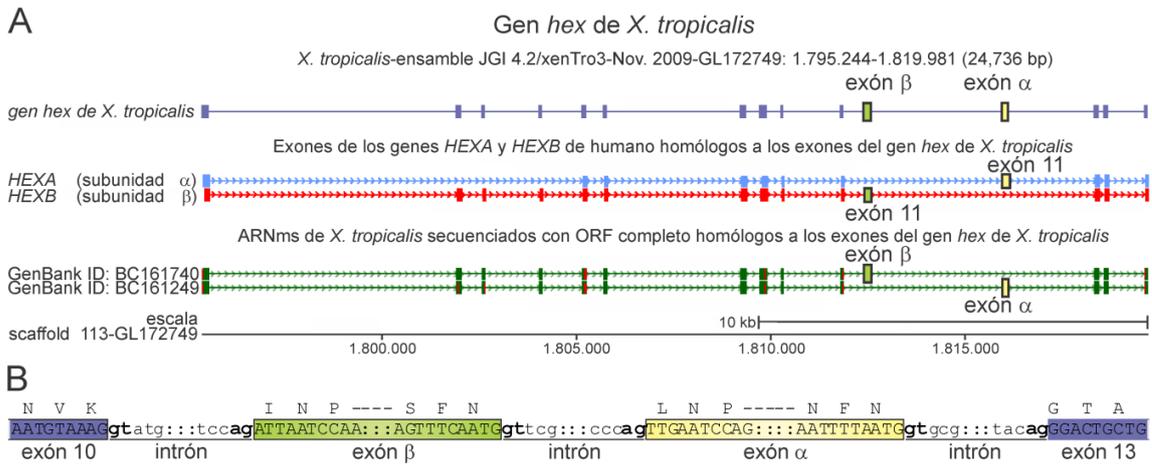
**E V W K E Q L Y Q E E M A A V T A A G F Q A L L S S P W Y**  
**TGAAGTGTGGAAGGAGCAGCTGTATCAAGAGGAAATGGCGGTGTTACAGCTGCCGGCTTCCAGCCCTTCTTTCTTCCCTTGGTAT**

**L N R I S Y G Q D W I Q V Y K V E P A N F N**  
**CTAAACCGCATCTCTTATGGTCAGGACTGGATCCAGGTCTACAAAGTTGAACCAGCTAATTTTAATG**gtgctccctgtcactgatt  
tgctgtgaatcaaaactaaacatggcagcttggcatggcttggcatattatctcttccctttcctaataatctccataaaaaagca  
gagactcgcaaggagaatgaaatggtggttaacatggcaggtttacatatttttaataaccactagagctaaggcaatgtaactaaaac  
aggagtaatagaggggtgataaaaggacatgaggggtgcatacaaaatgcaactgtattgtactttggcccgggcatctgtgtatctac  
aagagaatctgccaagggttattttctaaaataccataaagtctcagcagtgccaactgtacacaggaaggaatgaaatagtttga  
cttttaggagagcagatataaagatcattctgtgtgtgtattggctctagaggtcatttcatgagcagtaaaaggcaagccataaatta  
gcagcagacaggatatactagcaggttcattggcaggtacacatacaagggtctatgcccagcagtggtgcttcttagatttttggctg  
tttccgggtaagcctactccatattctgtaataaaccatatacaactatagatatttccagctatggcccataatgacattttt  
accaacatggagaccattcaggtttattgtattataataattacactgaaatctcaaacattctctcagcaatgtttatttagta  
cctgtgtcactggccactgcagaactgtgtgggataatgtgcaggtacattccatttggctttagttatcttactagtgctgaaac  
aagtgtgcatagaatctacagtaggtggcaaggaaagtgctatagaaccatgttccataaaccttggtttgaatgatatataatatt  
gcatttagtattgctagtaaaattatattggcttacatttagtttgcagctgtctggccaagctttacatattacatgcttaggcatag  
gctcagtttttattctctatctctgttggcaggatggttatggagaatatttggtaaccctattacacgtggaaggaatggggg  
gtcatttatagcagaaaagacatgcataataggagcattaaaagtgaagaccattaaaagtgtagtcagtaggtggggagagag  
ggtaaaaaaagttgacgggcaaatagtagagaatgagagaagggaagagtagaggtgcaactcaatgcaatagatatttggctgcc  
accaatattagatttcaatagaagtaaaagaatattggtatttccgtaggaatggcacggttatgtctcataaataagttcataggtggac  
agtgtaggacttggttatttggatggagtgcttctgtgtaaaactatttggtaaccctattacacgtggaaggaatgggggcttccct  
taggttgaatagtttagtggtccatgaaggcaagatttgaatttggctctgttctctccaccatagtgtagttatttctaagtat  
acatttccctcctgctttagccaacatggcagctcaataaacctcctgctgcttccagggcttctgctggctaaactcctggctcag  
agcaagcatggcatatcatggcatgaggaactggcaaggggcccactgcatgctgggtaacatttgcagtgccagggtatattcagca  
ctctaggaactggagaattttaaattctctgtttataaaaggccctcagctgaccattctttagccatgaggaagcttcccttggaaatg  
gtttttacaacatggaacagatcatttctcatctgtgaaatgtctcatgtttctatttttgcaggcactgtataatgtaaaagttaggg  
ctgtatcattgtagagcagttctgtgatatttccatgaactgtaattgggtgggtgaccccagctggaatccataatgcacccta  
gtgattgagcttgtgccatttttagactcttggattttttttagtattcttataacttttgggtggcacattaaccatgctggatc  
ataaataaatttggctgatttgggagaagggttcccttaccatgatttggctcagtaactgttagtcagtaactgttagtgccatgaaagt  
ccatagatacggataagcaaggccaatagatgctgggatttccattaaacttaattttttaaattttttcagggactgctgaa  
CAGAAGCAGCTTGTGATTGGAGGTGAAGCCTGTATGTGGGGTGAATTTGTGGATGCCACTAATCTTACTCCAAGACTATGgtatgtct  
gtgccattctgtattctgcctgacacatgtatagctatatttggccatagatgtatttggataaaaggcacacattgcttggctgggtg  
caatctatggcagtgaaatccatctgaaatgtcaatttggcaattcttcccctgtatcccgcag**GCCTCGGGGAGTGCTGTAGCTGA**  
**GAGACTGTGGAGCAACCAGAATGTGACGTGAGTGGGAGATGCTTACAATCGGCTTGTCAAACACCGCTGCCGTATGCTCAGG**tcaggt  
ccgtgctgaactcactagtctcactgctcaaacagcagtggtatcaatgcaggaggcaggaattgacttagcttagaataatccctga  
ttcatagagcagcagctcaccatattgtactgtgagtttggactccagagttccttttggaaatgtaaaatcttctcacaatagaa  
ggattcatagaataatataaaaaatacaagcagtgtaactgtttttagcttaactctttggggcccaagcaataaaggcaaggtgctt  
attagcactagagggagctgggttgtatctaggtaccaggaactactatagcggctgaaatagagattgaaataaaatggttaa  
tacactttacattacaagtctgatgaattgtagacgtggaggcattttattcatgtaaaatccagccactttgggttttctcttctcatt  
tattccatggcactcctggcaagattctgtactttaaacactgtacagcaggttaagcgggttaattttaaagccaggttgcctttttt  
tcatctccagataaaatagctgcacatcataatttaaaggcagtgatcacagaaagtgcttcttgcactgggtggctcggggcagagc  
actttgaataaaaaaaatcctaaatgttggcttattcagagctcagcggctatgttagtgccagtggaagaaactttcattggtgta  
gggtgcttgaagtgaaagttatagagcttttacacatgggcattttctctgcttctctatgggtgaaatgtttcacaacttctgct  
caggaatgcaggaagaaactaagcctgtactttcattaggtttcactgggctggagcattcctaaagctagcttggcaacaacg  
gccaacttccagtttacttactgacatgatttggtttccctttcag**agCGTGGAAATAGCAGCTGAGCCTTTATATGTGGGATAC**  
**TGTGACCATGAGCTGGATGCTAG**taataacatttggctatttctcctcaacgtagcctttagtttacagcagcacaac

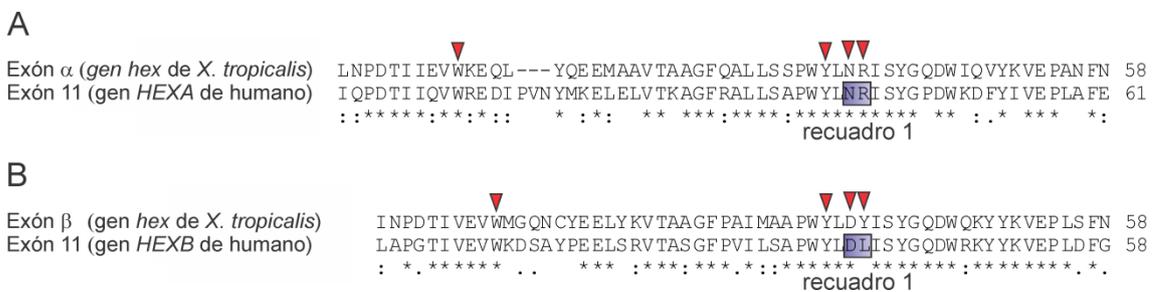
**Figura 18. Gen *hex* de *X. tropicalis*.** **A-** Diagrama mostrando las regiones de homología entre las secuencias exónicas de los genes *HEXA* y *HEXB* de humano y el gen de la Hex de *X. tropicalis* identificado; y entre este último y el ADNc JN127371 (*X. laevis*) (adaptado de UCSC Genome Browser). **B-** Secuencia genómica del gen de la Hex de *X. tropicalis* (xenTro3 refGene\_NM001127137; rango=GL172749: 1795194-1820026). Los exones se muestran en letras mayúsculas y sombreadas en gris. Los exones que codifican los fragmentos polipeptídicos que definen la identidad del sitio activo de la Hex como  $\alpha$  o  $\beta$  (traducidos *in silico* por encima de su secuencia) se muestran sombreados en verde ( $\beta$ ) o amarillo ( $\alpha$ ). Las secuencias resaltadas en negrita en los extremos de cada intrón muestran los sitios dadores (5' GT) y aceptores (3' AG) de splicing.

Como se describió en la introducción, los sitios activos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las distintas isoformas de la Hex en los humanos se diferencian en sólo 2 de los 12 residuos de aminoácidos endógenos que los componen. El sitio activo de la subunidad  $\alpha$  presenta un residuo de Asn (N) y uno de Arg (R) en las posiciones 423 y 424 que son reemplazados por un residuo de Asp (D) y una Leu (L) en el sitio activo de la subunidad  $\beta$  (Lemieux y col., 2006). La presencia de estos residuos determina la especificidad de carga de los sustratos que las distintas isoformas pueden metabolizar.

Un estudio comparativo entre los genes *HEXA* y *HEXB* y el gen *hex* de *X. tropicalis* identificado mostró que los exones que codifican las regiones polipeptídicas que contienen estos residuos de aminoácido variables (NR o DL) entre los sitios activos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de humano (exón 11 del gen *HEXA* y *HEXB*, respectivamente) están contenidos en el mismo gen en *X. tropicalis* (fig. 19A). El alineamiento de estos exones se muestra en detalle en la figura 20.



**Figura 19. Caracterización del gen *hex* de *Xenopus*.** **A-** Diagrama mostrando la estructura exón-intrón del gen *hex* de *X. tropicalis*; de los exones de los genes *HEXA* y *HEXB* de humano homólogos a los exones del gen *hex* de *X. tropicalis*; y de los ARNm secuenciados con ORF completo que se predice que son transcritos desde el gen de *hex* de *X. tropicalis* (BC161740 y BC161249). Los exones codificantes para las zonas polipeptídicas que determinan la naturaleza del sitio activo de la Hex como  $\alpha$  o  $\beta$  son denominados como exón 11 en los genes de humano y como exón  $\alpha$  y exón  $\beta$  en el gen de *X. tropicalis*. Diagrama tomado de UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) y levemente modificado para su mejor entendimiento. **B-** Diagrama mostrando la secuencia de los intrones (en letras minúsculas y subrayados) que flanquean a la de los exones (en letras mayúsculas y sombreadas)  $\alpha$  y  $\beta$  del gen de la Hex de *X. tropicalis*. En los extremos de cada intrón se resaltan en negrita los sitios dadores (GT) y aceptores (AG) de splicing. Las secuencias internas de los exones e intrones fueron removidas por razones de espacio y son señalizadas con puntos doble. Por encima de los exones se muestra su traducción *in silico* para facilitar la comparación con las figuras 18B y 20.

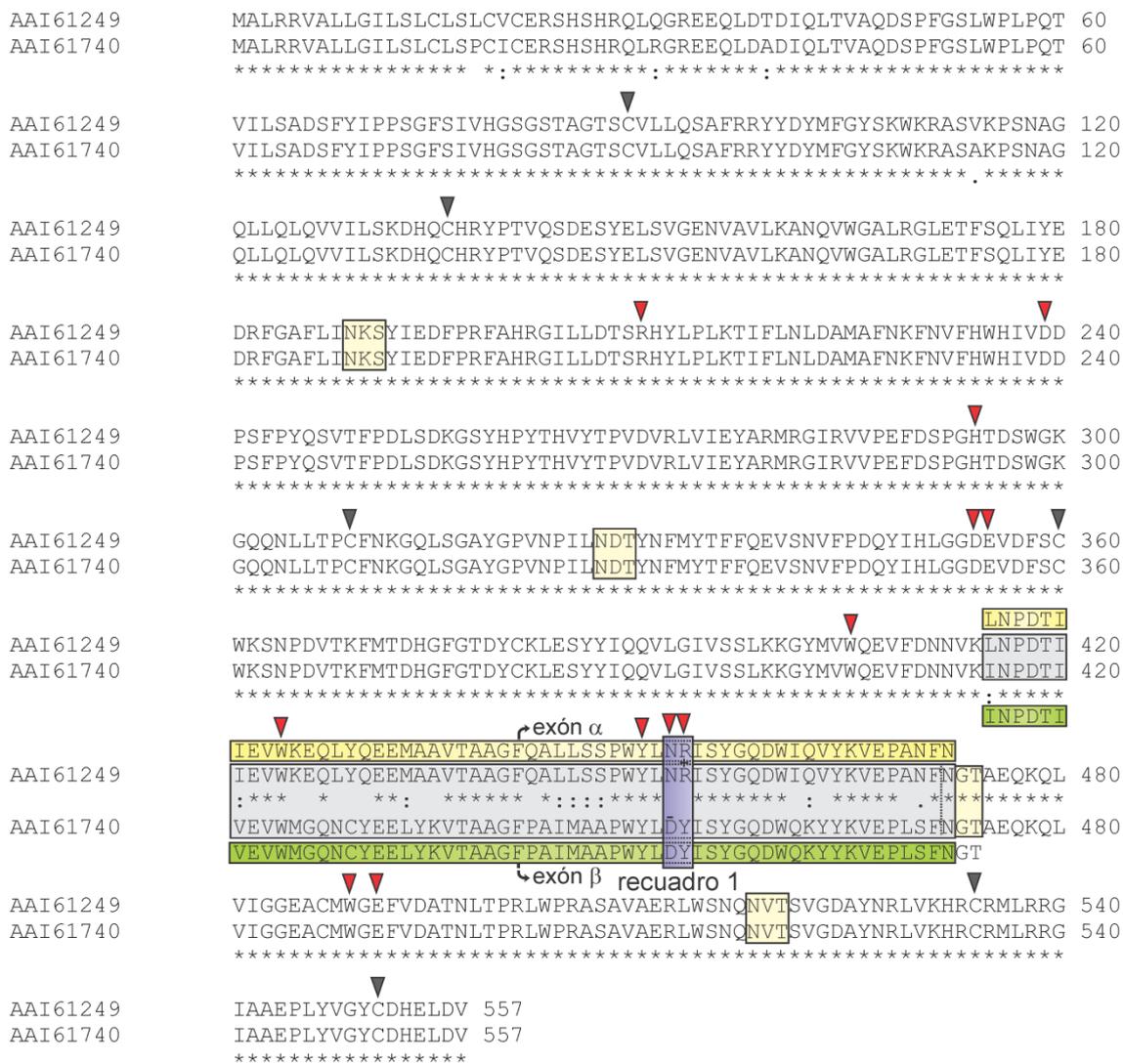


**Figura 20. Alineamiento entre los polipéptidos codificados en el exón 11 de los genes (A) *HEXA* o (B) *HEXB* de humano y de los polipéptidos codificados en sus exones homólogos del gen *hex* de *X. tropicalis* (exón  $\alpha$  y exón  $\beta$  en la figura 19). Los asteriscos indican los residuos de aminoácido conservados en las dos secuencias alineadas. Las flechas rojas indican los residuos de aminoácido que forman parte del sitio activo en las Hexs de humano. El recuadro 1 muestra los residuos de aminoácido que definen la naturaleza del sitio activo de las subunidades que constituyen las Hexs de humano como  $\alpha$  (NR) o  $\beta$  (DL).**

Estos hallazgos permiten suponer que en los anfibios se podrían sintetizar polipéptidos con sitios activos con actividades enzimáticas similares a las encontradas en las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano a partir de un mismo gen.

Para confirmar la funcionalidad de los exones que definirían la especificidad del sitio activo de la Hex de *X. tropicalis* como  $\alpha$  o  $\beta$  se estudiaron las secuencias nucleotídicas de los intrones que los flanquean para determinar la presencia de sitios dadores (GT) y aceptores (AG) de splicing. Los tres intrones que flanquean a estos exones muestran en sus extremos la presencia de los dinucleótidos GT a AG necesarios para su correcta remoción por la maquinaria de splicing (fig. 18B y 19B), sugiriendo que ambos exones son funcionales.

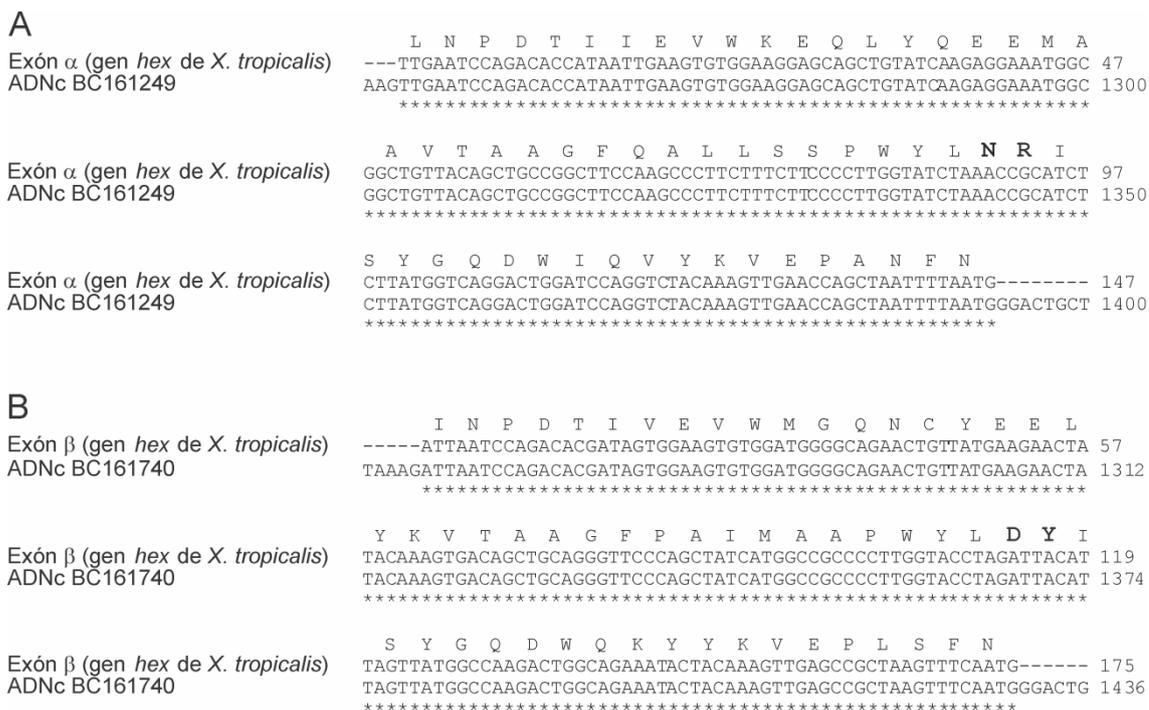
Una búsqueda realizada por similitud de secuencias (UCSC Genome Browser) entre los ADNc de *X. tropicalis* secuenciados a la fecha que contienen ORF completo, y el gen *hex* de *X. tropicalis* identificado predijo que dos ARNm (GenBank ID BC161740 y BC161249) secuenciados a partir de una biblioteca de expresión de intestino de *X. tropicalis* (Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative) podrían transcribirse a partir de este gen (fig. 19A). El alineamiento de los polipéptidos predichos desde estos transcritos (GenBank ID: AAI61740 codificado en el ADNc BC161740 y GenBank ID: AAI61249 codificado en el ADNc BC161249) se muestra en la figura 21.



**Figura 21. Alineamiento de los polipéptidos deducidos desde los ARNm que se predice que son transcritos del gen *hex* de *X. tropicalis*.** Los asteriscos indican los residuos de aminoácido conservados en las dos secuencias alineadas. La región polipeptídica divergente entre ambos polipéptidos se muestra sombreada en gris. Las secuencias de aminoácidos predichas desde las secuencias nucleotídicas de los exones  $\alpha$  o  $\beta$  del gen *hex* de *X. tropicalis* se muestran sombreadas en amarillo o verde, respectivamente, por encima y por debajo de la zona con la que se corresponden en el alineamiento. Las flechas rojas señalan los residuos de aminoácido que conforman el sitio activo de la Hex. El recuadro 1 muestra los dos residuos de aminoácido variables del sitio activo de la Hex que definirían su especificidad como  $\alpha$  o  $\beta$ . Las flechas negras señalan los residuos de cisteínas que se predice que formarían enlace disulfuro. Los recuadros canela muestran los sitios potenciales de N-glucosilación.

Llamativamente el alineamiento de estos polipéptidos muestra que existe una elevada identidad de secuencia entre ellos (~95%) excepto en las regiones polipeptídicas que definen la especificidad de sus sitios activos como  $\alpha$  o  $\beta$  (sombreados en gris en la fig. 21). El análisis de los residuos de aminoácido que componen el sitio activo de la Hex contenidos en estas regiones mostró que el polipéptido AAI61249 presenta los residuos de aminoácido NR que definen el sitio

activo de tipo  $\alpha$ , mientras que el polipéptido AAI61740 presenta el residuo de D clave que define el sitio activo de tipo  $\beta$  (fig. 21, recuadro 1). Interesantemente, las secuencias nucleotídicas que codifican estas regiones divergentes en los ADNc BC161249 y BC161740, mostraron un 100% de identidad con las secuencias genómicas de los exones  $\alpha$  (BC161249) y  $\beta$  (BC161740) del gen *hex* de *X. tropicalis* identificado (fig. 22), permitiendo deducir que son transcriptas a partir de ellos.



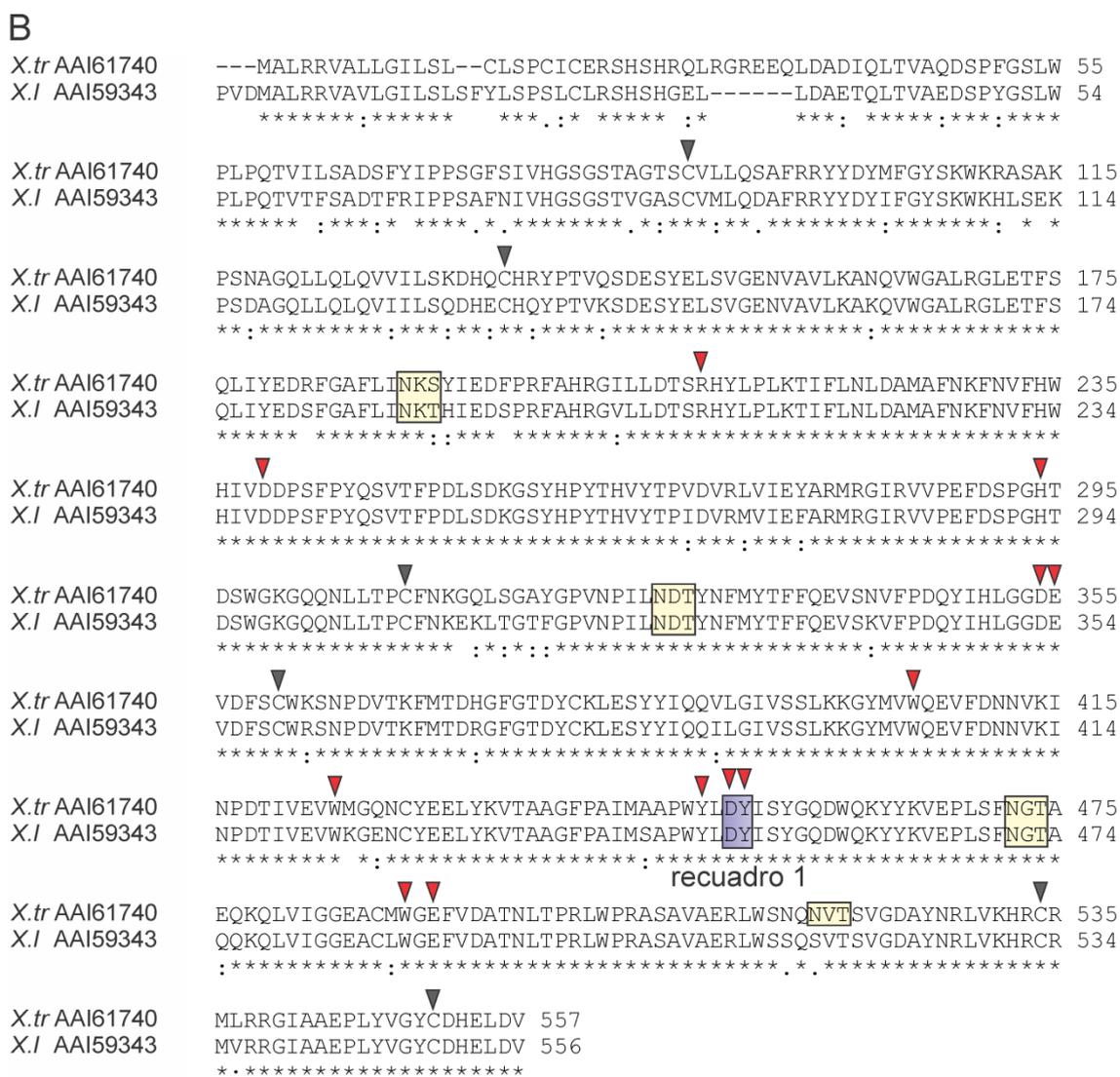
**Figura 22. Alineamiento entre (A) la secuencia nucleotídica del exón  $\alpha$  del gen *hex* de *X. tropicalis* y la secuencia nucleotídica que se corresponde en el ADNc BC161249 (codificante para AAI61249) y; (B) entre la secuencia nucleotídica del exón  $\beta$  del gen *hex* de *X. tropicalis* y la secuencia nucleotídica que se corresponde en el ADNc BC161740 (codificante para AAI61740). Los asteriscos indican los nucleótidos conservados en las dos secuencias alineadas. Por encima de los alineamientos se muestra su traducción *in silico* para facilitar la comparación con la figura 21.**

Polipéptidos altamente homólogos a los que se predice que son sintetizados a partir del gen *hex* de *X. tropicalis* fueron encontrados en *X. laevis*: GenBank ID AEJ87970 y GenBank ID AAI59343 (fig. 23).

III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios

A

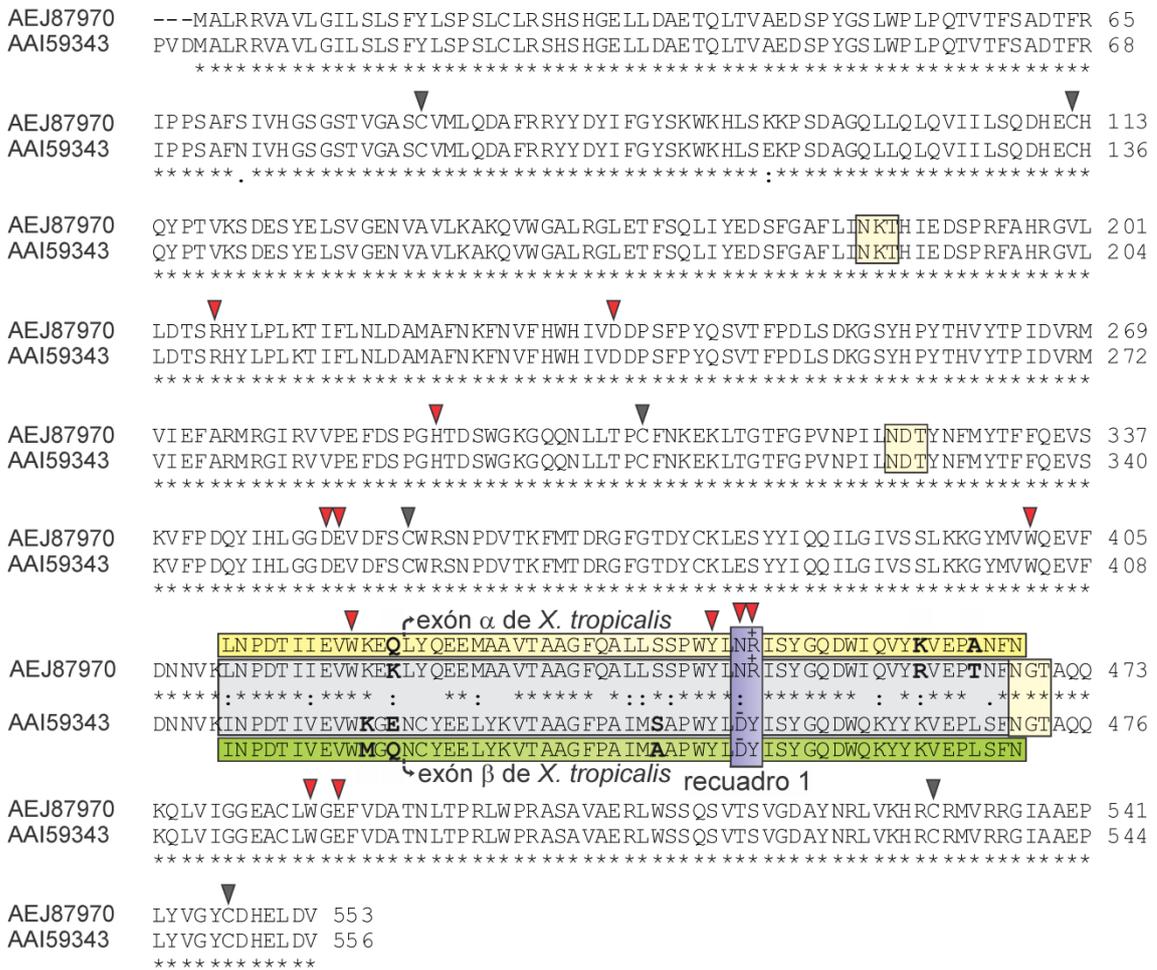
<i>X.tr</i> AAI61249	MALRRVALLGILSL--CLSLCVCERSHSHRQLQGREGQLDQDIQLTVAQDSPFGSLWPLP	58
<i>X.l</i> AEJ87970	MALRRVAVLGILSLSFYLSPSLCLRSHSHGEL-----LDAETQLTVAEDSPYGSWPLP	54
	*****:***** ** .:* ***** :* **:: *****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	QTVILSADSIFYIPPSGFSIVHGSGSTAGTSCVLLQSAFRYYDYDMFGYSKWKRASVKPSN	118
<i>X.l</i> AEJ87970	QTVTFADTFRIPPFAFIVHGSGSTVGASCVMLQDAFRYYDYIFGYSKWKHLKSKPSD	114
	*** :***:* ****.*****.*:***:*.*****:*****: * **:	
<i>X.tr</i> AAI61249	AGQLLQLQVVILSKDHQCHRYPTVQSDSESYELSVGENVAVLKANQVWGALRGLETFSQLI	178
<i>X.l</i> AEJ87970	AGQLLQLQVVIILSQDHECHQYPTVKSDSESYELSVGENVAVLKAKQVWGALRGLETFSQLI	174
	*****:***:*.**:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	YEDRFGAFLINKSYIEDFPRFAHRGILLDTSRHYLPLKTI FLNLDAMAFNKFNVFHWIIV	238
<i>X.l</i> AEJ87970	YEDSFGAFLINKTHIEDSPRFAHRGVLLDTSRHYLPLKTI FLNLDAMAFNKFNVFHWIIV	234
	*** *****:.* ** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	DDPSFPYQSVTFPDLSDKGSYHPYTHVYTPVDVRLVIEYARMRGIRVVPFEDSPGHTDSW	298
<i>X.l</i> AEJ87970	DDPSFPYQSVTFPDLSDKGSYHPYTHVYTPIDVRMVEYFARMRGIRVVPFEDSPGHTDSW	294
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	GKGQQNLLTPCFNKGQLSGAYGPVNPIINDTYNFMYTFQEVSNVFPDQYIHLGGDEVDF	358
<i>X.l</i> AEJ87970	GKGQQNLLTPCFNKEKLTGTFGPVNPIINDTYNFMYTFQEVSKVFPDQYIHLGGDEVDF	354
	*****:***:*.**:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	SCWKSNDPDKFMTDHGFGTDYCKLESYYIQQVLGIVSSLKKGVMVWQEVFDNNVKLNPD	418
<i>X.l</i> AEJ87970	SCWRSNDPDKFMTDRGFGTDYCKLESYYIQQILGIVSSLKKGVMVWQEVFDNNVKLNPD	414
	***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>X.tr</i> AAI61249	TII EVWKEQLYQEEMAAVTAAGFQALLSSPWYLNRISYGQDWIQVYKVEPANFNGTAEQK	478
<i>X.l</i> AEJ87970	TII EVWKEKLYQEEMAAVTAAGFQALLSSPWYLNRISYGQDWIQVYRVEPTNFNGTAQK	474
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***	
	<b>recuadro 1</b>	
<i>X.tr</i> AAI61249	QLVIGGEACMWGEFVDATNLTPRLWPRASAVAERLWSNQNVTSVGDAYNRLVKHRCRMLR	538
<i>X.l</i> AEJ87970	QLVIGGEACLWGEFVDATNLTPRLWPRASAVAERLWSSQSVTSVGDAYNRLVKHRCRMVR	534
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*	
<i>X.tr</i> AAI61249	RGIAAEPLYVGYCDHELDV	557
<i>X.l</i> AEJ87970	RGIAAEPLYVGYCDHELDV	553
	*****	



**Figura 23. Polipéptidos deducidos de *X. laevis* (*X.l*) homólogos a los polipéptidos deducidos de *X. tropicalis* (*X.tr*) que serían sintetizados desde el gen *hex*. A- Alineamiento de los polipéptidos AEJ87970 de *X. laevis* y AAI61249 de *X. tropicalis* y; B- alineamiento de los polipéptidos AAI59343 de *X. laevis* y AAI61740 de *X. tropicalis*. Los asteriscos indican los residuos de aminoácido conservados entre las secuencias alineadas. Las flechas rojas señalizan los residuos de aminoácido que conforman el sitio activo de la Hex. El recuadro 1 resalta los dos residuos de aminoácido del sitio activo de la Hex que definen su especificidad como  $\alpha$  (NR; GenBank ID: AAI61249 y AEJ87970) o  $\beta$  (DY; GenBank ID: AAI61740 y AAI59343). Las flechas negras señalan los residuos de cisteínas que se predice que estarían unidos por enlace disulfuro. Los recuadros canela muestran los sitios potenciales de N-glucosilación.**

Al igual que en *X. tropicalis* el alineamiento de estos polipéptidos de *X. laevis* mostró una elevada identidad entre ellos (~96%) excepto en los fragmentos polipeptídicos que definen la especificidad de sus sitios activos como  $\alpha$  o  $\beta$  (fig. 24). Interesantemente, estos fragmentos polipeptídicos disímiles (sombreados en gris en la figura 24) presentaron una alta similitud (95% de identidad y 99% de similitud) con los

fragmentos polipeptídicos deducidos desde los exones  $\alpha$  y  $\beta$  del gen *hex* de *X. tropicalis* (fig. 24).



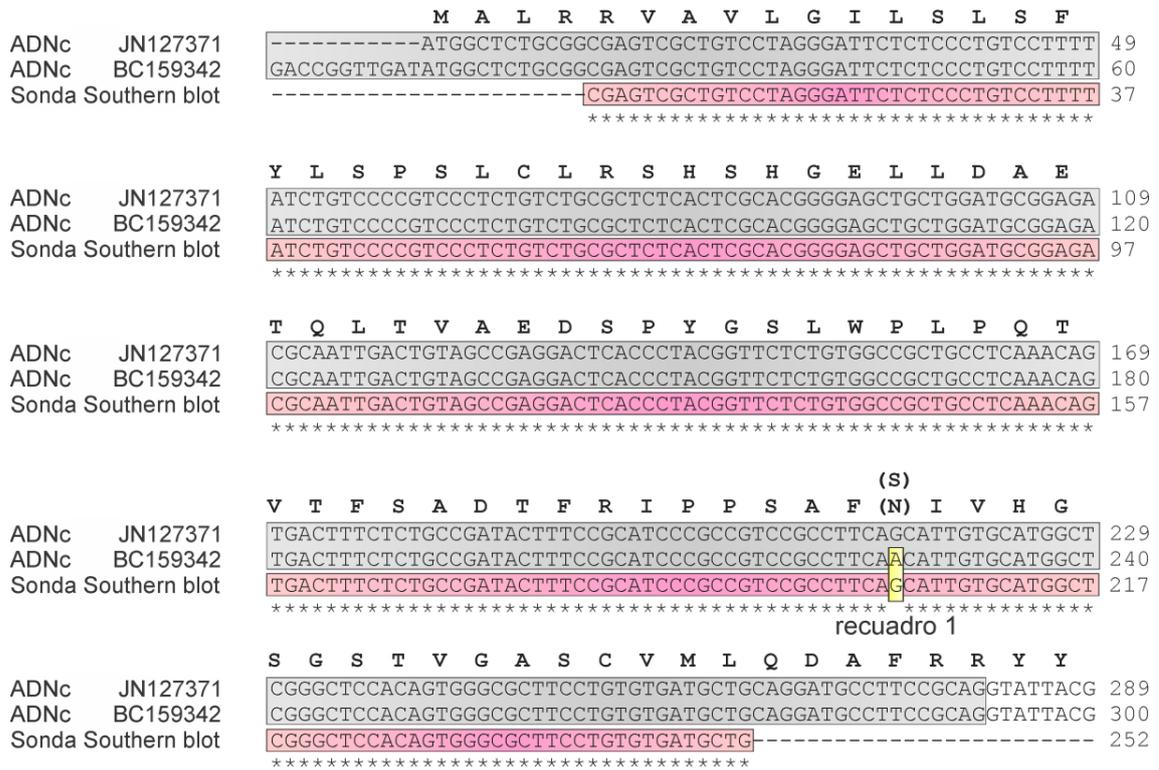
**Figura 24. Alineamiento de los polipéptidos deducidos de *X. laevis* que serían sintetizados desde el gen *hex* de *Xenopus*.** Los asteriscos indican los residuos de aminoácido conservados entre las secuencias alineadas. La región polipeptídica divergente entre ambos polipéptidos se muestra sombreada en gris. Las secuencias sombreadas en amarillo o verde, por encima y por debajo de las secuencias alineadas, muestran las regiones polipeptídicas codificadas en los exones  $\alpha$  o  $\beta$  del gen *hex* de *X. tropicalis*. En negrita se resaltan los residuos de aminoácido variables entre el fragmento polipeptídico codificado en el exón  $\alpha$  de *X. tropicalis* y su fragmento homólogo en el polipéptido de *X. laevis* AEJ87970; y entre el fragmento polipeptídico codificado por el exón  $\beta$  de *X. tropicalis* y su fragmento homólogo en el polipéptido de *X. laevis* AAI59343. Las flechas rojas señalan los residuos de aminoácido que componen el sitio activo de la Hex. El recuadro 1 muestra los dos residuos de aminoácido variables del sitio activo de la Hex que definen su naturaleza como  $\alpha$  (NR; en AEJ87970) o  $\beta$  (DY; en AAI59343). Las flechas negras señalan los residuos de cisteína que se predice que estarían unidos por enlace disulfuro. Los recuadros canelados muestran los sitios potenciales de N-glucosilación.

Estos hallazgos sugieren, en su conjunto, que en *Xenopus* polipéptidos con sitios activos Hex de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  podrían ser sintetizados desde un mismo gen por splicing alternativo.

### B3- Determinación del número de genes codificantes para las Hexs identificadas en *X. laevis*

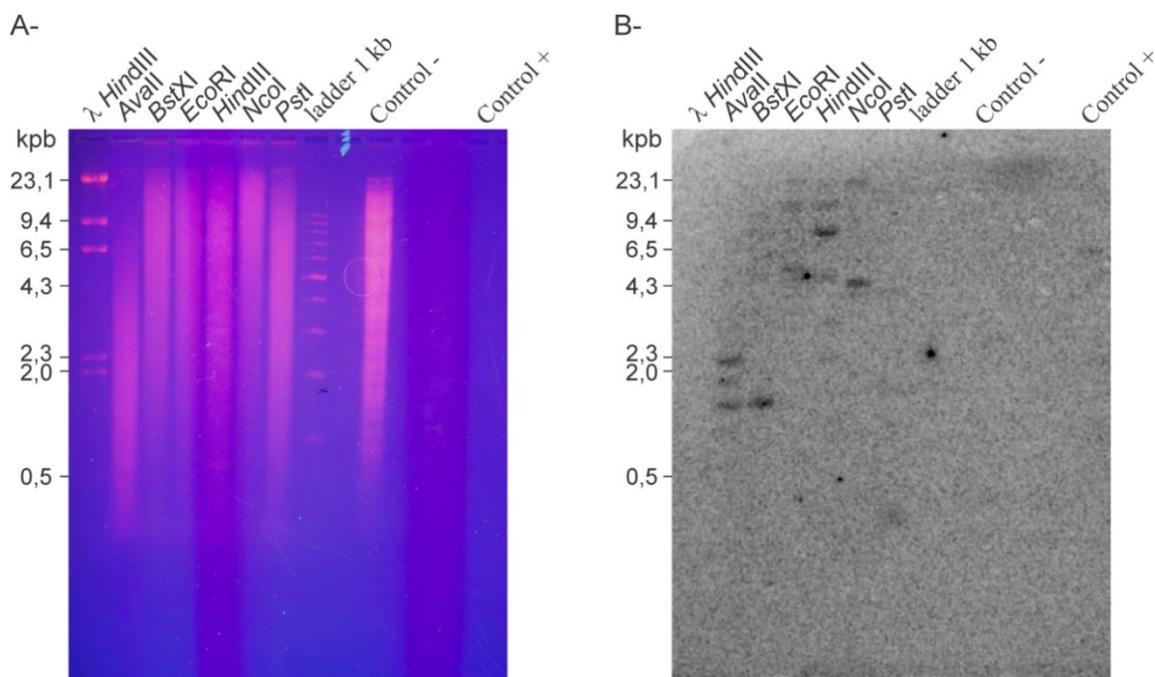
Los hallazgos bioinformáticos encontrados en el apartado anterior permiten suponer que en *Xenopus*, y tal vez en el resto de los anfibios, los polipéptidos con sitios activos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs se podrían sintetizar por medio del splicing alternativo de los exones contenidos en un mismo gen. Sin embargo, un análisis minucioso del alineamiento de estos polipéptidos, tanto en *X. laevis* como en *X. tropicalis* (fig. 21 y fig. 24), muestra la existencia de pequeñas diferencias entre sus secuencias (5/557 residuos de aminoácido entre los polipéptidos de *X. tropicalis* y 2/553 residuos de aminoácido entre los polipéptidos de *X. laevis*) por fuera de la zona que sería codificada en los exones alternantes  $\alpha$  o  $\beta$ , sugiriendo la existencia de diferentes variantes alélicas del gen *hex* en *Xenopus* o su reciente duplicación. Esta última posibilidad fue estudiada por medio de experimentos de Southern blot, utilizando una sonda de 252 pb sintetizada a partir de una región del ADNc JN127371 que se corresponde con el primer exón del gen *hex* de *Xenopus* (fig. 25). Sin embargo, debido a la imposibilidad de conseguir animales de *X. tropicalis* (anfibio con genoma diploide) en nuestro país se utilizó a *X. laevis* (anfibio con genoma tetraploide) como modelo experimental.

La sonda utilizada presenta, además, un 99,6% de identidad nucleotídica con su fragmento homólogo en el ADNc BC159342, siendo capaz de reconocer él, o los genes, que dieron origen a ambos ADNcs y como consecuencia a los polipéptidos de tipo  $\alpha$  (AEJ87970 codificado en JN127371) y  $\beta$  (AAI59343; codificado en BC159342) de la Hex de *X. laevis* caracterizados.



**Figura 25. Alineamiento de los ADNcs codificantes para los polipéptidos de tipo  $\alpha$  (ADNc JN127371) y  $\beta$  (ADNc BC159342) de la Hex de *X. laevis* y de la sonda utilizada en el experimento de Southern blot (Sonda Southern blot; resaltada en rosa) para determinar el número de genes que los codifica.** Los asteriscos indican los residuos nucleotídicos conservados en las tres secuencias alineadas. Por encima de las secuencias nucleotídicas se muestra su traducción *in silico* para facilitar su comparación con las secuencias polipeptídicas alineadas en la figura 24. Las secuencias nucleotídicas que se predice que están codificadas en el primer exón del gen *hex* de *Xenopus* se muestran sombreadas en gris. El recuadro 1 (sombreada en amarillo) resalta el único nucleótido que varía entre la sonda y el ADNc BC159342.

Los resultados obtenidos en el experimento se muestran en la figura 26.



**Figura 26. Análisis por Southern blot del número de copias del gen *hex* caracterizado en el genoma de *X. laevis*.** **A-** Los fragmentos resultantes de la digestión de 15µg de ADNg de *X. laevis* con las enzimas de restricción *AvaII*, o *BstXI*, o *EcoRI*, o *HindIII*, o *NcoI*, o *PstI* fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % p/v y teñidos con bromuro de etidio. Control -: ADNg de *S. marcescens* digerido con la enzima de restricción *BamHI*. Control+: ADN plasmídico linealizado conteniendo el ADNc JN127371 (5,8 kpb). ladder 1 kb y λ *HindIII*: marcadores de tamaño molecular Ladder DNA 1kb (Biodynamics) y ADNg del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*. **B-** Los fragmentos de ADNg provenientes de cada digestión y separados en el gel de agarosa, fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup> y unidos covalentemente a ella por tratamiento térmico. El número de fragmentos de ADNg codificantes para las Hexs de *X. laevis* caracterizadas fueron detectados utilizando una sonda radioactiva ( $1 \times 10^4$  cpm/ml) complementaria al primer exón del gen *hex* de *Xenopus* caracterizado.

En los experimentos de Southern blot es frecuente la aparición de bandas de hibridación de elevado tamaño (~23 kb) ocasionadas por hibridaciones a ADNg incompletamente digerido, como se observa en las calles correspondientes a los digeridos realizados con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* y *NcoI*. Descartando estas bandas, una única banda de hibridación se observa en la calle correspondiente a los digeridos de ADNg realizados con las enzimas de restricción *BstXI* o *NcoI*. La presencia de una única banda de hibridación en estos digeridos sugiere que los ADNc codificantes para las polipéptidos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  caracterizados para la Hex de *Xenopus* podrían ser sintetizados desde un mismo locus génico, como fue predicho *in silico*.

En las calles correspondientes a los digeridos realizados con las enzimas de restricción *AvaII*, *EcoRI* y *HindIII* se evidenciaron dos o tres fragmentos de hibridación. Dadas las condiciones de temperatura y astringencia utilizadas en este experimento es

improbable que estas bandas provengan de hibridaciones inespecíficas. Además, la especificidad de la sonda, y las condiciones de alta astringencia utilizadas en este experimento, fueron demostradas por la ausencia de bandas de hibridación en el digerido de ADN<sub>g</sub> de *S. marcescens* (utilizado como control negativo de hibridación) y por la presencia de una banda de hibridación del tamaño esperado (~5,8 kpb) en el calle de siembra correspondiente al plásmido linealizado que contenía el ADN<sub>c</sub> JN127371.

### **C- EXPRESIÓN DE LA HEX DE *X. LAEVIS* CODIFICADA EN EL ADN<sub>c</sub> JN127371 EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO**

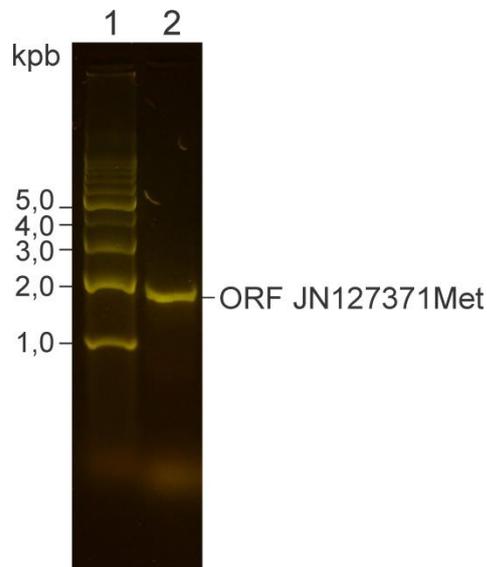
En los apartados anteriores se identificaron ADN<sub>c</sub> que codifican para Hexs de *X. laevis* y de *X. tropicalis* y se obtuvieron sus secuencias polipeptídicas por medio de la traducción *in silico* de los ORF contenidos en ellos. La identidad Hex de estos polipéptidos fue validada por métodos bioinformáticos a través de la comparación de sus secuencias y características estructurales, con las de otras Hex de vertebrados caracterizadas. A pesar de ello, la prueba más contundente sobre la verdadera identidad bioquímica de una proteína es su actividad biológica.

Para determinar si la proteína codificada en el ADN<sub>c</sub> JN127371 es una verdadera Hex de *X. laevis*, como fue predicho por métodos bioinformáticos, se planteó como siguiente objetivo expresarla en células eucariotas para evaluar su actividad Hex.

#### *C1- Adecuación del marco de lectura abierto de la Hex de *X. laevis* codificada en el ADN<sub>c</sub> JN127371 para su expresión en células eucariotas*

Como se describió en el apartado A de este capítulo el ORF codificado en el ADN<sub>c</sub> JN127371 (ORF JN127371 de aquí en adelante) carece de los dos primeros residuos nucleotídicos (AT) que compondrían el codón ATG (codificante para un residuo de metionina) que señala el inicio de la traducción. Con el objetivo de reconstituir este codón, en el contexto de una secuencia Kozak que facilite su reconocimiento por la maquinaria de traducción de las células eucariotas, se diseñaron cebadores específicos (fig. 11; materiales y métodos) que introducirían los residuos nucleotídicos AT en la posición predicha por medio de una reacción de PCR. Ambos cebadores, además, adicionan sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción que facilitan el clonado del ORF JN127371 amplificado.

Los cebadores anteriormente descritos fueron utilizados para amplificar por PCR un fragmento del ADNc JN127371 que abarca su ORF completo. Un único fragmento de ADN del tamaño esperado (~1,7 kpb) fue evidenciado cuando el producto de la reacción de PCR fue resuelto por electroforesis en un gel de agarosa (fig. 27).



**Figura 27. Adecuación por PCR del ORF JN127371 para su expresión en células eucariotas.** El ORF contenido en el ADNc JN127371 fue amplificado por PCR utilizando los cebadores mostrados en la figura 11 (materiales y métodos). El producto de la reacción fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. Calle 1: Marcador de tamaño molecular Ladder 1 kpb (PB-L); Calle 2: reacción de PCR.

El fragmento de ADN amplificado por PCR (ORF JN127371Met) fue clonado en el vector pGEM-T Easy y luego subclonado en el vector pcDNA3 para su expresión en células eucariotas. La reconstrucción del codón que señala el inicio de la traducción en el ORF JN127371Met y su integridad traduccional fueron verificados a través de su secuenciación completa utilizando los cebadores descritos en la Tabla III (materiales y métodos). La secuencia obtenida es mostrada en la figura 28.

*III: Caracterización bioquímica y molecular de la Hex de anfibios*

AATCGGCCGAGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGCCGCGGGAATTCGATT <u>TGAATCGATAGATCT</u>	68
<b>M A L R R V A V L G I L S L S F Y L S</b>	<b>19</b>
AAGCTT <u>GCCACCATG</u> GCTCTGCGGCGAGTCGCTGTCTAGGGATTCTCTCCCTGTCCCTTTTATCTGTCT	136
<b>P S L C L R S H S H G E L L D A E T Q L T V</b>	<b>41</b>
CCCGTCCCTCTGTCTGCGCTCTCACTCGCACGGGGAGCTGCTGGATGCGGAGACGCAATTGACTGTAG	204
<b>A E D S P Y G S L W P L P Q T V T F S A D T F</b>	<b>64</b>
CCGAGGACTCACCTACGGTTCTCTGTGGCCGCTGCCTCAAACAGTGACTTTTCTCTGCCGATACTTTT	272
<b>R I P P S A F S I V H G S G S T V G A S C V M</b>	<b>87</b>
CGCATCCCGCCGTCCGCCTTCAGCATTGTGCATGGCTCGGGCTCCACAGTGGGCGCTTCTGTGTGAT	340
<b>L Q D A F R R Y Y D Y I F G Y S K W K H L S</b>	<b>109</b>
GCTGCAGGATGCCTTCCGAGGTATTACGATTACATATTTGGCTATTCAAATGAAACATTTGTCTA	408
<b>K K P S D A G Q L L Q L Q V I I L S Q D H E C</b>	<b>132</b>
AAAAGCCCTCTGATGCTGGCCAGTTGCTGCAGCTTCAAGTTATAATTCTTTCTCAGGATCATGAATGC	476
<b>H Q Y P T V K S D E S Y E L S V G E N V A V L</b>	<b>155</b>
CATCAGTATCCCACTGTAAATCAGATGAATCATATGAACTGAGTGTGGAGAGAATGTCGCTGTCCCT	544
<b>K A K Q V W G A L R G L E T F S Q L I Y E D</b>	<b>177</b>
GAAAGCAAAGCAAGTTTGGGGCGCTCTCAGAGGGCTGGAGACTTTTCACTCAACTCATCTATGAAGACA	612
<b>S F G A F L I N K T H I E D S P R F A H R G V</b>	<b>200</b>
GTTTTGGAGCTTTTCTGATCAACAAGACTCATATAGAGGATTCCCAAGGTTTGCACACAGAGGAGTT	680
<b>L L D T S R H Y L P L K T I F L N L D A M A F</b>	<b>223</b>
CTACTGGACACTTCCAGGCATTACCTGCCGCTCAAACCATTTTTTCTGAACTTGGACGCAATGGCGTT	748
<b>N K F N V F H W H I V D D P S F P Y Q S V T</b>	<b>245</b>
TAACAAGTTTAAATGTGTTTCACTGGCATATTGTTGATGATCCATCTTCCCCTACCAGAGTGTTACTT	816
<b>F P D L S D K G S Y H P Y T H V Y T P I D V R</b>	<b>268</b>
TTCCTGATCTAAGTGACAAGGGTTCTTATCACCCATACACACGTTTATACCCCCATTGATGTCCGG	884
<b>M V I E F A R M R G I R V V P E F D S P G H T</b>	<b>291</b>
ATGGTGATTGAATTTGCTAGAAATGAGAGGAATTCGTGTGTACCAGAGTTTGATTCCACGGGACATAC	952
<b>D S W G K G Q Q N L L T P C F N K E K L T G</b>	<b>313</b>
GGATTCTTGGGGTAAAGGGCAACAAAATCTTTTAACTCCTTGCTTCAACAAAGAAAAGCTGACCGGTA	1020
<b>T F G P V N P I L N D T Y N F M Y T F F Q E V</b>	<b>336</b>
CATTTGGCCCTGTCAATCCCATCTAAATGATACTTACAATTTTCAATGTACACGTTTTTTTCAAGAAGTC	1088
<b>S K V F P D Q Y I H L G G D E V D F S C W R S</b>	<b>359</b>
AGCAAAGTTTTCCCTGATCAATACATCCACTTAGGAGGGGATGAAGTAGACTTTTCTTGTCTGGAGATC	1156
<b>N P D V T K F M T D R G F G T D Y C K L E S</b>	<b>381</b>
AAATCCGGATGTTACCAAATTTATGACTGACCGTGGCTTTGGCACAGACTACTGCAAGCTAGAATCAT	1224
<b>Y Y I Q Q I L G I V S S L K K G Y M V W Q E V</b>	<b>404</b>
ATTACATCCAGCAAATCTTGGGCATAGTCTCATCTCTTAAGAAGGGCTACATGGTCTGGCAGGAGGTC	1292
<b>F D N N V K L N P D T I I E V W K E K L Y Q E</b>	<b>427</b>
TTTGATAACAATGTAAAGTTGAATCCAGACACCATAATTGAAGTGTGAAGGAGAAGCTGTATCAAGA	1360
<b>E M A A V T A A G F Q A L L S S P W Y L N R</b>	<b>449</b>
GGAAATGGCAGCTGTTACAGCTGCCGCTTCCAAGCCCTTCTTTCTCTCCTTGGTATCTAAATCGCA	1428
<b>I S Y G Q D W I Q V Y R V E P T N F N G T A Q</b>	<b>472</b>
TCTCATATGGTCAGGACTGGATCCAGGTCTACAGAGTTGAACCAACCAATTTTAAATGGAAGTGCCTTAC	1496
<b>Q K Q L V I G G E A C L W G E F V D A T N L T</b>	<b>495</b>
CAGAAGCAGCTTGTGATTGGAGGGGAAGCCTGTTTGTGGGGTGAATTTGTGGACGCCACCAATCTTAC	1564
<b>P R L W P R A S A V A E R L W S S Q S V T S</b>	<b>517</b>
TCCAAGACTATGGCCTCGAGCGAGTGTGTAGCTGAAAGATTATGGAGCAGCCAGAGTGTGACGTCGG	1632

V G D A Y N R L V K H R C R M V R R G I A A E	540
TGGGAGATGCTTACAATCGGCTTGTGAAACATCGCTGCCGCATGGTCAGGCGCGGAATAGCAGCTGAG	1700
P L Y V G Y C D H E L D V .	553
CCTTTATACGTGGGCTACTGTGACCATGAGCTGGATGTCTGAATTGGTCACATGACACTGCAATTCTT	1768
GCACCACCCGGGTCTAGAACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG	1836
CTCCAACCGCGTTGGAAGCCAAGGTTT	1864

**Figura 28. Secuencia completa del inserto contenido en el plásmido pcDNA3-Hex.** La secuencia completa del inserto contenido en el plásmido pcDNA3-Hex fue obtenida por superposición de las secuencias parciales obtenidas con los cebadores SP6 y T7 (provistos en el plásmido pcDNA3) y de los cebadores directo y reverso mostrados en la tabla III. Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores directo y reverso utilizados en la reacción de PCR. Sombreada en gris se muestra la secuencia Kozak conteniendo el codón ATG (en negrita) que señala el sitio de inicio de la traducción. Por encima de la secuencia nucleotídica se muestra la traducción *in silico* del ORF obtenido para facilitar su comparación con la secuencia presentada en la fig. 15.

En esta secuencia se puede verificar la introducción del codón ATG que señala el inicio de la traducción en el sitio predicho (capítulo III; apartado A) y la ausencia de mutaciones en el ORF JN127371Met.

#### C2- Expresión de la Hex de *X. laevis* codificada en el ADNc JN127371 (GenBank ID: AEJ87970) en células de ovario de hámster chino

La actividad enzimática de una proteína expresada en forma heteróloga requiere de su correcto plegamiento y procesamiento postraduccional. En este sentido, la Hex de humano pudo ser expresada con actividad en cultivos *in vitro* de células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) (Miranda y col., 2000; Hou y col., 2000; Sinici y col., 2006). En consecuencia, la línea celular CHO-K1 (CHO de aquí en adelante) fue seleccionada para evaluar la expresión y actividad de la putativa Hex de *X. laevis* codificada en el ORF JN127371Met.

#### C2A- Transfección de células de ovario de hámster chino con el ADNc JN127371

El vector pcDNA3-Hex fue transfectado en células CHO mantenidas en cultivo una vez alcanzado el 70% de confluencia celular. Para evaluar la eficiencia de la transfección, se transfectaron separadamente células CHO con el vector reportero pHRGFP (Agilent Technologies) en igualdad de condiciones. Este último vector, una vez ingresado a la célula, es capaz de dirigir la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor constitutivo fuerte del citomegalovirus humano (CMV). En consecuencia, las células que recibieron el vector y que expresan a GFP se pueden evidenciar por microscopía de fluorescencia siguiendo la emisión de luz verde.

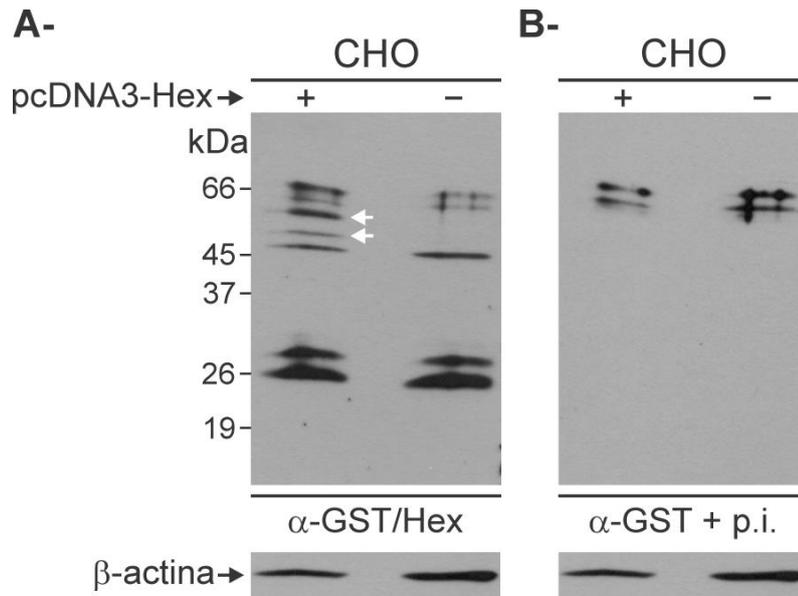
Debido a que fue reportada la existencia de Hexs endógenas en las células CHO (Sinici y col., 2004) también se realizaron réplicas de los cultivos, que no fueron transfectados, para determinar la actividad Hex basal en éstas células.

Las micrografías obtenidas en los cultivos control de células CHO transfectados con el vector phrGFP nos permitieron calcular una eficiencia de transfección aproximada de 15% (figura 29). En base a ello se podría suponer que la misma eficiencia de transfección fue alcanzada para las células CHO transfectadas con pcDNA3-Hex.



**Figura 29. Transfección de células CHO con phrGFP.** Micrografías de campo claro (A) y de fluorescencia verde (B) de los cultivos de células CHO transfectadas con el plásmido phrGFP. C: superposición de las micrografías A y B evidenciando la expresión de la proteína GFP en las células que fueron eficientemente transfectadas. Las flechas amarillas señalan algunas de las células que expresan GFP. Las imágenes corresponden a 24 h posttransfección.

Una vez determinada la funcionalidad y la eficiencia de la transfección, las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex, y sin transfectar, fueron mantenidas en cultivo por 48 h. Trascurrido este plazo las células fueron cosechadas mediante la adición de tripsina y los extractos celulares totales fueron obtenidos en buffer fosfato pH=6,0 por medio de cuatro ciclos de congelamiento y descongelamiento (Sinici y col., 2006). La presencia de polipéptidos provenientes de la expresión del ORF JN127371Met fue verificada por Western blot utilizando anticuerpos policlonales específicos obtenidos en nuestro laboratorio capaces de reconocer su región N-terminal (fig. 30). Estos anticuerpos (antisueros) fueron denominados anti-GST/Hex ( $\alpha$ -GST/Hex) ya que se obtuvieron mediante la inoculación en conejo de la región N-terminal del polipéptido codificado en el ORF JN127371 (GenBank ID: AEJ87970) (ver fig. 17) fusionada a la proteína glutatión S-transferasa (GST). La obtención y validación de los anticuerpos  $\alpha$ -GST/Hex se describe en detalle en el capítulo IV.



**Figura 30. Análisis por Western blot de la expresión del ORF JN127371Met en células CHO.** Las proteínas provenientes de extractos celulares totales de las células CHO transfectados con el vector pcDNA3-Hex (+) y no transfectados (-) fueron resueltas en SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. **A-** Inmunodetección con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Las flechas blancas señalan los polipéptidos heterólogos. **B-** Inmunodetección conjunta con anticuerpos  $\alpha$ -GST y suero preinmune ( $\alpha$ -GST + p.i.). La cantidad de proteínas totales sembradas en cada calle fue verificada incubando la membrana con anticuerpos comerciales anti-actina ( $\beta$ -actina).

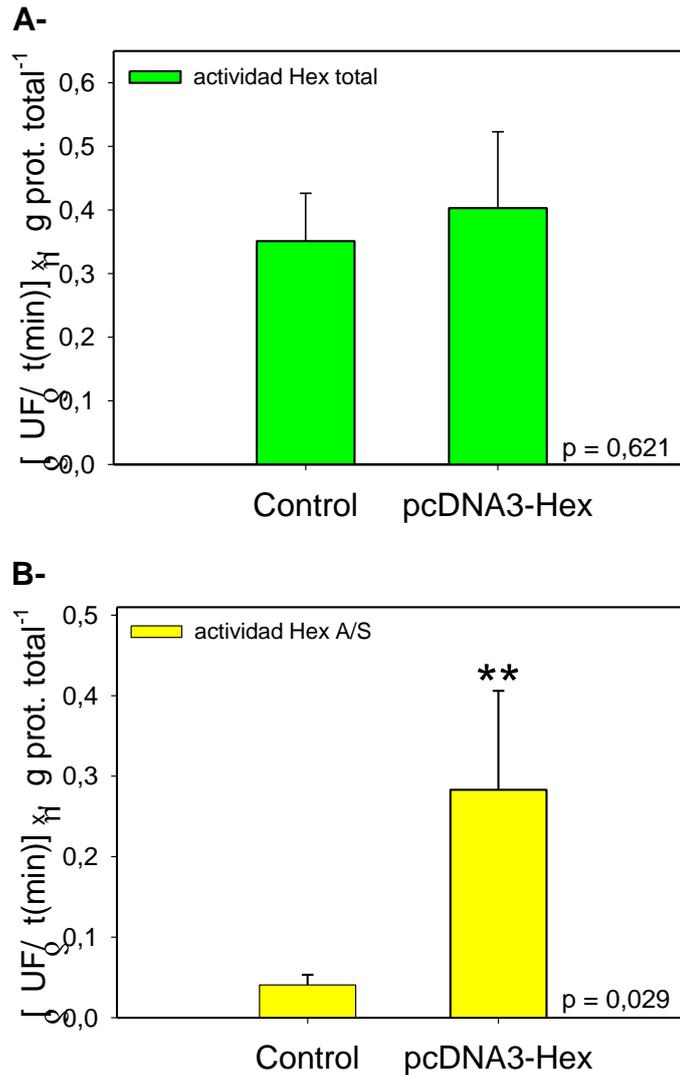
Como se observa en la figura 30, siete bandas proteicas de: ~64 kDa; ~59 kDa; ~56 kDa; ~50 kDa; ~45 kDa; ~28 kDa y ~25 kDa fueron evidenciadas cuando los extractos celulares totales provenientes de las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex fueron inmunodetectados con los anticuerpos  $\alpha$ -GST/Hex. Los polipéptidos de 64 kDa y 59 kDa también fueron evidenciados cuando los mismos extractos fueron expuestos a los anticuerpos control (suero pre-inmune y  $\alpha$ -GST) mostrando ser inespecíficos. Las proteínas de 45 kDa, 28 kDa y 25 kDa fueron evidenciadas tanto en los extractos celulares totales provenientes de células CHO transfectadas como en aquellos provenientes de las células CHO no transfectadas. La presencia de actividad Hex endógena en los extractos de células CHO fue previamente reportada (Sinici y col., 2004; Sinici y col., 2006). En experimentos de SDS-PAGE fue encontrado que las isoformas A y B de la Hex presente en la placenta humana están constituidas por tres proteínas de ~53 kDa (subunidad  $\alpha$  madura), ~30 kDa (subunidad  $\beta$ a) y ~26 kDa (subunidad  $\beta$ b) (Mahuran y col., 1988). Basados en estos reportes, y en que la región N-terminal del polipéptido utilizado para obtener los anticuerpos  $\alpha$ -GST/Hex contiene un pequeño péptido altamente conservado entre las Hexs, aún

entre Hex de especies filogenéticamente distantes (fig. 17, recuadro 1), es probable que estas bandas provengan del reconocimiento específico de las subunidades que constituyen a las Hexs endógenas presentes en las células CHO. Finalmente, las proteínas de ~56 kDa y ~50 kDa mostraron ser específicas y estuvieron sólo presentes en los extractos celulares provenientes de las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex, sugiriendo su síntesis a partir del ORF JN127371 introducido en ellas.

*C2B- Análisis de la actividad Hex en las células ovario de hámster chino transfectadas con el ADNc JN127371*

Como mencionamos en la introducción, los dos residuos de aminoácido variables entre los sitios activos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que componen las distintas isoformas de la Hex en humano (Asn<sub>423</sub> y Arg<sub>424</sub> en el sitio activo  $\alpha$  y Asp<sub>452</sub> y Leu<sub>453</sub> en el  $\beta$ ) serían responsables de la especificidad de los sustratos que pueden metabolizar. Mientras que ambas subunidades pueden metabolizar sustratos neutros, la presencia del Aspartato<sub>452</sub> negativamente cargado en el sitio activo de la subunidad  $\beta$  repele a los sustratos negativamente cargados, siendo sólo la subunidad  $\alpha$  capaz de metabolizarlos. Como consecuencia, a pesar de que las 3 isoformas de la Hex caracterizadas en mamíferos (A( $\alpha\beta$ ), B( $\beta\beta$ ) y S( $\alpha\alpha$ )) pueden metabolizar sustratos neutros, sólo las isoformas A y S, conteniendo subunidades  $\alpha$  en su estructura, pueden metabolizar sustratos negativos.

Con el objetivo de determinar si la transfección de las células CHO con el vector pcDNA3-Hex produce un aumento significativo en alguna de las actividades Hex celulares, se estimó la velocidad de metabolización de los sustratos MUG (metabolizado por todas las isoformas de las Hexs) y MUGS (metabolizado por las subunidades  $\alpha$  encontradas sólo en las isoformas A y/o S) en los extractos celulares totales provenientes de las células CHO transfectadas y control (no transfectadas). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 31.



**Figura 31. Actividad Hex total y HexA/S en los extractos celulares totales provenientes de las células CHO transfectadas con pcDNA3-Hex y control.** A- La actividad específica Hex total y B- Hex de tipo A/S presente en las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex (pcDNA3-Hex) y en las células CHO no transfectadas (Control) fue estimada en forma separada utilizando los sustratos fluorogénicos MUG y MUGS, respectivamente. Para ello se midió la velocidad de aumento de las unidades de fluorescencia ( $\lambda=450\text{nm}$ ) por minuto  $[(\delta\text{UF}/\delta t(\text{min}))]$ , y por microgramo de proteínas totales, en sus extractos celulares totales. Las barras representan el promedio y el desvío estándar obtenido de cuatro experimentos de transfección realizados de forma independiente. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un ensayo t de Student.

La comparación de las actividades Hexs en los extractos celulares totales provenientes de las células CHO no transfectadas (fig. 31 A y B; barras control) muestra que la actividad Hex total basal presente en las células CHO (fig. 31A; barra control) es al menos 7 veces mayor que la actividad Hex de tipos A/S basal (fig. 31B; barra control), siendo esta última muy baja.

Además, la comparación de las actividades Hex total (fig. 31A) y Hex de tipo A/S (fig. 31B) obtenidas en los extractos celulares totales provenientes de las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex y control muestra que a pesar de que no hubo un aumento significativo de la actividad Hex total en las células luego de la transfección (fig. 31A), sí hubo un aumento significativo en la actividad Hex de tipo A/S (fig. 31B).

Estos resultados serían concordantes con lo esperado para una sobreexpresión de polipéptidos Hex con sitios activos de tipo  $\alpha$  en las células CHO transfectadas; y representan el primer reporte sobre la expresión con actividad de una Hex de anfibio en células eucariotas.

## DISCUSIÓN

Las glucosidasas han sido involucradas en diferentes etapas de la fecundación, desde la interacción inicial entre los gametos hasta la prevención de la polispermia, en numerosas especies de animales.

A pesar de la existencia de un profundo conocimiento bioquímico sobre las Hexs en los mamíferos (Proia y col., 1984; Proia, 1988; Mahuran y col., 1988; Schuette y col., 2001; Mark y col., 2003; Lemieux y col., 2006), muy poco era conocido sobre la estructura molecular de la Hex en otros vertebrados, incluido los anfibios.

Es este capítulo, utilizando pequeños péptidos conservados de las regiones N-terminal, central y C-terminal de ocho Hexs de vertebrado conocidas se pudo identificar al ADNc codificante para una putativa Hex de *X. laevis*. Esta secuencia fue depositada para su libre acceso en la base de datos GenBank con número de acceso JN127371.

La adjudicación de identidad Hex al polipéptido codificado en el ADNc JN127371 (GenBank ID: AEJ87970) fue realizada en primera instancia por métodos bioinformáticos. El análisis de su secuencia polipeptídica mostró la presencia de dos dominios proteicos ( $\beta$ -acetil hexosaminidasa-like y catalítico) que están presentes en todos los miembros de la familia 20 de las glucósido hidrolasas, a la cual pertenecen todas las Hexs caracterizadas. Este polipéptido mostró, además, una alta similitud de secuencia con otras Hexs de mamíferos caracterizadas, incluyendo las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano, y también con la Hex de un animal filogenéticamente distante como la ascidia *P. mammillata* (O'Dowd y col., 1985; Korneluk y col., 1986; Koyanagi y Honegger, 2003). También mostró la conservación

de todas las características estructurales encontradas a nivel molecular en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de humano (conservación de todos los residuos de aminoácido que componen el sitio activo de la Hex, de todos los residuos de cisteína involucrados en la formación de uniones disulfuro, y de los sitios de N-glicosilación). La conservación de todas estas características estructurales que definen a las Hexs, y la similitud de su secuencia polipeptídica con la secuencia polipeptídica de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de humano (Myerowitz y col., 1985; Korneluk y col., 1986), y con la secuencia polipeptídica de otras Hex caracterizadas (ratón (Bapat y col., 1988; Beccari y col., 1992), gato (Muldoon y col., 1994), *P. mammillata* (Koyanagi y Honegger, 2003)), nos permitieron concluir con un alto grado de certeza que el polipéptido AEJ87970 pertenece a una verdadera Hex de *X. laevis*. Además, el polipéptido AEJ87970 conservó los residuos de aminoácido (NR) que definen el sitio activo  $\alpha$  en las subunidades que constituyen las Hexs de humano, permitiendo predecir su naturaleza de tipo  $\alpha$ . La publicación de la secuencia polipeptídica de esta Hex representó el primer informe reportado en la literatura mostrando la secuencia primaria de una Hex de anfibio (Morales y col., 2012).

Una búsqueda por homología de secuencias realizada en bases de datos de libre acceso nos permitió identificar otros ADNcs de ORF completo codificantes de Hexs, tanto de *X. laevis* como de *X. tropicalis*. Estas Hexs presentaron todas las características estructurales que definen a las Hexs a nivel molecular. Además, el análisis de los sitios activos en los polipéptidos deducidos nos permitió predecir que estos ADNcs codificaban polipéptidos tanto de tipo  $\alpha$  como de tipo  $\beta$  en ambas especies.

A pesar de que existe un amplio conocimiento sobre los genes *HEXA* y *HEXB* de humano, ningún gen codificante para una Hex había sido reportado en los anfibios. En este trabajo de tesis, logramos identificar una secuencia genómica de 24,7 kpb correspondiente a un gen *hex* de *X. tropicalis*. Esta secuencia estaba anotada en forma automática como un putativo gen codificante para Hexs. Sin embargo, ningún estudio había sido realizado para abordar en profundidad su caracterización.

Un análisis comparativo entre los genes *HEXA*, *HEXB* y *hex*, y de sus correspondientes transcriptos, mostró que el gen *hex* de *X. tropicalis* posee dos copias del exón que se corresponde con el exón 11 de los genes de humano que codifica para el fragmento polipeptídico que define la especificidad del sitio catalítico en las

subunidades  $\alpha$  (*HEXA*) o  $\beta$  (*HEXB*). Estos exones mostraron que pueden ser correctamente procesados por la maquinaria de splicing y fueron utilizados alternativamente para generar los transcritos que dieron origen a los polipéptidos tipo  $\alpha$  o  $\beta$  de *Xenopus* identificados. Teniendo en cuenta la presencia de este exón múltiple en *Xenopus*, el número de exones que codifican para polipéptidos de tipo  $\alpha$  o  $\beta$  en los anfibios fue igual al número de exones presentes en los genes *HEXA* y *HEXB* de humano (Proia, 1988; Proia y Soravia; 1987). Estos hallazgos nos permitieron proponer la hipótesis de que en *Xenopus*, y tal vez en el resto de los anfibios, los polipéptidos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  que dan origen a las distintas isoformas de la Hex podrían sintetizarse desde un mismo gen por splicing alternativo, a diferencia de los mamíferos donde ambas subunidades son sintetizadas desde genes separados (Proia, 1988).

Sin embargo, los alineamientos de secuencias entre las Hex de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  de *Xenopus* que serían sintetizadas por splicing alternativo desde el gen *hex* mostraron la existencia de pequeñas diferencias entre sus residuos de aminoácido por fuera de la región de splicing. Estos cambios puntuales sugirieron la posible existencia de diferentes variantes alélicas de este gen o su reciente duplicación. El estudio de estas hipótesis fue abordado en *X. laevis* por medio de experimentos de Southern blot utilizando una sonda capaz de reconocer la, o las, secuencias genómicas que dieron origen a los polipéptidos de ambas Hexs. Los resultados obtenidos con 2 de las 6 enzimas de restricción utilizadas para digerir el ADNg de *X. laevis* (*BstXI* y *NcoI*) mostraron una única banda de hibridación, sugiriendo que los ARNm (ADNc) que dan origen a las Hex de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  de *X. laevis* caracterizadas serían transcritos desde diferentes variantes alélicas del mismo locus génico. Sin embargo, los digeridos realizados con las enzimas *AvaI*, *EcoRI*, *HindIII* y *PstI* mostraron la presencia de al menos tres fragmentos de ADNg conteniendo estas secuencias. La ausencia de bandas de hibridación en el genoma digerido de *S. marcescens* descartó la posibilidad de que estas hibridaciones sean inespecíficas. Teniendo en cuenta que *X. laevis* es un anfibio tetraploide que posee su genoma duplicado (Bisbee y col., 1977), la presencia de esta multiplicidad de bandas de hibridación podría ser explicada por la existencia de polimorfismos genéticos entre cromosomas homólogos que generarían distintos patrones de restricción. La presencia de polimorfismos genéticos entre cromosomas homólogos de *X. laevis* que llevan a la aparición de multiplicidad de bandas en los experimentos de Southern blot ha sido informada previamente (Stutz y Spohr, 1986).

De este modo, a pesar de que la falta de consistencia en los resultados encontrados dificultan la interpretación de este experimento, la detección de un único fragmento génico en dos de los digeridos realizados sostiene la hipótesis de que en *Xenopus* un mismo gen *hex* podría dar origen a polipéptidos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  por splicing alternativo.

La naturaleza Hex de los polipéptidos identificadas en *Xenopus* fue determinada en primera instancia por métodos bioinformáticos a través de la comparación de su secuencia primaria y características estructurales con la de otras Hexs caracterizadas. Sin embargo, la verdadera identidad bioquímica de una proteína queda determinada por su actividad biológica, lo que requiere de su correcto plegamiento.

Reportes previos habían informado la expresión exitosa y con actividad biológica de la subunidad  $\beta$  que constituye las Hexs A y B de humano en células CHO (Miranda y col., 2000; Sinici y col., 2004). Basados en estos reportes, el vector pcDNA3-Hex fue transfectado en células de la línea celular CHO-K1. La eficiencia de transfección se determinó por la transfección paralela de células CHO-K1 con el vector phrGFP. Fue estimado que en promedio, un 15% de las células sometidas a transfección con el vector pcDNA3-Hex habrían recibido y expresaban el ADNc JN127371. La síntesis de la proteína codificada en el ADNc JN127371 por las células CHO transfectadas quedó demostrada en experimentos de Western blot realizados con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex por la presencia de 2 polipéptidos en los extractos celulares totales provenientes de las células CHO transfectadas con el vector pcDNA3-Hex que no estaban presentes en los extractos celulares control. Los pesos moleculares obtenidos para estos polipéptidos fueron ~56 kDa y ~50 kDa, mientras que el peso molecular esperado para el polipéptido codificado en el ADNc JN127371, luego de proteólisis de su péptido señal, es de ~60,5 kDa.

Como se describió en la introducción, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las distintas isoformas de la Hex (A, B y S) en humano son sintetizadas como pre-pro-precursores (Mahuran y col., 1987). Sus estructuras maduras son obtenidas luego de su procesamiento proteolítico y glucosilación a lo largo del camino que las conduce desde el retículo endoplásmico al lisosoma. El pre-pro-polipéptido  $\beta$  pierde el péptido señal de anclaje al RER (~2,3 kDa), y sufre la ruptura endoproteolítica de un pro-péptido N-terminal de ~10 kDa. Además, sufre un procesamiento proteolítico posterior que remueve un tri o tetrapéptido interno que está expuesto en su estructura. Esto genera las

dos mitades,  $\beta\beta$  y  $\beta\alpha$ , encontradas en la subunidad  $\beta$  madura (Mahuran y col., 1988). Diferencialmente, el pre-pro-precursor de la subunidad  $\alpha$  sólo sufre la ruptura proteolítica de su péptido señal de anclaje al RER ( $\sim 2,3$  kDa) y de un pro-péptido ubicado en su extremo N-terminal de  $\sim 8,0$  kDa (Mahuran y col., 1988). Estos procesamientos fueron claramente evidenciados cuando las isoformas HexA ( $\alpha\beta$ ) y HexB ( $\beta\beta$ ), purificadas desde placenta humana, fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Mahuran y col., 1988). Estos investigadores observaron que mientras que la subunidad  $\beta$  es evidenciada como 2 polipéptidos de  $\sim 26$  kDa ( $\beta\beta$ ) y  $\sim 30$  kDa ( $\beta\alpha$ ), la subunidad  $\alpha$  aparece como una única banda proteica de  $\sim 53$  kDa. Teniendo en cuenta este reporte, se podría suponer que los polipéptidos de  $\sim 56$  kDa y  $\sim 50$  kDa originados desde el ADNc JN127371 transfectado en las células CHO podrían representar al pro-polipéptido y la proteína madura de un precursor de tipo  $\alpha$  de *X. laevis*. La presencia del pro-polipéptido ( $\sim 64$  kDa) y la proteína madura (24-28 kDa) fue evidenciada por otros autores cuando la subunidad  $\beta$  humana fue sobreexpresada en células CHO (Hou y col., 2000; Sinici y col., 2004; Sinici y col., 2006). El vector pcDNA3 dirige la expresión de la proteína recombinante desde el promotor constitutivo fuerte del citomegalovirus humano (CMV). Es probable que la producción de pro-polipéptidos en las células transfectantes haya sido lo suficientemente alta como para saturar la maquinaria celular que da origen a su procesamiento, y como consecuencia se evidencie junto a la proteína madura en los extractos celulares. Sin embargo, la existencia de un paralelismo entre los procesamientos reportados para las subunidades que constituyen las Hex de humano y las Hexs de Anfibio aguarda a ser demostrado.

La verdadera identidad Hex de la proteína codificada en el ADNc JN127371 fue demostrada de manera contundente mediante ensayos de actividad Hex realizados con los sustratos MUG y MUGS. En estos experimentos de transfección transiente, se demostró que a pesar de que no hubo un aumento de la actividad Hex total de las células CHO luego de la transfección con el vector pcDNA3-Hex, si hubo un aumento significativo de la actividad Hex de tipo A/S. Debido a que sólo el sitio activo  $\alpha$  puede metabolizar sustratos negativamente cargados como el MUGS (Lemieux y col., 2006) este resultado demuestra no sólo la identidad Hex del polipéptido codificado en el ADNc JN127371 sino, además, su naturaleza de tipo  $\alpha$  como había sido predicho a parir

del análisis *in silico* de su sitio activo. El análisis cualitativo de los resultados obtenidos muestra concordancia con lo esperado para la sobreexpresión de polipéptidos de tipo  $\alpha$  en un porcentaje reducido de las células sometidas a transfección, como en el caso de los experimentos realizados en esta tesis (~15% de células transfectantes). La actividad Hex total basal obtenida en las células CHO no transfectadas fue mucho mayor que la actividad Hex de tipo A/S basal, lo que sugiere que existe una escasa expresión de subunidades  $\alpha$  en estas células. De este modo, se podría pensar que la sobreexpresión de polipéptidos de tipo  $\alpha$  sólo en un pequeño porcentaje de las células que fueron sometidas a transfección no fue suficiente como para elevar de manera significativa la elevada actividad Hex total basal preexistente en los extractos celulares totales provenientes del total de las células utilizadas en el experimento de transfección. Por el contrario, la pequeña actividad Hex de tipo A/S basal preexistente en estos extractos sí permitió evidenciar el aumento de esta actividad resultante de la sobreexpresión del polipéptido de tipo  $\alpha$  codificado en el ADNc JN127371 en las escasas células transfectantes.

En humanos ha sido reportado que las isoformas A, B y S de la Hex metabolizan a los sustratos MUG y MUGS con distinta velocidad y afinidad (Kytzia y Sandhoff, 1985; Hepbildikler y col., 2002). La estructura y los parámetros cinéticos de la/s Hex/s resultantes de la sobreexpresión del polipéptido codificado en el ADNc JN127371 en las células CHO no fue determinada. De este modo, el análisis cuantitativo de las actividades Hex (total y A/S) obtenidas en este experimento no fue llevado a cabo, puesto que requeriría de la purificación de cada una de las isoformas presente en los extractos de las células CHO (transfectadas y control), y de la determinación de sus parámetros cinéticos y cantidades relativas. Estos experimentos no fueron realizados en este trabajo de tesis por estar fuera del alcance de los objetivos planteados.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten concluir certeramente que el ADNc JN127371 codifica una verdadera Hex de *X. laevis* de tipo  $\alpha$ . De manera extensiva la identidad Hex podría asignarse con un alto grado de certeza al resto de los polipéptidos caracterizados tanto en *X. laevis* como en *X. tropicalis* y al gen identificado.

Estos resultados representan el primer reporte sobre la caracterización de una Hex de anfibio a nivel molecular y bioquímico.

## **OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HEX**

### **INTRODUCCIÓN**

Los anticuerpos han resultado de gran utilidad en la caracterización bioquímica de proteínas. En este campo, han sido utilizados en numerosas aplicaciones, desde el estudio de la estructura y el tamaño molecular de las proteínas que reconocen, hasta la determinación de su función y localización subcelular.

Como fue mencionado en la introducción, la Hex ha sido vinculada a la fecundación en numerosas especies de animales, incluyendo a los anfibios. En *X. laevis* una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos participa en la prevención de la polispermia (Greve y col., 1985; Prody y col., 1985; Vo y Hedrick, 2003). La Hex de espermatozoides de *R. arenarum* fue capaz de interactuar con la EV solubilizada de ovocitos homólogos (Martinez y col., 2000). Sin embargo, la estructura molecular de la Hex presente en los gametos de los anfibios es desconocida, y aún no se ha determinado la localización subcelular de la Hex en los gametos de *R. arenarum*. De este modo, como un prerrequisito para avanzar sobre estas determinaciones, nos propusimos obtener anticuerpos específicos capaces de reconocerla.

En la primera parte de esta tesis se identificaron y caracterizaron varias secuencias de ADNc codificantes para Hexs de *X. laevis* y *X. tropicalis*. Además, se sintetizó la Hex AEJ87970 de *X. laevis* en células CHO. Sin embargo, la cantidad de Hex obtenida en estos experimentos fue muy baja, y los costos requeridos para obtenerla en la cantidad necesaria para realizar un protocolo de inoculación en conejo que permitiese obtener anticuerpos anti-Hex (~200 µg de proteína pura) hicieron esta metodología inviable en nuestro laboratorio. Como una opción económica, se intentó la obtención de anticuerpos anti-Hex en conejo a partir de la síntesis recombinante de la Hex AEJ87970 de *X. laevis* en células de *E. coli*.

## RESULTADOS

### A- SÍNTESIS DE LA HEX AEJ87970 DE *X. LAEVIS* EN *E. COLI*

La síntesis de la Hex AEJ87970 de *X. laevis* (sin su péptido señal de anclaje al RER) fue evaluada en distintas cepas de *E. coli* y plásmidos de expresión: células de *E. coli* BL21 CodonPlus (Novagen; optimizadas para la expresión de genes heterólogos eucariotas) transformadas con el plásmido pEF1/HistA (promotor T7; Invitrogen); células de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 pLys (adecuadas para la expresión de genes tóxicos) y BL21 CodonPlus<sup>TM</sup> (Novagen) transformadas con plásmido pRSET-C (Invitrogen; promotor T7); y células de *E. coli* M15[pREP4], que en ausencia de inductor aseguran una expresión basal nula de la proteína recombinante, transformadas con el vector pQE31 (Qiagen, promotor T5). Para cada uno de los cultivos transformantes se probaron distintas condiciones de síntesis, como la temperatura del cultivo (37 °C y 25 °C), la concentración de inductor (IPTG desde 0,1 mM a 10 mM) y la etapa de crecimiento del cultivo en el momento de la inducción (D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,3 y 0,6), y a pesar de ello ninguna proteína recombinante fue observada cuando los extractos celulares totales fueron analizados a distintos tiempos posinducción (entre 1 y 16 horas) por SDS-PAGE teñidos con Coomassie blue (dato no mostrado).

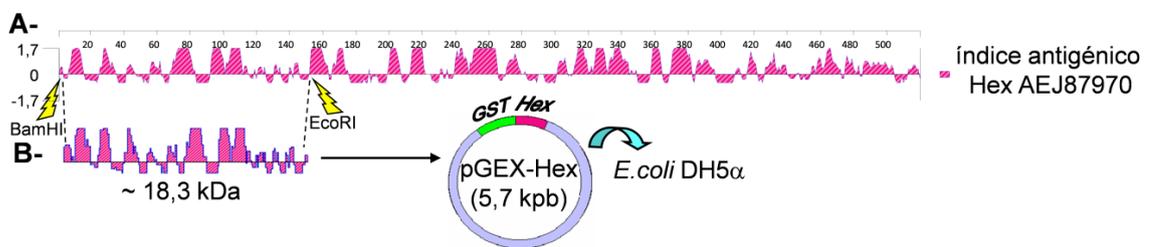
Como una alternativa, se evaluó la expresión en células de *E. coli* de un fragmento de la Hex que fuese adecuado para la obtención de anticuerpos.

### B- SÍNTESIS DE UN FRAGMENTO N-TERMINAL DE LA HEX AEJ87970 DE *X. LAEVIS* EN *E. COLI*

Estudios realizados *in silico* muestran que la región amino terminal de la Hex AEJ87970 de *X. laevis* posee zonas potencialmente antigénicas necesarias para la obtención de anticuerpos (fig. 32A). Además, la secuencia de aminoácidos de esta región fue la más divergente cuando se la comparó con la secuencia de aminoácidos deducida de otras proteínas de *X. laevis* depositadas en bases de datos de transcritos de libre acceso (datos no mostrados), permitiendo predecir que los anticuerpos obtenidos a partir de su inoculación tendrían bajas posibilidades de reconocer a otros polipéptidos. Dentro de esta región, además, se encuentra el péptido altamente conservado entre las Hexs animales (recuadro 1, fig. 17; capítulo III), y presente tanto en las subunidades  $\alpha$

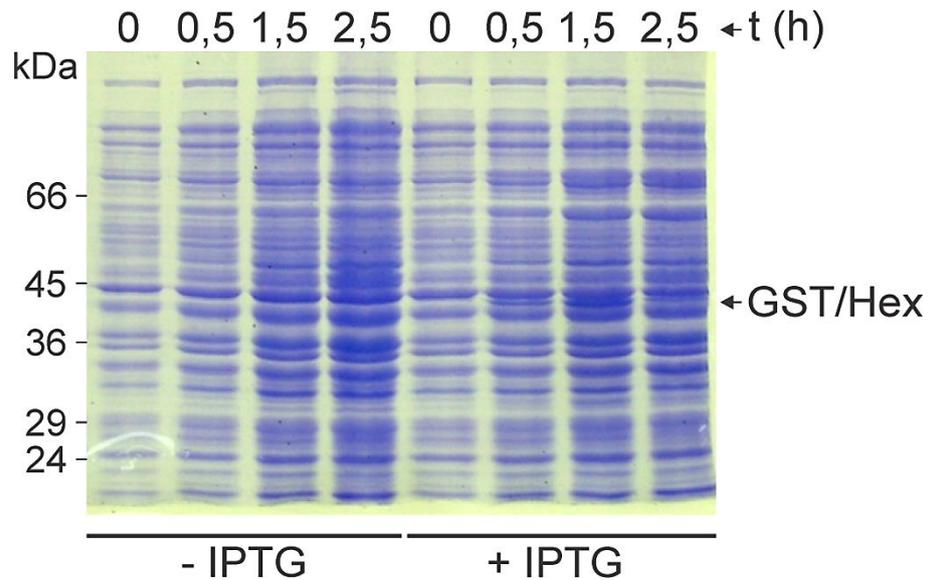
como  $\beta$  constituyentes de las Hexs de humano, sugiriendo que los anticuerpos obtenidos podrían también ser utilizados para caracterizar Hexs heterólogas.

Basados en estas predicciones, un fragmento de 761 pb del ADNc JN127371, codificante para 151 aminoácidos del extremo N-terminal de la Hex AEJ87970 (aminoácidos 36 al 187; fig. 17, capítulo III), se subclonó en el plásmido pGEX-3X como fusión a la proteína GST (~26 kDa) para intentar su expresión en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (diagramado en la fig. 32B). La fusión a la proteína GST no sólo aumenta la chances de que la proteína recombinante se sintetice de manera soluble (Rosano y Ceccarelli, 2014) sino que también facilita su purificación desde los extractos celulares con matriz de glutatión Sepharose<sup>TM</sup> (Smith y Johnson, 1988).



**Figura 32. Clonado de la región N-terminal de la Hex AEJ87970 de *X. laevis* en el plásmido pGEX-3X.** A- Análisis del índice antigénico de la Hex AEJ87970. B- Un fragmento del ADNc JN127371 (761pb) codificante un polipeptídico de ~18,3 kDa pertenecientes a la región N-terminal de la Hex AEJ87970 fue subclonado en el plásmido pGEX-3X para evaluar su expresión en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El plásmido obtenido fue denominado pGEX-Hex.

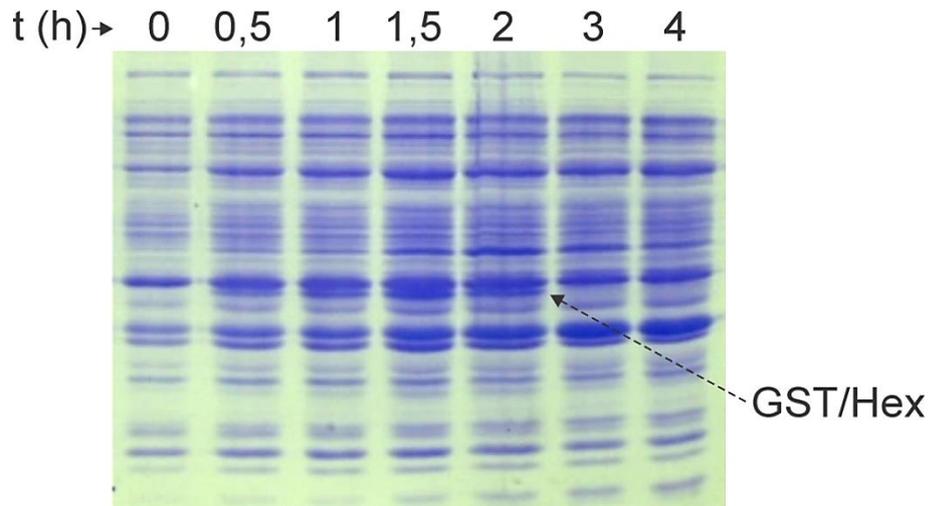
Luego de su obtención, el plásmido pGEX-Hex fue introducido en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante una transformación química, y la síntesis de la proteína de fusión GST/Hex en las células fue evaluada tomando alícuotas de un cultivo transformante a diferentes tiempos luego de la adición del inductor IPTG. Como un control, se tomaron alícuotas a los mismos tiempos de una réplica del cultivo al que no se le adicionó IPTG (sin inducir). Los extractos celulares totales correspondientes a cada tiempo de muestreo fueron analizados por SDS-PAGE (fig. 33).



**Figura 33. Análisis por SDS-PAGE de la síntesis de GST/Hex en las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEX-Hex.** Alícuotas de cultivos líquidos de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el vector pGEX-Hex fueron tomadas a los tiempos indicados (t (h)) luego de la adición de 0,5 mM del inductor IPTG (+ IPTG) o en su ausencia (- IPTG; control). Los extractos celulares totales provenientes de cada alícuota fueron analizados por SDS-PAGE 12% p/v. La posición de GST/Hex en el gel es indicada con una flecha. Tinción: Coomassie blue.

La aparición de una banda polipeptídica de ~43,5 kDa, similar al peso molecular esperado para GST/Hex (44,3 kDa), fue observada sólo en los extractos celulares totales provenientes de los cultivos de células transformadas con pGEX-Hex que fueron inducidos con IPTG. La ausencia de esta banda polipeptídica en los extractos celulares totales provenientes de los cultivos sin inducir confirmó que este polipéptido es sintetizado a partir del plásmido pGEX-Hex.

Con el objetivo de determinar el tiempo de inducción en el cual las células bacterianas presentan la mayor cantidad de GST/Hex en su citosol, se tomaron alícuotas de un cultivo transformante a diferentes tiempos posinducción y se analizaron los extractos celulares totales por SDS-PAGE (fig. 34).



**Figura 34. Análisis de la síntesis de GST/Hex en el citosol de las células bacterianas a distintos tiempos posinducción por SDS-PAGE.** Alícuotas de un cultivo líquido de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-Hex fueron tomadas a diferentes tiempos (t (h)) luego de la adición de IPTG. Los extractos celulares totales provenientes de cada alícuota fueron analizados por SDS-PAGE al 12% p/v. La posición de GST/Hex en el gel se señala con una flecha. Tinción: Coomassie blue.

El análisis del gel presentado en la figura 34 permite inferir que luego de la adición de IPTG la cantidad de GST/Hex presente en las células bacterianas aumenta con el transcurso del tiempo, hasta alcanzar un máximo a la hora y media posinducción. En las alícuotas tomadas a tiempos mayores la cantidad de GST/Hex visualizada en el gel disminuyó, indicando que a estos tiempos GST/Hex está siendo eliminada de las células bacterianas.

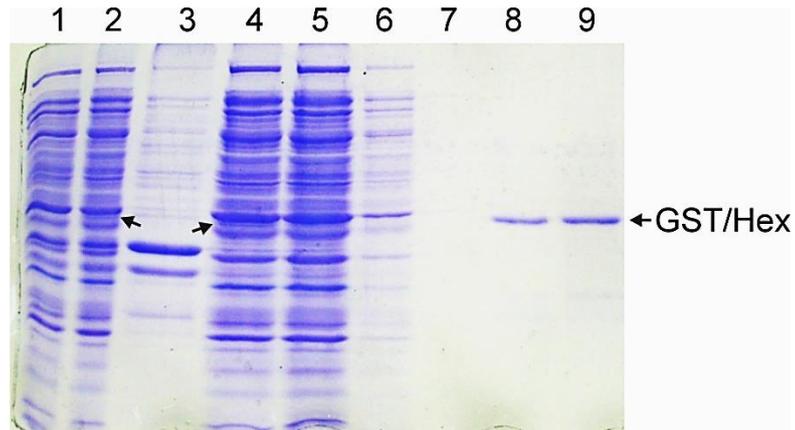
Las resinas de glutatión Sepharose sólo unen GST si ésta se encuentra correctamente plegada. Además, la solubilidad de las proteínas recombinantes en el citosol bacteriano está en relación con su estado de plegamiento, ya que las proteínas mal plegadas tienden a agregarse formando cuerpos de inclusión insolubles cuando son sobreexpresadas (para una revisión ver Rosano y Cecarelli, 2014). Teniendo en cuenta estas consideraciones, y con el objetivo de determinar las condiciones de inducción necesarias para la síntesis de GST/Hex en forma plegada (soluble) en el citosol bacteriano para poder purificarla, se determinó su presencia en las fracciones celulares soluble e insoluble provenientes de diferentes cultivos bacterianos, que fueron inducidos con distintas concentraciones de IPTG (0,1 mM y 0,5 mM) y mantenidos a distintas temperaturas (25 °C y 37 °C). Para cada condición ensayada, las fracciones celulares soluble e insoluble fueron analizadas por SDS-PAGE (datos no mostrados). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla V.

Cepa de <i>E. coli</i>	Temperatura de inducción (°C)	D.O. de inducción	IPTG [mM]	Estado de solubilidad de GST/Hex
DH5 $\alpha$	37	0,6	0,5 y 0,1	Insoluble
DH5 $\alpha$	25	0,6	0,5 y 0,1	Soluble

**Tabla V.** Solubilidad de GST/Hex en el citosol bacteriano en diferentes condiciones de inducción.

Estos experimentos mostraron que el estado de solubilidad de la proteína GST/Hex en el citosol bacteriano es principalmente dependiente de la temperatura a la que es mantenido el cultivo inducido durante su síntesis. A 37 °C, GST/Hex fue encontrada predominantemente en la fracción insoluble de los extractos bacterianos inducidos, permitiendo inferir su falta de plegamiento. Sin embargo, una disminución de la temperatura del cultivo inducido a 25 °C favoreció su solubilidad en los extractos celulares, permitiendo predecir que GST/Hex se encuentra plegada en el citosol celular.

Teniendo en cuenta los resultados detallados anteriormente, y con el objetivo de purificar a GST/Hex desde los extractos bacterianos solubles en una cantidad suficiente para obtener anticuerpos en conejo (~200  $\mu$ g de proteína pura), un cultivo de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el vector pGEX-Hex (~200 ml) fue inducido (D.O. ~0,6) mediante el agregado de 0,1 mM de IPTG. El cultivo se mantuvo a 25 °C con agitación constante por 90 minutos y las células se cosecharon por centrifugación. El pellet celular se resuspendió en un buffer de lisis y las células en suspensión se lisaron mediante pulsos de ultrasonido. La proteína GST/Hex pudo finalmente ser purificada a partir del extracto celular soluble utilizando resina de glutatión Sepharose<sup>TM</sup>. Fracciones correspondientes a cada etapa del proceso de síntesis, y de purificación de GST/Hex, fueron analizadas por SDS-PAGE (fig. 35).

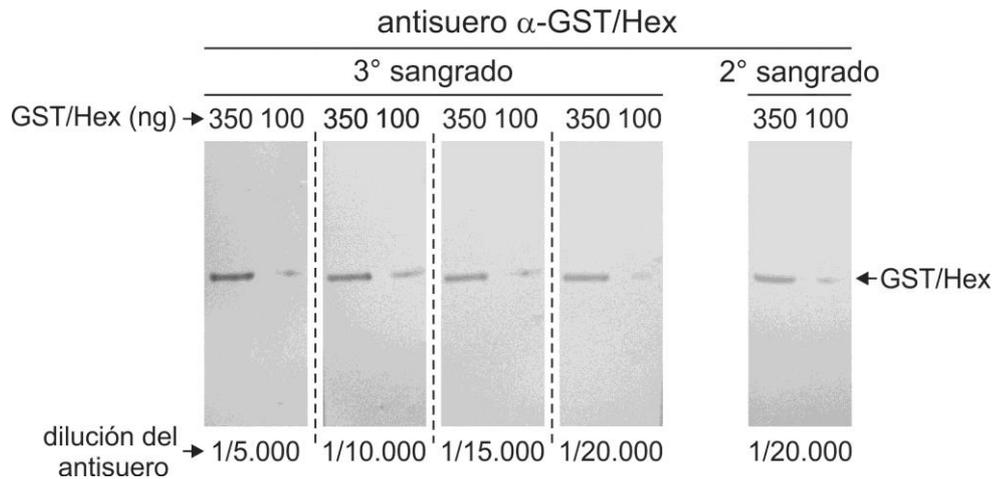


**Figura 35. Análisis por SDS-PAGE de la síntesis y purificación de GST/Hex a partir de cultivos celulares inducidos de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pGEX-Hex. Calles 1 y 2:** extractos celulares totales antes (1) y después (2) de una hora y media de inducción con 0,1 mM de IPTG a 25 °C. **Calle 3:** extracto celular insoluble posinducción. **Calle 4:** extracto celular soluble posinducción. **Calle 5:** fracción del extracto celular soluble no retenida en la resina de glutatión Sepharose. **Calles 6 y 7:** primer (6) y quinto (7) lavado de la resina de glutatión Sepharose luego de la adición del extracto celular soluble. **Calles 8 y 9:** primera (8) y segunda (9) elución de las proteínas retenidas en la resina de glutatión Sepharose con glutatión reducido (10 mM). La posición de GST/Hex en el gel (12% p/v) se indica con flechas. **Tinción:** Coomassie blue.

### C- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-HEX

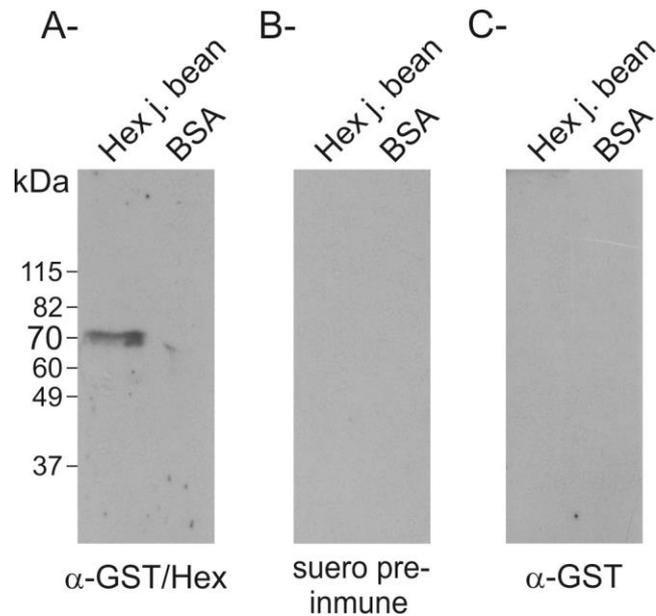
Con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales que permitiesen abordar la caracterización inmunoquímica de la Hex presente en los gametos de los anfibios *X. laevis* y *R. arenarum*, una cantidad de la proteína GST/Hex adecuada para llevar a cabo un protocolo de inoculación en conejo se purificó a homogeneidad.

Para ello, eluatos provenientes de una resina de glutatión Sepharose conteniendo GST/Hex fueron resueltos por SDS-PAGE preparativo y la banda proteica identificada como GST/Hex luego de la tinción con Coomassie blue fue cortada y separada del gel. GST/Hex pura se obtuvo en forma soluble por electroelución y se utilizó para desarrollar un protocolo de inoculación en conejo. Luego de cada inoculación (tres en total) se realizaron sangrados y la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -GST/Hex en el suero sanguíneo, y su título, se evaluó por Western blot utilizando como antígeno 350 ng y 100 ng de la proteína GST/Hex pura. Tanto en el segundo como en el tercer sangrado se obtuvieron antisueros (denominados  $\alpha$ -GST/Hex) capaces de reconocer al menos 100ng de la proteína GST/Hex en diluciones de hasta 20.000 veces (fig. 36).



**Figura 36. Análisis por Western blot del título de los antisueros  $\alpha$ -GST/Hex obtenidos en conejo.** Diferentes réplicas de siembras de 350 ng y 100 ng de la proteína GST/Hex pura fueron resueltas por SDS-PAGE (15% p/v) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Secciones de la membrana, cada una conteniendo 350 ng y 100 ng de GST/Hex, fueron incubadas separadamente con una dilución diferente (desde 1/5.000 a 1/20.000) del suero sanguíneo obtenido en el segundo o en el tercer sangrado. La formación de inmunocomplejos  $\alpha$ -GST/Hex-GST/Hex en la membrana fue evidenciada utilizando anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa, y DAB como sustrato.

La capacidad del antisuero  $\alpha$ -GST/Hex para reconocer Hexs en forma específica fue evaluada por Western blot utilizando réplicas de membranas de nitrocelulosa conteniendo 1  $\mu$ g de Hex pura de la leguminosa *Canavalia ensiformis* (jack bean de aquí en adelante; Sigma) y 1  $\mu$ g de BSA como control de especificidad. Las réplicas fueron incubadas en forma separada con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex, con suero preinmune o con anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados (fig. 37).



**Figura 37. Análisis por Western blot de la especificidad de los antisueros  $\alpha$ -GST/Hex.** Tres réplicas de siembras de 1  $\mu$ g de Hex de jack bean (Hex j. bean) y 1  $\mu$ g de BSA fueron resueltas por SDS-PAGE 10 % p/v y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Secciones de la membrana, cada una conteniendo la Hex de jack bean y BSA, fueron incubadas en forma separada con una dilución 1/1000 del antisuero  $\alpha$ -GST/Hexs (A-) o del suero preinmune (B-) o anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados (dilución 1/20 en PBS 1X) (C-). La formación de inmunocomplejos fue evidenciada utilizando anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Una banda polipeptídica de ~70 kDa fue evidenciada en la membrana incubada con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex, y en la calle correspondiente a la siembra de la Hex de jack bean (fig. 37A). Ninguna polipéptido fue evidenciado en las membranas incubadas con suero preinmune (fig. 37B) o con anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados (fig. 37C), ni en las calles sembradas con BSA, demostrando la especificidad de los inmunocomplejos evidenciados.

## DISCUSIÓN

En el capítulo III de esta tesis se comprobó la identidad Hex de la proteína AEJ87970 de *X. laevis* (codificada en el ADNc JN127371) mediante su síntesis en células CHO y la determinación de su actividad enzimática.

Con el objetivo de obtener una cantidad adecuada de esta Hex que permitiese realizar un protocolo de inoculación en conejo para obtener anticuerpos específicos anti-Hex, se intentó su síntesis en distintos sistemas procariotas. A pesar de que se evaluaron

distintas cepas de *E. coli*, diferentes plásmidos, y de que se probaron diferentes condiciones de inducción, ninguna proteína del tamaño esperado pudo identificarse en los extractos celulares totales provenientes de los cultivos inducidos. Hou y col. (2000), y Patricia Miranda (comunicación personal), trataron de expresar la HexB de humano en células de *E. coli* y tampoco tuvieron éxito. Rashid y col. (1995) reportaron problemas de toxicidad cuando trataron de expresar la Hex de *Bacillus subtilis* en *E. coli*.

La presencia de actividad  $\beta$ -N-acetil glucosaminidasa (una de las actividades de la Hex) fue reportada tanto en *B. subtilis* (gram +) (Rogers y col., 1984) como en *E. coli* (gram -) (Yem y Wu; 1976). En *B. subtilis* la  $\beta$ -N-acetil glucosaminidasa es catalogada como una autolisina puesto que su actividad es capaz de hidrolizar el enlace  $\beta$ 1-4 entre los residuos de N-acetil glucosamina y de ácido N-acetil murámico que constituyen el peptidoglicano presente en su pared celular (Rogers y col., 1984). En condiciones naturales la actividad de las autolisinas, que son potencialmente letales para las bacterias, y que participan de procesos celulares importantes como el crecimiento y el recambio de la pared celular, la separación de las células, la motilidad celular, la muerte celular programada, etc., es finamente controlada y regulada por las células (Rashid y col., 1995).

A pesar de que no se conoce con exactitud la causa por la cual la Hex no puede sintetizarse en *E. coli*, teniendo en cuenta estos reportes, y que la estructura química básica del peptidoglicano es igual en bacterias gram (+) y gram (-), es probable que la síntesis recombinante de la Hex en *E. coli* no haya sido posible debido a que su sobreexpresión cause problemas de toxicidad relacionados con la degradación de la pared celular.

Como una alternativa se expresó un fragmento de ~18,3 kDa perteneciente a la región N-terminal de la Hex AEJ87970 como fusión a GST en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Este fragmento presentó zonas potencialmente antigénicas necesarias para desencadenar respuesta inmune y, además, permitió prever que los anticuerpos obtenidos a partir de su inoculación tendrían bajas probabilidades de reconocer otras proteínas de *X. laevis*. Además, los anticuerpos obtenidos contra este fragmento servirían para reconocer tanto subunidades de tipo  $\alpha$  como  $\beta$  de Hexs de otras especies animales, aún aquellas filogenéticamente distantes a *X. laevis*.

La cantidad de GST/Hex presente en el citosol bacteriano alcanzó un máximo entre 1,5 y 2 horas luego de la adición de IPTG, y luego disminuyó gradualmente hasta su desaparición. La causa de esta disminución no pudo ser determinada, aunque es probable que GST/Hex sea proteolizada debido a problemas en su plegamiento, o a que su presencia en grandes cantidades resulte tóxica para las células bacterianas (Rashid y col., 1995; Hou y col., 2000). En favor de esta última hipótesis, cuando el mismo fragmento de la Hex se trató de expresar en células de *E. coli* BL21 y *E. coli* M15 con los plásmidos pRSET-C y pQE31, respectivamente, las colonias transformantes presentaron problemas de crecimiento en cultivos de LB líquidos (datos no mostrados). Sin embargo, sería esperado que el fragmento de la Hex sintetizado no presente actividad enzimática debido a que carece de la totalidad de los residuos de aminoácido que fueron identificados en el sitio activo de las Hexs (Lemieux y col., 2006).

La temperatura de síntesis fue el principal factor que afectó la solubilidad de GST/Hex en el citosol bacteriano. A 37 °C GST/Hex se encontró principalmente en la fracción insoluble de los extractos celulares totales provenientes de los cultivos inducidos, demostrando su falta de plegamiento. Sin embargo, una disminución de la temperatura del cultivo inducido a 25 °C favoreció su solubilidad y nos permitió inferir su plegamiento adecuado.

Fue reportado que una disminución de la temperatura del cultivo disminuye la velocidad de síntesis de proteínas en las células bacterianas, y en consecuencia le otorga a las proteínas recombinantes más tiempo para plegarse (Schein y Noteborn, 1988; Vera y col., 2007). La disminución de la temperatura, además, desfavorece las interacciones hidrofóbicas (temperatura dependientes) perjudicando la agregación entre proteínas mal plegadas (Rosano y Ceccarelli, 2014). En base a ello, es probable que la disminución de la temperatura del cultivo inducido haya provocado una disminución en la velocidad de síntesis de GST/Hex en las células bacterianas, y en su velocidad de agregación con otras GST/Hexs mal plegadas, otorgándole mayores chances para que pudiese plegarse adecuadamente.

El plegamiento correcto de GST/Hex en el citosol bacteriano fue posteriormente comprobado por su unión a la resina de glutatión-Sepharose. Esta metodología, asociada a la repurificación de los eluatos de GST/Hex en geles de SDS-PAGE preparativos, nos permitió obtener una cantidad de GST/Hex pura adecuada para llevar adelante un protocolo de inoculación en conejo. El éxito del protocolo realizado fue demostrado por la presencia de una elevada concentración de anticuerpos que reconocieron a GST/Hex

en los antisueros obtenidos luego de las inoculaciones ( $\alpha$ -GST/Hex), que no estuvieron presentes en la sangre del conejo en forma previa. Estos anticuerpos fueron capaces de reconocer de manera específica a la Hex de la leguminosa *C. ensiformis* en experimentos de Western blot, demostrando su capacidad para evidenciar Hexs, aún de especies filogenéticamente distantes de *X. laevis*. Además, la Hex de *C. ensiformis* no fue evidenciada por anticuerpos  $\alpha$ -GST obtenidos mediante la inoculación de GST pura en conejo, lo que demostró que los anticuerpos presentes en el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex que la reconocieron fueron producidos en contra del fragmento de la Hex que se inoculó fusionado a GST.

Anticuerpos policlonales capaces de reconocer a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de mamíferos (humano, ratón, rata, perro, vaca, chanco, caballo, etc.) pueden ser adquiridos de manera comercial (Sigma; Santa Cruz Biotechnology, Nordic MUBio, etc.). Otros laboratorios disponen de sus propios anticuerpos  $\alpha$ -Hex. Hasilik y Neufeld (1980) obtuvieron anticuerpos en cabra capaces de reconocer a las isoformas de la Hex A y B de humano. Sin embargo, ningún antisuero obtenido contra una Hex de anfibio era disponible hasta este trabajo de tesis. De este modo, éste representa el primer informe sobre la obtención de un antisuero contra una Hex de anfibio (*X. laevis*) purificada a partir de su síntesis recombinante en *E. coli*.

## **CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GLUCOSIDASAS PRESENTES EN LOS GAMETOS DE ANFIBIO**

### **INTRODUCCIÓN**

Como se describió en la introducción, las glucosidasas han sido vinculadas a la fecundación en numerosas especies de animales, abarcando desde las ascidias hasta el humano.

Entre las glucosidasas resulta de particular interés el estudio de la Hex, puesto que no sólo ha sido involucrada en la unión de gametos, sino además, en el pasaje del espermatozoide a través de las cubiertas que rodean al ovocito y en la prevención de la polispermia.

En humanos, se ha propuesto que la Hex participaría en la interacción de los espermatozoides con la ZP (Miranda y col., 2000; Perez Martinez y col., 2008). Resultados similares a los encontrados en humano fueron reportados en hámster (Zitta y col., 2004; Zitta y col., 2006) y en *D. melanogaster* (Perotti y col., 2001). En ratón, la Hex sería necesaria para la penetración de la ZP (Miller y col., 1993a) y participaría, además, en el bloqueo de la polispermia (Miller y col., 1993b).

Como se describió en la introducción, y se abordará con detalle en los distintos apartados de este capítulo, la Hex de los anfibios *X. laevis* y *R. arenarum* también ha sido vinculada a la fecundación (Martinez y col., 2000; Hedrick, 2008).

En este capítulo se abordará la caracterización bioquímica de la Hex de ovocitos y de espermatozoide de *R. arenarum*, como un prerequisite para vislumbrar su rol biológico durante la fecundación de este anfibio. Además, se completará la caracterización bioquímica de las Hexs de ovocitos de *X. laevis*.

## RESULTADOS

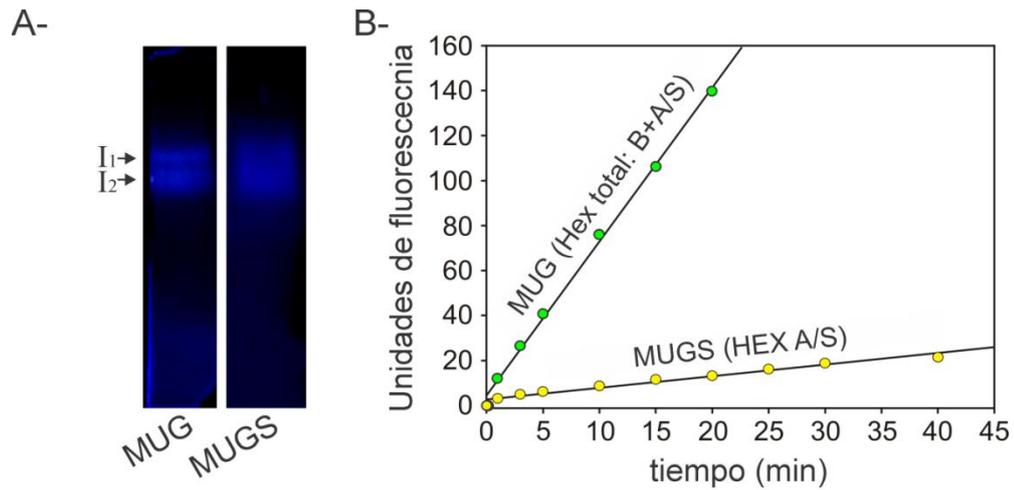
### A- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HEX DE OVOCITOS DE *X. LAEVIS*

Greve y col. (1985) reportaron la existencia de dos isoformas de la Hex en los ovocitos de *X. laevis*. Una de estas isoformas fue asociada a los gránulos corticales, y la otra al resto del citoplasma de los ovocitos. Como se mencionó en la introducción, fue demostrado que la Hex de gránulos corticales es liberada durante la reacción cortical (Greve y col., 1985), y que participa del bloqueo de la polispermia catalizando la hidrólisis de residuos N-acetil glucosamina terminales de oligosacáridos de ZPC, que actúan como receptores espermáticos (revisado en Hedrick, 2008). La Hex de ovocitos de *X. laevis*, además, fue asociada a estructuras semejantes a lisosomas que han sido relacionadas con la endocitosis de vitelogenina (Wall y Meleka, 1985) y con las reacciones catabólicas que tienen lugar en el cigoto recientemente formado (Decroly y col., 1979). Sin embargo, el tipo de isoforma (A, B o S) al que pertenecen estas Hexs, la composición polipeptídica de cada una de ellas, y la localización subcelular de la Hex en ovocitos crecidos y en el cigoto, es desconocida.

En esta sección, se abordarán estas determinaciones con el objetivo de completar la caracterización de las Hexs en los ovocitos de *X. laevis*.

#### *AI- Caracterización electroforética de las Hexs de ovocitos de X. laevis*

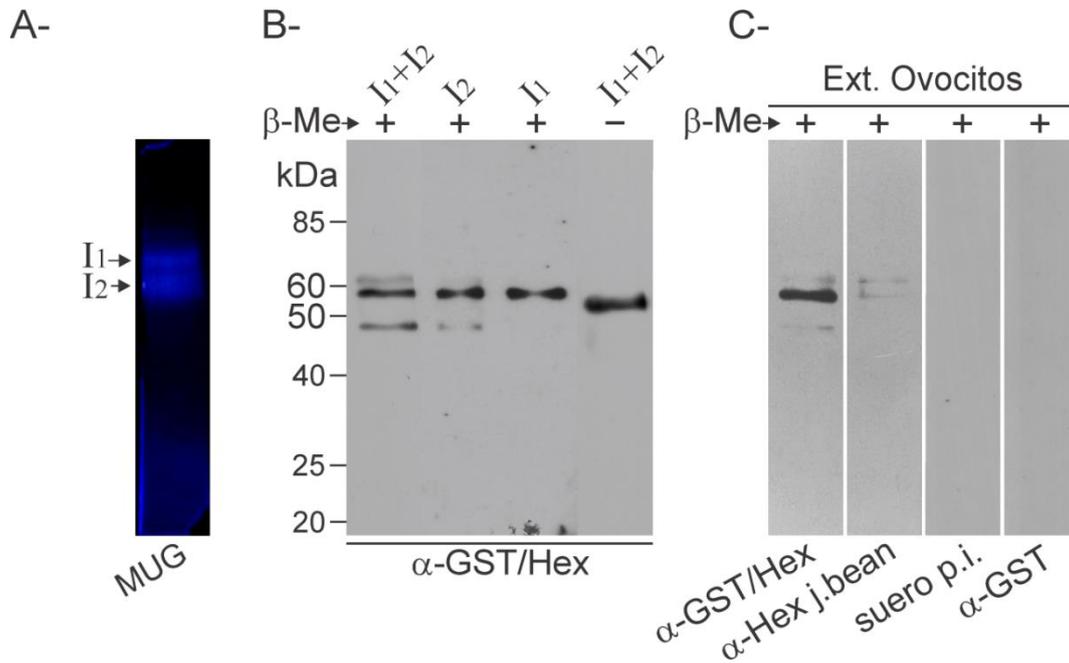
Con el objetivo de determinar el número y tipo de isoformas de la Hex existentes en los ovocitos de *X. laevis*, una alícuota de un extracto crudo obtenido a partir de ovocitos depuestos fue resuelta por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue incubado en un buffer de pH=4,0 (cercano al pH óptimo reportado para las Hexs) y las isoformas de la Hex fueron evidenciadas por su actividad enzimática incubando el gel con los sustratos fluorogénicos MUG o MUGS seguido de irradiación con luz ultravioleta (fig. 38).



**Figura 38. Isoformas de la Hex en ovocitos depuestos de *X. laevis*.** A- Una alícuota de un extracto crudo de ovocitos depuestos de *X. laevis* (160 µg de proteínas totales) fue resuelta en gel de poliacrilamida nativo al 8% p/v. El gel fue posteriormente equilibrado a pH=4,0 y las isoformas de la Hex (indicadas como I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>) fueron evidenciadas por incubación con los sustratos fluorogénicos MUG o MUGS. Las bandas con actividad HexA/S en la calle correspondiente al sustrato MUGS fueron resaltadas para su mejor visualización. B- La actividad Hex total (Hex A+B+S) y Hex A/S en el extracto crudo de ovocitos depuestos (~20 µg de proteínas totales) fue evaluada con los mismos sustratos mediante ensayos continuos de actividad enzimática.

Los ensayos de actividad realizados en gel nativo demostraron la existencia de 2 isoformas activas de la Hex (I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>) en los ovocitos depuestos de *X. laevis*. Ambas isoformas fueron capaces de metabolizar tanto sustratos neutros (MUG) como negativamente cargados (MUGS) (fig. 38A), aunque estos últimos con menor eficiencia (fig. 38B), demostrando la presencia de polipéptidos con sitios activos de tipo  $\alpha$  en su estructura.

Con el objetivo de determinar los polipéptidos estructurales que componen a estas isoformas, las bandas con actividad Hex, I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>, fueron cortadas del gel nativo y sus proteínas fueron eluidas, resueltas por SDS-PAGE y, finalmente, analizadas por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Como un control, se analizó el extracto crudo de ovocitos depuestos con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex, con un antisuero  $\alpha$ -Hex obtenido por inoculación de la Hex pura de jack bean en conejo (Martinez y col., 2000), y con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST como controles de especificidad. Los resultados de estos experimentos son mostrados en la figura 39.



**Figura 39. Análisis por Western blot de las isoformas de la Hex encontradas en los ovocitos depuestos de *X. laevis*.** **A-** Las isoformas de la Hex presentes en los ovocitos depuestos de *X. laevis* fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (8% p/v) e identificadas utilizando el sustrato fluorogénico MUG. **B-** Las isoformas de la Hex  $I_1$  e  $I_2$  fueron cortadas del gel nativo, juntas (calles  $I_1+I_2$ ) o separadamente (calles  $I_1$  o  $I_2$ ), y sus polipéptidos estructurales fueron analizados por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. La adición (+) o no (-) de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me) en las muestras analizadas se indica por encima de cada calle. **C-** Como control, el extracto crudo de ovocitos depuestos de *X. laevis* (Ext. Ovocitos) fue analizado con diferentes antisueros:  $\alpha$ -GST/Hex,  $\alpha$ -Hex j.bean, suero preinmune (suero p.i.) y anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados ( $\alpha$ -GST). Los inmunocomplejos fueron evidenciados utilizando anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Nuestros experimentos de Western blot, realizados con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex, demostraron que las isoformas de la Hex presentes en los ovocitos de *X. laevis* están constituidas, al menos, por 3 tipos de polipéptidos de diferentes tamaños: 63 kDa, 59 kDa y 49 kDa (fig. 39B; calle  $I_1+I_2$ , +  $\beta$ -Me). El análisis de las isoformas por separado (fig. 39B; calles  $I_1$  o  $I_2$ , +  $\beta$ -Me) demostró que sólo la Hex de mayor movilidad electroforética en gel nativo ( $I_2$ ) está compuesta por los tres polipéptidos. La isoforma de menor movilidad electroforética ( $I_1$ ) mostró sólo el polipéptido de 59 kDa en su estructura.

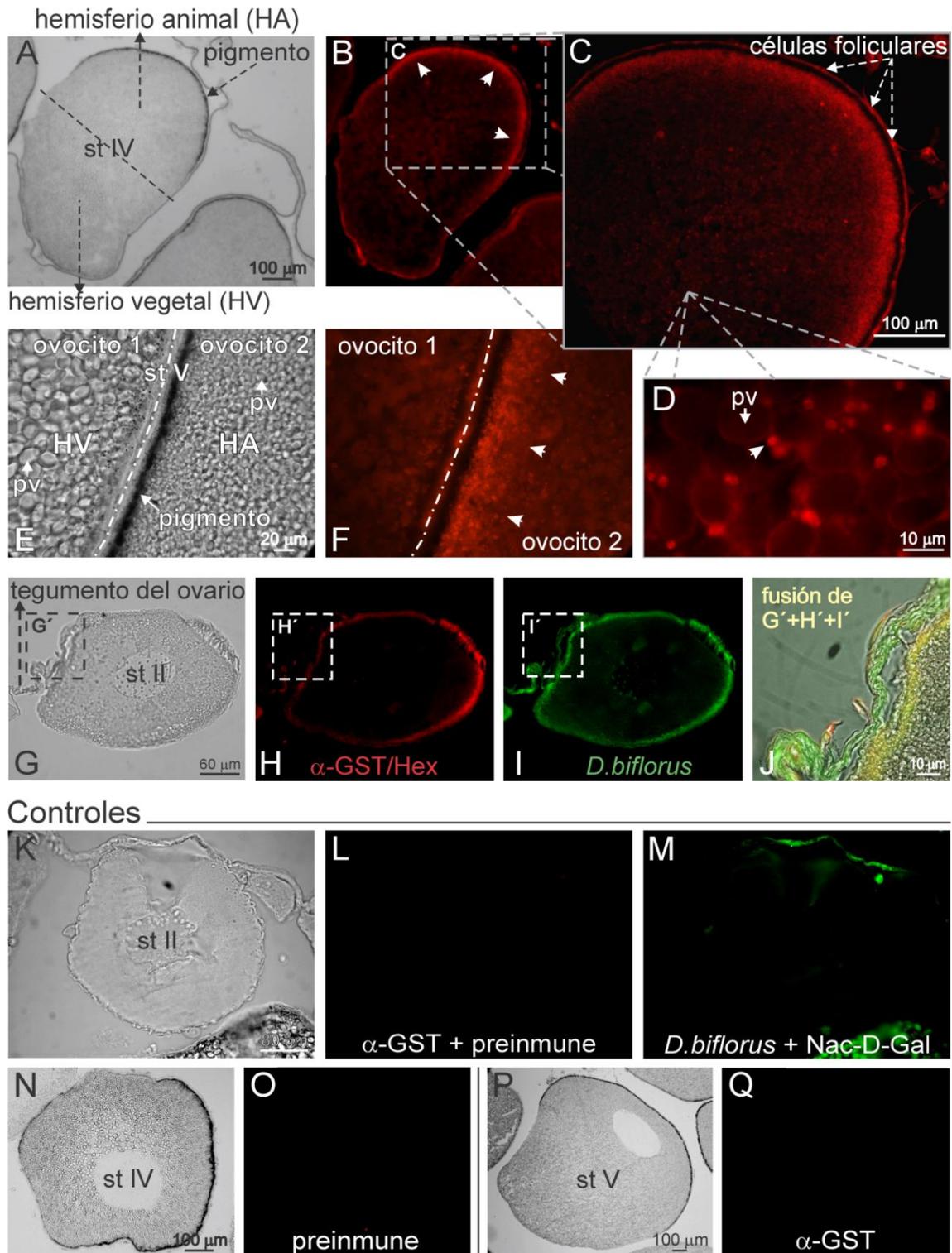
Cuando se analizó el extracto crudo de ovocitos depuestos (fig. 39C) con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex, los mismos polipéptidos de 63 kDa, 59 kDa y 49 kDa fueron inmunodetectados, demostrando que la totalidad de las isoformas de la Hex presentes en los ovocitos depuestos fueron resueltas en el gel nativo. Los anticuerpos  $\alpha$ -Hex obtenidos contra la Hex de jack bean, detectaron los polipéptidos de 63 kDa y 59 kDa,

reafirmando su identidad Hex. Ninguno de los polipéptidos inmunodetectados con los antisueros anti-Hex ( $\alpha$ -GST/Hex o  $\alpha$ -Hex j.bean) fue evidenciado con el suero preinmune o con los anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados, demostrando la especificidad de los inmunocomplejos obtenidos.

Para evaluar la posibilidad de la existencia de procesamientos proteolíticos en las Hexs de ovocitos depuestos de *X. laevis*, semejantes a los que ocurren en los precursores de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  maduras que constituyen las distintas isoformas de la Hex en humano (Mahuran y col., 1988; Hubbes y col., 1989; Quon y col., 1989), las isoformas I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> fueron analizadas por Western blot en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Una única banda en la posición correspondiente a una proteína de ~55 kDa fue evidenciada en estos experimentos (fig. 39B; calle I<sub>1</sub>+I<sub>2</sub>, -  $\beta$ -Me).

#### A2- Localización subcelular de la Hex de ovocitos de *X. laevis*

Wall y Melaka (1985) reportaron la localización de la Hex en la periferia de los ovocitos de *X. laevis* que se encuentran en etapas muy tempranas de su crecimiento (estadio II temprano según Dumont, 1972). Sin embargo, no existen reportes que informen sobre la localización de la Hex en los ovocitos en estadios más avanzados de crecimiento (estadio IV en adelante). De este modo, para abordar este objetivo se realizó la inmunolocalización de la Hex en cortes de ovario de una hembra adulta de *X. laevis*, utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Los resultados obtenidos en estos experimentos son mostrados en la figura 40.



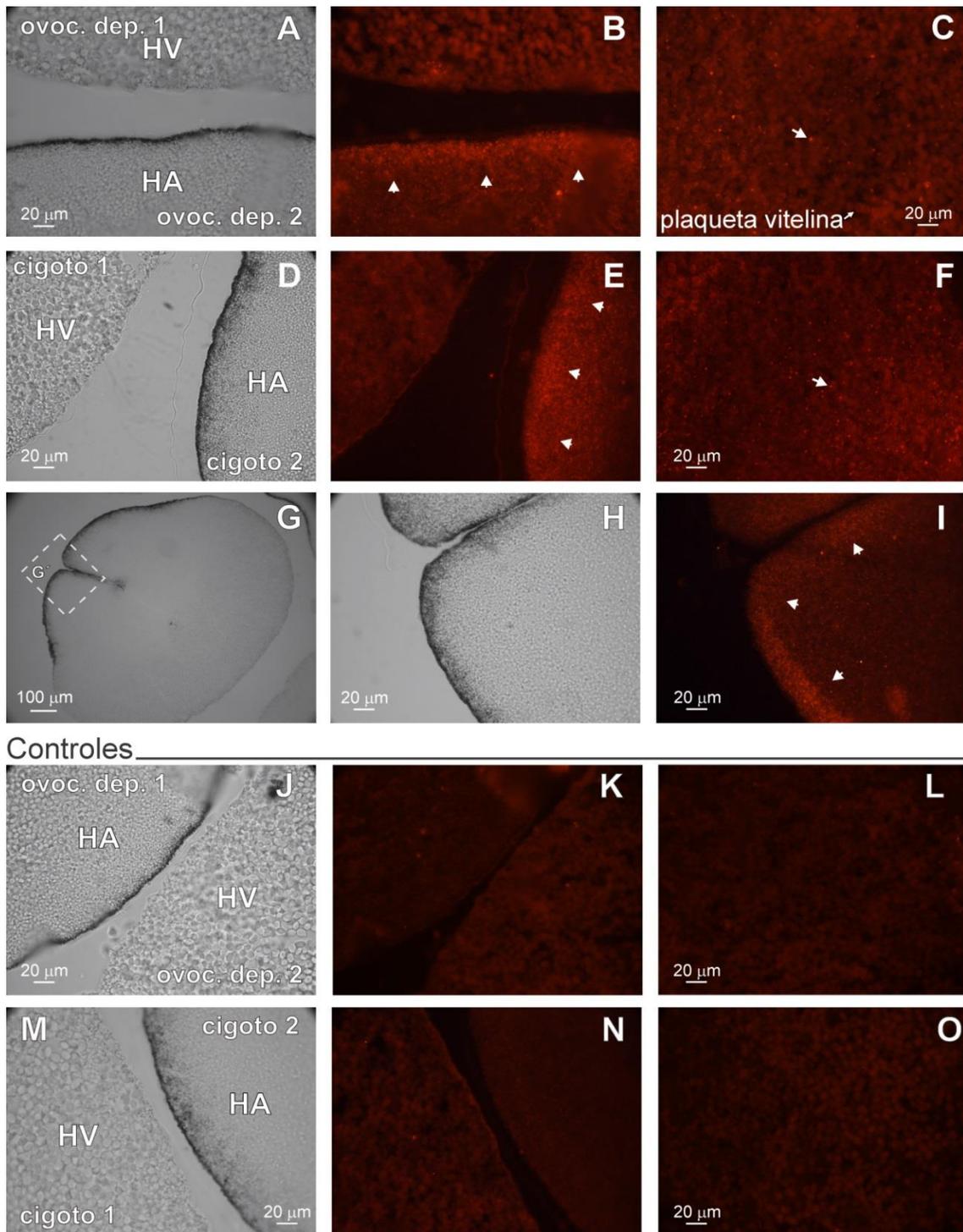
**Figura 40. Inmunolocalización de la Hex en cortes de ovocitos de *X. laevis*.** A: micrografía de campo claro y (B) de fluorescencia roja de una sección de ovario de *X. laevis* que fue incubada con  $\alpha$ -GST/Hex mostrando un ovocito en estadio IV de su crecimiento. E: micrografía de campo claro y (F) de fluorescencia roja de una sección de ovario que fue incubada con  $\alpha$ -GST/Hex mostrando el hemisferio vegetal (HV) de un ovocito en estadio V de su crecimiento (ovocito 1) enfrentado al hemisferio animal (pigmentado; HA) de otro ovocito igualmente crecido (ovocito 2). Las flechas en las micrografías B y F señalan la localización preferencial de la Hex (fluorescencia roja) en el hemisferio animal de los ovocitos crecidos. C: magnificación del hemisferio animal del ovocito mostrado en B. D: magnificación de la región citoplasmática

no cortical del ovocito mostrado en B. La flecha señala una de las estructuras tipo vesicular inmunoreactiva para Hex. **G**: micrografía de campo claro y de fluorescencia roja (**H**) y verde (**I**) de una sección de ovario que fue coincubada con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex (evidenciado en H) y con la lectina de *Dolichos biflorus* conjugada a FITC (evidenciada en I) mostrando un ovocito en estadio II de su crecimiento. **J**: superposición de las regiones contenidas en los recuadros G', H' e I' de las micrografías G, H e I. **K-Q**: ensayos control. **K**: micrografías de campo claro y de fluorescencia roja (**L**) y verde (**M**) de una sección de ovario que fue coincubada en simultáneo con suero preinmune, anticuerpos  $\alpha$ -GST y la lectina de *D. biflorus* pretratada con su azúcar hapteno N-acetil-D-galactosamina (Nac-D-Gal) mostrando un ovocito en estadio II de su crecimiento. **N**: micrografía de campo claro y (**O**) de fluorescencia roja de una sección de ovario incubada con suero preinmune mostrando un ovocito en estadio de crecimiento IV. **P**: micrografía de campo claro y (**Q**) de fluorescencia roja de una sección de ovario incubada con anticuerpos  $\alpha$ -GST mostrando un ovocito en estadio de crecimiento V. En todos los casos los inmunocomplejos fueron evidenciados con anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a Cy3 ( $\lambda_{em}$ : 570nm; fluorescencia roja). pv: plaqueta vitelina.

Estos experimentos demuestran por primera vez, que en los ovocitos crecidos de *X. laevis* (estadio IV en adelante), donde el hemisferio animal (pigmentado) y el vegetal (no pigmentado) de los ovocitos pueden ser claramente diferenciados, la Hex está preferencialmente localizada en el córtex del hemisferio animal (fig. 40; A-F). A altas magnificaciones se pudo visualizar que la señal inmunoreactiva proveniente de la Hex (visualizada como fluorescencia roja) es originada desde pequeñas estructuras de tipo vesicular cuyo diámetro varió entre 1,5 y 2,5  $\mu$ m (fig. 40D). Si bien estas estructuras vesiculares se encontraron principalmente concentradas en el córtex del hemisferio animal de los ovocitos, también se observaron dispersas entre las plaquetas vitelinas en todo el citoplasma celular (fig. 40C y D). Como fue previamente reportado (Wall y Meleka, 1985), la Hex también fue inmunolocalizada en las células foliculares que rodean a los ovocitos (fig. 40C).

En los ovocitos que se encuentran en etapas tempranas de su crecimiento (estadio I y II), la Hex fue localizada en todo el córtex celular (fig. 40; G-H), en forma coincidente con lo informado por Wall y Meleka (1985). En estos ovocitos, además, la señal inmunoreactiva fue coincidente con la observada cuando se utilizó la lectina de *Dolichos biflorus* (fig. 40; I-J), un marcador de gránulos corticales de ovocitos de *X. laevis* (Sokac y col., 2003). Ninguna de las señales inmunoreactivas fluorescentes anteriormente descritas, fueron visualizadas en los ensayos control realizados con suero preinmune, con anticuerpos  $\alpha$ -GST o con la lectina de *D. biflorus* preincubada con su azúcar hapteno (Nac-D-Gal), demostrando la especificidad de las inmunomarcaciones encontradas (fig. 40 K-Q).

El hemisferio animal de los ovocitos de anfibio ha sido señalado como el sitio de entrada del espermatozoide (Elinson, 1975; Cabada y col., 1989); y la Hex de ovocitos de *X. laevis* participa en la prevención de la polispermia (Hedrick, 2008). De este modo, la localización preferencial de la Hex en el córtex del hemisferio animal podría sugerir un vínculo entre estos sucesos. Sin embargo, los ovocitos ováricos no son fecundables, puesto que requieren de la maduración que tiene lugar durante la ovulación, y de las modificaciones enzimáticas que ocurren en su envoltura celómica durante el tránsito por el oviducto (Bement y Capco; 1990; Hedrick, 2008). En consecuencia, se evaluó la localización de la Hex en cortes de ovocitos depuestos y fecundados (cigotos) mediante su incubación con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Como control, los cortes de ovocitos depuestos y fecundados fueron coincubados con suero preinmune y con anticuerpos  $\alpha$ -GST purificados (fig. 41).



**Figura 41. Inmunolocalización de la Hex en cortes ovocitos depuestos y fecundados (cigotos) de *X. laevis*.** A: micrografía de campo claro y (B) de fluorescencia mostrando el hemisferio vegetal (HV) de un ovocito depuesto (ovoc. dep. 1) enfrentado al hemisferio animal (HA) de otro ovocito depuesto (ovoc. dep. 2) que fueron incubados con  $\alpha$ -GST/Hex. D: micrografía de campo claro y (E) de fluorescencia mostrando el hemisferio vegetal de un cigoto (cigoto 1) enfrentado al hemisferio animal de otro cigoto (cigoto 2) incubados con  $\alpha$ -GST/Hex. C: micrografía de fluorescencia de la región citoplasmática no cortical de un ovocito depuesto incubado con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. F: micrografía de fluorescencia de la región citoplasmática no cortical de un cigoto incubado con  $\alpha$ -GST/Hex. G: micrografía de campo claro mostrando un cigoto que comenzó su primera división celular incubado con  $\alpha$ -GST/Hex. H e I: micrografías de campo claro (H) y de fluorescencia (I) de la región G' del

cigoto mostrado en G tomadas a mayor magnificación. Las flechas en las micrografías B, E e I señalan la localización preferencial de la Hex en el córtex del hemisferio animal de los ovocitos depuestos y de los cigotos. Las flechas en C y F señalan las estructuras de tipo vesicular inmunoreactivas para Hex. **J-O**: ensayos control. **J**: micrografía de campo claro y (**K**) de fluorescencia mostrando el hemisferio animal de un ovocito depuesto (ovoc. dep. 1) enfrentado al hemisferio vegetal de otro ovocito depuesto (ovoc. dep. 2) coincubados con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST. **M**: micrografía de campo claro y (**N**) de fluorescencia mostrando el hemisferio vegetal de un cigoto (cigoto 1) enfrentado al hemisferio animal de otro cigoto (cigoto 2) coincubados con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST. **L** y **O**: micrografías de fluorescencia de la región citoplasmática no cortical de un ovocito depuesto (**L**) y de un cigoto (**O**) coincubados con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST. Los inmunocomplejos fueron evidenciados con anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a Cy3. La cubierta gelatinosa que recubre a los ovocitos depuestos y a los cigotos fue retirada en forma química previamente a estos experimentos.

Al igual que en los ovocitos ováricos crecidos, la distribución preferencial de la Hex en el córtex del hemisferio animal, fue también observada en los ovocitos depuestos (fig. 41; A-C). Esta distribución preferencial de la Hex permanece luego de la fecundación (fig. 41; D-I).

## **B- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HEX DE GAMETOS DE *R. ARENARUM***

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la Hex está presente en los espermatozoides de *R. arenarum*, y que es capaz de interactuar *in vitro* con la EV solubilizada de ovocitos homólogos (Martinez y col., 2000). Además, en ensayos de fecundación *in vitro* fue encontrado que si se compite la actividad de la Hex utilizando sustratos solubles, o se bloquea con anticuerpos específicos  $\alpha$ -Hex de jack bean, disminuye la tasa de fecundación (Martinez y col., 2000). Por otra parte, la presencia de una Hex heteróloga en el medio de fecundación provocó el mismo efecto (Martinez y col., 2000).

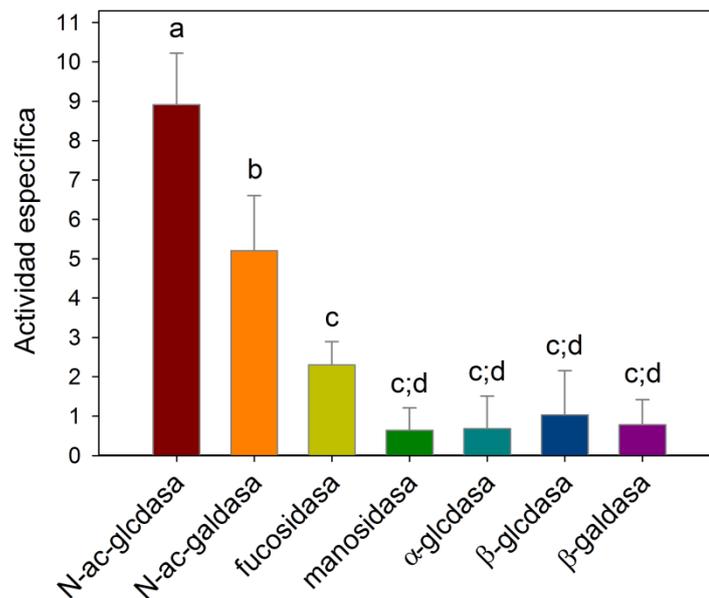
A pesar de que estos experimentos vinculan a la Hex con la fecundación de *R. arenarum*, la etapa en la que estaría involucrada (unión de los gametos, penetración de la EV, prevención de la polispermia, etc.) no fue determinada. En este sentido, tanto la localización subcelular de la Hex en los gametos, como su caracterización bioquímica, podrían aportar datos importantes sobre su rol en la fecundación.

En los siguientes apartados nos propusimos como objetivo avanzar sobre estas determinaciones, como un prerrequisito para vislumbrar el rol de la Hex durante la fecundación de *R. arenarum*.

## B1- CARACTERIZACIÓN DE LA HEX DE OVOCITOS DE *R. ARENARUM*

### B1A- Actividades glucosídicas en ovocitos de *R. arenarum*

La Hex es la principal actividad glucosídica en los espermatozoides de *R. arenarum* (Martinez y col., 2000). Sin embargo, la presencia de glucosidasas en los ovocitos de esta especie es desconocida. De este modo, para determinar la presencia de glucosidasas en los ovocitos de *R. arenarum*, se ensayaron las actividades de siete glucosidasas en sus extractos crudo midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado desde los p-nitrofenil-azúcares sustrato correspondientes (fig. 42).



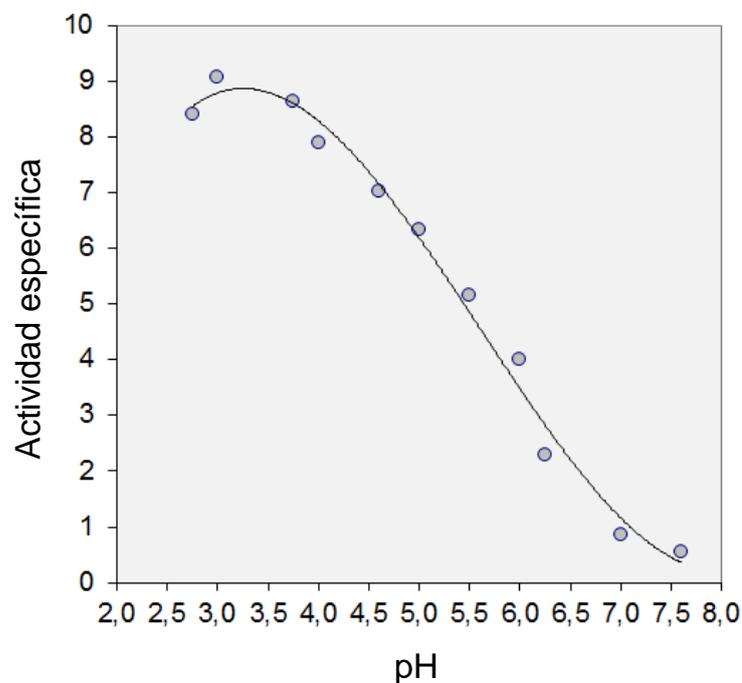
**Figura 42. Actividades glucosídicas en ovocitos de *R. arenarum*.** La presencia de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (N-ac-glc-dasa), N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa (N-ac-gal-dasa), fucosidasa, manosidasa,  $\alpha$  y  $\beta$  glucosaminidasa ( $\alpha$ -glc-dasa o  $\beta$ -glc-dasa) y  $\beta$ -galactosaminidasa ( $\beta$ -gal-dasa) en los ovocitos de *R. arenarum* se determinó midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado ( $Abs_{400nm}$ ) a partir de los p-nitrofenil-azúcares sustrato correspondientes luego de 30 minutos de reacción a 37 °C. Las barras representan los promedios con su desvío estándar obtenidos a partir de mediciones realizadas por triplicado en los extractos crudos provenientes de dos hembras distintas. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un test ANOVA;  $p < 0,001$ .

La principal actividad glucosídica encontrada en los extractos de ovocitos de *R. arenarum* fue la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Hex), seguida por las actividades N-acetil- $\beta$ -D-galactosidasa y fucosidasa, entre otras. La actividad proveniente de estas glucosidasas fue al menos 2,5 veces mayor que el resto de las actividades ensayadas.

#### B1B- Actividad Hex de ovocitos de *R. arenarum* a distintos pH

Como fue descrito en la introducción, en las ascidias se postula que la actividad de las glucosidasas presentes en los gametos es modulada por el pH de su microentorno. Fue propuesto, que al pH natural al que ocurre la fecundación ( $\sim$ pH=8), las glucosidasas no manifestarían su actividad catalítica, sino que actuarían a modo de lectina, mediando la unión de los gametos (revisado en Honegger y Koyanagi, 2008).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, y que la Hex fue la principal actividad glucosidasa presente en los ovocitos, se evaluó su actividad a distintos pHs como un prerequisite para vislumbrar su posible rol durante la fecundación. Para ello, se midió la cantidad de p-nitrofenol liberado desde el sustrato p-nitrofenil-N-acetil-glucosaminida luego de incubarlo 0,5 horas a 37 °C con el extracto crudo de ovocitos en buffers de distintos pHs (fig. 43).

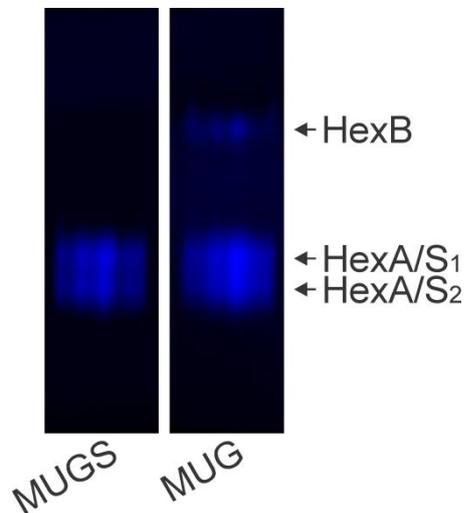


**Figura 43. Actividad Hex de ovocitos de *R. arenarum* a distintos pH.** La actividad de la Hex en el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* se determinó a distintos pH midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado desde su sustrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida luego de 0,5 hora de reacción a 37 °C.

La actividad Hex de ovocitos de *R. arenarum* fue máxima a pHs cercanos a 3,5. A pH más elevados, la actividad Hex disminuyó gradualmente conforme al aumento de pH hasta hacerse casi nula a pH=7 o mayores (fig. 43).

*BIC- Caracterización electroforética de las Hexs de ovocitos de R. arenarum*

Como fue realizado en *X. laevis*, para determinar el número y tipo de isoformas de la Hex (A, S o B) presentes en los ovocitos de *R. arenarum* se realizaron ensayos de actividad Hex en geles nativos. Para ello, el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* fue resuelto por electroforesis en gel nativo y las distintas isoformas de la Hex fueron evidenciadas por su actividad con los sustratos MUG y MUGS (fig. 44).

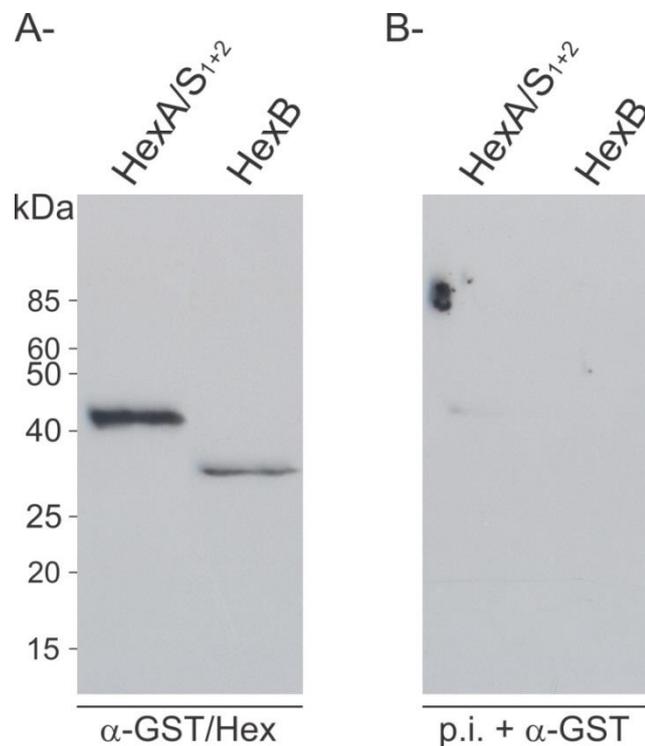


**Figura 44. Caracterización en gel nativo de las Hexs de ovocitos de *R. arenarum*.** El extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* (100  $\mu$ g de proteínas totales) fue resuelto por electroforesis en gel nativo (8% p/v) y las distintas isoformas de la Hex fueron evidenciadas por su actividad con los sustratos MUG y MUGS.

Tres bandas con actividad Hex fueron evidenciadas en los geles nativos. Dos de estas bandas (HexA/S<sub>1</sub> y HexA/S<sub>2</sub>; fig. 44) fueron evidenciadas con ambos tipos de sustratos (MUG y MUGS) demostrando que poseen sitios activos de tipo  $\alpha$ , en forma semejante a las Hex A y S caracterizadas en los mamíferos y en *X. laevis* (esta tesis). Sin embargo, una de estas bandas sólo fue evidenciada con el sustrato neutro (MUG) sugiriendo sólo la presencia de sitios activos de tipo  $\beta$  en su estructura, como en el caso de la isoforma B.

Para determinar la composición polipeptídica de estas isoformas, las bandas con actividad Hex fueron cortadas del gel nativo, y sus proteínas fueron eluidas y analizadas

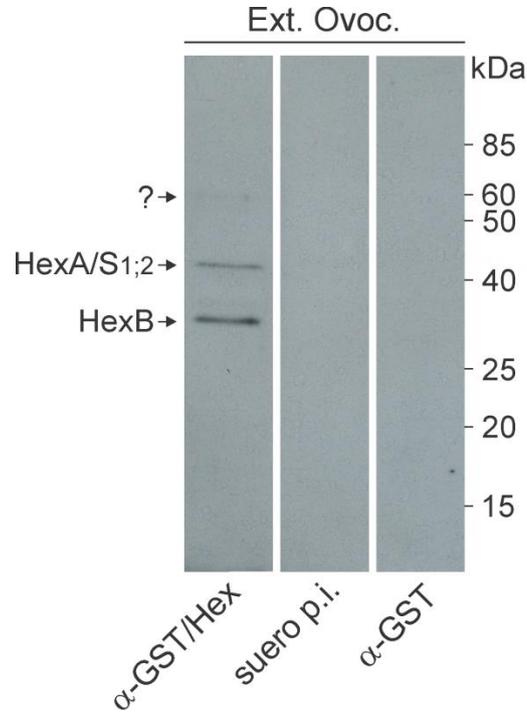
por Western blot, en condiciones reductoras, utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex (fig. 45).



**Figura 45. Análisis por Western blot de la composición polipeptídica de las Hexs de ovocitos de *R. arenarum* caracterizadas en geles nativos.** 25  $\mu$ g de proteínas totales obtenidas a partir de las bandas con actividad de tipo HexA/S (HexA/S<sub>1+2</sub>) o HexB (HexB) en los geles nativos fueron resueltos por SDS-PAGE al 12% p/v y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. **A-** Inmunodetección con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. **B-** Inmunodetección con suero preinmune (p.i.) y anticuerpos  $\alpha$ -GST (control de especificidad). La formación de inmunocomplejos fue evidenciada con anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Un único polipéptido antigénicamente relacionada con las Hexs fue evidenciado a partir de las bandas de actividad (A/S<sub>1+2</sub> y B) obtenidas a partir de los geles nativos. Estos polipéptidos no fueron evidenciados cuando las membranas de nitrocelulosa se incubaron con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST, demostrando su especificidad. De este modo, a diferencia de *X. laevis*, en ovocitos de *R. arenarum*, las tres isoformas de la Hex caracterizadas en gel nativo parecen estar constituidas por uno o varios polipéptidos de igual peso molecular. Mientras que el/los polipéptidos que constituyen la isoforma de tipo A/S presentaron un tamaño aproximado de 43 kDa, la isoforma de tipo B mostró estar constituida por polipéptidos de ~32 kDa.

Para verificar si todas las isoformas de la Hex presentes en los ovocitos de *R. arenarum* fueron resueltas en los geles nativos (pH~8,8), el extracto crudo de ovocitos fue analizado por Western blot con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex (fig. 46).

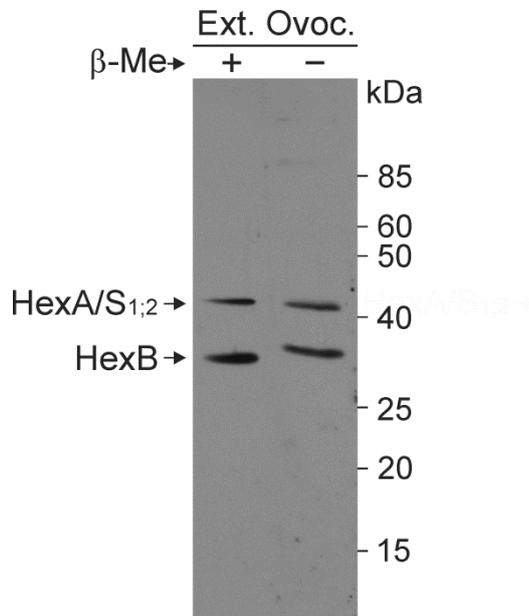


**Figura 46. Análisis por Western blot de las Hexs presentes en el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum*.** Alícuotas de extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* (50 $\mu$ g de proteínas totales) fueron resueltas por SDS-PAGE (12% p/v) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas separadamente con  $\alpha$ -GST/Hex, suero preinmune (suero p.i.) o  $\alpha$ -GST. Los inmunocomplejos fueron evidenciados con anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Polipéptidos de igual peso molecular (~43 kDa y ~32 kDa) a los observados por Western blot a partir de las bandas de actividad Hex obtenidas en los geles nativos fueron evidenciados en el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* (fig. 46). En estos extractos, a su vez, se observó una banda minoritaria de ~60 kDa, permitiendo inferir que en los geles nativos no fueron resueltas la totalidad de las isoformas de la Hex presentes en los ovocitos de *R. arenarum*.

Para estudiar la posible asociación intracatenaria por enlace disulfuro entre polipéptidos derivados de un precursor, como fue reportado para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano (Mahuran y col., 1988; Hubbes y col., 1989; Quon y col., 1989), el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* fue analizado por Western

blot en condiciones reductoras y no reductoras utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex (fig. 47).



**Figura 47. Análisis por Western blot de las Hexs de ovocitos de *R. arenarum* en condiciones reductoras y no reductoras.** Extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* (75  $\mu$ g de proteínas totales) fue resuelto por SDS-PAGE (12% p/v) en condiciones reductoras (+  $\beta$ -Me) y no reductoras (-  $\beta$ -Me) y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas que constituyen las Hexs fueron evidenciadas incubando la membrana con  $\alpha$ -GST/Hex. Los inmunocomplejos fueron evidenciados con  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Tanto en condiciones reductoras como no reductoras se detectaron dos bandas inmunoreactivas cuyos tamaños moleculares se correspondieron con los de los polipéptidos evidenciados a partir de los geles nativos (~32 kDa y ~43 kDa).

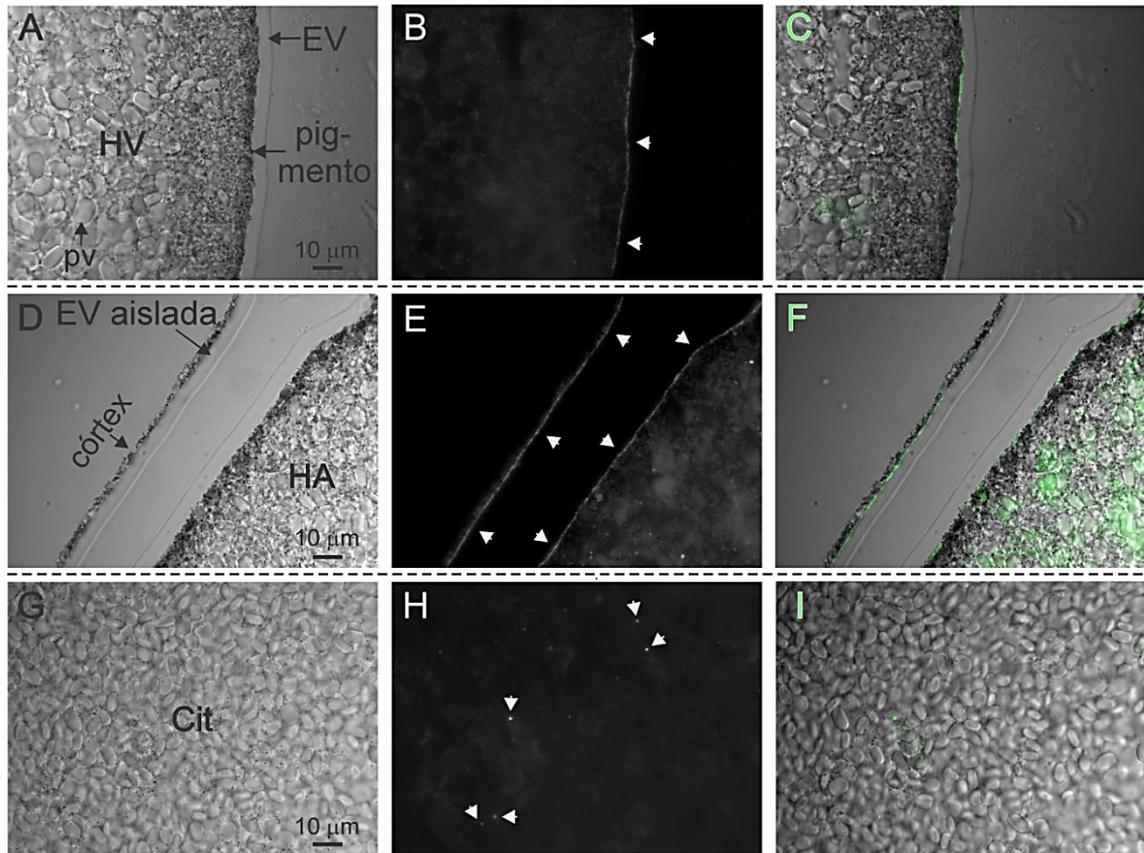
En condiciones no reductoras sólo un ligero retraso en la movilidad electroforética del polipéptido de 32 kDa (constituyente de la isoforma B), equivalente a ~1,7 kDa, fue evidenciado. En estas condiciones, además, fueron evidenciadas 1 o 2 bandas inmunoreactivas minoritarias, de tamaños moleculares mayor a 90 kDa, cuyos polipéptidos originarios no pudieron relacionarse con ninguno de los polipéptidos inmunodetectados en condiciones reductoras.

#### *BID- Localización subcelular de la Hex de ovocitos de R. arenarum*

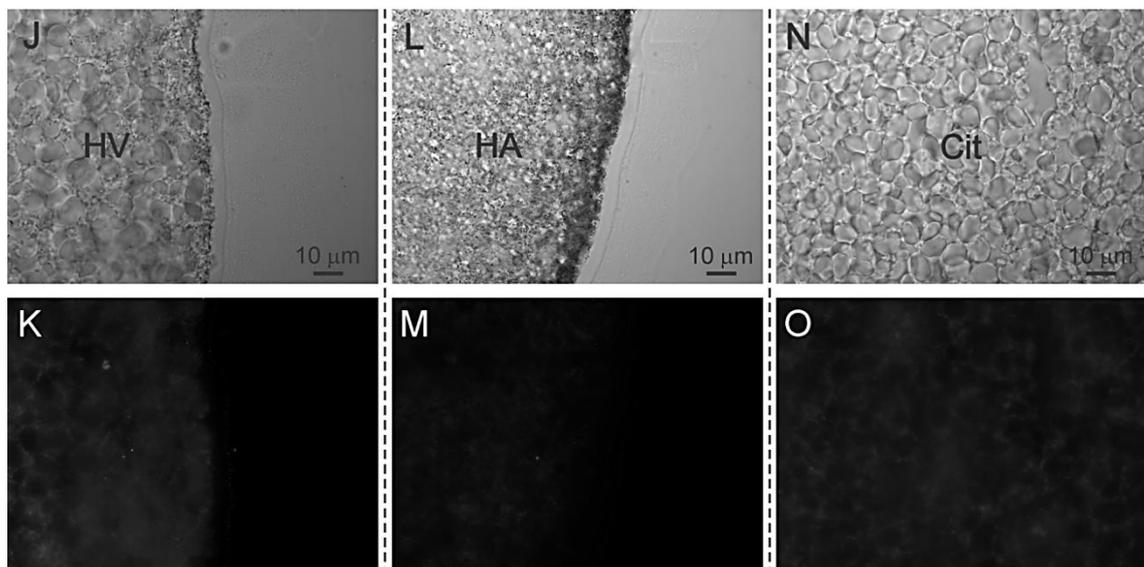
La localización subcelular de una enzima suele ser un prerequisite importante para entender su rol biológico. De este modo, para avanzar sobre el rol de la Hex en la fecundación de *R. arenarum*, se determinó su localización en cortes de ovocitos

maduros fecundables, utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Como control de especificidad, cortes de los mismos ovocitos fueron coincubados con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 48.

$\alpha$ -GST/Hex



Control



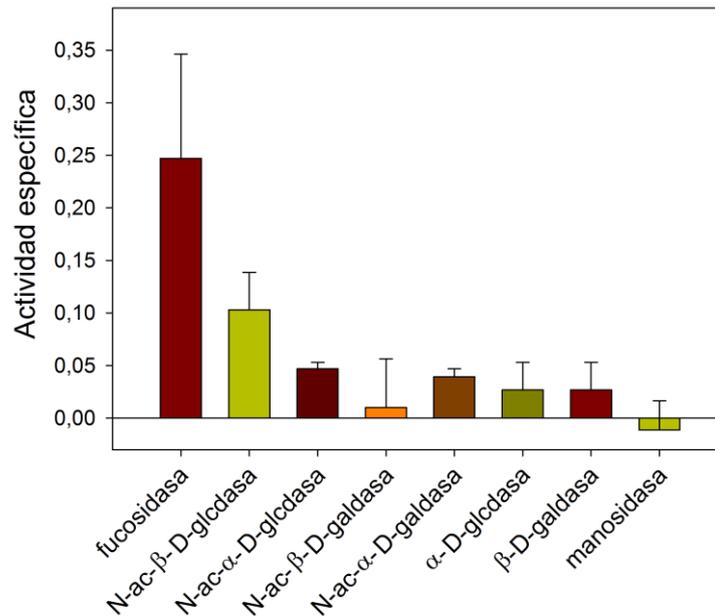
**Figura 48. Inmunolocalización de la Hex en cortes de ovocitos maduros de *R. arenarum*.** A-I: micrografías de secciones de ovocitos maduros de *R. arenarum* desprovistos de su cubierta gelatinosa incubadas con el antisero  $\alpha$ -GST/Hex. A- Micrografía de campo claro y (B) de fluorescencia mostrando la región cortical del hemisferio vegetal (HV) de un ovocito. La envoltura vitelina (EV) que rodea a los ovocitos es señalada con una flecha. D- Micrografía de campo claro y (E) de fluorescencia mostrando la región cortical del hemisferio animal (HA) de un ovocito, y una EV aislada unida a la membrana plasmática y conservando parte del córtex celular. G- Micrografía de campo claro y (H) de fluorescencia, mostrando la región citoplasmática (Cit) de un ovocito. Las flechas en las micrografías de fluorescencia B, E y H

señalan la localización de la Hex. **C**: superposición de las micrografías A y B. **F**: superposición de las micrografías D y E. **I**: superposición de las micrografías G y H. La señal inmunofluorescente proveniente de la Hex es mostrada en color verde para una mejor visualización de su localización. **J-O**: Ensayos control. Micrografías de secciones de ovocitos maduros de *R. arenarum* coincubadas con suero preinmune y anticuerpos  $\alpha$ -GST. **J**- Micrografía de campo claro y (**K**) de fluorescencia mostrando la región cortical del hemisferio vegetal de un ovocito. **L**- Micrografía de campo claro, y (**M**) de fluorescencia mostrando la región cortical del hemisferio animal de un ovocito. **N**- Micrografía de campo claro y (**O**) de fluorescencia mostrando la región citoplasmática (Cit) de un ovocito. En todos los casos los inmunocomplejos fueron evidenciados con anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{em}$ : 519nm; fluorescencia verde).

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que la Hex está localizada en pequeñas estructuras puntiformes ( $\sim 0,7 \pm 0,25 \mu\text{m}$  de diámetro) situadas en toda la periferia de los ovocitos entre los gránulos de pigmento y la EV (Fig. 48, A-F), como así también, distribuidas de manera irregular en todo el citoplasma celular (fig. 48, G-I). A diferencia de lo encontrado en los ovocitos de *X. laevis*, la señal de la Hex se encontró igualmente distribuida en ambos hemisferios, animal y vegetal, de los ovocitos maduros de *R. arenarum*.

La localización periférica de la Hex en los ovocitos sugiere que podría estar asociada a los gránulos corticales. De este modo, para determinar si la Hex está verdaderamente presente en los gránulos corticales, y además, para determinar la presencia de otras glucosidasas posiblemente involucradas en la prevención de la polispermia, se obtuvo el producto de los gránulos corticales (PGC) de los ovocitos maduros de *R. arenarum* con el objetivo de medir las actividades glucosidasas asociadas a los mismos. Para ello, ovocitos maduros desprovistos de su cubierta gelatinosa fueron tratados con ionóforo de calcio (para promover la exocitosis de los gránulos corticales) y el PGC fue colectado como se describió en materiales y métodos.

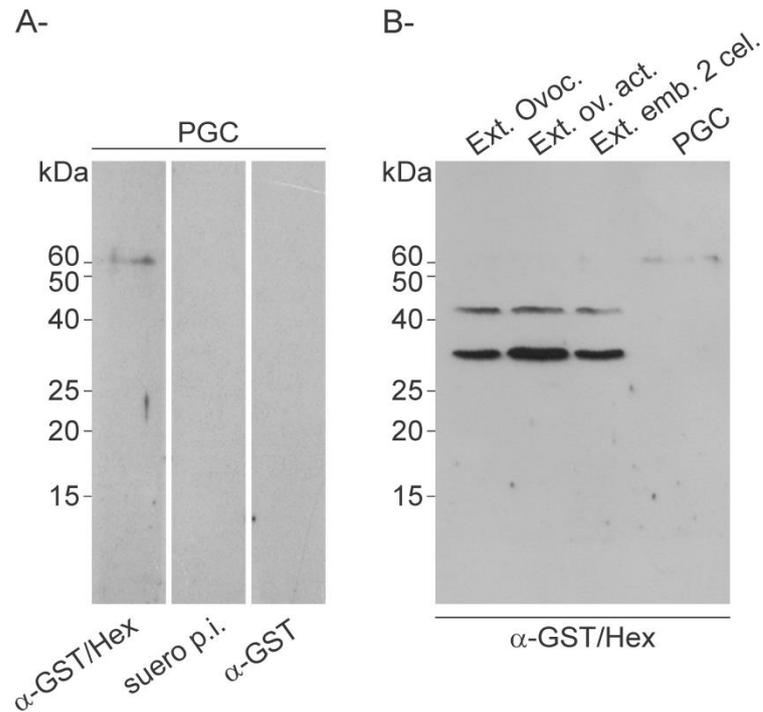
La presencia de la Hex, y de otras glucosidasas, fue evaluada midiendo la actividad enzimática con los p-nitrofenil-azúcares sustrato correspondientes (fig. 49).



**Figura 49. Actividades glucosídicas en el producto de gránulos corticales de ovocitos maduros de *R. arenarum*.** La presencia de ocho glucosidasas fue evaluada en el producto de gránulos corticales de ovocitos maduros de *R. arenarum* midiendo la liberación de p-nitrofenol a partir del p-nitrofenil-azúcar sustrato correspondiente. Las barras muestran el promedio y el error estándar obtenido desde mediciones realizadas por triplicado en dos muestras independientes. Fucosidasa:  $\alpha$ L-fucosidasa; N-ac- $\beta$ -D-glcidasa y N-ac- $\alpha$ -D-glcidasa: N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminidasa; N-ac- $\beta$ -D-galdasa y N-ac- $\alpha$ -D-galdasa: N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa y N-acetil- $\alpha$ -D-galactosaminidasa;  $\alpha$ D-glcidasa:  $\alpha$ D-glucosaminidasa;  $\alpha$ D-galdasa:  $\alpha$ D-galactosaminidasa; mansidasa:  $\alpha$ D-manosidasa.

Las principales actividades encontradas en el PGC fueron la  $\alpha$ -L-fucosidasa y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Hex), demostrando que estas glucosidasas están presentes en los gránulos corticales de los ovocitos maduros de *R. arenarum* y, que además, son liberadas durante la reacción cortical.

Para determinar la isoforma de la Hex que se encuentra en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum*, el PGC fue analizado por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Además, para lograr una mejor comprensión sobre el rol de la Hex en los ovocitos y en la fecundación de *R. arenarum*, los extractos crudos de ovocitos sin activar, de ovocitos activados con ionóforo de  $Ca^{++}$ , y de ovocitos activados por fecundación (embriones de 2 células), fueron también analizados (fig. 50).



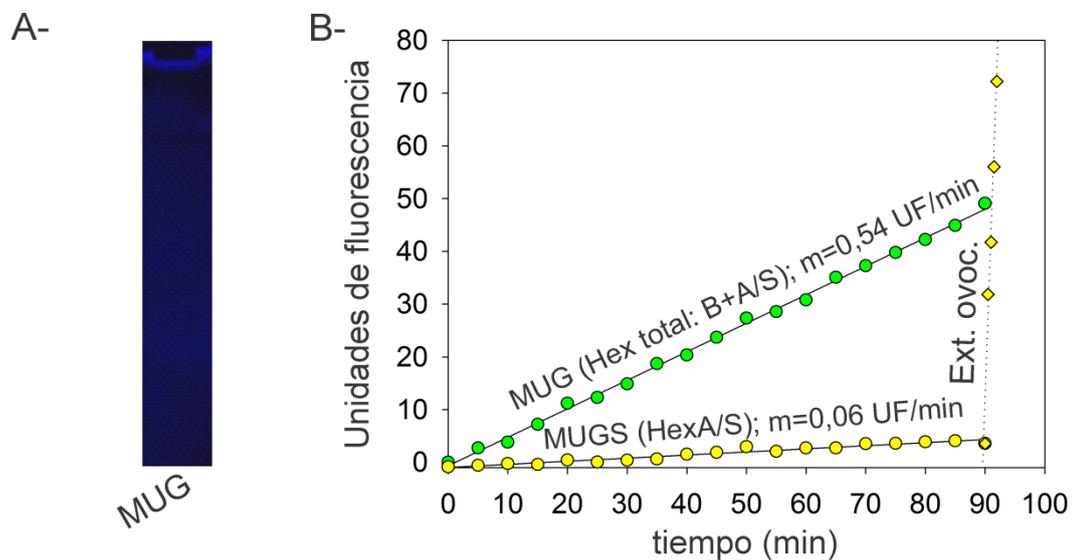
**Figura 50. Análisis por Western blot de las Hexs presentes en el producto de los gránulos corticales, en ovocitos maduros sin activar y activados con ionóforo de calcio, y en ovocitos fecundados de *R. arenarum*.** A- El PGC de *R. arenarum* (15 µg de proteínas totales) fue resuelto por SDS-PAGE en condiciones reductoras (12 % p/v) y transferido a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con antisuero α-GST/Hex. Como control de especificidad, réplicas de la membrana conteniendo la misma cantidad de PGC fueron incubadas con suero preinmune (suero p.i.) o con anticuerpos α-GST. B- Western blot utilizando antisuero α-GST/Hex de: extracto crudo de ovocitos maduros sin activar (Ext. Ovoc., 75 µg de proteínas totales), extracto crudo de ovocitos maduros activados con ionóforo de calcio (Ext. ov. act., 75 µg de proteínas totales) y extracto crudo de ovocitos fecundados (Ext. emb. 2 cel.; 75 µg de proteínas totales). En todos los casos la formación de inmunocomplejos fue evidenciada con anticuerpos α-IgG de conejo conjugados a peroxidasa y sustrato quimioluminiscente.

Una banda inmunoreactiva proveniente de polipéptidos de tamaño molecular equivalente a los polipéptidos de ~60 kDa inmunodetectados con el mismo antisuero en el extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* fue observada en el PGC.

Ninguno de los polipéptidos que constituyen las isoformas de la Hex anteriormente caracterizadas en gel nativo (Hex A/S<sub>1y2</sub>: 43 kDa y HexB: 32 kDa) fue encontrado en el PGC. Sin embargo, estos polipéptidos fueron evidenciados de manera inalterada tanto en el extracto crudo de ovocitos no activados como activados, sugiriendo que estas Hexs no estarían relacionadas con los gránulos corticales y la prevención de la polispermia de *R. arenarum*.

**BIE- Isoforma de la Hex presente en los gránulos corticales de ovocitos de *R. arenarum***

Para determinar el tipo de isoforma (A/S y/o B) al que pertenece la Hex localizada en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum*, el PGC fue resuelto en gel nativo y la actividad Hex total y Hex A/S fue ensayada en el gel utilizando los sustratos MUG y MUGS, respectivamente (fig. 51A; se muestra sólo la actividad Hex total). Ninguna banda con actividad Hex fue evidenciada en estos geles, probablemente debido a la escasa cantidad de PGC que pudo ser sembrado en ellos (35  $\mu$ l conteniendo  $\sim$ 15  $\mu$ g de proteínas totales). Como una alternativa, el PGC fue analizado mediante ensayos continuos de actividad enzimática utilizando los mismos sustratos (fig. 51B).



**Figura 51. Isoforma de la Hex presente en el producto de los gránulos corticales de los ovocitos maduros de *R. arenarum*.** A- El PGC fue resuelto en gel nativo (15  $\mu$ g de proteínas totales) y las isoformas de la Hex fueron evidenciadas por incubación con el sustrato MUG. B- La actividad Hex total (círculos verdes) y HexA/S (círculos amarillos) en el PGC (100  $\mu$ g de proteínas totales por reacción) fue analizada con los sustratos MUG y MUGS mediante ensayos continuos de actividad enzimática. Como control interno de actividad Hex de tipo A/S, 30  $\mu$ g de extracto crudo de ovocitos de *R. arenarum* (Ext. ovoc.) fueron adicionados a la reacción con MUGS luego de 90 min de transcurrida.

La actividad Hex total (HexB + HexA/S) encontrada en el PGC fue 9 veces mayor que la actividad Hex de tipo A/S. Sin embargo, la actividad Hex de tipo A/S no fue nula.

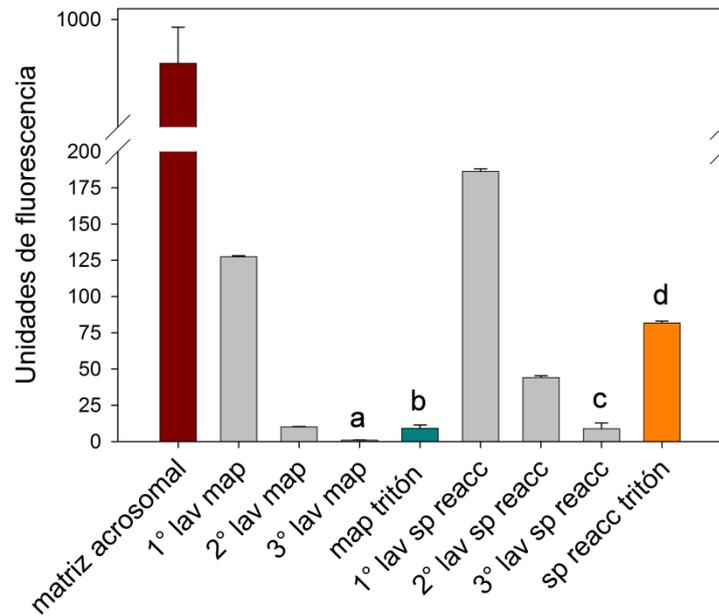
## **B2- CARACTERIZACIÓN DE LA HEX DE ESPERMATOZOIDES DE *R. ARENARUM***

Como un prerrequisito para vislumbrar la etapa de la fecundación en la que estaría involucrada la Hex de espermatozoides de *R. arenarum*, se planteó determinar su localización subcelular.

### *B2A- Localización subcelular de la Hex de espermatozoides de R. arenarum*

Para determinar la localización de la Hex en los espermatozoides de *R. arenarum* inicialmente se desarrolló un protocolo de fraccionamiento subcelular para obtener las distintas fracciones subcelulares espermáticas en forma separada (fig. 52). Brevemente, primero se indujo la ruptura del acrosoma mediante la resuspensión de espermatozoides liofilizados en un buffer hipotónico (Raisman y col., 1980). Luego, los espermatozoides reaccionados fueron separados de los productos provenientes de la ruptura del acrosoma (matriz acrosomal y fracciones de membrana provenientes de la cabeza del espermatozoide (membrana plasmática apical y membrana acrosomal externa)) por centrifugación a baja velocidad (650g). Por último, las membranas provenientes de la cabeza del espermatozoide fueron separadas de la matriz acrosomal por ultracentrifugación a 100.000g.

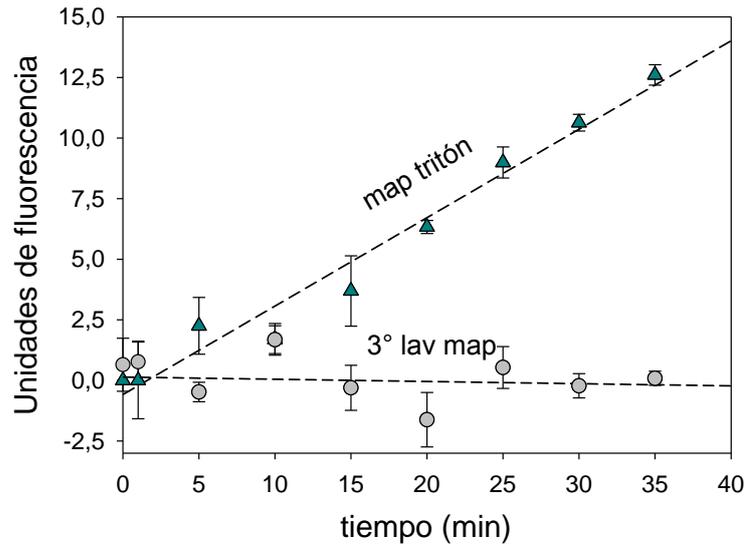




**Figura 53. Actividad Hex en las fracciones subcelulares de los espermatozoides de *R. arenarum*.** La actividad Hex total en las distintas fracciones subcelulares de los espermatozoides de *R. arenarum* (indicadas por debajo de cada barra) fue inferida midiendo la cantidad de metil-umbeliferona liberada a partir del sustrato MUG luego de 45 min de reacción a 37 °C y pH=3,6. map tritón: proteínas solubles extraídas con el buffer conteniendo NaCl 0,4M y tritón X-100 1,5% p/v a partir de las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides sedimentadas. sp reacc tritón: sobrenadante resultante del tratamiento de los espermatozoides reaccionados con el mismo buffer. Las barras grises muestran la actividad Hex total obtenida en el sobrenadante de cada uno de los tres lavados realizados a las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides sedimentadas (lav map) o a los espermatozoides reaccionados (lav sp reacc). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre las actividades Hex total inferidas en map tritón y su 3° lavado (3° lav map), o entre las inferidas en sp reacc tritón y su tercer lavado (3° lav sp reacc), mediante un ensayo t de Student;  $p < 0,024$ . En todas las reacciones se utilizó un volumen porcentual equivalente de cada fracción debido a la imposibilidad de determinar la cantidad de proteínas totales en los buffers provenientes de los terceros lavados (3° lav map y 3° lav sp reacc). Las barras representan el promedio y el desvío estándar obtenido en dos experimentos independientes realizados por triplicado.

En concordancia con los resultados previamente publicados por nuestro laboratorio (Martinez y col., 2000), se detectó actividad Hex en la matriz acrosomal y en los espermatozoides reaccionados de *R. arenarum*. Además, se detectó actividad Hex asociada a las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides.

La presencia de actividad Hex entre las proteínas extraídas de las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides fue verificada, a su vez, mediante ensayos continuos de actividad enzimática (fig. 54).

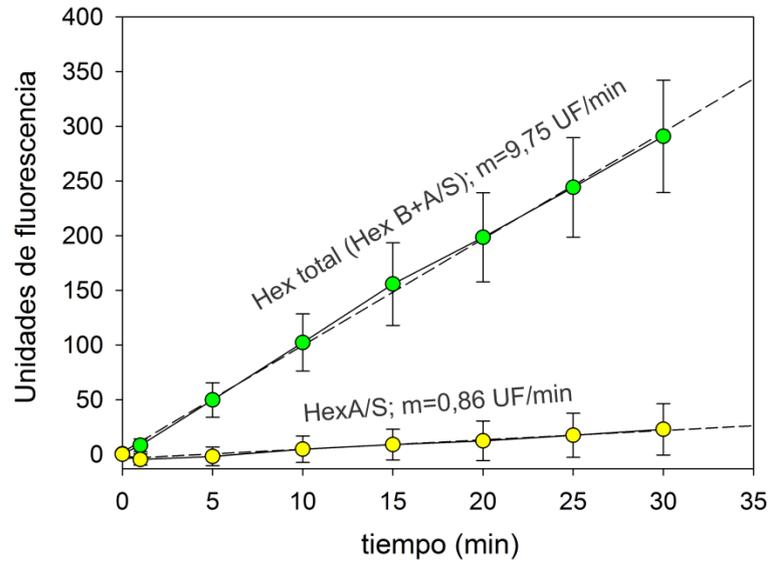


**Figura 54. Actividad Hex en las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides de *R. arenarum*.** La actividad Hex total presente en el tercer lavado de las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides (3° lav map; círculos grises), y en las proteínas extraídas desde ellas (map tritón; triángulos verdes; 16,5 µg de proteínas totales), fue inferida mediante ensayos continuos de actividad enzimática utilizando el sustrato MUG (T=37 °C; pH=5,0). Las gráficas muestran el promedio y el error estándar obtenido en un experimento realizado por triplicado. Para cada reacción se utilizaron volúmenes porcentuales equivalentes debido a la imposibilidad de determinar la cantidad de proteínas totales en el buffer del 3° lav map.

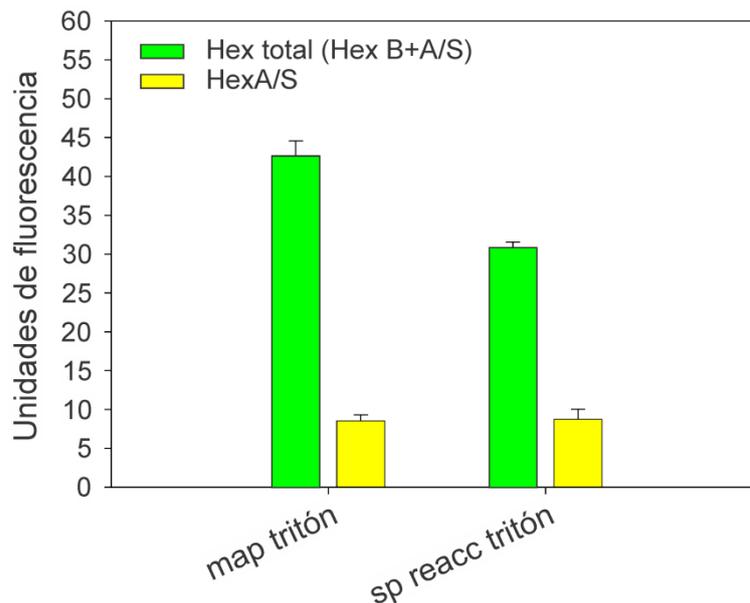
En estos ensayos se observó que el buffer conteniendo las proteínas extraídas desde la fracción de las membranas provenientes desde la cabeza de los espermatozoides produce la hidrólisis continua del sustrato MUG, confirmando la presencia de Hex/s en estas membranas. En el buffer proveniente del tercer lavado de esta fracción no se observó la presencia de actividad Hex, descartando la posibilidad de contaminación de las proteínas extraídas desde las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides por Hexs provenientes de la matriz acrosomal.

*B2B- Isoformas de la Hex presentes en las distintas fracciones subcelulares de los espermatozoides de R. arenarum*

Para determinar el tipo de isoforma/s de la Hex presente en cada una de las fracciones subcelulares de los espermatozoides de *R. arenarum* donde la Hex fue encontrada, y de este modo, el tipo de isoforma posiblemente involucrada en las distintas etapas de su fecundación, se realizaron ensayos de actividad Hex utilizando los sustratos MUG y MUGS (figs. 55 y 56).



**Figura 55. Isoformas de la Hex presentes en la matriz acrosomal de los espermatozoides de *R. arenarum*.** La actividad Hex total (Hex B+A/S) y Hex de tipo A/S (HexA/S) en el contenido acrosomal de los espermatozoides de *R. arenarum* (30  $\mu$ g de proteínas totales por reacción) fue inferida mediante ensayos continuos de actividad enzimática (T=37 °C; pH=5,0) midiendo la cantidad de metil-umbeliferona liberada a partir de los sustratos MUG y MUGS, respectivamente.



**Figura 56. Isoformas de la Hex presentes en las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides, y en los espermatozoides reaccionados, de *R. arenarum*.** La actividad Hex total (barras verdes) y de tipo Hex A/S (barras amarillas) en las proteínas extraídas desde las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides (map tritón; 13  $\mu$ g de proteínas totales por reacción), y desde los espermatozoides reaccionados (sp reacc tritón; 25  $\mu$ g de proteínas totales por reacción), fue inferida midiendo la cantidad de metil-umbeliferona liberada a partir de los sustratos MUG y MUGS, respectivamente, luego de 45 min de reacción a 37°C (pH=3,6).

La actividad Hex total encontrada en la matriz acrosomal de los espermatozoides fue al menos 11 veces mayor que la actividad de tipo A/S. En las proteínas extraídas desde los espermatozoides reaccionados, y desde las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides, la actividad Hex total fue ~5 veces mayor, y ~3,5 veces mayor, que la actividad de tipo A/S, respectivamente. Sin embargo, en ninguna de estas fracciones la actividad de tipo A/S fue nula.

## DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, las glucosidasas, y entre ellas la Hex, han sido vinculadas a la fecundación en numerosas especies de animales, incluyendo a los anfibios.

En ovocitos depuestos de *X. laevis*, dos isoformas de la Hex habían sido caracterizadas en base a sus diferentes movilidades electroforéticas en electroforesis en disco (Greve y col., 1985). Una de estas isoformas fue asociada a los gránulos corticales, y la otra al resto del citoplasma del ovocito (Greve y col., 1985). La isoforma de gránulos corticales fue liberada durante la reacción cortical inducida con ionóforo de calcio (Greve y col., 1985). Vo y col. (2003) reportaron que la isoforma presente en los gránulos corticales y liberada durante la reacción cortical (Greve y col., 1985), participa de la prevención de la polispermia hidrolizando residuos de N-acetil glucosamina terminales de ZPC, una de las glucoproteínas de la EV que actúa como receptor espermático. Sin embargo, nada era sabido acerca del tipo de isoforma (A, S o B) al que pertenecían estas Hexs, ni sobre su composición polipeptídica. Tampoco era conocida su localización subcelular en los ovocitos crecidos, depuestos y en el cigoto. En este trabajo de tesis, todos estos aspectos fueron abordados.

En coincidencia con los reportes mencionados anteriormente, nuestros experimentos demostraron la existencia de dos isoformas de la Hex en los ovocitos depuestos de *X. laevis*. Estas isoformas fueron capaces de metabolizar tanto sustratos neutros (MUG) como negativamente cargados (MUGS), demostrando la existencia de sitios activos de tipo  $\alpha$  en la estructura de ambas isoformas. Como fue descrito en la introducción, en los mamíferos han sido caracterizadas 3 isoformas de la Hex (A, B y S), compuestas por la homo o heterodimerización de dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) distintas. Las tres isoformas pueden metabolizar sustratos neutros. Sin embargo, sólo las

isoformas A ( $\alpha\beta$ ) y S ( $\alpha\alpha$ ) son capaces de metabolizar sustratos negativamente cargados, debido a la presencia de subunidades  $\alpha$  en su estructura. En base a ello, las dos isoformas encontradas en los ovocitos de *X. laevis* podrían ser clasificadas como de tipo A y/o S.

Ambas isoformas pudieron separarse por electroforesis en geles nativos puesto que mostraron diferentes movilidades electroforéticas. La composición polipeptídica de cada una de ellas pudo determinarse por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex obtenido en esta tesis. La isoforma de mayor movilidad electroforética en gel nativo (referida como I<sub>2</sub>) mostró estar compuesta por, al menos, tres tipos de polipéptidos de 63 kDa, 59 kDa y 49 kDa. Sólo el polipéptido de 59 kDa estuvo presente en la isoforma de menor movilidad electroforética (referida como I<sub>1</sub>). El peso molecular predicho para los polipéptidos codificados en los ADNcs de las Hexs de *X. laevis* caracterizados en esta tesis fue de 60,5 kDa, luego de la ruptura de su péptido señal de anclaje al RER. Los pesos moleculares encontrados para los polipéptidos de 63 kDa y 59 kDa estarían en concordancia con estas predicciones, y también con los pesos moleculares predichos para los polipéptidos codificados en el gen *hex* identificado en *X. tropicalis* (61,3 kDa, luego de la ruptura del péptido señal de anclaje al RER). El tamaño molecular encontrado para estos polipéptidos, también fue concordante con los tamaños moleculares esperados para los precursores (pro-polipéptidos) de las subunidades  $\alpha$  (58,2 kDa) y  $\beta$  (59,5 kDa) que constituyen las Hexs de humano (Mahuran y col., 1988) y con el tamaño molecular deducido para el polipéptido de la Hex de *P. mammillata* (59 kDa; Koyanagi y Honegger, 2003).

Como fue mencionado previamente, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las distintas isoformas de la Hex en humano son sintetizadas como pre-pro-precursores. La obtención de las subunidades maduras requiere, entre otras modificaciones, la ruptura proteolítica del péptido señal de anclaje al RER y de un propéptido de ~10 kDa perteneciente a su extremo N-terminal (Mahuran y col., 1988). Fue reportado que luego de su separación proteolítica, los propéptidos se mantienen unidos a las subunidades maduras por enlace disulfuro (Quon y col., 1989; Hubbes y col., 1989). Esta posibilidad fue estudiada en las Hexs de ovocitos de *X. laevis* y sólo un polipéptido a ~55 kDa fue inmunodetectado con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex en condiciones no reductoras. Este resultado sugiere que los 3 polipéptidos que constituyen a estas Hexs, están química y estructuralmente relacionados. Además, podría sugerir que los polipéptidos de 59 kDa

y/o 49 kDa que constituyen la isoforma I<sub>2</sub> podrían ser originados por la ruptura proteolítica de alguno de los polipéptidos de mayor tamaño, de manera semejante a lo que ocurre en humano.

El antisuero  $\alpha$ -GST/Hex fue obtenido a partir de la región N-terminal de la Hex de *X. laevis* codificada en el ADNc JN127371. De este modo, es esperado que sólo sea capaz de reconocer epítopes pertenecientes a esta región de las Hexs. Sin embargo, ningún polipéptido de bajo peso molecular (~10 kDa) fue identificado por Western blot con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex cuando el extracto crudo de ovocitos de *X. laevis* fue resuelto en SDS-PAGE concentrado (15 % p/v) en condiciones reductoras (dato no mostrado). En base a ello, se podría hipotetizar que los polipéptidos de 59 kDa y 49 kDa encontrados en la isoforma I<sub>2</sub> podrían originarse por la ruptura proteolítica de un fragmento C-terminal de un precursor. En concordancia con esta hipótesis, Mahuran y col. (1988) propusieron, a partir del análisis del peso molecular esperado y del obtenido por cromatografía de exclusión molecular en HPLC, que la subunidad  $\alpha$  constituyente de las Hexs de humano podría ser modificada en el lisosoma en su extremo C-terminal. Sin embargo, nuevos experimentos deberán ser realizados para demostrar esta hipótesis en *X. laevis*.

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las Hexs de humano sufren procesamientos proteolíticos diferenciales que permiten identificarlas en SDS-PAGE (Mahuran y col., 1988). En esta tesis fue demostrado que los polipéptidos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  de las Hexs de *X. laevis* podrían ser sintetizados desde un mismo gen *hex* por splicing alternativo de dos de sus exones. Ambos polipéptidos presentan el mismo tamaño molecular deducido (~60,5 kDa). Como se discutió anteriormente, el tamaño de estos polipéptidos es concordante con el tamaño molecular de los polipéptidos de 59 y 63 kDa encontrados en la isoforma de tipo A/S I<sub>2</sub> y con el tamaño molecular del polipéptido de 59 kDa que constituye la isoforma de tipo A/S I<sub>1</sub>. En mamíferos, la isoforma A está constituida por un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y la isoforma S por un homodímero de subunidades  $\alpha$ . Sin embargo, se desconoce la estructura molecular de estas Hexs de *X. laevis*, como también la de la Hex de otros anfibios. De este modo, a pesar de que nuestros experimentos muestran diferentes composiciones polipeptídicas en las isoformas I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>, y que es probable que alguno de sus polipéptidos estructurales sufra procesamientos proteolíticos diferenciales, los mismos no son concluyentes para

establecer alguna relación entre la composición polipeptídica de estas isoformas y la naturaleza  $\alpha$  o  $\beta$  de los polipéptidos que las constituyen.

La localización subcelular de la Hex en ovocitos de *X. laevis* fue previamente estudiada por Wall y Meleka (1985). Estos autores mostraron, por experimentos de histoquímica y tinción por actividad, que la Hex está localizada en toda la periferia de los ovocitos en etapas tempranas de su crecimiento (estadio I y II temprano). Nuestros resultados de inmunohistoquímica utilizando antisuero  $\alpha$ -GST/Hex y la lectina de *D. biflorus* mostraron, además, que la Hex colocaliza con el ligando de dicha lectina, que es un marcador de gránulos corticales en *X. laevis*. La localización de la Hex en gránulos corticales de los ovocitos de *X. laevis* había sido previamente inferida por medidas de actividad glucosidasa realizadas en el exudado de los gránulos corticales proveniente de los ovocitos activados con ionóforo de calcio (Greve y col., 1985). Nuestros experimentos de inmunohistoquímica estarían en concordancia con lo reportado por estos autores. Sin embargo, Wall y Melaka (1985) no pudieron localizar a la Hex en ovocitos crecidos (estadio de crecimiento IV en adelante) debido a que la visualización de la señal proveniente de la Hex se enmascaró por la pigmentación del hemisferio animal de estos ovocitos y por la intensificación de una señal inespecífica proveniente de la deposición de colorante sobre el vitelo. Greve y col. (1985) intentaron localizar la Hex en ovocitos enteros depuestos mediante experimentos de citoquímica y tinción por actividad Hex, y también fallaron. Ellos adjudicaron la ausencia de tinción proveniente de la Hex a la falta de penetrabilidad celular de algunos de los reactivos utilizados para evidenciarla. En esta tesis, estas desventajas fueron superadas localizando la Hex por inmunohistoquímica de fluorescencia con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex en cortes de ovocitos. Nuestros resultados demostraron por primera vez que la Hex está principalmente localizada en el córtex del hemisferio animal de los ovocitos crecidos y depuestos (estadio de crecimiento IV en adelante), y que esta localización se mantiene luego de la fecundación. Este resultado sugiere que la Hex es relocalizada durante el crecimiento de los ovocitos en el ovario o que es preferencialmente sintetizada en el hemisferio animal de los ovocitos que se encuentran en las últimas etapas de su crecimiento. Esta última hipótesis es soportada por el hallazgo de que la periferia de los ovocitos crecidos es el sitio principal donde ocurre la síntesis de proteínas (Capco y Mecca; 1988) y de que la mayor parte del aparato de Golgi, un

orgánulo transitado por la Hex durante su síntesis (Proia y col., 1984), está localizado en el hemisferio animal de estos ovocitos (Imoh y col., 1983).

Decroly y col. (1979) y Wall y Meleka (1985) reportaron en *X. laevis* la presencia de la Hex en orgánulos semejante a lisosomas que fueron asociados con la endocitosis de vitelogenina y con el catabolismo del embrión recientemente formado. Vo y Hedrick (2003) demostraron que la Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos de *X. laevis* participa de la prevención de la polispermia. Nuestros experimentos de inmunohistoquímica mostraron una localización subcelular de la Hex (en gránulos corticales y en el citosol de los ovocitos) concordante con estos reportes. Interesantemente, Elinson y col. (1975), y Cabada y col. (1989), sugirieron que el hemisferio animal de los ovocitos de anfibio es el sitio de entrada del espermatozoide durante la fecundación. Sin embargo, estos experimentos no son suficientes para demostrar la existencia de alguna relación entre la localización diferencial de la Hex en el hemisferio animal de los ovocitos crecidos y cigotos, y estos sucesos. Tampoco son concluyentes para establecer cuál de las isoformas de la Hex caracterizadas en geles nativos está asociada con los gránulos corticales, y cuál con el resto del citoplasma del ovocito.

En los gametos de *R. arenarum* (modelo de estudio de nuestro laboratorio) sólo se había reportado la presencia de glucosidasas en los espermatozoides. En este trabajo de tesis, se determinó la presencia de siete glucosidasas en los ovocitos de *R. arenarum*. Las principales actividades encontradas en extractos crudo correspondieron a las glucosidasas N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Hex) y N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa. La actividad de estas enzimas fue al menos 2,5 veces mayor que el resto de las actividades ensayadas; incluyendo fucosidasa, manosidasa, glucosidasa y galactosidasa. Reportes previos sugieren que la Hex puede hidrolizar tanto residuos de N-acetil glucosamina como de N-acetil galactosamina terminales desde sus sustratos (Beely, 1985). De este modo, a pesar de que la actividad N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa fue 1,7 veces mayor que la actividad N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa, ambas podrían estar asociadas a la misma enzima.

La actividad de la Hex de ovocitos de *R. arenarum* fue evaluada a distintos pH. Fue encontrado que esta enzima presenta un valor de pH óptimo cercano a 3,5. Este

valor de pH óptimo está en concordancia con el valor de pH óptimo esperado para una enzima de origen lisosomal como lo es la Hex. Además, está en concordancia con el valor de pH óptimo reportado para la Hex de espermatozoides de la misma especie (pH=3,5; Martínez y col., 2000). Sin embargo, a pHs cercanos a los encontrados en el medio ambiente natural donde ocurre la fecundación de este anfibio (pH~8,0; O'Brien y col., 2011), la actividad de la Hex fue prácticamente nula. Martínez y col. (2000) demostraron que la Hex de espermatozoides de *R. arenarum* es capaz de interaccionar *in vitro* a modo de lectina con componentes de la EV de ovocitos homólogos en buffers de pH cercanos a la neutralidad (pH=7,6). A su vez, estos autores reportaron que esta Hex es capaz de recuperar su actividad luego de la incubación por tiempos prolongados (hasta 16 h) en buffer de pH 8,80. Nuestros experimentos realizados en gel nativo (pH~8,0) demuestran que la Hex de ovocitos de *R. arenarum* se comporta de la misma manera, siendo capaz de recuperar su actividad por la reincubación en un buffer de pH adecuado (pH~4,0). En su conjunto, estos resultados permiten hipotetizar que la actividad de la Hex de gametos de *R. arenarum*, como enzima o como lectina, podría ser modulada durante la fecundación por el pH de su microentorno, al igual que lo propuesto para las glucosidasas de los gametos de ascidias en el modelo de fecundación actualmente aceptado.

El número y tipo de isoformas de la Hex en los ovocitos maduros de *R. arenarum* fue determinado en primera instancia en gel nativo utilizando los sustratos MUG y MUGS. Tres isoformas de la Hex fueron evidenciadas en estos experimentos. Dos de estas isoformas (referidas como HexA/S<sub>1</sub> y HexA/S<sub>2</sub>) fueron capaces de metabolizar tanto sustratos neutros como negativamente cargados, mostrando ser isoformas de tipo A o S según la caracterización realizada para mamíferos. Sin embargo, una de ellas (referida como HexB) sólo fue capaz de metabolizar sustratos neutros en forma semejante a la isoforma de mamífero de tipo B. Éste representa el primer reporte sobre la existencia de distintas isoformas de la Hex en los anfibios con actividades semejantes a las de las isoformas A/S y B caracterizadas en los mamíferos.

La composición polipeptídica de estas isoformas se determinó por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. La isoforma de tipo A/S mostró estar constituida por polipéptidos de ~43 kDa, mientras que la isoforma de tipo B presentó sólo polipéptidos de ~32 kDa en su estructura. Martínez y col. (2000) reportaron que la Hex purificada a partir de hígado de *R. arenarum* posee un tamaño molecular aproximado de 45 kDa en SDS-PAGE. El tamaño molecular encontrado para el polipéptido

constituyente de la isoforma de tipo A/S está en concordancia con este reporte. Sin embargo, los tamaños moleculares de estos polipéptidos fueron diferentes a los encontrados por Western blot con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex para los polipéptidos constituyentes de las Hexs de ovocitos depuestos de *X. laevis*. También fueron diferentes a los tamaños moleculares predichos para los polipéptidos de las Hexs de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  caracterizados en *X. laevis* y *X. tropicalis*, y al tamaño molecular predicho para la Hex de *P. mammillata* (Koyangi y Honneger, 2003).

Como ya mencionamos, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  maduras encontradas en las Hexs de humano son generadas por proteólisis desde un precursor polipeptídico, y el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex no podría reconocer fragmentos polipéptidos provenientes de la región central o C-terminal de las Hexs. Cuando se estudió la asociación por enlace disulfuro de estos polipéptidos, con otros que posiblemente no fueron inmunodetectados, no se observó ningún corrimiento significativo de sus tamaños moleculares, sugiriendo que no son producto de una proteólisis interna de un precursor, a diferencia de lo que ocurre en humano. En estos experimentos sólo se evidenció un pequeño aumento en el tamaño molecular del polipéptido que constituye la isoforma de tipo B, equivalente a 1,7 kDa, sugiriendo que en realidad esta isoforma estaría constituida por polipéptidos de 32 kDa que tendrían unido un pequeño péptido por enlace disulfuro. Ha sido sugerido que los procesamientos proteolíticos que dan origen a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  maduras de las Hexs de humano, que ocurren luego de la ruptura del péptido señal de anclaje al RER, suceden en el lisosoma como consecuencia del ataque proteolítico de sectores estructuralmente expuestos en los precursores plegados (Mahuran y col., 1988). Es probable que ésta fragmentación del polipéptido constituyente de isoforma B de la Hex de ovocitos maduros de *R. arenarum* se genere de igual modo.

Como un prerrequisito para vislumbrar el rol de la Hex en los ovocitos de *R. arenarum* se determinó su localización subcelular. En experimentos de inmunohistoquímica realizados con el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex se pudo visualizar que la Hex está localizada en toda la periferia de los ovocitos, entre la envoltura vitelina y los gránulos de pigmento, como también dispersa en el interior de su citoplasma. Estudios de ultraestructura realizados por microscopía electrónica mostraron que los gránulos corticales de los ovocitos de *X. laevis* están dispuestos como una fila única de pequeños

orgánulos (~1,2µm - 2,5µm), situados en toda la periferia celular entre la membrana plasmática y los gránulos de pigmento (Balinsky y Devis, 1963; Dumont, 1972). La misma disposición fue encontrada en ovocitos de *R. arenarum* utilizando microscopía electrónica (Gómez y col., 1984). La localización periférica de la Hex encontrada en esta tesis en los ovocitos maduros de *R. arenarum* fue concordante con esta descripción, sugiriendo que podría estar asociada a los gránulos corticales. La presencia de la Hex en los gránulos corticales de estos ovocitos fue confirmada por medio de ensayos de actividad enzimática realizados en el producto de la reacción cortical. En estos ensayos no sólo fue detectada la actividad proveniente de la Hex, sino que además, fue encontrada la presencia de una alta actividad fucosidasa, sugiriendo que ambas enzimas podrían estar involucradas en la conversión de la envoltura vitelina en la envoltura de fecundación, y como consecuencia en la prevención de la polispermia durante la fecundación de *R. arenarum*. En concordancia con esta hipótesis, fue demostrado que una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos de *X. laevis* es liberada durante la reacción cortical y que participa de la prevención de la polispermia en esta especie (revisado en Hedrick, 2008). La Hex fue también relacionada con la prevención de la polispermia en especies no anfibias. Miller y col. (1993b) encontraron que una Hex de tipo B localizada en los gránulos corticales de los ovocitos de ratón es liberada durante la reacción cortical y que participa del bloqueo de la polispermia disminuyendo la unión de los espermatozoides con la zona pelúcida. En ascidias fue demostrado que una Hex que es liberada desde los óvulos al agua de mar luego de la fecundación participa del bloqueo de la polispermia impidiendo la unión supernumeraria de espermatozoides a la envoltura vitelina (Lambert, 1989b).

La composición polipeptídica de la Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum* se determinó por Western blot utilizando el antisuero  $\alpha$ -GST/Hex. Fue encontrado que esta Hex no estaba constituida por ninguno de los polipéptidos mayoritarios caracterizados en el extracto crudo de los ovocitos maduros (43 kDa y 32 kDa), sino por polipéptidos de ~60 kDa. El peso molecular encontrado para este polipéptido fue concordante con el peso molecular predicho para los polipéptidos de las Hexs de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  caracterizados en esta tesis en *Xenopus* y, además, fue similar al peso molecular de los polipéptidos de 63 kDa y 59 kDa que constituyen las isoformas I<sub>1</sub> (59kDa) e I<sub>2</sub> de la Hex de ovocitos de *X. laevis*.

Cuando la naturaleza de esta Hex fue estudiada midiendo la actividad con los sustratos MUG (HexA/S + HexB) y MUGS (HexA/S), se encontró que metaboliza sustratos neutros con mayor velocidad (~9 veces mayor) que sustratos negativamente cargados. Este resultado podría sugerir que la Hex de gránulos corticales de *R. arenarum* es principalmente del tipo B. Sin embargo, la actividad con el sustrato MUGS no fue nula.

En humanos, los parámetros cinéticos de las Hexs A, B y S, con los sustratos MUG y MUGS, fueron determinados para las isoformas purificadas a partir de hígado (Kytzia y Sandhoff, 1985). Fue encontrado que la isoforma de tipo A es capaz de metabolizar con mayor velocidad al sustrato MUG ( $K_m=0,90$  mM;  $V_{m\acute{a}x}: 1,8 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ) que al sustrato MUGS ( $K_m=0,31$  mM;  $V_{m\acute{a}x}: 2,5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ). Teniendo en cuenta este reporte, que el sustrato MUGS no es capaz de discriminar entre las isoformas A y S, y que en *R. arenarum* no se determinaron las propiedades cinéticas de las isoformas de la Hex caracterizadas con los sustratos MUG y MUGS, los resultados encontrados en esta tesis no resultan suficientes para descartar la presencia de ninguna de las isoformas de la Hex evaluadas, en los gránulos corticales de los ovocitos de *R. arenarum*. Además, la carencia de las determinaciones cinéticas en *R. arenarum* tampoco permiten predecir si las actividades obtenidas con los sustratos MUG y MUGS provienen, o no, de la misma enzima.

En su conjunto, los resultados encontrados en ovocitos maduros de *R. arenarum* demuestran la existencia de Hex/s exclusiva/s de gránulos corticales, que es/son liberada/s durante la reacción cortical. Este hallazgo permite hipotetizar la participación de esta/s Hex/s en la conversión de la envoltura vitelina en envoltura de fecundación, y en consecuencia en la prevención de la polispermia. Además, como ya mencionamos, en ovocitos de *X. laevis* fue reportada la existencia de Hex asociada a orgánulos semejantes a lisosomas que han sido vinculadas a la endocitosis de vitelogenina (Wall y Meleka, 1985) y al catabolismo del cigoto recientemente formado (Decroly y col., 1979). Es probable que las Hexs constituidas por los polipéptidos de 32 kDa y 43 kDa caracterizadas en los extractos crudo de los ovocitos maduros de *R. arenarum* tengan funciones semejantes a las de estas Hexs de *X. laevis*.

La localización subcelular de la Hex en los espermatozoides de *R. arenarum* fue estudiada como un prerrequisito para determinar su rol durante la fecundación en esta especie.

Durante la reacción acrosómica, las proteínas acrosomales son liberadas en el microentorno de la cabeza de los espermatozoides. Se cree que las enzimas liberadas (proteasas, glucosidasas, etc.) actúan localmente sobre las glucoproteínas de la envoltura del ovocito facilitando el avance del espermatozoide hacia su membrana plasmática. En ratón, fue demostrado que una Hex de tipo B es liberada durante la reacción acrosómica y que facilita la penetración del espermatozoide a través de la ZP presumiblemente removiendo o enmascarando residuos N-acetil glucosaminidasa que generarían uniones estables con los espermatozoides (Miller y col., 1993a). En concordancia con resultados previamente publicados por nuestro laboratorio (Martinez y col., 2000), el análisis de las fracciones espermáticas en *R. arenarum* mostró una alta actividad de Hex en el contenido acrosomal, sugiriendo su participación en el pasaje del espermatozoide a través de la envoltura vitelina de los ovocitos. El análisis de la actividad de esta/s Hex/s con los sustratos MUG (Hex total) y MUGS (HexA/S) mostró que puede metabolizar sustratos neutros al menos 11 veces más rápido que sustratos negativamente cargados. Sin embargo, la actividad Hex con el sustrato MUGS no fue nula. Teniendo en cuenta las mismas consideraciones realizadas en el análisis de las isoformas de la Hex presentes en los gránulos corticales de los ovocitos maduros de *R. arenarum*, no podría descartarse la presencia de ninguna de las isoformas analizadas (HexB y HexA/S) en la matriz acrosomal de los espermatozoides de *R. arenarum* en base a estos experimentos.

Como fue mencionado en la introducción, durante la reacción acrosómica se generan vesículas acrosomales compuestas por fracciones de la membrana acrosomal externa y de la membrana plasmática de la región apical de la cabeza del espermatozoide. En nuestros experimentos, la ruptura del acrosoma fue inducida por liofilización de los espermatozoides seguido de shock hiposmótico (Raisman y col., 1980). La Hex fue detectada entre las proteínas extraídas desde las membranas provenientes de la cabeza del espermatozoide, permitiendo suponer su presencia en la membrana plasmática apical y/o acrosomal externa. La presencia de Hex en la membrana plasmática de los espermatozoides fue reportada en humano (Perez Martinez, 2008) y en la mosca mediterránea de la fruta (Intra y col., 2011). En *D. melanogaster*

fue demostrado que una Hex integral de membrana ubicada en la región de la membrana plasmática que subyace por encima del acrosoma es indispensable para la fecundación de esta especie (Perotti y col., 2001). De este modo, la presencia de la Hex en esta fracción subcelular de los espermatozoides de *R. arenarum* podría sugerir su participación en la unión inicial de los gametos.

Martínez y col. (2000) sugirieron la presencia de una Hex integral de membrana en los espermatozoides reaccionados de *R. arenarum*. Nuestros resultados fueron concordantes con los de estos investigadores, verificándose la presencia de actividad Hex entre las proteínas extraídas con tritón X-100 de los espermatozoides reaccionados.

El análisis del tipo de actividad de las Hexs presentes en la fracción de las membranas provenientes de la cabeza de los espermatozoides y en los espermatozoides reaccionados, con los sustratos MUG y MUGS, mostró que metabolizan tanto sustratos neutros como sustratos negativamente cargados, aunque estos últimos con menor eficiencia. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente detalladas, tanto para la Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos, como para la Hex presente en la matriz acrosomal de los espermatozoides, no se podría descartar la presencia de ninguna de las isoformas de la Hex analizadas (B o A/S) en estas fracciones.

En resumen, el análisis de la presencia de Hexs en las distintas fracciones espermáticas sugiere que la Hex de espermatozoides de *R. arenarum* no sólo podría estar involucrada en la unión de los gametos sino, además, en el pasaje del espermatozoide a través de la envoltura vitelina de los ovocitos.

## **CAPÍTULO VI: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE GLUCOSIDASAS INVOLUCRADAS EN LA FECUNDACIÓN DE *R. ARENARUM***

### **INTRODUCCIÓN**

Resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio sugirieron que la Hex participa en la fecundación de *R. arenarum* (Martinez y col., 2000). Experimentos realizados en esta tesis demostraron, además, que la Hex está localizada tanto en la matriz acrosomal como en las membranas apicales de los espermatozoides de *R. arenarum*, sugiriendo que podría estar involucrada en la unión primaria entre los gametos y/o en el pasaje del espermatozoide reaccionado a través de la EV del ovocito.

En esta tesis también se demostró la presencia de glucosidasas en los ovocitos de este anfibio. Asociadas a los gránulos corticales se encontraron dos actividades glucosídicas mayoritarias, Hex y fucosidasa, que fueron liberadas durante la reacción cortical que lleva al bloqueo lento de la polispermia.

del Pino y Cabada (1987) reportaron que el tratamiento de los ovocitos de *R. arenarum* con la lectina concanavalina A disminuye la tasa de fecundación, sugiriendo la participación de residuos de D-manosa y/o D-glucosa de la EV en el etapa de reconocimiento espermatozoide- ovocito. En concordancia con estos trabajos, Darío Krapf (trabajo de tesis doctoral) mostró que la adición de D-manosa o de N-acetil galactosamina (sustrato de la Hex) en el medio de interacción disminuye el porcentaje de unión de espermatozoides al hemisferio animal de la EV de los ovocitos de *R. arenarum*.

Barisone y col. (2003) demostraron mediante ensayos de lectin blot que los residuos de N-acetil galactosamina de gp75 (homóloga a ZPA) son removidos durante la conversión de la EV en la EF en *R. arenarum*.

Estos trabajos sugieren la participación de distintas glucosidasas (Hex, fucosidasa, manosidasa, glucosidasa y N-acetil galactosidasa) en la fecundación de *R. arenarum*. En este capítulo se abordará la determinación de la participación de estas glucosidasas en la fecundación de este anfibio, tanto a nivel global como en la etapa de unión espermatozoide-EV, poniendo especial énfasis en determinar el rol de la Hex.

## RESULTADOS

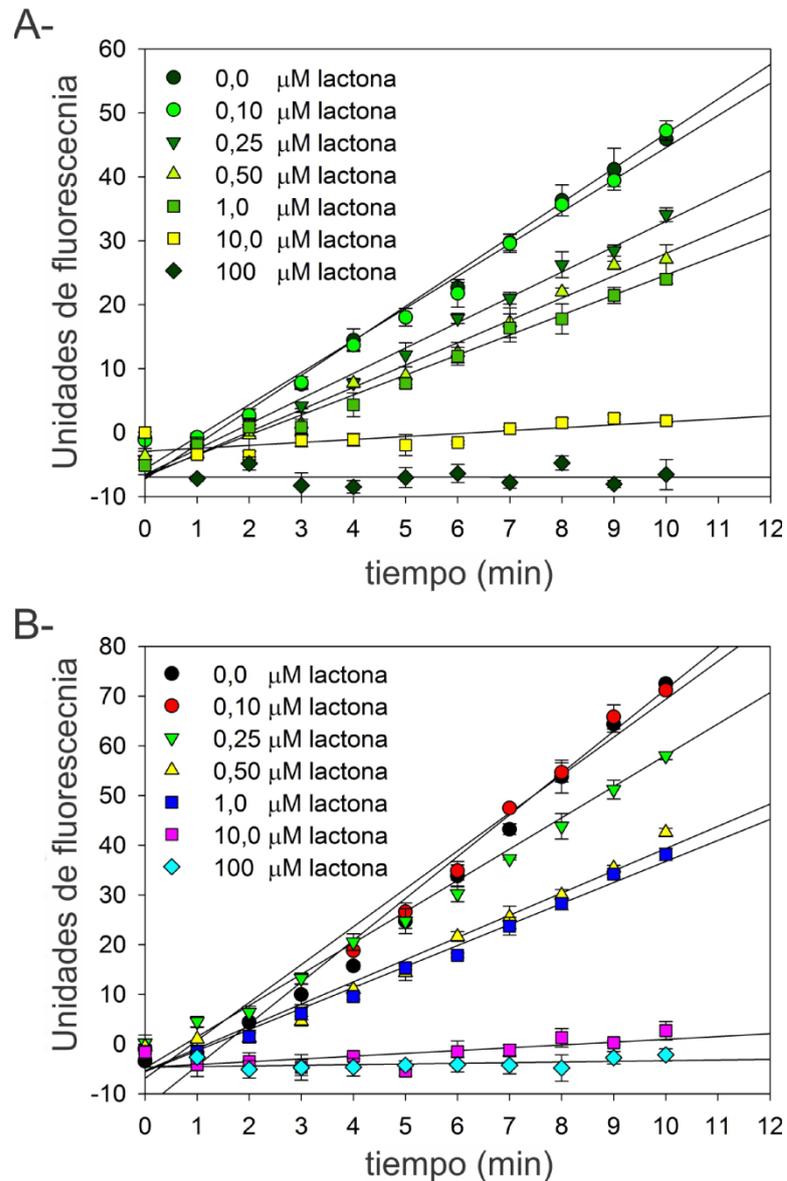
### A- ROL DE LA HEX EN LA FECUNDACIÓN DE *R. ARENARUM*

#### A1- Ensayos biológicos de inhibición de la Hex

El uso de inhibidores específicos para determinar el rol biológico de la Hex en la fecundación fue abordado en diferentes especies, incluyendo ratón (Miller y col., 1993a; Miller y col., 1993b), hámster (Zitta y col., 2006) y la ascidia *P. mammillata* (Godknecht y Honegger, 1995). Zitta y col. (2006) evaluaron el efecto de dos inhibidores específicos de la Hex, la 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona (lactona) y la N-acetilglucosamina tiazolina, sobre la Hex de espermatozoides de hámster. La lactona fue más potente como inhibidor de la Hex (EC50: 0,02 mM para la lactona y EC50: 32 mM para la N-acetilglucosamina tiazolina) y, además, fue capaz de inhibir la unión de los espermatozoides a la ZP en ensayos *in vitro*.

#### A1A- Efecto de la 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona sobre la Hex de gametos de *R. arenarum*

Como un primer objetivo para evaluar la participación de la Hex en la fecundación de *R. arenarum*, se determinó el efecto de la lactona sobre la Hex presente en sus gametos. Para ello, la actividad Hex total en los extractos crudo de espermatozoides y de ovocitos de *R. arenarum* fue evaluada mediante ensayos continuos de actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de lactona (0 a 100  $\mu$ M) (fig. 57).

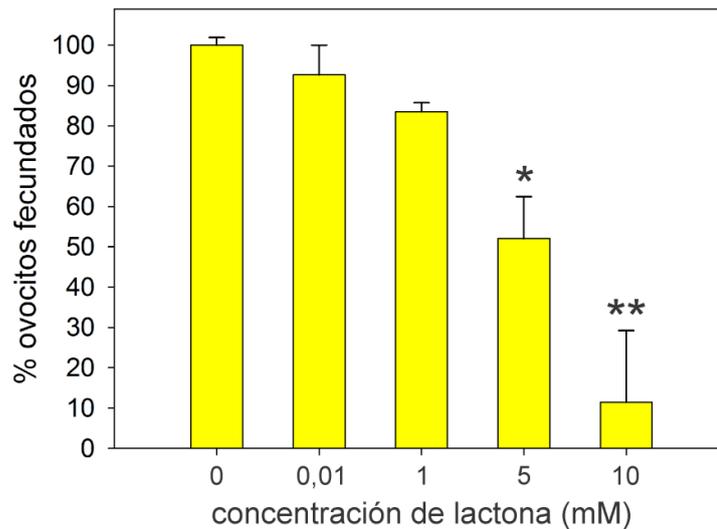


**Figura 57. Efecto de la 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona sobre la actividad Hex de gametos de *R. arenarum*.** La actividad Hex total en los extractos crudo de espermatozoides (A) y de ovocitos (B) de *R. arenarum* fue evaluada en presencia de distintas concentraciones de lactona midiendo la cantidad de metil-umbeliferona liberada desde el sustrato MUG (pH=5,0; 37 °C). Cada punto representa el promedio y el desvío estándar de tres mediciones.

La actividad Hex total presente tanto en el extracto crudo de espermatozoides como en el extracto crudo de ovocitos fue inhibida por la presencia de lactona de manera concentración dependiente. En ambos casos, a concentraciones de lactona 10  $\mu\text{M}$  la actividad Hex total fue  $\sim 7\%$  de la actividad Hex total control (en ausencia de lactona), mientras que a concentraciones mayores (100  $\mu\text{M}$  lactona) la actividad Hex total fue prácticamente nula (sólo 1,5% respecto del control).

*A1B- Efecto de la adición de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona en la fecundación de R. arenarum*

Con el objetivo de evaluar la participación de la Hex en la fecundación de *R. arenarum* se realizaron experimentos de fecundación *in vitro* en la presencia de diferentes concentraciones de lactona (0 a 10 mM). Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 58.



**Figura 58. Efecto de la adición de lactona en la fecundación de *R. arenarum*.** Lotes de ~50 ovocitos de *R. arenarum* desprovistos de su cubierta gelatinosa fueron inseminados con  $1 \times 10^5$  sp/ml (EW: 50% v/v) en presencia de distintas concentraciones de lactona ( $T=25$  °C). El porcentaje de ovocitos fecundados (embriones en estadio de 2 células) referido al control (tomado como 100%) fue determinado bajo lupa estereoscópica 2 horas después de la adición de los espermatozoides. Las barras representan el promedio y el desvío estándar obtenidos en 4 experimentos independientes realizados por triplicado. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante un ensayo ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak;  $p < 0,001$ . 100% equivale a un promedio de 65% de ovocitos fecundados.

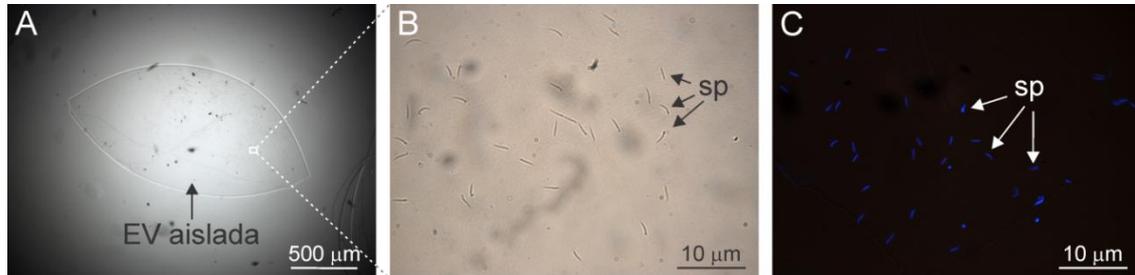
Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron un descenso gradual en el porcentaje de ovocitos fecundados a medida que se aumentó la concentración de lactona en el medio de fecundación. A concentraciones de lactona adicionadas de 5 mM y 10 mM el porcentaje de fecundación disminuyó en forma significativa a ~52% y ~11%, respectivamente, respecto del ensayo control (Ringer 10%; 0  $\mu$ M lactona). Ninguna diferencia en la motilidad de los espermatozoides fue observada por microscopía óptica respecto del control en los medios de fecundación conteniendo las distintas concentraciones de lactona analizadas (datos no mostrados).

Estos ensayos demuestran la participación de la Hex en la fecundación de *R. arenarum*, como fue previamente sugerido en base a la localización subcelular de la

Hex en sus gametos. Sin embargo, no son suficientes para establecer la etapa de la fecundación en la que la Hex estaría involucrada: unión de los gametos, pasaje del espermatozoide reaccionado a través de la EV de los ovocitos o prevención de la polispermia.

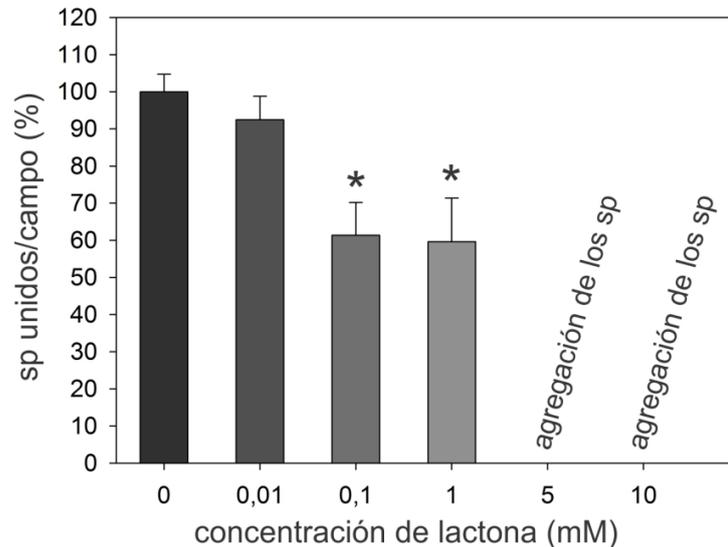
*AIC-Efecto de la adición de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona en la unión de los espermatozoides a la EV de los ovocitos de R. arenarum*

Experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio mostraron que la ausencia de EW en el medio de fecundación no afecta la cantidad ni la calidad de la unión de los espermatozoides de *R. arenarum* a las EV de los ovocitos homólogos (Darío Krapf; trabajo de tesis). Basados en estos trabajos, se diseñó una metodología para poder estudiar de manera cuantitativa la unión de los espermatozoides a EV aisladas (descrita en detalle en materiales y métodos). En estos experimentos los espermatozoides firmemente adheridos a las EV pueden ser contados por microscopía de campo claro o, alternativamente, por microscopía de fluorescencia luego de la tinción de sus núcleos con Hoechst (fig. 59).



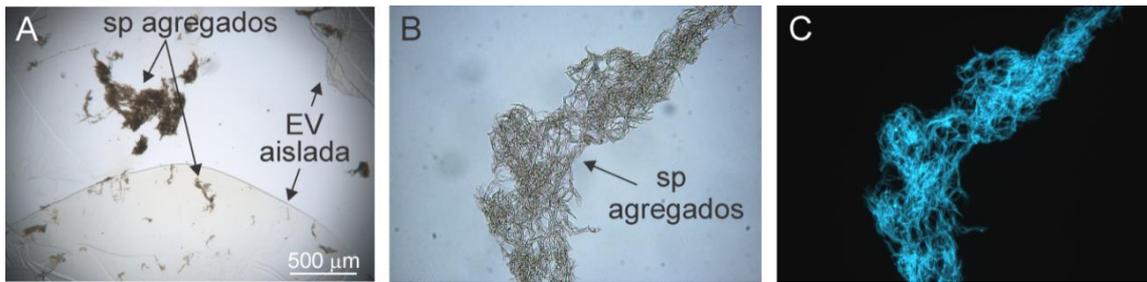
**Figura 59. Unión de espermatozoides a EVs aisladas.** EVs aisladas de ovocitos de *R. arenarum* fueron incubadas con una suspensión de espermatozoides ( $\sim 1 \times 10^6$  sp/ml) en un medio hipotónico (Ringer 10%) por 10 minutos. Luego, las EV fueron lavadas y los espermatozoides firmemente adheridos fueron fijados a la EV con formaldehído al 3,7 % v/v. **A-** Micrografía de campo claro tomada a baja magnificación (40x) mostrando una EV aislada y espermatozoides unidos a ella. **B-** Micrografía de campo claro tomada con una magnificación de 200 veces mostrando los espermatozoides (sp) que se unieron a la EV mediante una unión estable. Una región equivalente a la mostrada es señalizada con un recuadro en el panel A. **C-** Micrografía de fluorescencia azul (200x) correspondiente a espermatozoides unidos a una EV teñidos con Hoechst 33258 ( $\lambda_{em}=465nm$ ).

Con el objetivo de estudiar si la Hex participa de la fecundación de *R. arenarum* en la etapa de unión de los espermatozoides con la EV de los ovocitos, los ensayos de unión espermatozoide-EV aislada fueron realizados en la presencia de lactona a las concentraciones utilizadas en los experimentos de fecundación *in vitro* (fig.60).



**Figura 60. Efecto de la adición de lactona en la unión de los espermatozoides a la EV de ovocitos de *R. arenarum*.** EV aisladas de ovocitos de *R. arenarum* fueron incubadas por 10 minutos con  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml en medio Ringer 10% conteniendo distintas concentraciones de lactona (indicadas al pie del gráfico). Las barras indican el porcentaje promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo (magnificación 200x) referido al control (100%)  $\pm$  SEM; n=4. Para cada condición ensayada el número promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo fue obtenido a partir de al menos 10 campos distintos tomados sobre distintas EVs. 100% equivale a un promedio de 186 espermatozoides unidos por campo. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un ensayo ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni;  $p < 0,001$ .

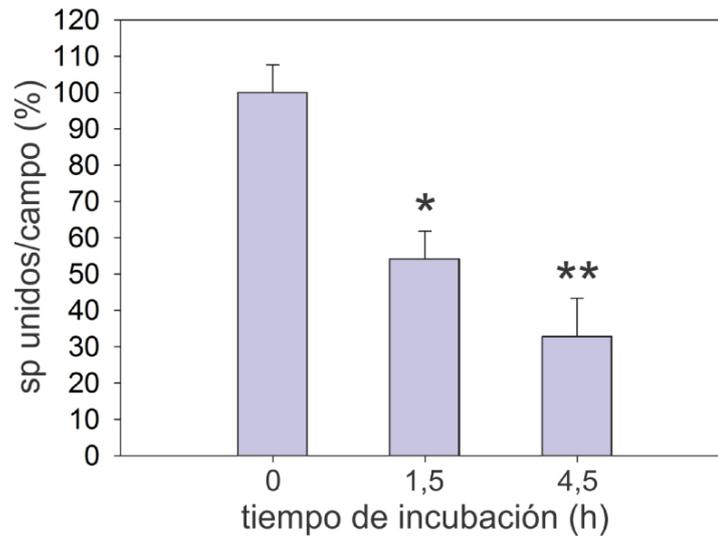
En estos ensayos se observó que la adición de lactona en el medio de incubación provocó una disminución significativa del número de espermatozoides unidos a la EV aislada de los ovocitos. A concentraciones de lactona adicionada de 0,1 mM y de 1 mM la unión de los espermatozoides a la EV disminuyó un 40%. Sin embargo, a concentraciones más elevadas (5 mM y 10 mM), donde la lactona también provocó un descenso significativo de la tasa de fecundación, los espermatozoides se agregaron espontánea e instantáneamente al contactar el medio que contenía a las EVs aisladas (fig. 61). Ninguna agregación espermática fue observada en la misma solución (Ringer 10%; lactona 5 mM y 10mM) en ausencia de EVs. El motivo de esta agregación es desconocido y posteriores experimentos deberán ser realizados para dilucidar este fenómeno.



**Figura 61. Efecto de la adición de lactona 10 mM sobre los espermatozoides de *R. arenarum* en presencia de EVs aisladas.** A- Micrografía de campo claro tomada a baja magnificación (40 x) mostrando la agregación de los espermatozoides (sp agregados) en presencia de EV y lactona 10 mM. B- Micrografía de campo claro y (C-) de fluorescencia tomadas a mayor magnificación mostrando la agregación de los espermatozoides con mayor detalle. Los núcleos espermáticos fueron teñidos con Hoechst 33258.

*A2- Efecto del pretratamiento de la EV de los ovocitos de *R. arenarum* con Hex pura en la unión de los espermatozoides*

Los resultados obtenidos en los experimentos de fecundación *in vitro* y de unión de espermatozoides a la EV en presencia de lactona, sugieren que la Hex participaría en la fecundación de *R. arenarum* al menos a nivel de la unión entre los gametos. Para corroborar esta hipótesis, se estudió la participación de la Hex en la unión de los espermatozoides con la EV utilizando EVs aisladas pretratadas con una Hex pura (jack bean; Sigma). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 62.



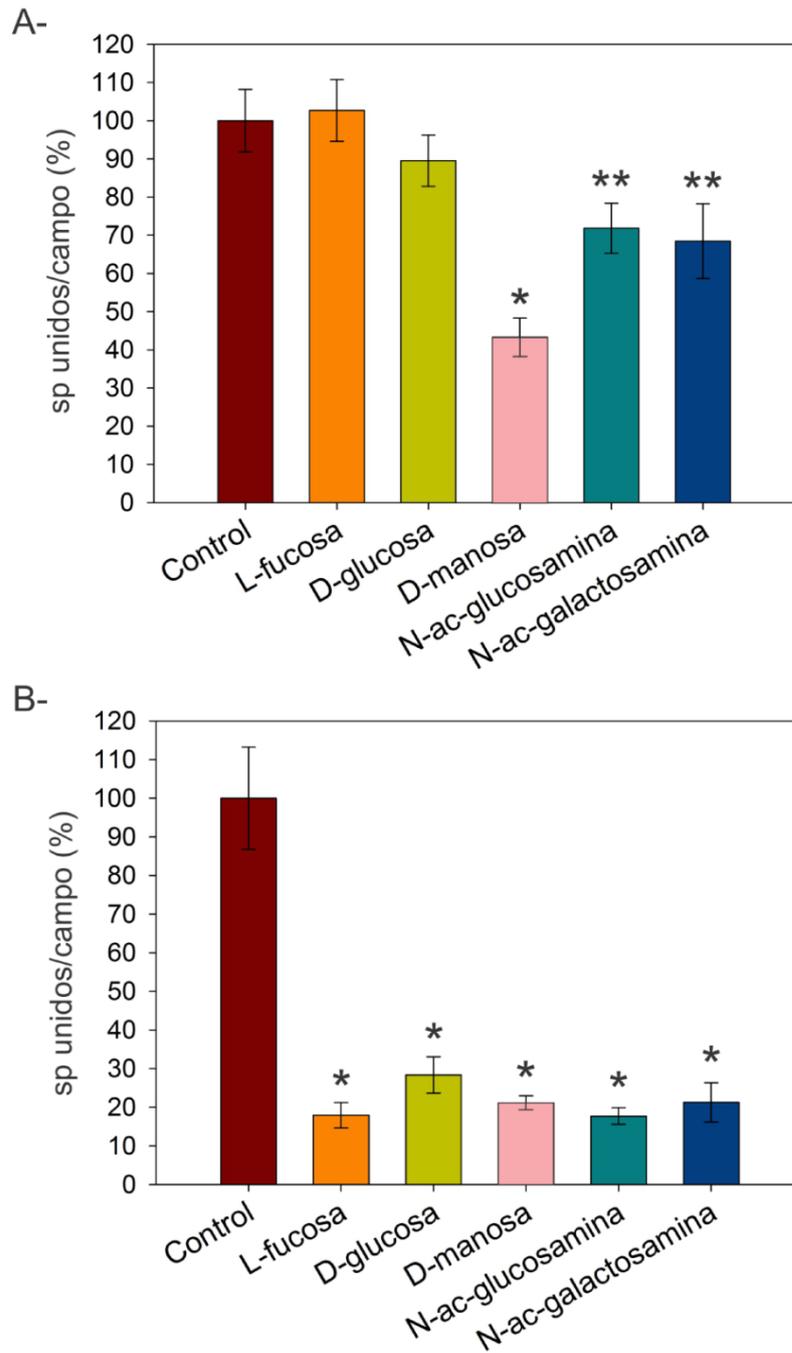
**Figura 62. Efecto del pretratamiento de la EV con Hex sobre la unión de los espermatozoides.** EVs aisladas de ovocitos de *R. arenarum* fueron incubadas con la Hex de jack bean pura los tiempos indicados al pie del gráfico (2 U/ml; pH=5,0). Las EVs fueron posteriormente lavadas e incubadas por 10 minutos con una suspensión de espermatozoides ( $3 \times 10^6$  espermatozoides/ml) en medio Ringer 10%; pH=7,6. Las barras indican el porcentaje promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo referido al control (100%)  $\pm$  SEM; n=3. Para cada condición ensayada el número promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo fue obtenido a partir de al menos 10 campos distintos tomados sobre distintas EVs. 100% equivale a un promedio de 40 espermatozoides por campo. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por el método de Kruskal-Wallis y el test de comparaciones múltiples de Dunn;  $p < 0,001$ .

En estos experimentos se observó un descenso gradual en el número de espermatozoides unidos a la EV en correlación con el aumento del tiempo de preincubación de las EVs aisladas con la Hex de jack bean pura. Luego de 4,5 horas de tratamiento, el número promedio de espermatozoides unidos a la EV disminuyó un 65% respecto del control (EVs aisladas sin tratar).

## **B- ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE OTRAS GLUCOSIDASAS EN LA FECUNDACIÓN DE *R. ARENARUM***

### *B1- Competencia de la unión espermatozoide-EV con distintos azúcares*

Para evaluar la participación de las glucosidasas sugeridas en la introducción (Hex, fucosidasa, manosidasa, glucosidasa y N-acetil galactosidasa) en la fecundación de *R. arenarum*, inicialmente se realizaron los experimentos de unión de los espermatozoides a la EV aislada en la presencia de concentraciones 10 mM y 100 mM de sus azúcares sustrato, que fueron utilizados como competidores de la interacción. Los resultados obtenidos son presentados en la figura 63.



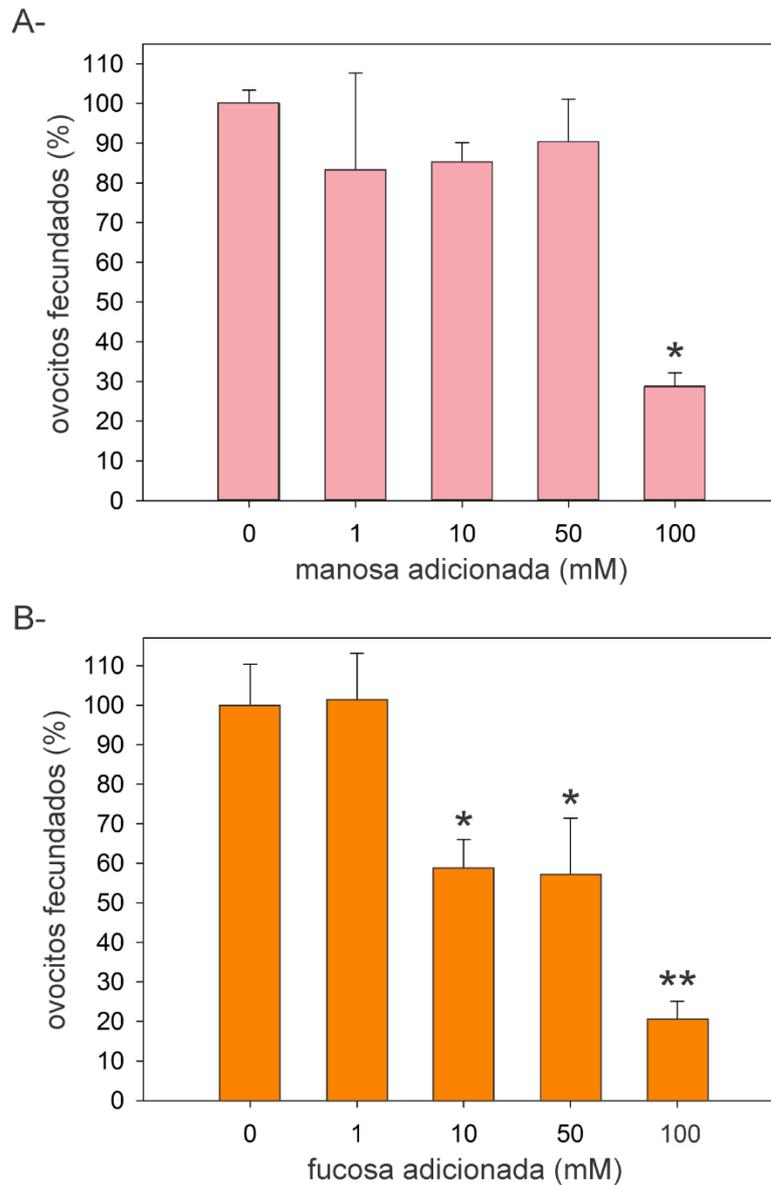
**Figura 63. Efecto de la presencia de distintos azúcares en la unión de los espermatozoides a la EV de ovocitos de *R. arenarum*.** EV aisladas de ovocitos de *R. arenarum* fueron incubadas por 10 minutos con  $3 \times 10^6$  espermatozoides/ml en medio Ringer 10% conteniendo (A-) 10 mM o (B-) 100 mM de los azúcares indicados al pie del gráfico. Las barras indican el porcentaje promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo referido al control (100%)  $\pm$  SEM. Para cada condición ensayada (n=3) el número promedio de espermatozoides unidos a la EV por campo fue obtenido a partir de al menos 10 campos distintos tomados sobre diferentes EVs. 100% equivale a un promedio de 35 espermatozoides por campo. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un ensayo ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Dunn;  $p < 0,05$ .

Los ensayos de competencia de la unión espermatozoide-EV aislada realizados en presencia de diferentes azúcares a concentraciones 10 mM (fig. 63A) mostraron que la

manosa, la N-acetil glucosamina y la N-acetil galactosamina fueron capaces de disminuir de manera significativa la unión de los espermatozoides a la EV. La manosa disminuyó la unión en aproximadamente el 57%, mientras que la N-acetil glucosamina y de N-acetil galactosamina provocaron una disminución de la unión en menores porcentajes (~30%). Ninguno de los otros azúcares evaluados a esta concentración (L-fucosa y D-glucosa) fue capaz de interferir la unión espermatozoide-EV, sugiriendo que no participan de esta interacción y demostrando la especificidad del efecto obtenido en las competencias realizadas con manosa, N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina. Cuando la concentración de los azúcares en el medio de interacción fue aumentada a 100 mM (fig. 63B), todos ellos fueron capaces de reducir significativamente la unión de los espermatozoides a la EV y en aproximadamente los mismos porcentajes (~80%). Ninguna diferencia en la motilidad de los espermatozoides fue observada por microscopía óptica cuando los espermatozoides fueron evaluados en los diferentes medios de unión analizados (datos no mostrados).

#### *B2- Efecto de la adición de manosa o fucosa en la fecundación de R. arenarum*

Con el objetivo de analizar si la adición de D-manosa o de L-fucosa afecta la fecundación de *R. arenarum* de manera global, se realizaron experimentos de fecundación *in vitro* en presencia de distintas concentraciones (0 a 100 mM) de estos azúcares (fig. 64).



**Figura 64. Efecto de la adición de manosa o fucosa en la fecundación de *R. arenarum*.** Lotes de ~50 ovocitos de *R. arenarum* desprovistos de su cubierta gelatinosa fueron inseminados con  $1 \times 10^5$  sp/ml (EW: 50% v/v) en presencia de distintas concentraciones de (A-) D-manosa o (B-) L-fucosa. El porcentaje de ovocitos fecundados referidos al control (100%) fue obtenido bajo lupa estereoscópica a las 2 horas de la adición de los espermatozoides. Las barras representan el promedio y el desvío estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un ensayo ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak;  $p \leq 0,001$ .

En estos experimentos se pudo verificar que la manosa redujo significativamente el porcentaje de fecundación sólo cuando fue adicionada a concentraciones de 100 mM (fig. 64A). A concentraciones menores (50 mM o inferior), el porcentaje de fecundación obtenido no varió respecto del control realizado sin la adición de azúcar. Por el contrario, la adición de fucosa mostró una disminución significativa (40%) del

porcentaje de fecundación a concentraciones 10 mM. La disminución de la fecundación fue mayor (80%) cuando se utilizaron concentraciones de fucosa 100 mM.

## DISCUSIÓN

Las glucosidasas, los carbohidratos y sus interacciones han sido relacionados al proceso de fecundación en numerosas especies animales (Miranda y col., 1997; Miranda y col., 2000; Perotti y col., 2001; Miller y col., 2002; Honegger y Koyanagi, 2008). En los anfibios, la deglucosilación de la EV de los ovocitos con PNGasa F, una enzima que remueve oligosacáridos unidos por enlace N-glucosídico a proteínas, o metaperiodato de sodio, disminuyó su capacidad de unión de espermatozoides tanto en *X. laevis* (Vo y Hedrick, 2000; Tian y col., 1997) como en *B. japonicus* (Omata y Katagiri, 1996) y *R. arenarum* (Gustavo Barisone, resultados no publicados), demostrando la importancia de estas interacciones en la fecundación.

Las glucosidasas fueron implicadas en la fecundación de *X. laevis* y *R. arenarum*. Como se detalló previamente, en *X. laevis* fue demostrado que una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos es liberada durante la reacción cortical desencadenada por la fecundación (Greve y col., 1985; Prody y col., 1985). Trabajos posteriores realizados en el mismo laboratorio demostraron que esta Hex hidroliza residuos de N-acetil glucosamina terminales de uno de los oligosacáridos de ZPC que actuaría como receptor espermático, contribuyendo de este modo con la prevención de la polispermia (Vo y Hedrick, 2003). Martínez y col. (2000) demostraron que si la fecundación de *R. arenarum* es competida con una Hex comercial (jack bean), con anticuerpos específicos  $\alpha$ -Hex o con los azúcares N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina a concentraciones 100 mM, la tasa de fecundación disminuye, vinculando a la Hex con la fecundación de este anfibio. Experimentos realizados en este trabajo de tesis mostraron que la Hex está presente tanto en los espermatozoides como en los ovocitos de *R. arenarum* y en localizaciones subcelulares que permiten suponer su participación en la fecundación. En este capítulo fue demostrado que el inhibidor específico de la Hex, 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona, que fue utilizado para determinar el rol de Hex en la fecundación de otras especies, es capaz de inhibir tanto la Hex de espermatozoides como de ovocitos de *R. arenarum*. La presencia de este inhibidor en experimentos de fecundación *in vitro* inhibió la fecundación de los

ovocitos de manera concentración dependiente, demostrando la participación de la Hex en la fecundación de este anfibio.

En *R. arenarum* la reacción acrosómica se desencadena por el contacto de los espermatozoides con la EV de los ovocitos en presencia de los factores difusibles de la cubierta gelatinosa (Barisone y col., 2002; Krapf y col., 2009). Sin embargo, Darío Krapf (tesis doctoral) mostró que si los componentes difusibles de la cubierta gelatinosa (EW) no están presentes durante esta interacción, los espermatozoides conservan su capacidad de unión a la EV pero no la de desencadenar la reacción acrosómica. Los experimentos de unión de espermatozoides a EVs aisladas en ausencia de EW y en presencia del inhibidor específico de la Hex realizados en esta tesis mostraron que la Hex de espermatozoides participa en la unión espermatozoide-EV. Sin embargo, la comparación de estos experimentos con los de fecundación *in vitro* muestra que la concentración de inhibidor necesaria para obtener un efecto significativo sobre la unión espermatozoide-EV es ~50 veces más baja que la necesaria para lograr el mismo efecto inhibitorio en la fecundación. Resulta razonable pensar que una disminución en el número de espermatozoides unidos a la EV no haya sido traducido en una disminución de la tasa de fecundación debido a que es suficiente con que unos pocos espermatozoides contacten al ovocito para que lo fecunden. En base a ello, es esperado que la concentración de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucono-1,5-lactona necesaria para visualizar su efecto inhibitorio en la fecundación sea mayor que la necesaria para visualizar su efecto en la unión de los espermatozoides a las EVs aisladas.

La participación de la Hex de espermatozoide en el reconocimiento de sus azúcares sustrato sobre la EV de los ovocitos fue demostrada, además, por el pretratamiento de las EVs aisladas con la Hex de jack bean pura. La Hex de jack bean puede hidrolizar tanto residuos de N-acetil glucosamina como de N-acetil galactosamina terminales desde glucoconjugados (Vo y Hedrick, 2000). De este modo, se podría hipotetizar que la Hex de espermatozoides de *R. arenarum* participa de la unión a la EV de los ovocitos reconociendo residuos de N-acetil glucosamina y/o N-acetil galactosamina terminales en alguna de las glucoproteínas que la componen. Martínez y col. (2000) demostraron mediante ensayos de actividad enzimática realizados en tubo que la Hex de espermatozoides de *R. arenarum* puede ser inhibida de manera competitiva por cualquiera de estos azúcares. En favor de la hipótesis formulada, nuestros experimentos de unión de espermatozoides a EVs aisladas mostraron que la

unión de los espermatozoides a la EV disminuyó cuando alguno de estos azúcares estaba presente en el medio de interacción, aún a concentraciones 10 mM.

Barisone y col. (2003) mostraron por experimentos de lectin blot (utilización de lectinas específicas para identificar azúcares unidos a glucoproteínas previamente adsorbidas en membrana) la presencia de residuos de N-acetil galactosamina, ácido siálico, manosa y/o glucosa, galactosa y N-acetil glucosamina en las glucoproteínas que componen la EV de los ovocitos de *R. arenarum*. Sin embargo, sólo los residuos de manosa, galactosa y N-acetil galactosamina se encontraron expuestos en la superficie de la EV de los ovocitos enteros. Teniendo en cuenta este reporte, se podría reformular la hipótesis anteriormente realizada proponiendo que la Hex de espermatozoide de *R. arenarum* participa de la unión inicial a los ovocitos reconociendo residuos de N-acetil galactosamina en alguna de las glucoproteínas que componen la EV. Interesantemente, los residuos de N-acetil galactosamina de gp75 fueron perdidos durante la conversión de la EV en EF, sugiriendo su participación como ligando de unión al espermatozoide y en el bloqueo de la polispermia.

El reconocimiento de azúcares específicos de la EV de los ovocitos por los espermatozoides fue previamente propuesto en otras especies de anfibios anuros. En *X. laevis* fue demostrado que el tratamiento de la EV con  $\alpha$ -fucosidasa y N-acetil glucosaminidasa reduce su unión con los espermatozoides, sugiriendo la participación de residuos de N-acetil glucosamina y/o fucosa de la EV en la unión de los gametos (Vo y Hedrick, 2000). En *B. japonicus* el pretratamiento de los ovocitos con lectinas llevó a la conclusión de que residuos de N-acetil galactosamina y/o de ácido siálico de la EV estarían involucrados en la unión con los espermatozoides (Omata y Katagiri, 1996).

El reconocimiento específico entre los gametos, mediado por interacciones proteína-carbohidrato, fue reportado también en otras especies animales. En erizos de mar, tanto la interacción de los espermatozoides con la cubierta gelatinosa de los óvulos que lleva al desencadenamiento la reacción acrosomal, como la unión bindina mediada de los espermatozoides reaccionados a la superficie del óvulo, involucrarían interacciones específicas entre proteínas y carbohidratos (Gilbert, 2005). En ascidias, glucosidasas presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides reconocerían de manera específica residuos glucosídicos de la envoltura vitelina del óvulo formando un complejo que uniría a ambos gametos (Honegger y Koyanagi, 2008). En los mamíferos, a pesar de que los mecanismos moleculares que llevan al reconocimiento

entre los gametos son actualmente objeto de debate, existe una amplia bibliografía que soporta el reconocimiento específico de carbohidratos de ZP3 por proteínas de unión al ovocito presentes en los espermatozoides (Benoff, 1997; Tulsiani y col., 1997).

Los experimentos de unión de espermatozoides a EVs aisladas realizados en esta tesis mostraron, además, que la adición de azúcares competidores en el medio de interacción a concentraciones elevadas como 100 mM inhibe la unión de los espermatozoides a la EV en porcentajes similares, y en forma independiente de la naturaleza química del azúcar evaluado. En los anfibios fue demostrado que el movimiento flagelar de los espermatozoides es activado por la hipotonicidad del medio de fecundación (Inoda y Morisawa, 1987; Hardy y Dent, 1986). A pesar de que ningún cambio general en la motilidad flagelar de los espermatozoides fue observado por microscopía a simple vista, es probable que la elevada concentración de osmolitos adicionados en estos ensayos, y el aumento en la viscosidad del medio provocado por la adición de azúcares a alta concentración, hayan interferido la motilidad de los espermatozoides, y en consecuencia su interacción con las EVs. Sin embargo, nuevos experimentos realizados con cámaras de video capaces de filmar el movimiento de los espermatozoides a alta velocidad y programas de análisis, serán necesarios para corroborar esta hipótesis.

Entre los azúcares evaluados, la manosa fue capaz de interferir la unión de los espermatozoides a las EVs aisladas a concentraciones de 10 mM, sugiriendo su participación y la de la manosidasa en la fecundación de *R. arenarum*. En concordancia con este resultado, Darío Krapf en su trabajo de tesis encontró que este azúcar fue capaz de disminuir en forma significativa la unión de los espermatozoides al hemisferio animal de EVs aisladas. del Pino y Cabada (1987) reportaron en *R. arenarum* que el enmascaramiento de residuos de D-manosa y/o D-glucosa en los ovocitos enteros con la lectina concanavalina A (~110 kDa) disminuye la tasa de fecundación. Además, los residuos de D-manosa se encontraron expuestos en la EV de los ovocitos enteros de *R. arenarum* (Barisone y col., 2003). Sin embargo, los ensayos de fecundación realizados en esta tesis demostraron que la adición de manosa, a concentraciones donde se podrían suponer efectos específicos para la competencia con azúcares (~10 mM), no fue capaz de interferir la fecundación de este anfibio. Barisone y col. (2003) reportaron que los residuos de D-manosa presentes en la superficie de la EV de los ovocitos sólo

fueron encontrados en la glucoproteína de 120 kDa (gp120). Experimentos posteriores, demostraron que gp120 no es capaz de interactuar con los espermatozoides homólogos (Barisone y col., 2007; Scarpeci y col., 2008; Barrera y col., 2012). Teniendo en cuenta estos reportes, y que debido al gran número de sitios de unión se ha sugerido que el bloqueo con concanavalina A podría ocasionar impedimentos estéricos de accesibilidad a la superficie de los ovocitos de *R. arenarum* (Omata y Katagiri, 1996), los resultados encontrados en esta tesis son consistentes con la apreciación de que los residuos de manosa, la manosidasa y sus interacciones no estarían relacionados con la fecundación de *R. arenarum*.

La fucosidasa fue la principal actividad glucosidasa liberada desde los gránulos corticales durante la activación de los ovocitos de *R. arenarum*, sugiriendo su participación y la de residuos de fucosa en la fecundación de esta especie. Los estudios realizados en este capítulo demostraron que si bien la adición de fucosa no es capaz de interferir la unión de los espermatozoides a la EV, si disminuyó la tasa de fecundación en experimentos realizados *in vitro*. En concordancia con estos resultados, la detección de residuos de fucosa sobre la superficie de la EV de los ovocitos enteros de *R. arenarum* con la lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA) arrojó resultados negativos (Barisone y col., 2003). De este modo, nuestros resultados muestran que la fucosidasa está involucrada en la fecundación de *R. arenarum* pero no en la etapa de unión de los gametos a nivel de la EV de los ovocitos. Sin embargo, la fucosidasa aún podría ser asociada al avance del espermatozoide reaccionado a través de la EV, a la fusión de membranas necesaria para el ingreso del pronúcleo masculino al ovocito, o a la interacción del espermatozoide con la cubierta gelatinosa.

Se cree que la penetración de la EV por el espermatozoide reaccionado requiere que éste se mantenga adherido a ella. En ratón, se ha propuesto que esta interacción secundaria sería llevada a cabo por proteínas presentes en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides y ZP2 (Bleil y col., 1988b). En concordancia con esta idea, Moller y Wassarman (1989) encontraron que una proteasa presente en los gránulos corticales de los ovocitos de ratón es liberada durante la reacción cortical y proteoliza a ZP2 en correlación con el endurecimiento de la ZP y la prevención de la polispermia. En cobayo, se piensa que estas interacciones secundarias serían llevadas a cabo por una hialuronidasa presente en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides, que también es capaz de interactuar con la ZP, denominada PH-20 (Hunnicuttt y col.,

1996). El bloqueo de esta proteína con anticuerpos específicos impidió la unión de los espermatozoides a la ZP en experimentos realizados *in vitro* y causó infertilidad (Primakoff y col., 1988).

Recientemente se ha encontrado en mamíferos (Bianchi y col., 2014) que la interacción de dos proteínas de la membrana plasmática de los gametos, una del espermatozoide (Izumo1) y la otra del ovocito (Juno), es esencial para que ocurra la fusión de sus membranas durante la fecundación. Sin embargo, la interacción entre Izumo1 y Juno sólo permitiría la adhesión de las membranas necesaria para la fusión, que sería llevada a cabo por otras proteínas aún desconocidas.

En los anfibios *X. laevis* y *R. arenarum* se ha sugerido que las integrinas participan en la interacción de las membranas plasmáticas de sus gametos durante la fecundación (Shilling y col., 1998; Coux y Cabada, 2006; Mouguelar y col., 2011). Sin embargo, la participación de las integrinas en esta interacción es controversial, y no se han establecido con certeza las moléculas involucradas.

En *R. arenarum* se reportó la presencia de residuos de fucosa en dos de las glucoproteínas que componen la cubierta gelatinosa de los ovocitos: HGP y L-HGP (Arranz y col., 1997). Fue demostrado que L-HGP difunde desde la cubierta gelatinosa al medio de fecundación una vez que los ovocitos son depuestos, y que ejerce propiedades protectoras del acrosoma de los espermatozoides frente a medios hipotónicos semejantes a los naturales donde ocurre la fecundación (Arranz y Cabada, 2000; Krapf y col., 2006). En base a ello, y a los resultados obtenidos en esta tesis, se podría pensar que una vez que el ovocito es fecundado, la fucosidasa liberada desde los gránulos corticales podría actuar sobre los residuos de fucosa de L-HGP, anulando su capacidad protectora del acrosoma y contribuyendo de este modo con la prevención de la polispermia. Sin embargo, la existencia de alguna relación entre los residuos de fucosa de L-HGP y sus propiedades protectoras del acrosoma aún no ha sido explorada y es desconocida. En consecuencia, los resultados obtenidos en esta tesis resultan preliminares para aseverar esta hipótesis, y nuevos experimentos deberán ser realizados para poder corroborarla.

En la actualidad cobra cada vez más consenso entre la comunidad científica el paradigma de que las proteínas no actúan solas durante el reconocimiento entre los gametos, sino como parte de complejos multiproteicos de interacción. En base a ello, los resultados obtenidos en esta tesis tampoco son suficientes para excluir la posibilidad

de la existencia de interacciones entre residuos de fucosa y fucosidasas en etapas posteriores a la unión inicial del espermatozoide con la EV de los ovocitos, como aquellas que permiten el avance del espermatozoide reaccionado hacia la membrana plasmática del ovocito o su posterior fusión.

## **CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES FINALES**

En este trabajo de tesis se pueden destacar las siguientes observaciones que aportan datos significativos y nuevas hipótesis, tanto a la caracterización general de las N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas (Hexosaminidasas o Hexs) de los vertebrados, como a la comprensión de los procesos que ocurren durante la fecundación en el Anfibio Anuro *Rhinella arenarum*:

i- Se logró obtener el primer antisuero policlonal específico contra una Hex de anfibio. Este antisuero nos permitió avanzar en la caracterización estructural de las Hexs presentes en los ovocitos maduros de *R. arenarum* y de *X. laevis*, y determinar su localización subcelular. Quedó demostrado, además, que el antisuero obtenido podría ser utilizado para caracterizar Hexs en otras especies.

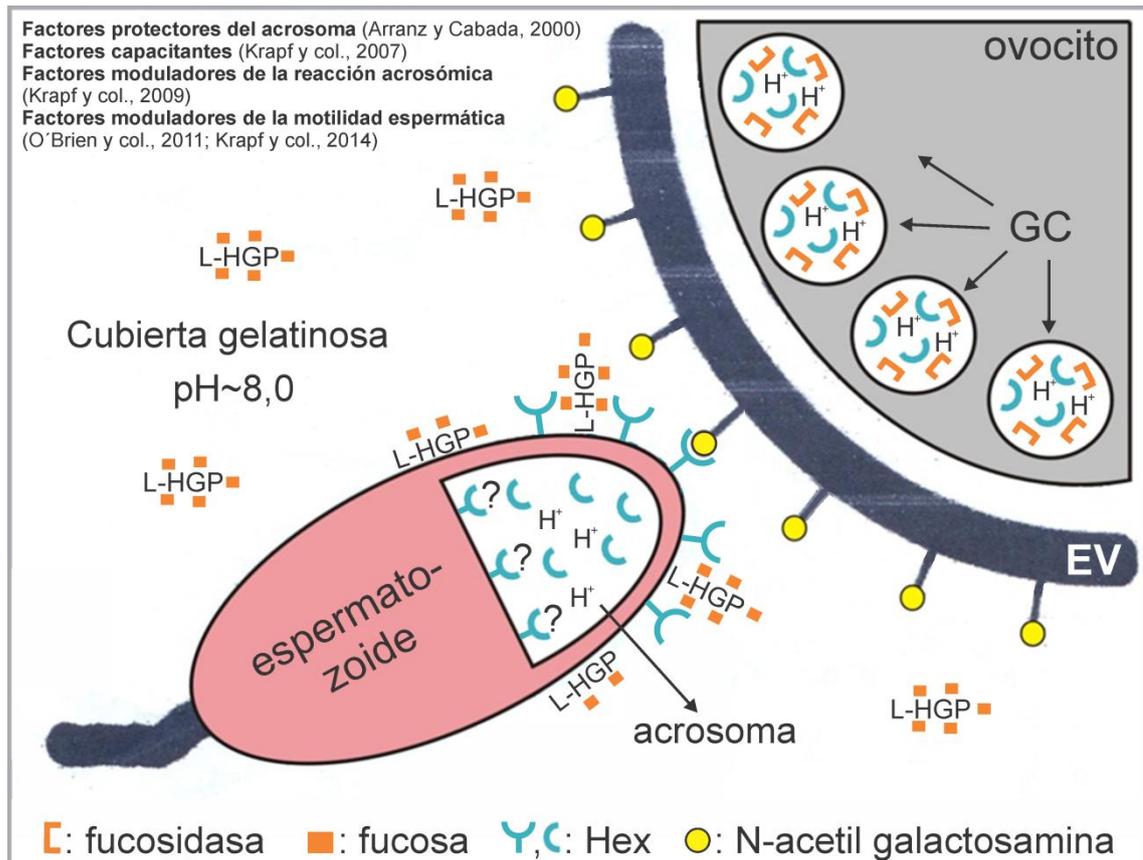
ii- Se demostró, por primera vez en los anfibios, la existencia de isoformas de la Hex con actividades semejantes a las de las isoformas de tipo A/S y B caracterizadas en los mamíferos. Debido a que sólo las isoformas A y S de mamíferos pueden metabolizar sustratos negativamente cargados (Lemieux y col., 2006), determinar la isoforma de la Hex asociada a la fecundación, y su especificidad, podría arrojar datos sobre la naturaleza química de su ligando. Los datos obtenidos en esta tesis, si bien demostraron la participación de la Hex en la unión entre gametos, y la presencia de la misma en los gránulos corticales que participan de la inhibición de la polispermia, no fueron suficientes para determinar con exactitud cuál de las isoformas de la Hex caracterizadas en los gametos está asociada a estos procesos en *R. arenarum*. Avanzar con estas investigaciones resulta interesante.

iii- Se obtuvo por primera vez la secuencia de ADNc codificante para una Hex de anfibio (*X. laevis*; GenBank ID: JN127371). El polipéptido deducido a partir de este ADNc (GenBank ID: AEJ87970; 553 residuos de aminoácidos) presentó una gran similitud de secuencia con otras Hexs de vertebrados caracterizadas (humano (Myerowitz y col., 1985; Korneluk y col., 1986), ratón (Bapat y col., 1988; Beccari y col., 1992), *P. mammillata* (Koyanagi y Honegger, 2003); etc.) y conservó todas las características estructurales que definen a las Hex (sitio activo, sitios de

N-glucosilación, etc.). Los hallazgos derivados de la obtención de esta secuencia merecen especial atención:

Utilizando el ADNc JN127371 se identificaron por similitud de secuencias otros ADNcs con ORF completo codificantes para Hexs de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , tanto en *X. laevis* como en *X. tropicalis*. Además, se identificó el primer gen codificante para Hex en los anfibios (*X. tropicalis*). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran, que en *Xenopus*, los polipéptidos de las Hexs de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  pueden ser sintetizados a partir de un mismo gen, por el splicing alternativo de dos de sus exones que codifican los segmentos polipeptídicos que definen la naturaleza catalítica ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del sitio activo. Este hallazgo, marcó una notoria diferencia con los mamíferos (incluyendo a los humanos), donde las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las distintas isoformas de la Hex que fueron caracterizadas (HexA ( $\alpha\beta$ ), HexB ( $\beta\beta$ ) y HexS ( $\alpha\alpha$ )) están codificadas en diferentes genes (*HEXA* y *HEXB*, respectivamente) ubicados en cromosomas separados (cromosoma 15 y cromosoma 5; humano). Actualmente, se cree que los genes *HEXA* y *HEXB* de mamíferos evolucionaron por duplicación y divergencia de un gen ancestral común (Proia, 1988). En base a ello, surge la pregunta de si el splicing alternativo pudo haber sido el mecanismo para la síntesis de las subunidades que conforman las distintas isoformas de la Hex, antes de que el gen ancestral se duplicara y divergiera durante el curso de la evolución. Si bien en esta tesis no se realizó un estudio comparativo de las Hexs en animales vertebrados e invertebrados, avanzar sobre esta hipótesis resulta muy interesante, debido a que se podrían obtener datos evolutivos importantes sobre la manera en que las distintas isoformas de la Hex eran obtenidas, antes de la duplicación y divergiera hacia  $\alpha$  o  $\beta$  del gen ancestral común.

iv- Se demostró la participación de las glucosidasas N-acetil- $\beta$ -D glucosaminidasa (Hex) y fucosidasa en distintas etapas de la fecundación de *R. arenarum*. Los resultados obtenidos durante el estudio de la Hex hacen aportes significativos a la comprensión del proceso de fecundación en esta especie, y se resumen en el modelo de la figura 65. A continuación de la figura serán detallados de manera conjunta con otros sucesos anteriormente caracterizados en nuestro laboratorio.



**Figura 65.** Esquema diagramando los principales aportes realizados en esta tesis en relación a la comprensión del proceso de fecundación de *R. arenarum*. Una Hex presente en la membrana de la cabeza del espermatozoide reconoce residuos de N-acetil- $\beta$ -D galactosamina en alguna de las glucoproteínas de la envoltura vitelina (EV) de los ovocitos. La Hex está localizada también en la matriz acrosomal de los espermatozoides reaccionados, y en los gránulos corticales (GC) de los ovocitos. En los GC también se encuentra la fucosidasa.

Durante la fecundación de *R. arenarum* los espermatozoides son liberados al medio externo conjuntamente con la deposición de los ovocitos por parte de la hembra. Si éste no fuera el caso, los espermatozoides se tornarían rápidamente infértiles debido al estrés osmótico (hipotónico) que deberían soportar en el medio natural donde ocurre la fecundación, lo que llevaría a la ruptura espontánea de su acrosoma. Sin embargo, ante la liberación, los espermatozoides interactúan con los factores de la cubierta gelatinosa que rodea a los ovocitos, y que difunden al medio acuoso. Estos factores cumplen diversas funciones:

a- previenen la ruptura del acrosoma del espermatozoide por shock osmótico, otorgándole mayores chances de alcanzar la EV con su acrosoma intacto (Arranz y Cabada, 2000; Krapf y col., 2006);

b- disparan en los espermatozoides eventos similares a los que ocurren durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos (Krapf y col., 2007), que permiten que pueda sufrir reacción acrosómica ante el estímulo de la EV (Krapf y col., 2009), y;

c- modulan el batido flagelar en el espermatozoide para que pueda avanzar hacia la membrana del ovocito y fusionarse con ella (O'Brien y col., 2011; Krapf y col., 2014).

Los datos experimentales presentados en este trabajo de tesis demuestran, además, que al pH natural al que ocurre la fecundación de *R. arenarum* (pH=8,0; O'Brien y col., 2011), una Hex presente en los espermatozoides (posiblemente en la membrana plasmática de la zona apical de la cabeza) participa, a modo de lectina, de la unión con el ovocito, reconociendo alguno de sus azúcares sustrato (probablemente residuos de N-acetil galactosamina) expuesto en la EV. Este mecanismo de reconocimiento entre los gametos, carbohidrato mediado, sería compartido con otras especies de anfibios anuros como *X. laevis* (Vo y Hedrick, 2000) y *B. japonicus* (Omata y Katagiri, 1996), con las ascidias (Honegger y Koyanagi, 2008), con algunos insectos (Perotti y col., 2001), y posiblemente con los mamíferos (Bennof, 1997; Tulsiani y col., 1997).

En esta tesis, la Hex también fue encontrada en el acrosoma del espermatozoide, en los espermatozoides reaccionados, y en los gránulos corticales de los ovocitos, lo que sugiere que podría tener otras funciones durante la fecundación de *R. arenarum*. Supuesto esto, se podría proponer que luego del contacto con la EV, la Hex liberada en la reacción acrosómica, actuando como enzima al pH ácido del contenido acrosomal, facilitaría el avance del espermatozoide a través de la EV, hidrolizando en ella sus azúcares sustrato e impidiendo que se formen uniones estables entre los gametos. Una vez activados los ovocitos, la Hex liberada desde los gránulos corticales durante la reacción cortical (esta tesis) podría participar de la prevención de la polispermia, bloqueando o hidrolizando los residuos N-acetil galactosamina que unen a los espermatozoides a la EV. El reconocimiento de residuos de carbohidrato (N-acetil glucosamina) de la EV (ZPC) por los espermatozoides, y su posterior hidrólisis durante el bloqueo lento de la polispermia, fue demostrado en *X. laevis* (Vo y Hedrick, 2003). En ratón, una Hex presente en los gránulos corticales de los ovocitos participa del bloqueo lento de la polispermia (Miller y col., 1993b), y la Hex presente en el acrosoma de los espermatozoides es requerida para penetrar la zona pelúcida (Miller y col., 1993a). De este modo, algunos de los roles propuestos para la Hex durante la fecundación de *R. arenarum* parecen estar conservados en otras especies animales.

Finalmente, no se pueden dejar de mencionar recientes hallazgos realizados en mamíferos (ratón), que demostraron que una proteína integral de la membrana plasmática del ovocito (Juno), que resulta indispensable para la fusión de las membranas plasmáticas de los gametos, es expulsada luego de la fecundación a través de la generación de vesículas extracelulares, previniendo la fusión de nuevos espermatozoides y contribuyendo con el bloqueo de la polispermia (Bianchi y col., 2014). Estos hallazgos fueron de gran importancia en el campo de la reproducción de los vertebrados, debido a que revelaron aspectos de la fecundación que eran desconocidos. En esta tesis se planteó como una hipótesis en *R. arenarum*, la posibilidad de que la fucosidasa liberada desde los ovocitos durante la reacción cortical, pudiese actuar sobre los residuos de fucosa de L-HGP, anulando su capacidad protectora del acrosoma del espermatozoide frente a medios hipotónicos, y contribuyendo de este modo con el bloqueo de la polispermia. Esta hipótesis, también promueve la exploración de un proceso asociado a la prevención de la polispermia que es desconocido en la fecundación de los vertebrados, y por lo tanto avanzar en su desarrollo resulta de gran relevancia.

Albert Tyler (1967) fue uno de los primeros en postular que el estudio de diferentes organismos es sumamente enriquecedor. Un estudio comparativo entre especies permite abordar generalizaciones e identificar procesos conservados y, por lo tanto, fundamentales. El anfibio anuro *R. arenarum* ofrece ventajas sumamente beneficiosas para el estudio del proceso de fecundación como un modelo vertebrado, y permite el análisis comparativo con los organismos más estudiados en la actualidad: mamíferos y erizos de mar. Los trabajos realizados en esta especie podrían ser de gran utilidad en el campo de la fecundación de los vertebrados.

## AGRADECIMIENTOS

A mis dos amores: Camilo y Soledad; y a toda mi familia.

A mi abuela Tata por su ayuda en la tierra y desde el cielo.

A la Dra. Silvia Arranz y al Dr. Marcelo Cabada por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, y por la dedicación que le brindaron a mi formación.

A la Dra. Nora Calcaterra por haberme inducido a realizar esta tesis.

A las autoridades del IBR (CONICET-UNR), del Área Biología (FBioyF) y de CONICET por haberme permitido realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Andrés, Cecilia, Emma, Vanina, Juan, Ignacio, Cintia, Paula, Florencia, Victoria y Mariano.

A todos mis compañeros del área Biología de FBioyF (UNR).

A mis amigos Ramiro, Sonia, Telma, Luciana, Pablo Armas, Lucas, Jimena, Pablo Domizi y Sebastián por haberme escuchado y aconsejado todas las veces que lo necesité.

A mi compañero de mesada Pablo Botta. Por su generosidad, por su gran compañía y por los buenos momentos que pasamos.

A la Dra. Claudia Banchio por su colaboración y consejos en los experimentos de expresión de la Hexosaminidasa en células CHO.

A la Dra. Lelia Orsaria por sus consejos en los experimentos de Southern blot.

A Andrea Weiner por su ayuda.

Al Dr. Eduardo Ceccarelli por las dudas evacuadas.

A las Dras. María Fabiana Drincovich y Adriana Torres por su guía tutorial durante la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial a mis amigos Matias y Darío. A Matías por haberse preocupado por mí cuando lo necesité, y por la provisión de los ejemplares de *R. arenarum*. A Darío por su compañía en la mesada, por su ayuda en la realización de esta tesis, y por haber estado siempre en los buenos y malos momentos, aun en la distancia.

A Graciela y Soledad por su ayuda en la corrección del manuscrito.

A todos a los que, seguramente, he olvidado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Anzi, B. y Chandler, D. E. (1998) A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Dev. Biol.* 198, 366-375.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K y Walter, P. (2010) En: *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, Barcelona. Quinta Edición, 1269-1304.
- Alves, A. P.; Mulloy, B.; Diniz, J. A. y Mourão, P. A. (1997) Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J Biol Chem.* 272, 6965-71.
- Anderson, E. (1967) The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. *J. Cell Biol.* 35, 193-212.
- Arranz, S. E.; Albertali, I. E. y Cabada, M. O. (1997) *Bufo arenarum* egg jelly coat: purification and characterization of two highly glycosylated proteins. *Biochem. J.* 323, 307-312.
- Arranz, S. E. y Cabada, M. O. (2000) Diffusible highly glycosylated protein from *Bufo arenarum* egg-jelly coat: biological activity. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 392-400.
- Austin, C. R. (1955) Ovulation, fertilization, and early cleavage in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. R. Microsc. Soc., Ser. III.* 75, 141-154.
- Bain, J. M. y Hall, J. M. (1969) Observations on the development and structure of the vitelline membrane of the hen's egg: an electron microscope study. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 653-665.
- Bakos, M. A.; Kurosky, A y Hedrick, J. L. (1990) Enzymatic and envelope-converting activities of pars recta oviductal fluid from *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 138,169-76.
- Balinsky, B. I. y Devis, R. J. (1963) Origin and differentiation of cytoplasmic structures in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Acta Morphol. Embryol.*, 6, 55-108.
- Bapat, B.; Ethier, M.; Neote, K.; Mahuran, D. y Gravel, R. A. (1988) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding the beta-subunit of mouse beta-hexosaminidase. *FEBS Lett.* 237,191-195.
- Barbieri, F. D. y Villecco, E. I. (1966) A fertilizin like substance in the jelly coat of the toad *Bufo arenarum*. *Arch. Zool. Ital.* 51, 227.
- Barbieri, F. D. y Oterino, J. M. (1972) A study of the diffusible factor released by the jelly of the eggs of the toad, *Bufo arenarum*. *Dev. Growth Differ.* 14, 107-117.
- Barbieri, F. D. (1976) Diffusible factors in anuran fertilization. *Acta Physiol Lat. Am.* 26, 1-9.
- Barisone, G. A.; Hedrick, J. L. y Cabada, M. O. (2002) Vitelline envelope of *Bufo arenarum*: biochemical and biological characterization. *Biol. Reprod.* 66, 1203-1209.
- Barisone, G. A.; Albertali, I. E.; Sanchez, M. y Cabada, M. O. (2003) The envelopes of amphibian oocytes: physiological modifications in *Bufo arenarum*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 18.
- Barisone, G. A., Krapf, D.; Correa-Fiz, F.; Arranz, S. E. y Cabada, M. O. (2007) Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: Biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 629-640.
- Barrera, D.; Llanos, R. J. y Miceli, D. C. (2012) Participation of the 39-kDa glycoprotein (gp39) of the vitelline envelope of *Bufo arenarum* eggs in sperm-egg interaction. *Zygote.* 20, 159-71.
- Bausek, N.; Waclawek, M.; Schneider, W. J. y Wohlrab, F. (2000) The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 275, 28866-28872.

- Beccari, T.; Hoade, J.; Orlacchio, A. y Stirling, J. L. (1992) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding the alpha-subunit of mouse beta-N-acetylhexosaminidase and comparison with the human enzyme. *Biochem. J.* 285, 593-596.
- Beeley, J.G. (1985) Glycoprotein and proteoglycan techniques. In: Burdon RH, van Knippenberg PH, editors. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.* p 254-263.
- Bement, W. M. y Capco, D. G. (1990) Transformation of the amphibian oocyte into the egg: structural and biochemical events. *J Electron Microsc Tech.* 16, 202-34.
- Benoff, S. (1997) Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod.* 3, 599-637.
- Bianchi, E.; Doe, B.; Goulding, D. y Wright, G. J. (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 508, 483-7.
- Bisbee C. A., Baker, M. A.; Wilson, A. C.; Haji-Azimi, I y Fischberg, M. (1977) Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science.* 195, 785-7.
- Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. (1980a) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202.
- Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. (1980b) Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell.* 20, 873-82.
- Bleil, J. D. y 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, 317-24.
- Bleil, J. D y Wassarman, P. M. (1986) Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol.* 102, 1363-71.
- Bleil, J. D. y Wassarman, P. M. (1988a) 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 Natl Acad Sci U S A.* 85, 6778-82.
- Bleil, J. D.; Greve, J. M. y Wassarman, P. M.(1988b) Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol.* 128, 376-85.
- Braden, A.W.; Austin, C. R. y David, H. A. (1954) The reaction of zona pellucida to sperm penetration. *Aust J Biol Sci.* 7, 391-409.
- Buffone, M. G.; Hirohashi, N y Gerton, G. L. (2014) Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod.* 90, 1-8.
- Burks, D. J.; Carballada, R.; Moore, H. D. y Saling, P. M. (1995) Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science.* 269, 83-6.
- Burnett, L. A.; Xiang, X., Bieber, A. L. y Chandler, D. E.(2008) Crisp proteins and sperm chemotaxis: discovery in amphibians and explorations in mammals. *Int J Dev Biol.* 52,489-501.
- Cabada, M. O. (1975) Some female coordinating factors in amphibian fertilization. *Dev. Growth Differ.* 17, 187-195.
- Cabada, M. O.; Mariano, M. I. y Raisman, J. S. (1978) Effect of trypsin inhibitors and concanavalin A on the fertilization of *Bufo arenarum* coelomic oocytes. *J. Exp. Zool.* 204, 409-416.
- Cabada, M. O.; Manes, M. E. y Gomez, M. I. (1989) Spermatolysins in *Bufo arenarum*: their activity on oocyte surface. *J. Exp. Zool.* 249, 229-234.
- Cajal, J. L. Morfología e histoquímica de las cubiertas gelatinosas de los ovocitos de *Bufo arenarum*. 1972. Instituto de Biología. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán. Ref Type: Thesis/Dissertation

- Capco, D. G. y Mecca, M. D. (1988) Analysis of proteins in the peripheral and central regions of amphibian oocytes and eggs. *Cell Differ.* 23, 155-64.
- Cardullo, R. A. y Florman, H. M. (1993) Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods Enzymol.* 225, 136-53.
- Cattaneo, F.; Pasini, M. E. y Perotti, M. E. (1997) Glycosidases are present on the surface of *Drosophila melanogaster* spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 48, 276-81.
- Chen, J.; Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (1998) Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 6193-7.
- Cheng, A.; Le, T.; Palacios, M.; Bookbinder, L. H.; Wassarman, P. M.; Suzuki, F. y Bleil, J. D. (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol.* 125, 867-78.
- Cherr, G. N.; Lambert, H.; Meizel, S. y Katz, D. F. (1986) In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev Biol.* 114, 119-31.
- Cho, C.; Bunch, D. O.; Faure, J. E.; Goulding, E. H.; Eddy, E. M.; Primakoff, P. y Myles, D. G. (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.* 281, 1857-9.
- Clark, G. F. y Dell, A. (2006) Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem.* 281, 13853-6.
- Cornwall, G. A.; Tulsiani, D. R. y Orgebin-Crist, M. C. (1991) Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod.* 44, 913-21.
- Cosson, M. P. (1990) Sperm chemotaxis. In *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*, C. Gagnon, ed. (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 103-135.
- Cotelli, F.; Andronico, F.; De, S. R.; Monroy, A. y Rosati, F. (1982) RNA and protein synthesis during oogenesis of *Ciona intestinalis*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 85 Pt A, 381-387.
- Coux, G. y Cabada, M. O. (2006) Characterization of *Bufo arenarum* oocyte plasma membrane proteins that interact with sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 343, 326-33.
- Coward, K.; Bromage, N. R.; Hibbitt, O. y Parrington, J. (2002) Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 12, 33-58.
- Crespo, C. A.; Ramos, I.; Medina, M. F.; Cisint, S. B.; Iruzubieta Villagra, A. L. y Fernández, S. N. (2014) Structural analysis of toad oviductal mucosa in relation to jelly components secretion throughout the reproductive cycle. *Zygote.* 22, 229-38.
- Cross, N. L. y Elinson, R. P. (1980) A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. *Dev Biol.* 75, 187-98.
- Decroly, M.; Goldfinger, M. y Six-Tondeur, N. (1979) Biochemical characterization of lysosomes in unfertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta.* 587, 567-78.
- del Pino, E. M. (1973) Interactions between gametes and environment in the toad *Xenopus laevis* (Daudin) and their relationship to fertilization. *J. Exp. Zool.* 185, 121-123.
- del Pino, E. J. y Cabada, M. O. (1987) Lectin binding sites in the vitelline envelope of *Bufo arenarum* oocytes: role in fertilization. *Gamete Res.* 17, 333-42.
- Diaz Fontdevila, M.F.; Bloj, B. y Cabada, M.O. (1988) Effect of cholesterol and phosphatidylcholine of different chain length on acrosome breakdown and fertilizing capacity of amphibian spermatozoa. *Gamete Res.* 21, 59-70.
- Diaz Fontdevila, M.F.; Bloj, B. y Cabada, M.O. (1991) Effect of Egg Water from *Bufo arenarum* on the fertilizing capacity of homologous spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 257, 408-414.
- Dostalova, Z.; Calvete, J.J.; Sanz, L. y Töpfer-Petersen, E. (1995) Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Eur J Biochem.* 230, 329-36.

- Duellman, W. E. y Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. (New York: McGraw-Hill Company, Inc.).
- Dumont, J. N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153-179.
- Eddy, E. M. y O'Brien, D. A. (1994) The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 29-78.
- Eisenbach, M. y Tur-Kaspa, I. (1994) Human sperm chemotaxis is not enigmatic anymore. *Fertil. Steril.* 62, 233-235.
- Eisenbach, M. (1999) Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* 4, 56-66.
- Elinson, R. P. (1971) Fertilization of partially jellied and jellyless oocytes of the frog *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* 176, 415-428.
- Elinson R. P. (1975) Site of sperm entry and a cortical contraction associated with egg activation in the frog *Rana pipiens*. *Dev Biol.* 47, 257-68.
- Florman, H. M. y Storey, B. T. (1982) Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol.* 91, 121-30.
- Florman, H. M.; Bechtol, K. B. y Wassarman, P. M. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol.* 106, 243-55.
- Florman, H. M. y Wassarman, P. M. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell.* 41, 313-324.
- Florman, H. M.; Arnoult, C.; Kazam, I. G.; Li, C. y O'Toole, C. M.B. (1999) An Intimate Biochemistry: Egg-Regulated Acrosome Reactions of Mammalian Sperm. *Adv. Dev. Biochem.* 5, 199-233.
- Fonovich De Schroeder, T. M.; Gauna, L. y Pechén de D'angelo (1993) Is buffering capacity the principal role of the jelly coat in *Bufo arenarum* fertilization?. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* 3, 533-537.
- Foster, J. A.; Friday, B. B.; Maulit, M. T.; Blobel, C.; Winfrey, V. P.; Olson, G. E.; Kim, K. S. y Gerton, G. L. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J Biol Chem.* 272, 12714-22.
- Fry, M. R.; Ghosh, S. S.; East, J. M. y Franson, R. C. (1992) Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod.* 47, 751-9.
- Gao, Z. y Garbers, D. L. (1998) Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J Biol Chem.* 273, 3415-21.
- Geng, J. G.; Raub, T. J.; Baker, C. A.; Sawada, G. A.; Ma, L. y Elhammer, A. P. (1997) Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectin on acrosomal membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions. *J Cell Biol.* 137, 743-54.
- Gerton G. L. y Hedrick, J. L. (1986) The coelomic envelope to vitelline envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. *J Cell Biochem.* 30, 341-50.
- Gilbert S. (2005) En: *Biología del Desarrollo*. Médica Panamericana, Buenos Aires. Séptima Edición, 197-238.
- Giusti, A. F.; Hoang, K. M. y Foltz, K. R. (1997) Surface localization of the sea urchin egg receptor for sperm. *Dev Biol.* 184, 10-24.
- Glabe, C. G. y Lennarz, W. J. (1979) Species-specific sperm adhesion in sea urchins. A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. *J Cell Biol.* 83, 595-604.

- Godknecht, A. y Honegger, T. G. (1991) Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Dev Biol.* 143,398-407.
- Gómez, M. I.; Santolaya, R. C. y Cabada, M. O. (1984) Exocytosis of cortical granules from activated oocytes of the toad, *Bufo arenarum*. *Cell Tissue Res.* 237, 191-4.
- Greve, L. C.; Prody, G. A. y Hedrick, J. L. (1985). N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Activity in the Cortical Granules of *Xenopus laevis* Eggs. *Gamete Res.* 12, 305-312.
- Grey, R. D.; Working, P. K. y Hedrick, J. L. (1977) Alteration of structure and penetrability of the vitelline envelope after passage of eggs from coelom to oviduct in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* 201, 73-83.
- Godknecht; A. J. y Honegger, T. G. (1991) Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Dev Biol.* 143, 398-407.
- Godknecht; A. J. y Honegger, T. G. (1995) Specific inhibition of sperm beta-N-acetylglucosaminidase by the synthetic inhibitor n-ecetylglucosaminono-1,5-lactone o-(phenylcarbomoyl) oxime inhibits fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Dev. Growth Differ.* 37, 183-189.
- Gur, Y. y Breitbart, H. (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 20, 411-416.
- Gur, Y. y Breitbart, H. (2007) Protein translation in mammalian sperm. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl* 65, 391-397.
- Hardy, M. P. y Dent, J. N. (1986) Regulation of motility in sperm of the red-spotted newt. *J Exp Zool.* 240,385-96.
- Hardy, D. M y Hedrick J. L. (1992) Oviductin. Purification and properties of the oviductal protease that processes the molecular weight 43,000 glycoprotein of the *Xenopus laevis* egg envelope. *Biochemistry.* 31, 4466-72.
- Hardy, D. M. y Garbers, D. L. (1995) A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 270, 26025-8.
- Hasilik, A. y Neufeld, E. F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem.* 255, 4937-45.
- Hedrick, J. L. y Hardy, D. M. (1991) Isolation of extracellular matrix structures from *Xenopus laevis* oocytes, eggs, and embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 231-247.
- Hedrick, J. L. y Nishihara, T. (1991) Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J. Electron Microsc. Tech.* 17, 319-335.
- Hedrick, J. L. (1996) Comparative structural and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl.* 50, 9-17.
- Hedrick, J. L. (2008) Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development. *Int J Dev Biol.* 52, 683-701.
- Hellsten, U.; Harland, R. M.; Gilchrist, M. J.; Hendrix, D.; Jurka, J.; Kapitonov, V.; Ovcharenko, I.; Putnam, N. H.; Shu, S.; Taher, L.; Blitz, I. L.; Blumberg, B.; Dichmann, D. S.; Dubchak, I.; Amaya, E.; Detter, J. C.; Fletcher, R.; Gerhard, D. S.; Goodstein, D.; Graves, T.; Grigoriev, I. V.; Grimwood, J.; Kawashima, T.; Lindquist, E.; Lucas, S. M.; Mead, P. E.; Mitros, T.; Ogino, H.; Ohta, Y.; Poliakov, A. V.; Pollet, N.; Robert, J.; Salamov, A.; Sater, A. K.; Schmutz, J.; Terry, A.; Vize, P. D.; Warren, W. C.; Wells, D.; Wills, A.; Wilson, R. K.; Zimmerman, L. B.; Zorn, A. M.; Grainger, R.; Grammer, T.; Khokha, M. K.; Richardson, P. M.; y Rokhsar, D. S. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328, 633-636.

- Hepbildikler, S. T.; Sandhoff, R.; Kolzer, M.; Proia, R. L. y Sandhoff, K. (2002) Physiological substrates for human lysosomal beta-hexosaminidase S. *J Biol Chem.* 277, 2562-72.
- Hirohashi, N y Lennarz, W. J. (2001) Role of a vitelline layer-associated 350 kDa glycoprotein in controlling species-specific gamete interaction in the sea urchin. *Dev Growth Differ.* 43, 247-55.
- Hiyoshi, M; Takamune, K; Mita, K; Kubo, H; Sugimoto, Y y Katagiri, C. (2002) Oviductin, the oviductal protease that mediates gamete interaction by affecting the vitelline coat in *Bufo japonicus*: its molecular cloning and analyses of expression and posttranslational activation. *Dev Biol.* 243,176-84.
- Honegger, T. G. (1982) Effect on fertilization and localized binding of lectins in the ascidian *Phallusia mammillata*. *Expl Cell Res.* 138, 446-51.
- Honegger, T. G. (1986) Fertilization in ascidians: Studies on the egg envelope, sperm and gamete interactions in *Phallusia mammillata*. *Dev Biol.* 118, 118-128.
- Honegger, T.G. y Koyanagi, R. (2008) The ascidian egg envelope in fertilization: structural and molecular features. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 527-533.
- Hoshi, M.; De Santis, R., Pinto, R. M.; Cotelli, F. y Rosati, F. (1985) Sperm glycosidase as mediators of sperm-egg binding in the ascidians. *Zool. Sci.* 2, 65-69.
- Hou, Y.; Vocadlo, D.; Withers, S. y Mahuran, D. (2000) Role of beta Arg211 in the active site of human beta-hexosaminidase B. *Biochemistry.* 39, 6219-6227.
- Houssay, B.A.; Giusti, L.A. y Lascano Gonzales, J.N. (1929) Implantation d'hypophyse et stimulation des glandes et des fonctions sexuelles du crapaud. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 102, 864-866.
- Hubbes, M.; Callahan, J.; Gravel, R. y Mahuran, D. (1989) The amino-terminal sequences in the pro-alpha and -beta polypeptides of human lysosomal beta-hexosaminidase A and B are retained in the mature isozymes. *FEBS Lett.* 249, 316-20.
- Hunnicut, G. R.; Primakoff, P. y Myles, D. G. (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod.* 55, 80-6.
- Inoda, T. y Morisawa, M. (1987) Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 88, 539-42.
- Inoue, N.; Ikawa, M.; Isotani, A. y Okabe, M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434, 234-8.
- Intra, J.; Cenni, F. y Perotti ME. (2006) An alpha-L-fucosidase potentially involved in fertilization is present on *Drosophila* spermatozoa surface. *Mol Reprod Dev.* 73,1149-58.
- Intra, J.; De Caro, D.; Perotti, M. E. y Pasini, M. E. (2011) Glycosidases in the plasma membrane of *Ceratitis capitata* spermatozoa. *Insect Biochem Mol Biol.* 41, 90-100.
- Imoh, H.; Okamoto, M. y Eguchi, G. (1983) Accumulation of Annulate Lamellae in the Subcortical Layer during Progesterone-induced Oocyte Maturation in *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ.* 25, 1-10.
- Ishihara, K.; Hosono, J.; Kanatani, H. y Katagiri, C. (1984) Toad egg-jelly as a source of divalent cations essential for fertilization. *Dev. Biol.* 105, 435-442.
- Jaffe, L. A. (1976) Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature.* 261, 68-71.
- Jaffe, L. A. y Cross, N. L. (1984) Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. *Biol Reprod.* 30, 50-4.
- Jin, M.; Fujiwara, E.; Kakiuchi, Y.; Okabe, M.; Satouh, Y.; Baba, S. A.; Chiba, K. y Hirohashi, N. (2011) Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 4892-6

- Johnston, D. S.; Wright, W. W.; Shaper, J. H.; Hokke, C. H.; Van den Eijnden, D. H. y Joziase, D. H. (1998) Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J Biol Chem.* 273, 1888-95.
- Jovine, L.; Qi, H.; Williams, Z.; Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (2004) A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5922-5927.
- Katagiri, C. (1973) Chemical analysis of toad egg-jelly in relation to its 'spermcapacitating' activity. *Dev. Growth Differ.* 15, 81-92.
- Katagiri, C.; Iwao, Y. y Yoshizaki, N. (1982) Participation of oviducal pars recta secretions in inducing the acrosome reaction and release of vitelline coat lysin in fertilizing toad sperm. *Dev. Biol.* 94, 1-10.
- Katagiri, C. (1987) Role of oviducal secretions in mediating gamete fusion in anuran amphibians. *Zoolog. Sci.* 4, 1-14.
- Kiefer, S. M. y Saling, P. (2002) Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol. Reprod.* 66, 407-414.
- Kinloch, R. A.; Sakai, Y. y Wassarman, P. M. (1995) Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 263-7.
- Kleinhans, F. W.; Travis, V. S.; Du, J.; Villines, P. M.; Colvin, K. E. y Critser, J. K. (1992) Measurement of human sperm intracellular water volume by electron spin resonance. *J. Androl* 13, 498-506.
- Korneluk, R. G.; Mahuran, D. J.; Neote, K.; Klavins, M. H.; O'Dowd, B. F.; Tropak, M.; Willard, H. F.; Anderson, M. J.; Lowden, J. A. y Gravel, R. A. (1986) Isolation of cDNA clones coding for the alpha-subunit of human beta-hexosaminidase. Extensive homology between the alpha- and beta-subunits and studies on Tay-Sachs disease. *J Biol Chem.* 261, 8407-13.
- Koyanagi, R. y Honegger T. G. (2003) Molecular cloning and sequence analysis of an ascidian egg beta-N-acetylhexosaminidase with a potential role in fertilization. *Dev Growth Differ.* 45, 209-18.
- Kozak, M. (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233-52.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15, 8125-48.
- Krapf, D.; Vidal, M.; Arranz, S. E. y Cabada, M. O. (2006) Characterization and biological properties of L-HGP, a glycoprotein from the amphibian oviduct with acrosome-stabilizing effects. *Biol Cell.* 98, 403-13.
- Krapf, D.; Visconti, P. E.; Arranz, S. E. y Cabada, M. O. (2007) Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* induces capacitation-like changes in homologous spermatozoa. *Dev Biol.* 306, 516-24.
- Krapf, D.; O'Brien, E. D.; Cabada, M. O.; Visconti, P. E. y Arranz, S. E. (2009) Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* modulates the ability of homologous sperm to undergo the acrosome reaction in the presence of the vitelline envelope. *Biol Reprod.* 80, 311-9.
- Krapf, D.; O'Brien, E.; Maidagán, M. P.; Morales, E. S.; Visconti, P. E. y Arranz, S. E. (2014) Calcineurin Regulates Progressive Motility Activation of *Rhinella (Bufo) arenarum* Sperm Through Dephosphorylation of PKC Substrates. *J Cell Physiol.* 229, 1378-86.
- Kytzia, H.J. y Sandhoff, K. (1985) Evidence for two different active sites on human beta-hexosaminidase A. Interaction of GM2 activator protein with beta-hexosaminidase A. *J Biol Chem.* 260, 7568-72.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, C. C. (1986) Fertilization-induced modification of chorion N-acetylglucosamine groups in the ascidian chorion, decreasing sperm binding and polyspermy. *Devl Biol.* 116, 168-173.
- Lambert, C. C. (1989a) Ascidian sperm penetration and the translocation of a cell surface glycosidase. *J Exp Zool.* 249, 308-15.
- Lambert, C. C. (1989b) Ascidian eggs release glycosidase activity which aids in the block against polyspermy. *Development.* 105, 415-20.
- Lemieux, M. J.; Mark, B. L.; Cherney, M. M.; Withers, S. G.; Mahuran, D. J. y James, M. N. (2006) Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 359, 913-929.
- Li, D.; Cao, S. y Xu, C. (2007) Polypeptide backbone derived from carboxyl terminal of mouse ZP3 inhibits sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev.* 74, 1327-36.
- Lillie, F. R. (1919) Problems of fertilization. (Chicago, IL: The University of Chicago Press).
- Lindsay, L. L.; Yamasaki, H.; Hedrick, J. L. y Katagiri, C. (1988) Egg envelope conversion following fertilization in *Bufo japonicus*. *Dev. Biol.* 130, 37-44.
- Lindsay, L. L. y Hedrick, J. L. (2004) Proteolysis of *Xenopus laevis* egg envelope ZPA triggers envelope hardening. *Biochem Biophys Res Commun.* 324, 648-54.
- Litscher, E.S.; Juntunen, K.; Seppo, A.; Penttilä, L.; Niemelä, R.; Renkonen, O. y Wassarman, P. M. (1995) Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry.* 34, 4662-9.
- Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (1996) Characterization of mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity in vitro. *Biochemistry.* 35, 3980-5.
- Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (2007) Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol.* 22, 337-47.
- Lu, Q. y Shur, B. D. (1997) Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development.* 124, 4121-31.
- Mahuran, D. J.; Neote, K.; Klavins, M. H.; Leung, A. y Gravel, R. A. (1988) Proteolytic processing of pro-alpha and pro-beta precursors from human beta-hexosaminidase. Generation of the mature alpha and beta a beta b subunits. *J. Biol. Chem.* 263, 4612-4618.
- Macek, M. B.; Lopez, L. C. y Shur, B. D. (1991) Aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev Biol.* 147, 440-4.
- Mariano, M. I.; de Martin, M. G. y Pisano, A. (1984) Morphological modifications of oocyte vitelline envelope from *Bufo arenarum* during different functional stages. *Dev Growth Differ* 26, 33-42.
- Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao, D.; Knapp, S. y James, M. N. (2003) Crystal structure of human beta-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J Mol Biol.* 327, 1093-109.
- Martínez, M. L. y Cabada, M. O. (1996) Assessment of the acrosome reaction in *Bufo arenarum* spermatozoa by immunostaining: comparison with other methods. *Zygote.* 4, 181-90.
- Martínez, M. L.; Martelotto, L. y Cabada, M. O. (2000) Purification and biological characterization of N-acetyl beta-D glucosaminidase from *Bufo arenarum* spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 57, 194-203.
- Masui, Y. y Clarke, H. J. (1979) Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* 57, 185-282.

- Matsuura, K.; Sawada, H. y Yokosawa, H. (1993). Purification and properties of N-acetylglucosaminidase from eggs of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Eur. J. Biochem. 218, 535-541.
- Medina, M. F.; Crespo, C. A.; Ramos, I. y Fernández, S. N. (2010) Role of cations as components of jelly coats in *Bufo arenarum* fertilization. Zygote. 18,69-80.
- Mengerink, K. J. y Vacquier, V. D. (2001) Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. Glycobiology 11, 37R-43R.
- Metz, E; Kane, R; Yanagimachi, H y Palumbi, S. (1994) Fertilization between closely related sea urchins is blocked by incompatibilities during sperm-egg attachment and early stages of fusion. Biol Bull 187, 23-34.
- Miceli, D. C.; del Pino, E. J.; Barbieri, F. D.; Mariano, M. I. y Raisman, J. S. (1977) The vitelline envelope-to-fertilization envelope transformation in the toad *Bufo arenarum*. Dev. Biol. 59, 101-110.
- Miceli, D. C.; Fernandez, S. N., Raisman, J. S. y Barbieri, F. D. (1978) A trypsin-like oviducal proteinase involved in *Bufo arenarum* fertilization. J. Embryol. Exp. Morphol. 48, 79-91.
- Miceli, D. C.; Fernandez, S. N.; Mansilla, Z. C. y Cabada, M. O. (1987) New evidence of Anuran oviductal pars recta involvement on gamete interaction. J. Exp. Zool. 244, 125-132.
- Millar, S. E.; Chamow, S. M.; Baur, A. W.; Oliver, C.; Robey, F. y Dean, J. (1989) Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. Science. 246, 935-8.
- Miller, R. L. (1985) Sperm chemo-orientation in the metazoa. In Biology of Fertilization, CB Metz and A Monroy, eds. (New York: Academic Press), pp. 275-337.
- Miller, D. J.; Macek, M. B. y Shur, B. D. (1992) Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature. 357, 589-93.
- Miller, D.J.; Gong, X. y Shur, B. D. (1993a) Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. Development. 118, 1279-89.
- Miller, D. J.; Gong, X.; Decker, G. y Shur, B. D.(1993b) Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. J Cell Biol. 123, 1431-40.
- Miller, D. J.; Shi, X. y Burkin, H. (2002) Molecular basis of mammalian gamete binding. Recent Prog Horm Res. 57, 37-73.
- Miranda, P. V.; Gonzalez-Echeverría, F.; Marín-Briggiler, C. I.; Brandelli, A.; Blaquier, J. A. y Tezón, J. G. (1997) Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. Mol Hum Reprod. 3, 399-404.
- Miranda, P. V.; González-Echeverría, F.; Blaquier, J. A.; Mahuran, D. J. y Tezón, J. G. (2000) Evidence for the participation of beta-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro*. Mol Hum Reprod. 6, 699-706.
- Moller, C. C. y Wassarman, P. M. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. Dev Biol. 132,103-12.
- Moore, J. A. (1955) Abnormal combinations of nuclear and cytoplasmic systems in frogs and toads. Adv. Genet. 7, 139-182.
- Morales, E. S.; Krapf, D; Botta, P. E.; Cabada, M. O. y Arranz, S. E. (2012)  $\beta$ -hexosaminidase from *Xenopus laevis* eggs and oocytes: from gene to immunochemical characterization. J Cell Biochem. 113, 3709-20.
- Mori, E.; Mori, T. y Takasaki, S. (1997) Binding of mouse sperm to beta-galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-coupled beads. Biochem Biophys Res Commun. 238, 95-9.
- Morisawa, M.; Suzuki, K. y Morisawa, S. (1983a) Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. J Exp Biol 107, 105-113.

- Morisawa, M.; Suzuki, K.; Shimizu, H.; Morisawa, S. y Yasuda, K. (1983b) Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol.* 107, 95-103.
- Morisawa, M. (1994) Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci.* 11, 647-662.
- Mouguelar, V. S., Cabada, M. O. y Coux, G. (2011) The integrin-binding motif RGDS induces protein tyrosine phosphorylation without activation in *Bufo arenarum* (Amphibia) oocytes. *Reproduction.* 141, 581-93.
- Moy, G. W. y Vacquier, V. D. (1979) Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Curr Top Dev Biol.* 1, 31-44.
- Muldoon, L. L.; Neuwelt, E. A.; Pagel, M. A. y Weiss, D. L. (1994) Characterization of the molecular defect in a feline model for type II GM2-gangliosidosis (Sandhoff disease). *Am. J. Pathol.* 144, 1109-1118.
- Myerowitz, R.; Piekarz, R.; Neufeld, E. F.; Shows, T. B. y Suzuki, K. (1985) Human beta-hexosaminidase alpha chain: coding sequence and homology with the beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7830-7834.
- Nishihara, T.; Wyrick, R. E.; Working, P. K.; Chen, Y. H. y Hedrick, J. L. (1986) Isolation and characterization of a lectin from the cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *Biochemistry.* 25, 6013-20.
- O'Brien, E. D.; Krapf, D.; Cabada, M. O.; Visconti, P. E. y Arranz, S. E. (2011) Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Dev Biol.* 350, 80-8.
- O'Dowd, B. F.; Quan, F.; Willard, H. F.; Lamhonwah, A. M.; Korneluk, R. G.; Lowden, J. A.; Gravel, R. A. y Mahuran, D. J. (1985) Isolation of cDNA clones coding for the beta subunit of human beta-hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 1184-8.
- Ohlendieck, K.; Dhume, S. T.; Partin, J. S. y Lennarz, W. J. (1993) The sea urchin egg receptor for sperm: isolation and characterization of the intact, biologically active receptor. *J Cell Biol.* 122, 887-95.
- Okamura, N.; Tajima, Y.; Soejima, A.; Masuda, H. y Sugita, Y. (1985) Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 260, 9699-9705.
- Olson, J. H.; Xiang, X.; Ziegert, T.; Kittelson, A.; Rawls, A.; Bieber, A. L. y Chandler, D. E. (2001) Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11205-11210.
- Omata, S. y Katagiri, C. (1996) Involvement of carbohydrate moieties of toad egg vitelline coat in binding with fertilizing sperm. *Dev Growth Differ.* 38, 663-672.
- Perez Martinez, S. L.; Menendez Helman, R. J.; Zitta, K. S.; Brandelli, A. y Miranda, P. V. (2008) Characterization of human sperm N-acetylglucosaminidase. *Int J Androl.* 31, 315-24.
- Perotti, M. E.; Cattaneo, F.; Pasini, M. E.; Verni, F. y Hackstein, J. H. (2001) Male sterile mutant casanova gives clues to mechanisms of sperm-egg interactions in *Drosophila melanogaster*. *Mol Reprod Dev.* 60, 248-59.
- Pinto, M. R.; De Santis, R.; D'Alessio, G. y Rosati, F. (1981) Studies on fertilization in the ascidians. Fucosyl sites on vitelline coat of *Ciona intestinalis*. *Exp Cell Res.* 132, 289-95.
- Primakoff, P.; Lathrop, W.; Woolman, L.; Cowan, A. y Myles, D. (1988) Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature.* 335, 543-6.
- Prody, G. A.; Greve, L. C. y Hedrick, J. L. (1985) Purification and characterization of an N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *J Exp Zool.* 235, 335-40.

- Proia, R. L.; d'Azzo, A. y Neufeld, E. F. (1984) Association of alpha- and beta-subunits during the biosynthesis of beta-hexosaminidase in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 259, 3350-4.
- Proia, R. L. y Soravia, E. (1987) Organization of the gene encoding the human beta-hexosaminidase alpha-chain. *J Biol Chem.* 262, 5677-81.
- Proia, R. L. (1988) Gene encoding the human beta-hexosaminidase beta chain: extensive homology of intron placement in the alpha- and beta-chain genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 1883-7.
- Quon, D. V.; Proia, R. L.; Fowler, A. V.; Bleibaum, J. y Neufeld, E. F. (1989) Proteolytic processing of the beta-subunit of the lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase, in normal human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264, 3380-3384.
- Raisman, J. S. y Barbieri, F. D. (1969) Lytic effects of sperm suspensions on the vitelline membrane of *Bufo arenarum* oocytes. *Acta Embryol. Exp. (Palermo)* 1, 17-26.
- Raisman, J.; de Cunio, R.; Cabada, M.; del Pino, E. y Mariano, M. (1980) Acrosome breakdown in *Leptodactylus chaquensis* (amphibia anura) spermatozoa. *Develop Growth Differ* 22, 289-297.
- Rashid, M. H.; Mori, M. y Sekiguchi, J. (1995) Glucosaminidase of *Bacillus subtilis*: cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization. *Microbiology.* 141, 2391-404.
- Richardson, R. T.; Yamasaki, N. y 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.
- Rogers, H. J.; Taylor, C., Rayter, S. y Ward, J. B. (1984) Purification and properties of autolytic endo-beta-N-acetylglucosaminidase and the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* strain 168. *J Gen Microbiol.* 130, 2395-402.
- Rosano, G. L. y Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 5, 172. doi: 10.3389
- Rosati, F. y De Santis, R. (1980) *Role of the surface carbohydrates in sperm-egg interaction in Ciona intestinalis.* *Nature.* 283, 762-4.
- Rosiere, T. K. y Wassarman, P. M. (1992) Identification of a region of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. *Dev Biol.* 154, 309-17.
- Rugh, R. (1935) Ovulation in the frog. Pituitary relation in induce ovulations. *J. Exp. Zool.* 71, 149-162.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: An Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Tercera Edition; Capítulo 6.
- Scarpeci, S. L.; Sanchez, M. L. y Cabada, M. O. (2008) Cellular origin of the *Bufo arenarum* sperm receptor gp75, a ZP2 family member: its proteolysis after fertilization. *Biol Cell.* 100, 219-30.
- Schackmann, R.W.; Christen, R. y Shapiro, B. M. (1984) Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. Changes upon activation and induction of the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 259, 13914-13922.
- Schuette, C. G.; Weisgerber, J. y Sandhoff, K. (2001) Complete analysis of the glycosylation and disulfide bond pattern of human beta-hexosaminidase B by MALDI-MS. *Glycobiology.* 11, 549-56.
- Sedmak, J. J. y Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem.* 79, 544-52.
- Shamsadin, R.; Adham, I. M.; Nayernia, K.; Heinlein, U. A.; Oberwinkler, H. y Engel W. (1999) Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod.* 61, 1445-51.

- Shilling, F. M.; Magie, C. R. y Nuccitelli, R. (1998) Voltage-dependent activation of frog eggs by a sperm surface disintegrin peptide. *Dev Biol.* 202, 113-24.
- Shimoda, Y.; Kitajima, K.; Inoue, S. y Inoue, Y. (1994) Isolation, structural determination, and calcium-binding properties of the major glycoprotein present in *Bufo japonicus japonicus* egg jelly. *Eur. J. Biochem.* 223, 223-231.
- Shur, B. D. y Hall, N. G. (1982) A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol.* 95, 574-9.
- Sinici, I.; Tropak, M. B.; Mahuran, D. J. y Özkara, H. A. (2004) Assessing the severity of the small inframe deletion mutation in the  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -hexosaminidase A found in the Turkish population by reproducing it in the more stable  $\beta$ -subunit. *J Inherit Metab Dis.* 27, 747-756.
- Sinici, I.; Zarghooni, M.; Tropak, M. B.; Mahuran, D. J. y Ozkara, H. A. (2006) Comparison of HCMV IE and EF-1 $\alpha$  promoters for the stable expression of  $\beta$ -subunit of hexosaminidase in CHO cell lines. *Biochem Genet.* 44, 173-80.
- Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67, 31-40.
- Sokac, A. M.; Co, C.; Taunton, J. y Bement, W. (2003) Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in *Xenopus* eggs. *Nat Cell Biol.* 5, 727-32.
- Sonderfeld-Fresko, S. y Proia, R. L. (1989) Analysis of the glycosylation and phosphorylation of the lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 264, 7692-7.
- Stears, R. L. y Lennarz, W. J. (1997) Mapping sperm binding domains on the sea urchin egg receptor for sperm. *Dev Biol.* 187, 200-8.
- Steinke, J. H. y Benson, D. G. J. (1970) The structure and polisaccharide cytochemistry of the jelly envelopes of the egg of the frog, *Rana pipiens*. *J. Morphol.* 130, 57-66.
- Stutz, F. y Spohr, G. (1986) Isolation and characterization of sarcomeric actin genes expressed in *Xenopus laevis* embryos. *J Mol Biol.* 187, 349-61.
- Swanson, W. J.; Yang, Z.; Wolfner, M. F. y Aquadro, C. F. (2001) Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 2509-14.
- Takamune, K.; Yoshizaki, N. y Katagiri, C. (1986) Oviductal pars recta-induced degradation of vitelline coat proteins in relation to acquisition of fertilizability of toad eggs. *Gamete Res* 14, 215-224.
- Tian, J.; Gong, H.; Thomsen, G. H. y Lennarz, W. J. (1997) Gamete interactions in *Xenopus laevis*: identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *J. Cell Biol.* 136, 1099-1108.
- Tulsiani, D. R.; Yoshida-Komiya, H. y Araki, Y. (1997) Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod.* 57, 487-94.
- Tyler, A. (1967). Problems and procedures of comparative gametology and syngamy. In *Fertilization*, A Monroy and E.C.Metz, eds. (New York: Academic press).
- Vacquier, V. D. y Moy, G. W. (1977) Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 2456-60.
- Valz-Gianinet, J.N.; del Pino, E.J. y Cabada, M.O. (1991) Glycoproteins from *Bufo arenarum* vitelline envelope with fertility-impairing effect on homologous spermatozoa. *Dev. Biol.* 146, 416-422.
- Vo, L. H. y Hedrick, J. L. (2000) Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod.* 62, 766-74.
- Vo, L. H.; Yen, T. Y.; Macher, B. A. y Hedrick, J. L. (2003) Identification of the ZPC oligosaccharide ligand involved in sperm binding and the glycan structures of *Xenopus laevis*

- vitelline envelope glycoproteins. *Biol Reprod.* 69, 1822-30.
- Wall, D. A. y Meleka, I. (1985) An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol.* 101, 1651-64.
- Ward, C. R. y Storey, B. T. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* 104, 287-96.
- Ward, G. E.; Brokaw, C. J.; Garbers, D. L. y Vacquier, V. D. (1985) Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol.* 101, 2324-9.
- Wassarman, P. M. (1999) Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of gamete adhesion, Exocytosis and Fusion. *Cell.* 96, 175-183.
- Wassarman, P. M.; Jovine, L. y Litscher, E. S. (2001) A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* 3, E59-64.
- Wassarman, P. M.; Jovine, L.; Qi, H.; Williams, Z.; Darie, C. y Litscher, E. S. (2005) Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol.* 234, 95-103.
- Wassarman, P. M. y Litscher, E. S. (2008) Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 52, 665-76.
- Wassarman, P. M. (2014) Reproductive biology: Sperm protein finds its mate. *Nature.* 508, 466-7.
- Williams, M.; Hill, C. J.; Scudamore, I.; Dunphy, B.; Cooke, I.D. y Barratt, C. L. (1993) Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum. Reprod.* 8, 2019-2026.
- Williams, Z.; Litscher, E. S.; Jovine, L. y Wassarman, P. M. (2006) Polypeptide encoded by mouse ZP3 exon-7 is necessary and sufficient for binding of mouse sperm in vitro. *J Cell Physiol.* 207, 30-9.
- Wolf, D. P. (1978) The block to sperm penetration in zonal-free mouse eggs. *Dev Biol.* 64, 1-10.
- Wyrick, R. E.; Nishihara, T. y Hedrick, J. L. (1974) Agglutination of jelly coat and cortical granule components and the block to polyspermy in the amphibian *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71, 2067-71.
- Xu, Y.; Intra, J.; Zhang, C. X. y Pasini, M. E. (2011) Recombinant expression of *Drosophila melanogaster*  $\alpha$ -L-fucosidase in *Trichoplusia ni* cells. *J Insect Physiol.* 57, 1205-11.
- Yamasaki, H.; Takamune, K. y Katagiri, C. (1988) Classification, inhibition, and specificity studies of the vitelline coat lysin from toad sperm. *Gamete Res.* 20, 287-300.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 189-317.
- Yem, D. W. y Wu, H. C. (1976) Purification and properties of beta-N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 125, 324-31.
- Yoshizaki, N. y Katagiri, C. (1981) Oviductal contributions to alterations of the vitelline coat in the frog, *Rana japonica*: an electron microscopic study. *Dev Growth Differ.* 23, 495-506.
- Yurewicz, E. C.; Sacco, A. G.; Gupta, S. K.; Xu, N. y Gage, D. A. (1998) Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 273, 7488-7494.
- Zitta, K.; Wertheimer, E. y Miranda P. V. (2004) Analysis of the participation of N-acetylglucosamine in the different steps of sperm-zona pellucida interaction in hamster. *Mol Hum Reprod.* 10, 925-33.
- Zitta, K.; Wertheimer, E. V. y Miranda, P. V. (2006). Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 557-563.

## FE DE ERRATAS

En la página 33 perteneciente a la sección Objetivos, se reemplazan los siguientes párrafos:

Las glucosidasas son encontradas en los gametos de casi todas las especies estudiadas. De este modo, la comunicación entre los gametos mediado por interacciones proteína-carbohidrato parece ser un mecanismo ampliamente distribuido en el reino animal. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en estas interacciones, como el rol que juegan las glucosidasas en cada uno de ellos, aún no son completamente conocidos en los vertebrados.

En este trabajo de tesis se planteó como objetivo general la identificación y el estudio de glucosidasas asociadas a la fecundación de los anfibios anuros *X. laevis* y *R. arenarum* como un prerrequisito para ahondar en la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la fecundación de los vertebrados. Se pondrá especial énfasis en el estudio de la Hex puesto que trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio la vinculan potencialmente a la fecundación *R. arenarum*.

por este otro:

Las glucosidasas se encuentran en los gametos de casi todas las especies estudiadas. La comunicación entre los gametos mediada por interacción proteína-carbohidrato parece ser un mecanismo ampliamente distribuido en el reino animal. Sumado a esto, datos previos de nuestro laboratorio sugieren un rol de la Hex en la fecundación de *R. arenarum*. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el pH del medio de fecundación y en la cubierta gelatinosa es cercano a 7, se plantea la hipótesis de que las Hexosaminidasas tendrían un rol de reconocimiento tipo lectina en eventos tempranos del reconocimiento entre gametos. Para analizar esta hipótesis, se plantea como objetivo general, la identificación y el estudio de glucosidasas asociadas a la fecundación de los anfibios anuros *X. laevis* y *R. arenarum*, con el objetivo particular de ahondar en la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la fecundación de los vertebrados.