

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



**COMPARACION DE LISINAS ACROSOMALES DE MOLUSCOS  
Y SU APLICACION EN MICROINYECCION**

**TESIS PROFESIONAL**

que como requisito parcial  
para obtener el título de

**BIOLOGO**

presenta

**LOURDES AIDEE SOLANO ESTRADA**

ENSENADA, B.C.

NOVIEMBRE DE 1991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**‘‘COMPARACION DE LISINAS ACROSOMALES DE MOLUSCOS  
Y SU APLICACION EN MICROINYECCION.’’**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

**LOURDES AIDEE SOLANO ESTRADA**

APROBADO POR

*Meredith Gould*

DRA. MEREDITH GOULD CH.

Presidente

~~*Olivia Tapia V.*~~  
BIOL. OLIVIA TAPIA V.

1er. Vocal

*Jose Luis Stephano*

M. C. JOSE LUIS STEPHANO

Secretario

## A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Meredith Gould y al M. C. José Luis Stephano por su paciencia y dedicación, por proporcionarme los conocimientos necesarios para ser hoy lo que soy.

A la M. C. Irma Rivera Garibaldi por su apoyo y confianza.

A la Bióloga Olivia Tapia V. por su valiosa ayuda.

A la Facultad de Ciencias y el personal Administrativo.

DEDICATORIA

A MI CAMELA, POR SUS NOCHES DE DESVELO.

A MIS PADRES, JORGE Y JOSEFINA POR SU ESTIMULO, APOYO,  
Y CONFIANZA.

A MIS HERMANOS, CLARISA, JORGE Y RAUL. SIGAN  
ADELANTE.

A RUFINO POR SU CARINO Y CONFIANZA.

A MIS MEJORES AMIGOS, LUCY, FELIPE,  
PEDRO Y CHOCO.

A MI NUMEROSA FAMILIA.

A TODOS, GRACIAS.

## RESUMEN

Durante la fertilización en muchas especies el espermatozoite libera una lisina que disuelve una porción de la capa vitelina para facilitar su penetración al ovocito. Los ovocitos de moluscos poseen una dura capa vitelina la cual es un obstáculo para introducir por microinyección genes, factores que controlan el ciclo celular,  $Ca^{++}$ , y que al forzar la penetración daña al ovocito. Este problema fue resuelto mediante la aplicación de lisina acrosomal de espermatozoides de *Haliotis rufescens*, *Astraea undosa* y *Norrisia norrisi* sobre las capas vitelinas de sus respectivos ovocitos. La lisina fue obtenida de la preparación de espermatozoides congelados y descongelados tres veces y centrifugada a 10,000 x g. Los ovocitos fueron puestos en una cámara de microinyección y se aplicó localmente extracto con lisina con una micropipeta de aproximadamente 10  $\mu$ m de diámetro. En *H. rufescens* y *N. norrisi* el extracto con lisina disolvió una porción de la capa vitelina un canal mientras que en *A. undosa* la capa vitelina se hizo laxa pero no la disolvió. En las tres especies las microagujas pudieron ser introducidas sin que hubiese resistencia y se microinyectaron los ovocitos sin dañarse. Los extractos con lisina se comportaron de manera similar en los ensayos de suspensión, disolviendo la capa vitelina completamente en *H. rufescens* *N. norrisia* y sólo de manera laxa en *A. undosa* aun a altas concentraciones. Sin embargo en *A. undosa* las capas vitelinas quedaron tan laxas e hinchadas que fácilmente fueron removidas de manera mecánica. Los extractos con lisina trabajaron de manera específica no teniendo efecto visible con las capas vitelinas heterologas aun a altas concentraciones. Los extractos con lisina fueron caracterizados por geles de poliacrilamida con dodesilsulfato de sodio (SDS) y los espermatozoides de *A. undosa* y *N. norrisi* fueron examinados por microscopía electrónica.

## A B S T R A C T

During fertilization in many species, the sperm liberates a lysin that dissolves a pathway in the vitelline coat to facilitate the penetration of the oocyte. Molluscan oocyte possess a tough vitelline coat that is an obstacle to the introduction of genes, cell cycle controlling factors,  $Ca^{++}$ , etc. by microinjection since the force required for penetration damages the oocyte. This problem was solved by local application of sperm acrosomal lysin to the vitelline coats of *H. rufescens*, *A. undosa* and *N. norrisi* oocytes. Sperm extracts containing lysin were prepared by freezing and thawing concentrated sperm suspension three times, then collecting the 10,000 x g supernate. Oocytes were placed in a microinjection chamber and lysin extract was applied locally with a micropipet of approximately 10  $\mu$ m tip diameter. In *H. rufescens* and *N. norrisi* the lysin extract dissolved a canal through the vitelline coat, and in *A. undosa* the coat was locally softened without dissolving. In all three species, microinjection pipets could then be introduced without resistance. Lysin extracts behaved similarly when tested in suspension, dissolving the vitelline coat completely in *H. rufescens* and *N. norrisi* and only softening it in *A. undosa* even at high concentration. However, the softened coat in *A. undosa* was easily removed by mechanical agitation. The lysin extracts were species-specific and had no visible effects on heterologous vitelline coats even at high concentrations. Lysin extracts were characterized by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and sperms from *A. undosa* and *N. norrisi* were examined by electron microscopy.

## INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
METODOLOGIA	6
RESULTADOS	16
DISCUSION	38
CONCLUSION	43
BIBLIOGRAFIA	45

## INTRODUCCION

Los ovocitos de la mayoría de los animales están rodeados por una o más capas a través de las cuales tiene que pasar el espermatozoide para fertilizarlos. Las capas de los ovocitos de cefalópodos, insectos y teleósteos tienen aberturas preformadas llamadas micrópilos, por los cuales los espermatozoides pueden fertilizar al ovocito una vez que han encontrado esta estructura (Austin, 1968). Pero en general los moluscos, anélidos, crustáceos, equinodermos, hemicordados, tunicados, anfibios, reptiles y mamíferos carecen de dichas estructuras especializadas y sus espermatozoides tienen que abrirse camino a través de las capas que rodean al ovocito (Austin, 1968). Generalmente se ha pensado que el camino es ayudado por un agente lítico que porta el espermatozoide, la lisina (Hoshi, 1985).

La lisina se encuentra en la vesícula acrosomal en la parte anterior del espermatozoide. Cuando este hace contacto con las capas del ovocito la vesícula se abre por exocitosis, liberando la lisina que disuelve una porción de las capas por la cual penetra el espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito (Hoshi, 1985).

Se puede definir la lisina como un agente lítico que porta el espermatozoide que le ayuda a abrirse camino a través de las capas que rodean al ovocito sin considerar su mecanismo de acción, localización o almacenamiento. El nombre específico de la lisina dependerá de la capa sobre la

que tenga efecto, tales como lisina de la capa de gelatina, lisina de la capa vitelina, etc. En algunas especies hay evidencias que las lisinas son enzimas (ejemplo: en mamíferos y en asidia *Halocynthia roretzi*; Hoshi, 1985), pero en otras las lisinas utilizan un mecanismo no-enzimático, (ver antecedentes).

Los moluscos marinos poseen una lisina muy potente (Lewis *et al* 1982), y sus ovocitos poseen una dura capa vitelina, lo cual viene siendo un obstáculo en microinyección al tratar de introducir en ellos cualquier sustancia como genes que codifiquen para una hormona de crecimiento, calcio, etc. Es por esto que en el presente trabajo se pretende extraer lisina acrosomal de los espermatozoides de tres especies de moluscos *Haliotis rufescens*, *Astraea undosa* y *Norrisia norrisi* para probarla en suspensión y aplicarla localmente por microinyección sobre la capa vitelina de los ovocitos de su propia especie así como entre ellas, y conocer si estas lisinas trabajan de manera específica.

Así como conocer la ultraestructura del acrosoma de los espermatozoides de *Astraea undosa* y *Norrisia norrisi*.

## ANTECEDENTES

Los primeros estudios realizados con lisinas comenzaron en el siglo pasado, por Schenk (1878; citado por Hoshi, 1985), donde observó la dispersión de células foliculares alrededor de ovocitos de mamíferos en una suspensión de espermatozoides. Hibbard (1928) y Wintrebert (1929) (citados por Hoshi, 1985), descubrieron que los espermatozoides de la rana *Discoglossus pictus* contienen un agente que ataca la capa de gelatina de los ovocitos, pero dicho descubrimiento no fué apreciado en esos días, porque se estaba buscando una enzima espermática que disolviera una capa superficial y activara a su vez al ovocito.

Meves (1915; revisado por Dan, 1967) realizó trabajos en invertebrados, descubriendo en el bivalvo *Mytilus edulis* que el espermatozoide entra al ovocito lisando la capa vitelina y perdiendo con ello su acrosoma.

Tyler (1939) obtuvo un agente lítico de los espermatozoides de la lapa gigante *Megathura crenulata* que tenía la capacidad de disolver las capas del ovocito, y resultados similares obtuvo en el abulón *Haliotis cracherodii*, pero en pruebas cruzadas la lisina de *H. cracherodii* no tuvo ningún efecto sobre las capas de los ovocitos de *M. crenulata*, ni viceversa. von Meden (1942, 1945; citado por Berg 1950), también concluyó con bases en ensayos más extensivos que las lisinas de la capa vitelina de varios moluscos son hasta cierto punto específicos.

Berg (1950) reportó el aislamiento de lisinas del acrosoma de *Mytilus edulis* y realizó pruebas cruzadas de extractos de *M. edulis* y *M. californianus* donde el extracto de *M. californianus* fué capaz de disolver la capa vitelina de los ovocitos de *M. edulis*, sin embargo el extracto de éste tuvo un efecto lítico muy débil sobre la capa vitelina de ovocitos de *M. californianus*. También reportó que las lisinas de la capa vitelina de *M. edulis* y *M. californianus* no disolvieron las capas de los ovocitos de *Acmaea scabra*, *Mya arenaria*, *Urechis caupo* ni de *Strongylocentrotus purpuratus* y extractos de éstas especies no tuvieron ningún efecto sobre las capas de *M. edulis* (Berg, 1950).

Se supuso que estas lisinas eran enzimas pero en 1974, Haino-Fukushima demostró que la lisina del caracol *Tegula pfeifferi* trabaja por un mecanismo no-enzimático. Las moléculas de lisina se unen estequiométricamente con moléculas de la capa vitelina, solubilizándolas sin degradarlas (Haino-Fukushima, 1974). Posteriormente se encontró que las lisinas de *Haliotis rufescens* (Lewis et al., 1982) y *Turbo cornutus* (Ogawa y Haino-Fukushima, 1984), trabajan de la misma manera. El mecanismo de acción de las lisinas de *Megathura crenulata* y *Mytilus edulis* todavía no se ha decifrado.

Haino (1971) menciona que entre cuatro especies de *Tegula*, las lisinas atacaban solamente capas vitelinas de su propia especie. Vacquier et al., (1990) encontró que la

lisina de *Haliotis rufescens* no disolvió capas vitelinas de *Haliotis corrugata* aunque la lisina de *H. corrugata* disolvió capas vitelinas de *H. rufescens*.

La lisina de *Haliotis rufescens* se ha caracterizado por geles de poliacrilamida con SDS encontrando dos componentes con masas moleculares de 13,000 y 15,000 daltones (Lewis, et al., 1980). También se han publicado varios estudios sobre la morfología de espermatozoides de *Haliotis* con microscopía electrónica (Lewis et al., 1980; Haino-Fukushima, y Usui, 1985).

No se ha reportado el uso de lisina acrosomal para facilitar microinyección en ninguna especie, y no existen estudios sobre lisinas ni de microscopía electrónica en *Astraea undosa* y *Norrisia norrisi*.

## METODOLOGIA

### 1.- OBTENCION Y TRANSPORTACION DE ORGANISMOS

Se compraron abulones *H. rufescens* sexualmente maduros hembras y machos del Abalone Farm en Cayucos California. Fueron transportados por avión hasta San Diego California y puestos en acuarios en SCRIPPS con flujo de agua de mar constante a 17°C y mucha aereación por un día para quitar el estrés en los organismos y evitar un posible desove. Posteriormente fueron trasladados a Ensenada B.C. al Laboratorio de Biología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Baja California, en cajas de unicel con agua de mar fresca aproximadamente a 17°C. Después fueron puestos en un acuario con filtro biológico a temperatura de 15-18°C y alimentados diariamente con *Macrocistys pyrifera* y mantenidos en la oscuridad.

Mientras que *A. undosa* y *N. norrisi* fueron colectados por buceo libre en el Rancho Packard, Municipio de Ensenada B.C. y transportados al laboratorio en cubetas de plástico con camas de algas y puestos en el mismo acuario con *H. rufescens*.

### 2.-LAVADO DE MATERIAL

Toda la cristaleria que se utilizó fue lavada con Alconox, Cloralex 1:10 por una hora, Acido Clorhídrico concentrado 1:60 por una hora, y enjuagadas con agua de la llave en cada cambio y una última enjuagada con agua

destilada. Los cubreobjetos fueron lavados con Alconox y agua caliente, posteriormente enjuagados con agua destilada y almacenados en etanol al 85%.

### 3. - ELABORACION DE CAMARAS

La elaboración de cámaras fué por el método de Kiehart (1982). Se hizo con los cubreobjetos lavados, donde en uno de sus lados se pusieron 3 tiras de cinta con adhesivo por ambos lados (ver fig. 1) puestos uno sobre otro y sobre de ella un trozo de cubreobjetos rectangular de 3 mm X 1.2 mm quedando un espacio de unos 300  $\mu\text{m}$  aproximadamente de altura. El cubreobjetos fue montado sobre un portaobjetos de plexiglas con la cámara hacia abajo y otro cubreobjetos pegado con silicón (Dow Corning) a la parte inferior del portaobjetos formando otra cámara de 3 mm de alto, (fig. 2 y 3).

### 4. - ELABORACION DE MICROPIPETAS Y MICROAGUJAS

Las microagujas se hicieron con capilares de cristal MICROCAPS (Drummond) con un diámetro de 1 mm en un aparato para estirar capilares (Industrial Science Associates, Inc. Ridgewood N.Y.). Las puntas de las microagujas (fig. 4 m), fueron de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro; también se hicieron dos tipos de micropipetas con puntas de 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente que se utilizaron para aplicar

lisina. (fig. 4 mp).

#### 5. - SUCCIONADOR DE OVOCITOS

Fue elaborado con una manguera de latex de 4mm de diámetro y a uno de sus extremos se le unió un capilar de cristal cuyo diámetro era de 1 mm.

#### 6. - OBTENCION DE GAMETOS

*A. undosa* y *N. norrisi* fueron previamente sexados quebrando una pequeña parte de la concha con un desarmador y un martillo. El color verde de la gónada indica que es hembra mientras que el color blanco lechoso indica que es macho. Después fueron mantenidos en el acuario hasta su uso. Para obtener los gametos se quebró la concha hasta dejar al descubierto toda la gónada y con un bisturí se hicieron pequeños cortes para abrirla. Con ayuda de una pipeta Pasteur se extrajeron los gametos (se cuidó de no tomar parte del tracto digestivo). Los ovocitos fueron lavados con agua de mar fresca y filtrada de tres a cinco veces por decantación para quitar basura y ovocitos destruidos. Los espermatozoides fueron revisados al microscopio para verificar su motilidad y que no hayan disparado su reacción acrosomal. Solo se trabajó con las gónadas que presentaron espermatozoides con gran motilidad. Para quitar basura y trozos de gónada, los espermatozoides fueron filtrados una vez por una malla con luz de 120  $\mu$ m y tres veces por una

mallá de luz de 60  $\mu\text{m}$ . Después se lavaron los gametos y fueron incubados en vasos de precipitado de 250 ml con agua de mar fresca y filtrada (Millipore 0.45  $\mu\text{m}$ ) y mantenidos a temperatura controlada, los ovocitos a 17°C y los espermatozoides a 4°C. (Stephano, 1991).

Los gametos de *H. rufescens* fueron obtenidos por desove siguiendo el método de Morse *et al.*, (1978) que consistió en preparar cada cuba de plástico con 12 litros de agua de mar: 50 ml de una solución conteniendo 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (Baker estabilizado), más 100 ml de tris (tris [hidroximetil]-aminometano SIGMA) 2M y algunas gotas de NaOH para ajustar el pH a 9.1. La temperatura del agua se mantuvo entre 15 y 17°C con unas charolas con hielo; una vez preparadas las cubas, se sexaron los organismos poniéndose una hembra en una cuba y un macho en otra, por aproximadamente dos o tres horas. Posteriormente se desaguaron las cubas con unas mangueras sin molestar a los organismos y se lavó con agua de mar a 17°C (3 veces) después se dejaron a los organismos con agua de mar hasta que desovaron. Los gametos fueron colectados con una pipeta Pasteur y puestos en vasos de precipitado y mantenidos a la temperatura óptima, los ovocitos a 17°C y los espermatozoides a 4°C.

#### 7. - OBTENCION DEL EXTRACTO CON LISINA

Una vez colectados y filtrados los espermatozoides, se

tomó una muestra para verificar que no hayan disparado su reacción acrosomal, su motilidad y para hacer un conteo de ellos. Después se procedió a lavar los espermatozoides centrifugándolos 5 minutos a 3,000 X g tirando el sobrenadante que contenía basura y espermatozoides muertos o dañados. El paquete fué resuspendido nuevamente. Esta operación se repitió tres veces. Al ser tirado por última vez el sobrenadante, al paquete se le agregaron 300  $\mu$ l de agua de mar fresca y filtrada. Posteriormente se congelaron y descongelaron tres veces. Después de la última descongelada se procedió a centrifugar durante 40 minutos a 12,000 X g para así obtener el extracto conteniendo la lisina, al cual se le agregó un poco de rojo fenol para indicar el pH y este se ajustó a 8 con 0.5M de NaOH. Fué necesario ajustar el pH a 8 ya que los extractos eran muy ácidos y al hacer los ensayos no funcionó.

#### 8. - ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se determinó el peso molecular de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato de sodio), a 80 voltios de 6 a 8 horas. (Laemmli, 1970). Los marcadores para masa molecular que se usaron fueron lisozima (14,300),  $\beta$ -lactoglobulina (18,400), albúmina de huevo (45,000), albúmina bovina (66,000) y tripsinógeno (24,000) daltones.

## 9. - DETERMINACION DE PROTEINA.

Se determinó la cantidad de proteína en los extractos obtenidos por el método de Lowry (1951).

Solución A: 1 gr de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 0.2 gr de NaOH en 50 ml de agua destilada.

Solución B: 1% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 gr en 100 ml).

Solución C: 2% de tartrato de Na-K (2 gr en 100 ml).

Reactivo de fenol: se diluye Folin-Ciocalteu 7 ml en 14 ml de agua destilada.

Se mezclaron 50 ml de la solución (A), 0.5 ml de solución (C) y 0.5 ml de solución (B) y se pusieron 2.75 ml en cada tubo de ensaye más la proteína a analizar, posteriormente se le agregaron 0.5 ml del reactivo de fenol y se agitaron en un vortex, y 30 minutos más tarde se leyó en un espectrofotómetro a 750 nm con cubeta de vidrio. El estándar fué albúmina bovina.

## 10. - MICROINYECCION

Con la manguera de succión se tomaron ovocitos y se pusieron en el reservorio pequeño de la cámara y el grande fue llenado con agua de mar a  $16^{\circ}\text{C}$  (fig. 2 y 3 ). La cámara fué montada en un microscopio American Optical que tiene una placa hueca de aluminio por donde circula agua fría que es mandada de un enfriador por medio de unas mangueras, con esto se siguió manteniendo la temperatura controlada de  $16^{\circ}\text{C}$  durante todo el experimento. Encima de la cámara se puso un

capilar lleno con aceite y otro del extracto con lisina (fig. 2). Se puso una micropipeta en el micromanipulador y se introdujo en el capilar de aceite para calibrar la micropipeta. Esto es, con ayuda de la reglilla micrométrica se tomó una cantidad de aceite conocida y se expulsó al reservorio pequeño y se midió el diámetro de la gota. Aplicando la formula  $V = 4/3 \pi r^3$  se conoció el volumen en picolitros (pl) que se tomó. Ya calibrada la micropipeta se introdujo en el capilar con el extracto y se llenó hasta el volumen que conocemos y se expulsó al ovocito monitoreado para tal efecto. Posteriormente se cambió la micropipeta por una microaguja y se probó si sería posible microinyectar al ovocito.

#### 11.- ENSAYO DE EXTRACTO CON LISINA EN SUSPENSION

Se pusieron ovocitos en una caja de Petri con agua de mar a 16°C, y con una pipeta Pasteur se pusieron en una serie de tubos de ensaye de 13 X 100 mm. Los tubos fueron centrifugados suavemente para compactar los ovocitos. Estos fueron mantenidos a 15-17°C. Posteriormente se tomaron los 20 ovocitos de cada tubo en cantidades de agua de mar de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 150  $\mu$ l con una pipeta Eppendorf y se pusieron en portaobjetos. Estos fueron montados en el microscopio, y con una pipeta Eppendorf se le adicionó 5  $\mu$ l del extracto con lisina agitando ligeramente para esparcirlo uniformemente en todo el volumen de agua de mar. Se observó

al microscopio el efecto que tenía la lisina sobre las capas vitelinas y se contabilizó el tiempo.

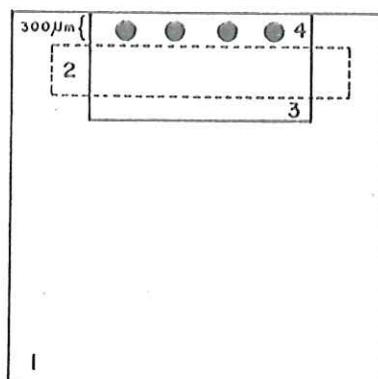
#### 12. - MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se utilizó el método de Gould-Somero y Holland (1975). Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 3%, 0.6 M de NaCl y  $K_2Cr_2O_7$  al 1% pH 7.4, y se posfijaron en  $OsO_4$  al 1%, 0.8 M NaCl,  $K_2Cr_2O_7$  al 1% pH 7.4. Después de la deshidratación fueron embebidos en resina Spurr. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio Phillips 300, en la Universidad de California en San Diego.

#### 13. - FOTOGRAFIA.

Se tomaron con una cámara de 35 mm OLYMPUS OM-1 con adaptador para el objetivo del microscopio American Optical. La película que se utilizó fué TEKPAN 100 (b/n) ó EKTACHROME 100 (color). Se midieron los diámetros de los ovocitos (sin incluir las capas vitelinas) con una reglilla ocular. Las mediciones fueron: *A. undosa*, 180  $\mu m$ ; *H. rufescens*, 180  $\mu m$ ; y *N. norrisi*, 150  $\mu m$ . Las impresiones en papel fueron en diferentes aumentos para tener una mejor imagen de los ovocitos.

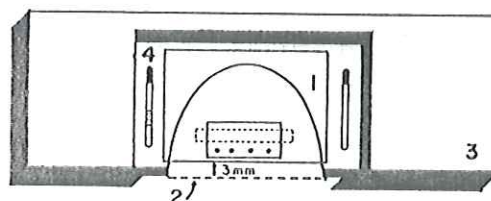
## ELABORACION DEL RESERVORIO PARA LA CAMARA DE MICROINYECCION



- 1) CUBREOBJETOS
- 2) 3 TIRAS DE CINTA ADHESIVA
- 3) TROZO DE CUBREOBJETO
- 4) OVOCITOS DENTRO DEL RESERVORIO

FIG. 1

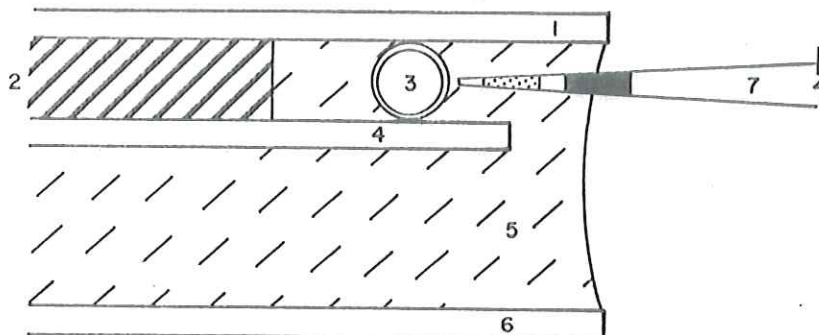
## CAMARA COMPLETA PARA MICROINYECCION



- 1) RESERVORIO PARA MICROINYECCION (FIG.1)
- 2) CUBREOBJETO INFERIOR
- 3) PORTAOBJETO DE PLEXIGLASS
- 4) CAPILARES MONTADOS ENCIMA DEL PORTAOBJETO PARA CARGAR MICROAGUJAS Y MICROPIPETAS

FIG. 2

## VISTA LATERAL DE LA CAMARA DE MICROINYECCION



- |                              |                          |
|------------------------------|--------------------------|
| 1) CUBREOBJETOS SUPERIOR     | 5) AGUA DE MAR           |
| 2) 3 TIRAS DE CINTA ADHESIVA | 6) CUBREOBJETOS INFERIOR |
| 3) OVOCITO                   | 7) MICROPIPETA           |
| 4) TROZO DE CUBREOBJETOS     |                          |

FIG. 3

m: MICROAGUJA CARGADA CON ADN  
PARA MICROINYECCION



mp: MICROPIPETA CARGADA CON LISINA



- |  |                                |
|--|--------------------------------|
|  | ACEITE                         |
|  | ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN) |
|  | MERCURIO                       |
|  | EXTRACTO CON LISINA            |

FIG. 4

## RESULTADOS

### 1.- MICROINYECCION.

Al tratar de microinyectar cualquier ovocito de las tres especies seleccionadas: *H. rufescens*, *A. undosa* y *N. norrisi* se observó que la capa vitelina presentó resistencia (fig 5). Cuando se hizo suficiente presión para atravesar la capa, la microaguja entró con demasiada fuerza, reventando al ovocito. Por esta razón se decidió probar la aplicación a nivel local del extracto con lisina acrosomal de espermatozoides, con el fin de hacer un orificio en la capa vitelina a través del cual se podía introducir la aguja para microinyectarlos. Fue preferible hacer un orificio en lugar de disolver toda la capa, ya que los ovocitos desnudos son muy frágiles.

En *H. rufescens* y *N. norrisi*, la aplicación local de sus respectivos extractos con lisinas hizo un orificio en sus capas vitelinas (fig. 6). En *A. undosa* la lisina solamente hizo muy laxa la capa vitelina sin hacer un orificio (fig. 7). En las tres especies, la aplicación local del extracto con lisina facilitó la introducción de la microaguja pudiendose inyectar al ovocito sin deformarlo o dañarlo. (fig. 8 y 9).

La tabla 1 muestra las concentraciones y cantidades de extractos con lisina aplicadas localmente en las tres especies. En *A. undosa* la cantidad mínima de lisina necesaria para facilitar la penetración de la microaguja

varió entre 442 (prep. 2 , tabla 1) y más de 2,000 pg (prep. 4 y 5, tabla 1). Esta variación se debió tal vez a una diferencia entre lotes de ovocitos y/o quizás a diferencias en la preparación de los extractos con lisina. Esto se puede reafirmar al comparar los ensayos realizados con la prep. (4) que tenía 23.6 pg/pl de proteína donde se probó un lote de ovocitos y 802 pg fué suficiente para reblandecer la capa vitelina y en otro lote de ovocitos diferente pero con el mismo extracto de lisina fué necesario aplicar 2,667 pg, tres veces más. En cuanto a la cantidad "máxima" se microinyectaron hasta 3,757 pg y la capa vitelina no se disolvió, solo se reblandeció lo cual significa que para esta especie no importa la cantidad del extracto con lisina que se aplique, los ovocitos no quedarán desnudos y no habrá problema con su manipuleo. No se investigó sistemáticamente que tanto de esta variación podría ser atribuida a diferencias en lotes de ovocitos y que tanto a diferencias en preparaciones de lisina aplicada, pero siempre fué posible reblandecer la capa vitelina suficientemente para la penetración de la microaguja.

En los ensayos de *N. norrisi* se observó que la lisina era muy potente, por la rapidez (segundos) con que se hacía un orificio en las capa vitelinas, y por las bajas cantidades de proteína microinyectadas suficientes para hacer un orificio: 104 a 345 pg aproximadamente. Con esto se facilitaba tanto la microinyección como el manipuleo; a

mayores cantidades los ovocitos quedaban desnudos en pocos segundos. No fué necesario repetir estos ensayos por más ocasiones debido a la rapidez con la que esta lisina trabaja ya que estos resultados están respaldados con los ensayos en suspensión (ver gráfica 1).

Con *H. rufescens* había más variación entre diferentes preparaciones de extractos con lisina. La prep. (6) fué muy potente he hizo un orificio con solamente 49 pg, mientras que con la preparación (8), 813 pg fue la cantidad mínima necesaria (tabla 1). En una tercera preparación (7) aun 1,107 pg no siempre hizo un orificio (tabla 1). Sin embargo fue posible hacer un orificio en la capa vitelina de *H. rufescens* cuando se seleccionó un lote bueno de lisina y se aplicó la cantidad necesaria. En ensayos anteriores de extractos con lisina donde no se conoció la cantidad de proteína ni se contabilizó la cantidad microinyectada del extracto fué posible hacer un orificio en las capas vitelinas en un 100% de 138 ovocitos probados. De la prep. (6) se obtuvo lisina de muy buena calidad, ya que pequeñas cantidades lograron hacer un orificio, cuando se obtiene esto, es muy importante cuidar las cantidades microinyectadas ya que a grandes volúmenes (1,311 pg) se disuelven completamente las capas vitelinas dejando a los ovocitos desnudos y con ello se dificulta su manipuleo. Es importante conocer el rango donde la lisina trabaja de manera favorable y esto va a depender de la calidad de cada

lote del extracto con lisina.

## 2.- MICROINYECCION CRUZADA.

Se investigó la especificidad de los extractos con lisinas de las tres especies antes citadas por aplicación local. Los datos se encuentran en las tablas 2, 3 y 4. Se ve que en ningún caso había un efecto de la lisina de una especie sobre la capa vitelina de otra especie, aunque los extractos con lisina que se usaron para dicha cruzada fueron las que más altas concentraciones de proteína tenían, y que trabajaron muy bien sobre las capas vitelinas de sus ovocitos homólogos (ver tabla 1).

## 3.- SUSPENSION.

También se probó el efecto de los extractos con lisina en suspensión sobre la capa vitelina entera en las diferentes especies. Las muestras contenían desde 10 hasta 150 ul de agua de mar con 5 ul del extracto con lisina y 20 ovocitos.

Para cuantificar el efecto de la lisina sobre las capas vitelinas, se adoptó el siguiente sistema de calificaciones. Cuando la capa quedó intacta (fig. 10) se asignó un valor de cero. Cuando empezó a deshacerse quedando corrugada (fig. 11), se asignó un valor de 1. Un valor de 2 fue asignado a una capa laxa e hinchada (fig. 12), y un valor de 3 a una capa casi disuelta, quedando solamente vestigios (fig. 13).

Ovocitos completamente desnudos (fig. 14) recibieron una calificación de 4. Para cada prueba, la calificación final era la suma de las calificaciones de cada ovocito entre el número de ovocitos.

La gráfica 1 muestra los resultados en *N. norrisi*. En dos experimentos con concentraciones finales de proteína de 14.3 y 24.7 mg/ml el 100% de las capas vitelinas fueron completamente disueltas (calificación 4). La eficiencia con la que trabaja esta lisina es sorprendente, ya que el efecto de esta sobre las capas vitelinas era inmediato empezando a hacerlas laxas y en un promedio de 5 minutos todos los ovocitos quedaban desnudos.

En cambio, la lisina de *A. undosa* no disolvió completamente las capas vitelinas, confirmando el resultado obtenido por aplicación local. Los resultados de seis experimentos son presentados en la gráfica 2. El grado de disolución de las capas fue más o menos constante con todas las concentraciones de lisina probadas con la excepción de un solo experimento en que había menos lisis con más extracto. La razón se desconoce; quizás había un contaminante en esta preparación que a más altas concentraciones interfirió con la acción de las lisinas. La incubación de los ovocitos con estos extractos fué de 10 minutos con las prep. (1-4) donde la gran mayoría de los ovocitos solo presentaron capas vitelinas laxas. Se amplió el margen de incubación para ver si era necesario que con

más tiempo la lisina trabajaba mejor y se incubaron ovocitos por una hora con las preparaciones 4 y 5 (+,o) pero los resultados fueron similares, los ovocitos quedaron con sus capas vitelinas laxas. Cabe señalar que aunque no se disolvieron completamente las capas vitelinas con la lisina quedaron tan delgadas y laxas que fué posible removerlas con agitación y lavado.

Los resultados de *H. rufescens* se muestran en la gráfica 3. La lisina trabajó muy bien y con mucha rapidez ya que en un promedio de tres minutos los ovocitos quedaban desnudos, pero entre más diluida se encontraba más retardado era el efecto (hasta 7 min. ). En la prep. 6 no se obtuvo la calificación de 4, ya que algunos de los ovocitos presentaban vestigios de sus capas vitelinas aunque con un poco más de tiempo de incubación se hubiesen tenido todos los ovocitos desnudos. En general, en casi todos los ovocitos de los tres experimentos las capas vitelinas se disolvieron.

#### 4.- SUSPENSION CRUZADA.

Los ovocitos se mantuvieron incubados en los extractos con lisina por un período de una hora. Los extractos de *A. undosa* y *H. rufescens* fueron los de más alta concentración (prep. 5 y 8, Tabla 1), mientras que el extracto de *N. norrisi* estaba tres veces más concentrado que la anteriormente utilizada. Pasado ese tiempo no se observó

efecto alguno sobre las capas vitelinas permaneciendo estas intactas dándosele una calificación de cero.

#### 5.- GELES.

Los extractos caracterizados en geles de poliacrilamida con SDS mostraron que en el corrimiento para *A. undosa* presenta dos bandas principales de aproximadamente 16,800 y 40,700 d cada una, mientras que *N. norrisi* presenta tres bandas principales de aproximadamente 15,100, 17,200 y 18,800 d cada una. No se sabe cuales de estas bandas contienen la lisina a diferencia de *H. rufescens* cuya banda es de 14.800 d y que ya fué identificada como la lisina (Lewis et al,1982; 13,000 d en su estudio), (fig. 15).

#### 6.- MICROSCOPIA ELECTRONICA Y DE CONTRASTE DE FASES.

Se determinó la ultraestructura de los espermatozoides de *A. undosa* y *N. norrisi* observándose en cada uno de ellos estructuras similares a las que fueron reportadas en espermatozoides de *H. rufescens* (Figs. 16-18). Por medio de fotografías de espermatozoides intactos visualizados por microscopia de contraste de fases se establecieron las siguientes mediciones. En *A. undosa* el núcleo mide 4.0  $\mu\text{m}$  de longitud por 1.3  $\mu\text{m}$  de ancho, y 2.4 x 1.1  $\mu\text{m}$  su acrosoma, mientras que en *N. norrisi* el núcleo mide 2.9 x 1.3  $\mu\text{m}$  y 4.4 x 1.1  $\mu\text{m}$  su acrosoma. En *H. rufescens* el acrosoma mide 2.5 x 1.1  $\mu\text{m}$  y el núcleo, 4.2 x 1.0  $\mu\text{m}$  (Lewis et al., 1980). El

acrosoma de *N norrisi* sobresale por su gran tamaño. Además en un corte aparecieron en el gránulo acrosomal dos regiones de diferentes densidades sugiriendo la posibilidad de una regionalización de su contenido. Sería necesario examinar más cortes para confirmar esta observación.

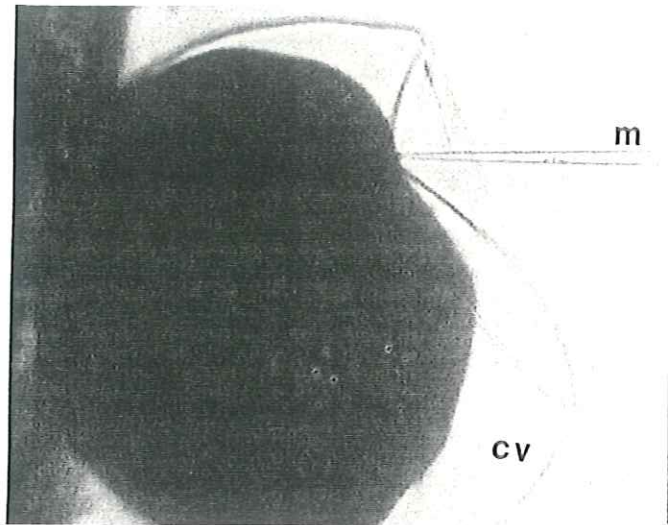


Figura 5.

Ovocito de Haliotis rufescens con capa vitelina (cv) intacta: la microaguja (m) no penetra.

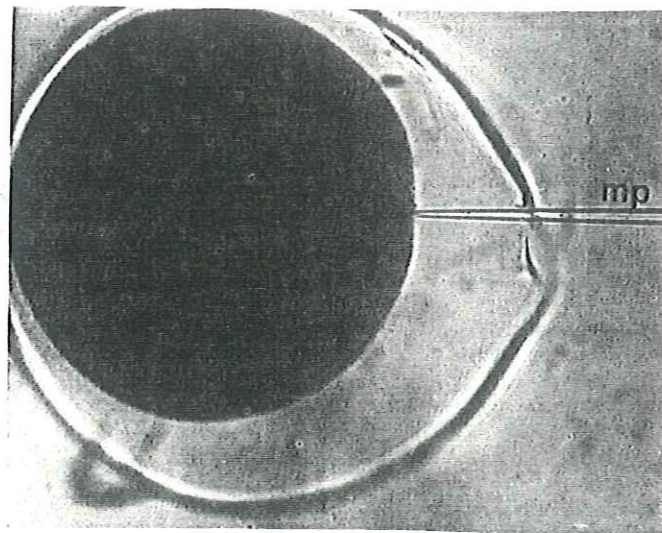


Figura 6.

Orificio en la capa vitelina de un ovocito de Haliotis rufescens hecho con una micropipeta (mp) cargada de extracto con lisina.

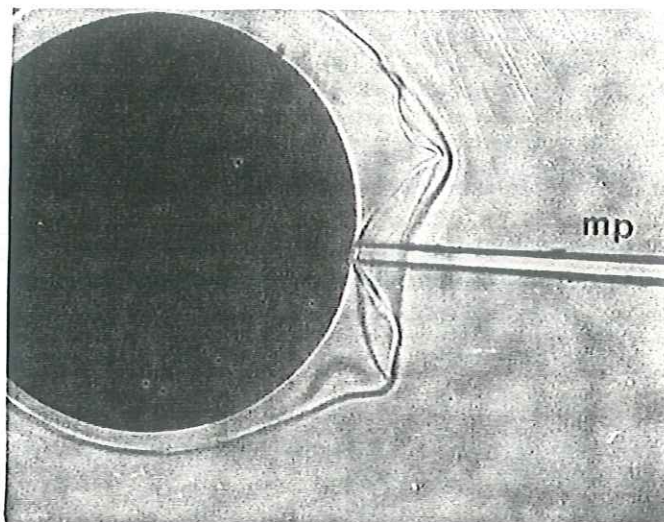


Figura 7.

Area de capa vitelina laxa de Astraea undosa hecho con una micropipeta (mp) cargada de extracto con lisina.

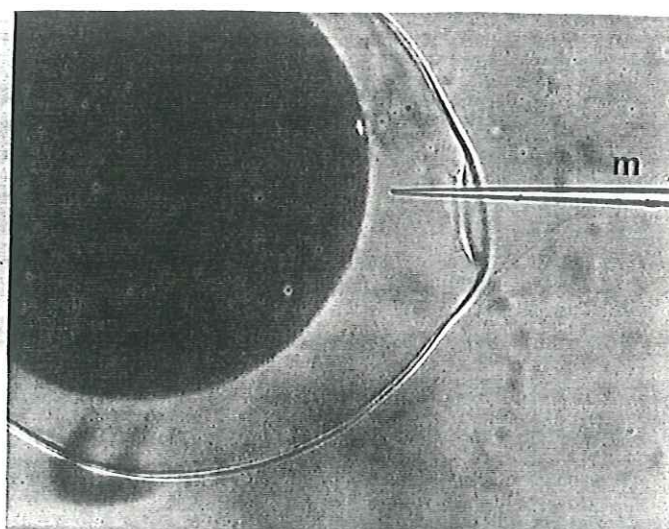


Figura 8.

Penetración de una microaguja (m) a través del orificio hecho con lisina en la capa vitelina de un ovocito de Haliotis rufescens.

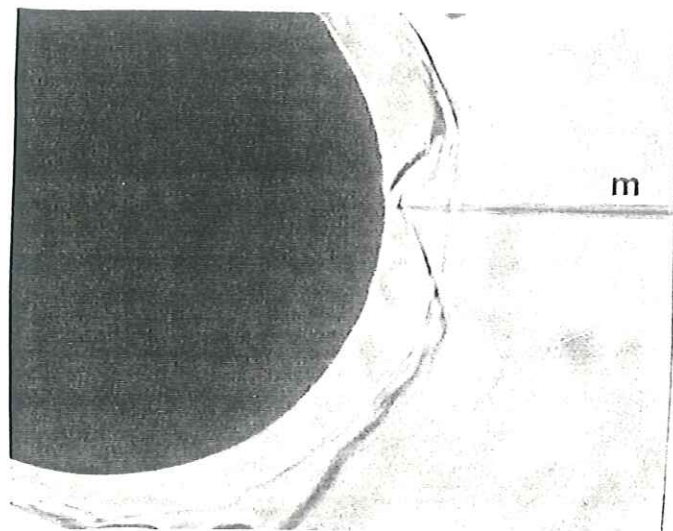


Figura 9.

Penetración de una microaguja (m) por el área laxa hecho con lisina en la capa vitelina de un ovocito de Astraea undosa.

Volumen	Astraea undosa						Haliotis rufescens			Norrissia norrisi	
	No	No	No	No	No (2)	No (2)	No	No (2)	No	No	Si
4.2 pl	76	55	53	99	99	140	Si 49	41	53	60	Si 104
14 pl	No 252	No 182	No (2) 176	No 330	No (2) 330	No (2) 446	Si 162	No (5) Si 137	No 175	Si 201	Si 345
34 pl	No (2) 612	Si 442	No 428	Si 802	No (2) 802	No (2) 1132	Si 394	No (2) Si 333	No 425	Si 487	Si 838
65 pl	Si (2) 1170	Si 845	Si (2) 813	Si 1534	No (2) 1534	Si (2) 2166			Si 813	Si 932	Si 1603
113 pl	Si 2034	Si 1469	Si 1413	Si 2667	Si (2) 2667	Si (2) 3757	Si (2) 1311	No Si 1107	Si (2) 1413	Si 1619	Si 2787
Prep.	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10
Conc. mg/ml	18	13	12.6	23.6	23.6	33.3	11.6	9.8	12.5	14.3	24.7

Tabla 1.

Resultados de la aplicación local de extractos con lisina sobre las capas vitelinas de las tres especies de moluscos. Los volúmenes aplicados en picolitros (pl), su concentración en mg/ml, y la cantidad calculada con estos valores de proteína en picogramos (pg), aplicada a cada experimento.

En los experimentos indicados con "si" la cantidad aplicada fue suficiente para hacer un orificio en la capa vitelina (*H. rufescens*, *N. norrisi*) o reblandecerla (*A. undosa*). En los paréntesis se indica el número de ovocitos probados, siendo uno en el caso de no ser indicado. En el renglón "prep", son los números de las diferentes preparaciones de lisina.

Extracto con lisina de <i>Astraea undosa</i> 33.3 mg/ml de proteína.		
Picolitros	O V O C I T O S	
4.2	No	No
14	No	No
34	No	No
65	No	No
113	No	No
	<i>N. norrisi</i>	<i>H. rufescens</i>

Tabla.2.

Extracto con lisina de <i>Haliotis rufescens</i> 12.5 mg/ml de proteína		
Picolitros	O V O C I T O S	
4.2	No	No
14	No	No
34	No	No
65	No	No
113	No	No
	<i>A. undosa</i>	<i>N. norrisi</i>

Tabla.3.

Extracto con lisina de <i>Norrisia norrisi</i> 61.5 mg/ml de proteína		
Picolitros	O V O C I T O S	
4.2	No	No
14	No	No
34	No	No
65	No	No
113	No	No
	<i>A. undosa</i>	<i>H. rufescens</i>

Tabla.4.

Resultados de la aplicación local de lisina cruzada a las capas vitelinas de las tres especies de moluscos, las cantidades aplicadas son las de más alta concentración y que trabajaron muy bien con sus ovocitos homólogos (se utilizó un ovocito para cada prueba).

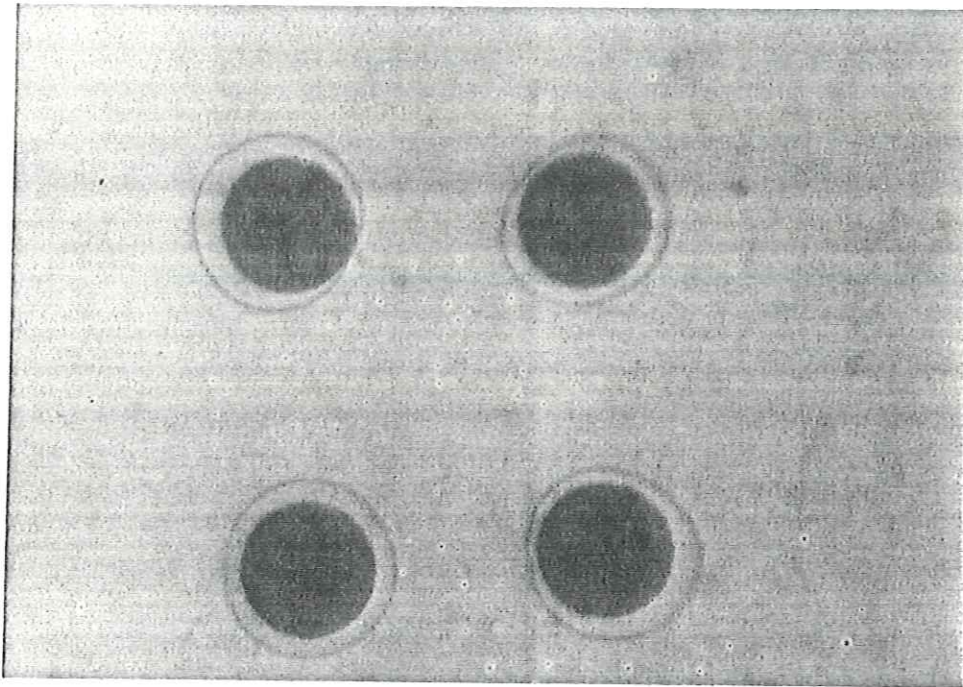


Fig. 10 .

Capa vitelina intacta (Norrisia norrisi).

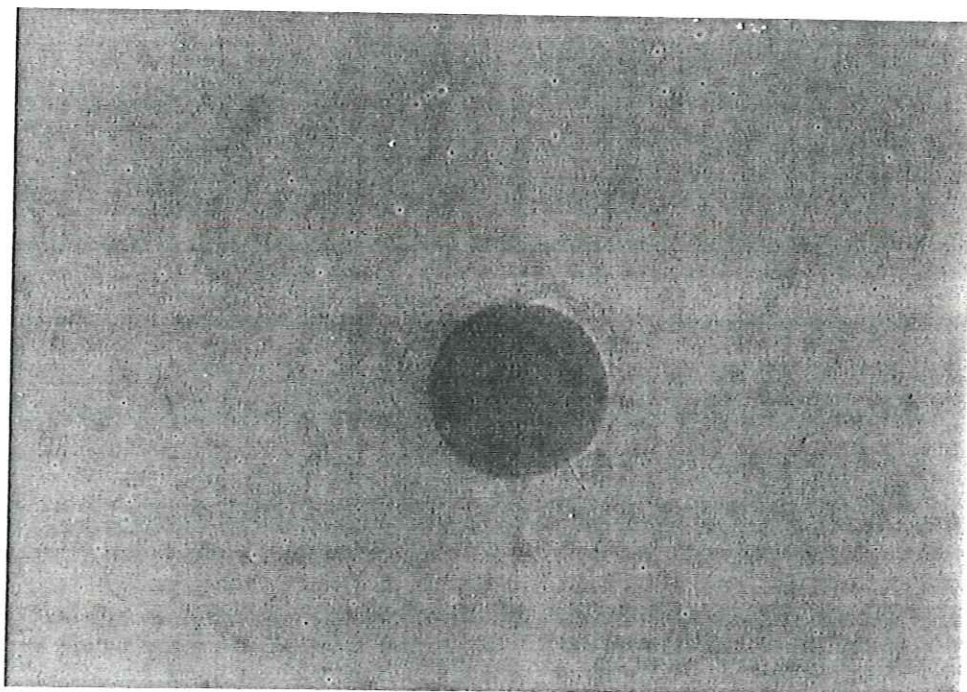


Fig. 11

Capa vitelina corrugada (Astraea undosa).

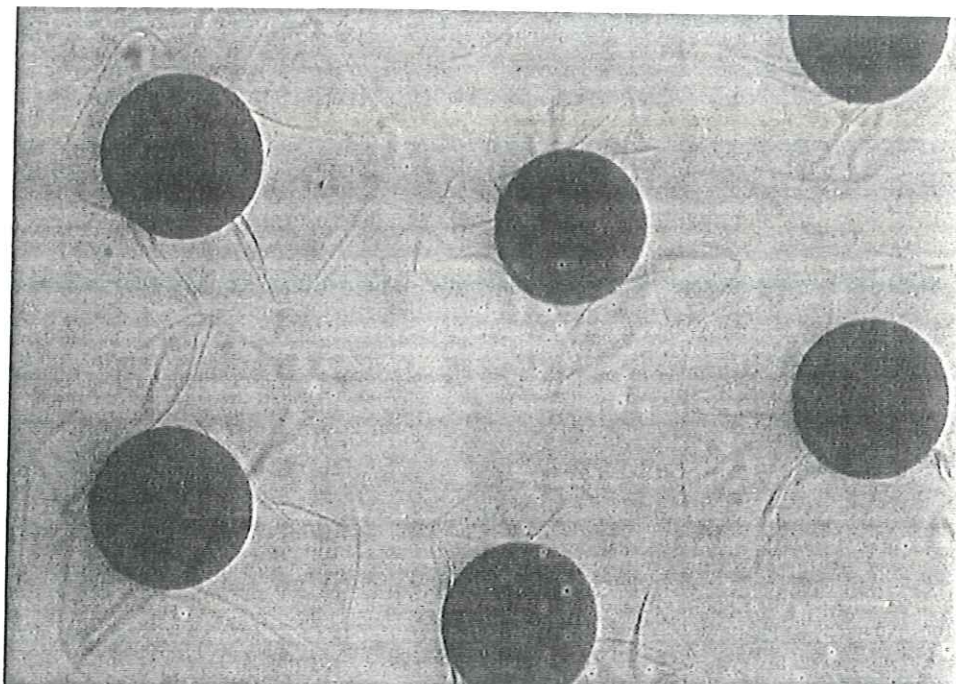


Fig. 12

Capa vitelina laxa e hinchada (N. norrisi).

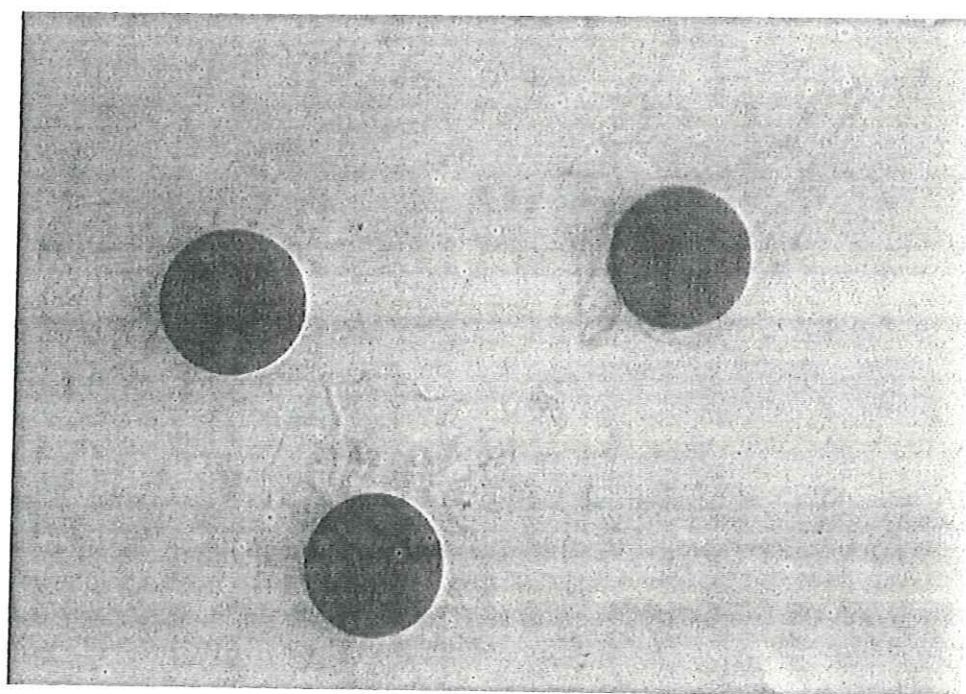


Fig. 13

Capa vitelina casi disuelta (N. norrisi).

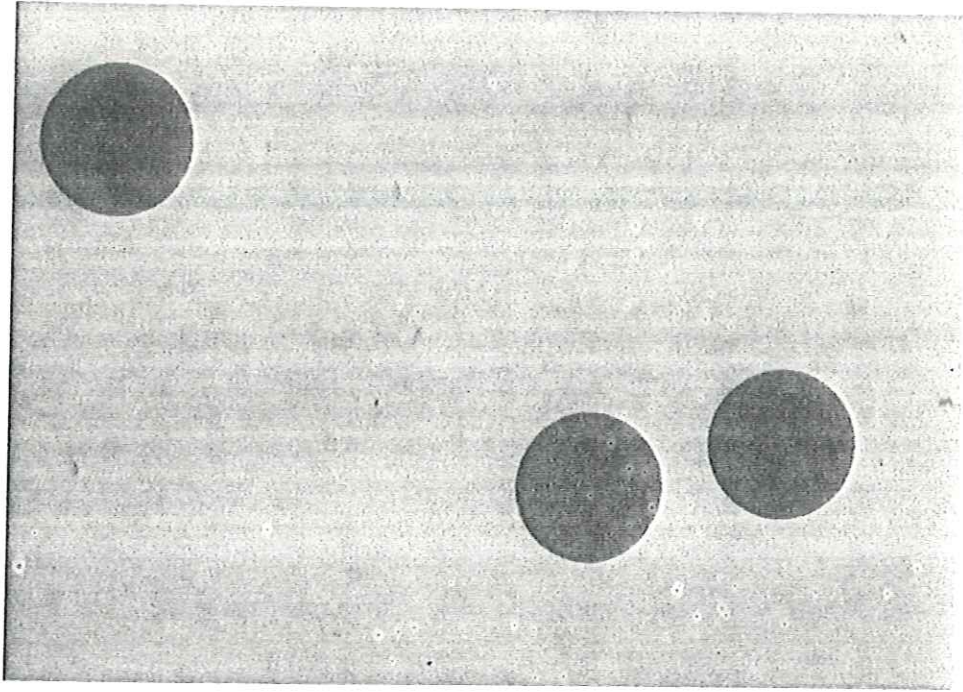
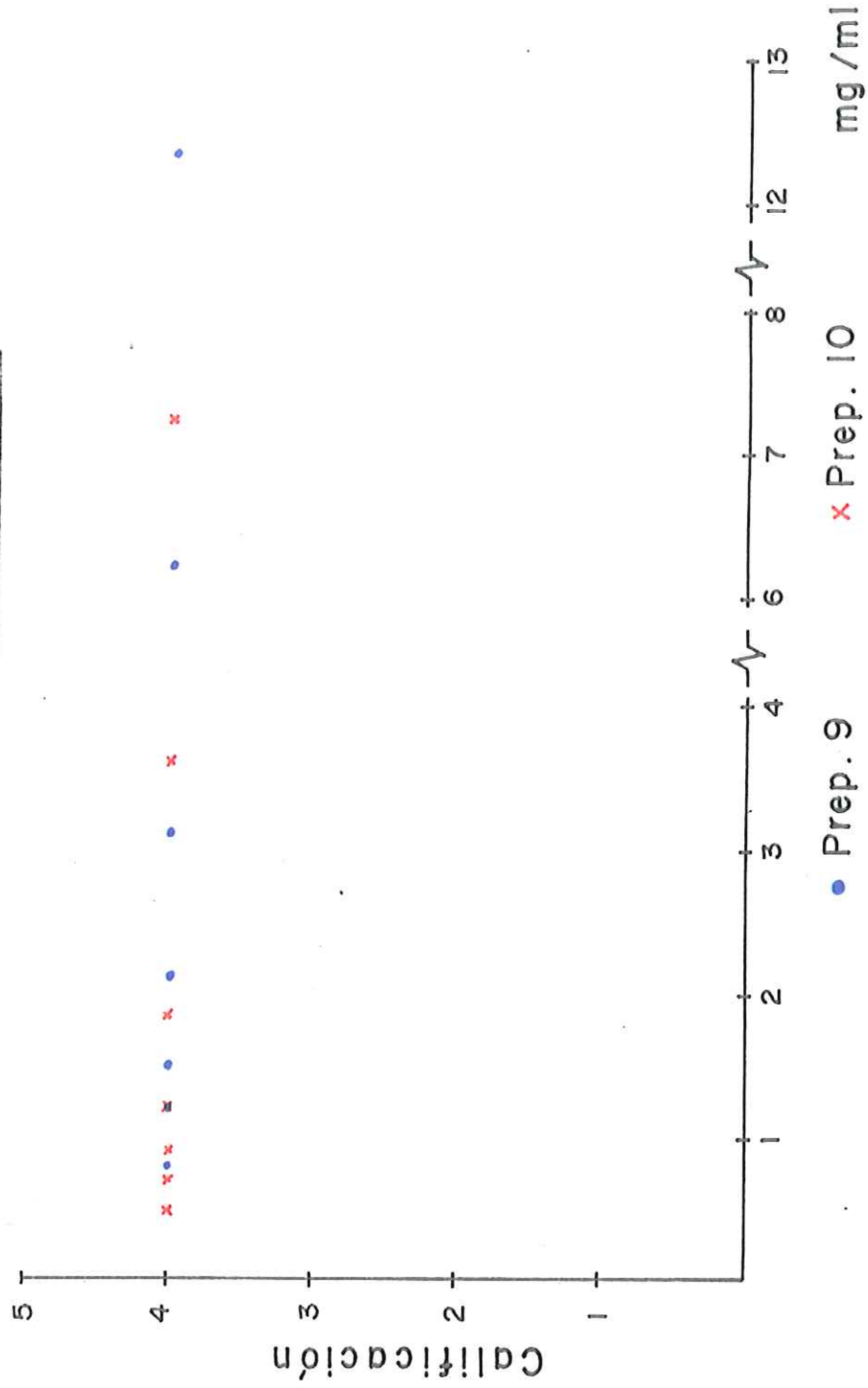


Fig. 14

Ovocito desnudo (N. norrisi).

Ensayos en Suspensión

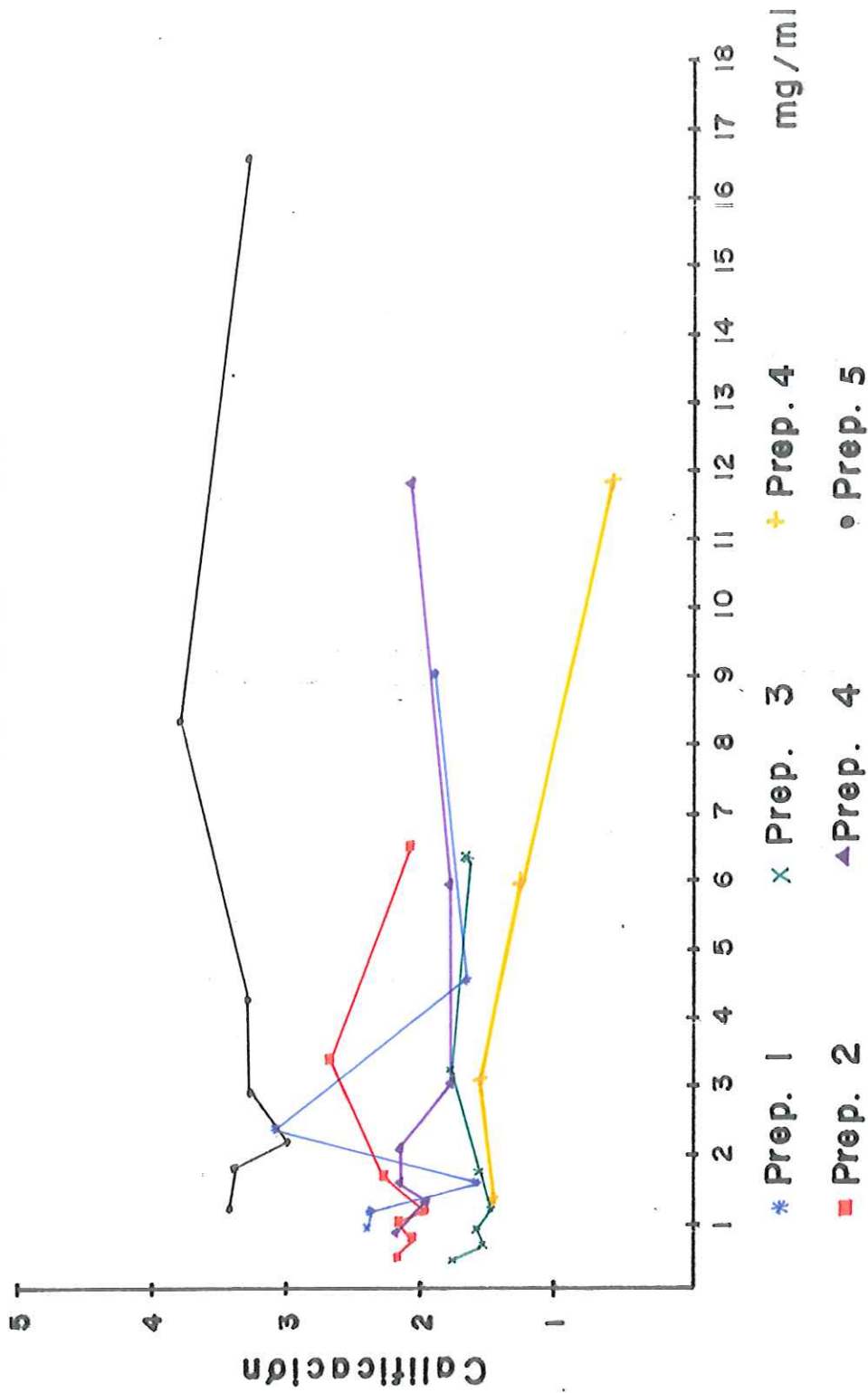
Ovocitos de Norrissia norrisi



Gráfica 1. Efecto de la Lisina de N. norrisi

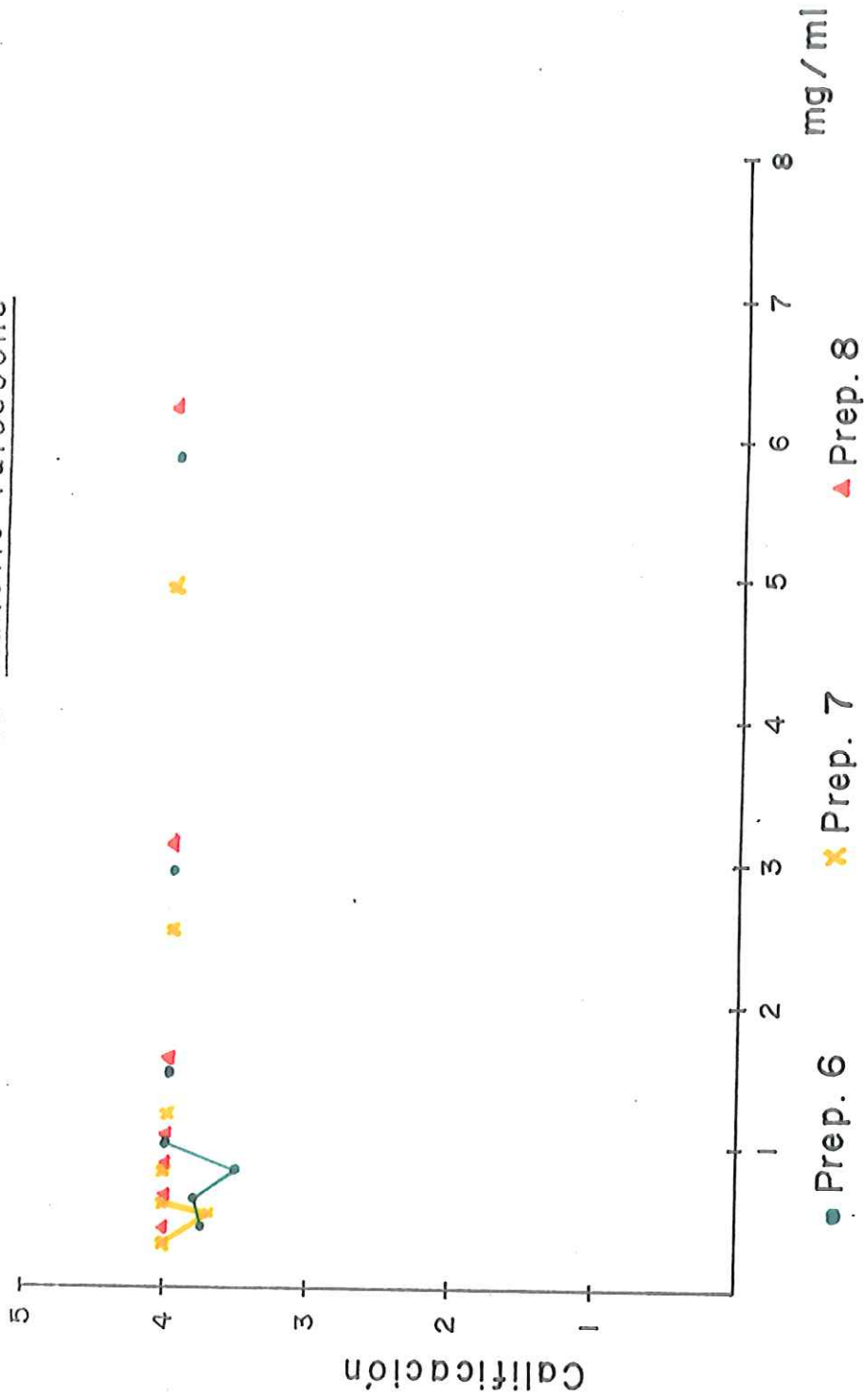
Ensayo en Suspensión

Ovocitos de Astraea undosa



Gráfica 2. Efecto de la Lisina de A. undosa

Ovocitos de Haliotis rufescens



Gráfica 3. Efecto de la Lisina de H. rufescens

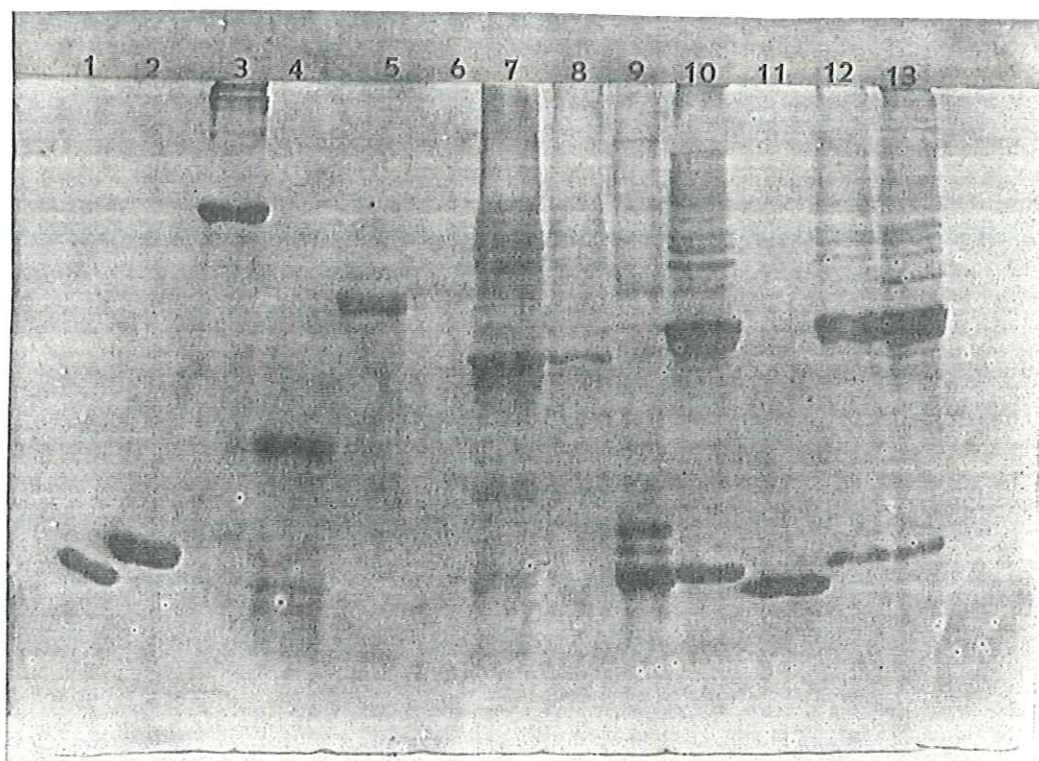


Fig. 15

Proteínas presentes en los extractos con lisina visualizados por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato de sodio). Los estándares y sus masas moleculares son: (1) Lisozima 14,300 d, (2)  $\beta$ -Lactoglobulina 18,400 d, (3) Albúmina bovina 66,000 d, (4) Tripsinógeno 24,000 d, (5) Albúmina de huevo 45,000 d, (7-8) Stenoplax conspicua, (9) N. norrisi, (10, 12-13) A. undosa, (11) H. rufescens.

Fig. 16.- Ultraestructura del espermatozoide de *Haliotis rufescens* (Lewis et al., 1980). Vesícula acrosomal (VA),  $2.5 \times 1.1 \mu\text{m}$ ; núcleo (N)  $4.2 \times 1.0 \mu\text{m}$ . Dos substancias diferentes componen el gránulo acrosomal (1) de forma esférica y de material más electrodensó en la parte anterior del gránulo y (2) de material homogéneo menos denso en la parte posterior del gránulo. Mitocondrias (M), flagelo (F), fosa acrosomal (AF), fosa nuclear (NF), lagunas (L), soportes (A), y vesículas (V).

Fig. 17.- Corte longitudinal de un espermatozoide de *Astraea undosa*. Regiones marcadas como en la figura 16. Aumento 23,000 X.

Fig. 18.- Corte longitudinal de un espermatozoide de *Norrisia norrisi*. Regiones marcadas como en la figura 16. Aumento 16,400 X.

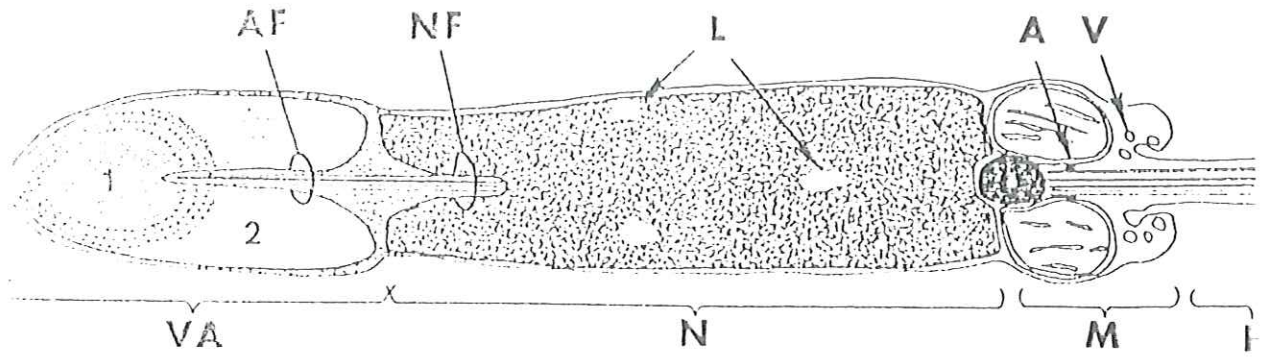


Fig. 16

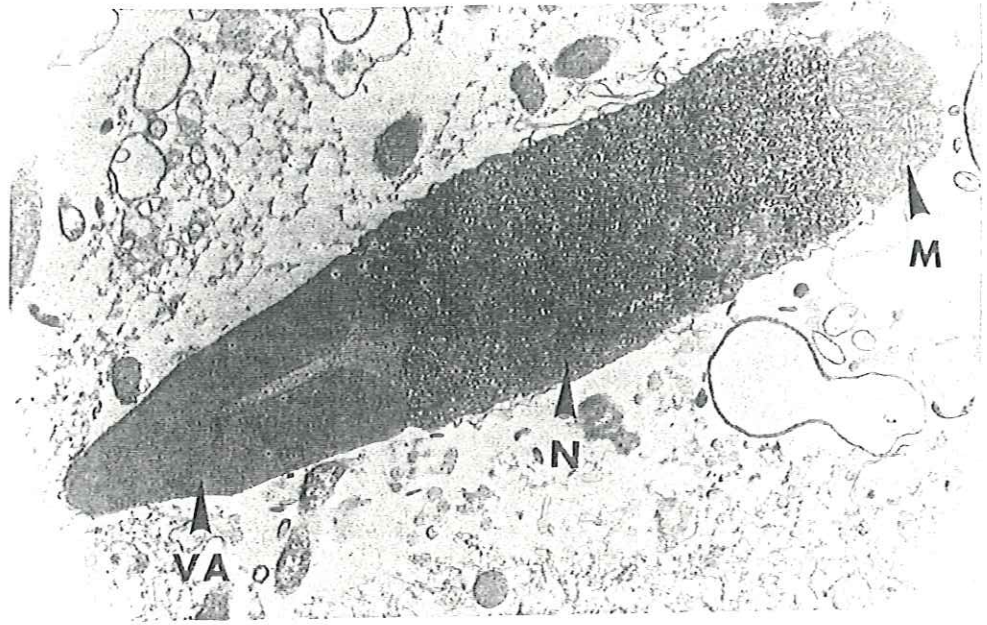


Fig. 17

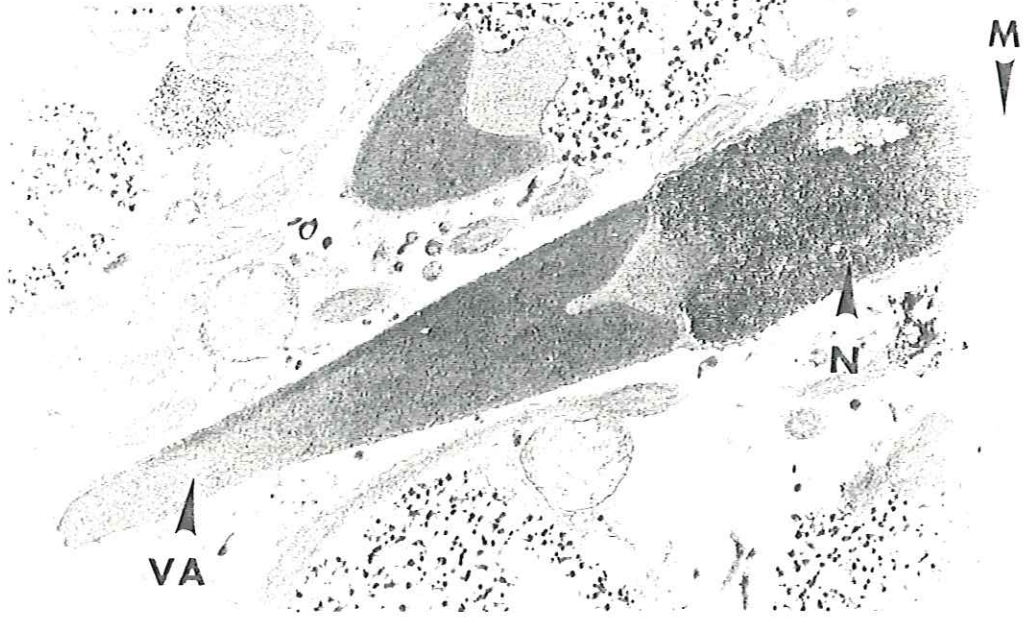


Fig. 18

## DISCUSION

En las tres especies probadas fué posible obtener un extracto de los acrosomas de los espermatozoides capaz de solubilizar la capa vitelina del ovocito. En el caso de *H. rufescens* y *N. norrisi*, las capas vitelinas se disolvieron completamente cuando los ovocitos fueron incubados en suspensión con el extracto de lisina de su propia especie, mientras que en *A. undosa* la capa vitelina se reblandeció pero nunca disolvió completamente, aun con concentraciones muy altas del extracto. Lo mismo ocurrió cuando las lisinas fueron aplicadas localmente: en *H. rufescens* y *N. norrisi* se hizo un orificio en la capa vitelina, mientras que en *A. undosa* se hizo un reblandecimiento local sin orificio, pero en los tres casos se facilitó la microinyección sin reventar los ovocitos. Con estos datos se agrega a la lista de moluscos con lisinas acrosomales (ver antecedentes) dos especies más, *A. undosa* y *N. norrisi*.

En el presente estudio, siempre fue posible encontrar una concentración del extracto para facilitar la microinyección o remover completamente la capa vitelina como en *H. rufescens* y *N. norrisi* en ovocitos en suspensión o reblandecerla como en el caso de *A. undosa* (aunque una vez que las capas vitelinas estuvieran laxas, con agitación y lavado éstas se desprendían dejando desnudos los ovocitos).

Hubo variación en la calidad de los extractos usados.

Las posibles causas de esta variación tal vez se deben a : el grado de pureza de la lisina, la desnaturalización, y las variaciones en lotes de ovocitos, entre otros. Con respecto a la pureza, cabe señalar que se trabajó con extractos impuros en que la proporción entre lisina y contaminantes podía haber variado de preparación en preparación. De hecho se ve claramente en las preparaciones corridas en geles de poliacrilamida (fig. 15) que hubo múltiples bandas en los extractos de *A. undosa* y *N. norrisi*; todavía no se sabe cuales de estas tienen la actividad lítica. Otro factor que podía contribuir a la variación en fuerza lítica de los extractos es la desnaturalización, por ejemplo hubo variación en el número de veces que las muestras fueron congeladas y descongeladas. También es posible que diferentes lotes de ovocitos variaran en la susceptibilidad de sus capas vitelinas a la lisis. Para controlar mejor la variabilidad es recomendable la purificación de las lisinas y desarrollar un procedimiento para minimizar su desnaturalización. Sin embargo, es importante hacer notar que la variabilidad en potencia de los extractos no fué un obstáculo; era fácil encontrar la concentración necesaria para disolver (o reblandecer en el caso de *A. undosa*) las capas vitelinas.

Aun tomando en cuenta que los extractos no fueron puros y variaban en su potencia, había diferencias consistentes entre las tres especies. Las lisinas de *H. rufescens* y *N.*

*norrisi* disolvieron completamente las capas vitelinas, mientras que en *A. undosa* solo se reblandecieron las capas vitelinas sin disolverlas. Se ha reportado la disolución completa de capas vitelinas con lisinas acrosomales en *H. rufescens* (Lewis et al., 1982), *Mytilus edulis* (Berg, 1950), *Megathura crenulata* (Tyler, 1939), y *Tegula pfeifferi* (Haino-Fikushima, 1974), pero los datos con *N. norrisi* son nuevos. Mientras que en los resultados de *A. undosa* esta se parece a *Turbo cornutus* (Ogawa y Haino, 1984) donde la lisina reblandece las capas vitelinas sin llegar a disolverlas.

Otra diferencia que se notó fué que el extracto de *N. norrisi* era muy potente en comparación con los extractos de las otras dos especies y mostró menos variabilidad. Con solamente 100-350 pg (aproximadamente) de proteína se hicieron orificios rápidamente; a mayores cantidades los ovocitos quedaban desnudos en pocos segundos. En suspensión, el efecto era inmediato empezando a hacer las capas laxas, y disolviéndolas completamente en 5-10 minutos.

Cuando se probó extractos de lisina de una especie con ovocitos de las otras especies no hubo ningún efecto aun a concentraciones más altas que las necesarias para disolver o reblandecer las capas de su especie homóloga. Esto nos dice que las lisinas son diferentes tipos de moléculas en las tres especies. Los resultados de electroforesis en geles de poliacrilamida apoyan esta conclusión porque el patrón de

bandas fué distinto en las preparaciones de las tres especies (fig. 15).

Sería interesante purificar y determinar la estructura de las lisinas de *N. norrisi* y *A. undosa*. En el caso de *N. norrisi*, las bandas más fuertes son de 15,100, 17,200 y 18,800 d; sería necesario purificar cada proteína y determinar cuales son necesarias para la actividad lítica. En *A. undosa*, las bandas principales serían las proteínas de 16,800 y 40,700 d. En *H. discus* hay dos componentes acrosomales (de 15,000 y 20,000 d); el de 15,000 fué localizado en la región posterior de la vesícula acrosomal (Haino-Fukushima y Usui, 1985), además se encontró que ninguno de los dos trabaja de manera aislada, sino de forma combinada (Usui y Haino-Fukushima, 1991). En este trabajo había una sola proteína de 14,800 d en el extracto de *H. rufescens* y fué capaz de disolver capas vitelinas en ovocitos intactos. En el estudio de Lewis *et al.*, (1982) al inducir la reacción acrosomal por un método diferente (0.3M  $\text{CaCl}_2$ ) encontraron dos componentes de 15,000 y 13,000 d. El componente de 13,000 d disolvió capas vitelinas aisladas, pero no probaron con ovocitos intactos ni con el compuesto de 15,000 d. Para resolver estas discrepancias entre los dos estudios sería interesante utilizar los dos métodos de inducción a la reacción acrosomal (alto calcio y congelamiento), y comparar las preparaciones en geles de poliacrilamida y con ovocitos intactos.

La disponibilidad de un método sencillo para disolver local o completamente las capas vitelinas en abulón y otras especies abre muchas posibilidades para investigaciones básicas y aplicadas. Con microinyección se pueden introducir genes, anticuerpos, agentes que modifican las concentraciones intracelulares de  $Ca^{++}$  ó  $H^+$ . Alternativamente se puede tratar de introducir tales sustancias por medio de liposomas (ejem. Felgner y Ringold, 1989) con ovocitos desnudos. En abulón la lisina fué utilizada para remover las capas vitelinas con espermatozoides supernumerarios pegados, facilitando un estudio de polispermia (Stephano, 1991). También se ha observado que los ovocitos desnudos facilmente pueden fusionarse formando embriones gigantes, ofreciendo otro método para manipular los componentes intracelulares. El uso de las lisinas también facilita la formación de híbridos entre especies, permitiendo el acceso a la membrana plasmática de espermatozoides heterólogos cuyas lisinas no pueden disolver las capas.

En suma, las lisinas representan una herramienta poderosa para tratar de mejorar las características de especies de importancia económica EN donde se facilitara su cultivo, así como su estudio sobre fecundación y desarrollo donde surgirían nuevas ideas para sus aplicaciones.

## CONCLUSIONES

1.- Al aplicar los extractos con lisina se facilitó la microinyección en los ovocitos sin reventarlos en *H. rufescens*, *N. norrisi* y *A. undosa*, haciendo un orificio en la capa vitelina de los dos primeros y solo reblandeciéndola en *A. undosa*.

2.- Al aplicar los extractos con lisina se obtuvieron ovocitos desnudos de *N. norrisi* y *H. rufescens* y el reblandecimiento de la capa vitelina que con agitación y lavado se desprendían dejándolos desnudos en *A. undosa*.

3.- Al aplicar los extractos con lisina se comprobó que hay una fuerte especificidad en estas especies al realizar las pruebas cruzadas de microinyección y suspensión.

4.- Al correr el gel de poliacrilamida con SDS se obtuvieron 2 bandas de 16,800 y 40,700 d en *A. undosa* y tres en *N. norrisi* de 15,100, 17,200 y 18,800 d, pero no se sabe cual de estos contienen la lisina. En *H. rufescens* había una sola banda de 14,500 d.

5.- Los espermatozoides de *N. norrisi* el núcleo miden aproximadamente  $2.9 \times 1.3 \mu\text{m}$  y su acrosoma  $4.4 \times 1.1 \mu\text{m}$  y este representa el 62% de la longitud total de la cabeza, mientras que el núcleo de los espermatozoides de *A. undosa*

mide  $4.0 \times 1.3 \mu\text{m}$  y su acrosoma  $2.4 \times 1.1 \mu\text{m}$  siendo este un 39% de su longitud total de la cabeza.

## BIBLIOGRAFIA

- Austin C. R. (1968). "Ultrastructure of Fertilization". Holt, New York.
- Berg W. E. (1950). Lytic Effects of Sperm Extracts on the Eggs of *Mytilus edulis*. Biological Bulletin 98:128-138.
- Dan J. C. (1967). Acrosome Reaction and Lysins. Fertilization C.B. Metz and A. Monroy, (eds.) Academic Press, N.Y. Vol.1:237-293.
- Felgner J. L. y Ringold G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. Nature 337:387-388.
- Gould-Somero M. y Holland L. (1975). Oocyte Differentiation in *Urechis caupo* (Echiura): A Fine Structural Study. J. Morph. 147:475-505.
- Haino K (1971) Studies on the Egg-Membrane Lysin of *Tegula pfeifferi*: Purification and Properties of the Egg-Membrane Lysin. Biochim. Biophys. Acta 229: 459-470.

- Haino-Fukushima K. (1974). Studies on the Egg-Membrane Lysin of *Tegula pfeifferi* : The Reaction Mechanism of the Egg-Membrane Lysin. *Biochim. Biophys. Acta* 352:179-191.
- Haino-Fukushima K. y Usui N. (1985). Purification and Immunocytochemical Localization of the Vitelline Coat Lysin of Abalone Spermatozoa. *Dev. Biol.* 115:27-34.
- Hoshi M. (1985). Lysins. *Biol. of Fertilization*. C. Metz y A. Monroy (eds.) Academic Press, N.Y. 2:431-462.
- Kiehart D.P. (1982). Microinjection of Echinoderm Eggs: Apparatus and Procedures. *Methods in Cell Biology* 25:13-31.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680-685.
- Lewis C. A., Leighton D. L. y Vacquier V. D. (1980) Morphology of Abalone Spermatozoa Before and After the Acrosome Reaction. *J. Ultrastruc. Res.* 72:39-36.

- Lewis C. A., Talbot G. F. y Vacquier V. D. (1982). A Protein from Abalone Sperm Dissolves the Egg Vitelline Layer by a Nonenzymatic Mechanism. *Dev. Biol.* 92:227-239.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Morse D. E., Hooker N. y Morse A. (1978). *World Mariculture Soc. Proc.* 9:543-547.
- Ogawa A. y Haino-Fukushima K. (1984). Isolation and Purification of Vitelline-Coat Lysin from Testis of *Turbo cornutus* (Mollusca). *Develop. Growth and Differ.* 26 (4): 345-360.
- Stephano J. L. (1991). A Study of Polyspermy in Abalone. In: "Proceedings of the 1st International Symposium on Abalone Fisheries, Biology, and Culture, La Paz, B.C.S., MEXICO" (S.A. Shepherd, M.J. Tegner, and S. Guzmán-del Proo, eds.), Blackwell Scientific, en prensa.

- Tyler A. (1939). Extraction of an Egg Membrane-Lysis from Sperm of the Giant Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*). *J Exptl. Zoology* 25:317-323.
- Usui N. y Haino-Fukushima K. (1991). Two mayor Acrosomal Act on Different Parts of the Oocyte Vitelline Coat in the Abalone, *Haliotis discus*. *Molec. Rep. Dev.* 28: 189-198.
- Vacquier V., Carner K. y Stout D. (1990). Species-Specific Sequences of Abalone Lysin, the Sperm Protein that Creates a Hole in the Egg Envelope. *Biochemistry* 87:5792-5796.