Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. Tomo 59, pp. 133-141; 1988

EFECTOS TOXICOS DE MERCURIO II EN GAMETOS, FECUNDACION Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN ERIZO NEGRO *TETRAPYGUS NIGER* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)

Toxic effects of mercuric mercury (Hg^{2+}) on gametes, fertilization and embrionic development of sea urchin *Tetrapygus niger*. (Echinodermata, Echinoidea)

OSCAR PONCE P., ALICIA MAGAÑA A., SILVIA ENRIQUEZ V. Y LETICIA SANCHEZ-CHIANG.*

RESUMEN

Se describen los efectos tóxicos del mercurio II sobre gametos, fecundación y desarrollo embrionario en la especie *Tetrapygus niger*.

Espermatozoides pierden la motilidad a los 20 min. con mercurio II 0.27 ppm. A concentración 1.35 ppm la motilidad se pierde al min. Espermatozoides tratados con mercurio II 0.27 ppm por 12 min. utilizados en fecundación dan origen a pluteus con marcados efectos teratogénicos.

El tratamiento de huevos con mercurio II 6.75 ppm por 60 min. y su posterior fecundación inhibe la división celular. La fecundación de los óvulos tratados con mercurio II 5.4 ppm da origen a estados de dos células, pero a partir de este estado sólo uno de los dos blastómeros se sigue dividiendo.

El tratamiento de células fecundadas, de 2, 16 células, gástrula y pluteus temprano con mercurio II 0.27 ppm produce detención del desarrollo.

El tratamiento de blástulas con mercurio II 0.0168 ppm produce efectos teratogénicos a nivel del estado de pluteus.

ABSTRACT

The toxic effects of mercuric mercury on gametes, fertilization and embrionic development in the species *Tetrapygus niger* are described.

Sperms lose motility within 20 minutes with 0.27 ppm mercuric mercury. A 1.35 ppm concentration brings about a loss of motility within a minute. Sperms used in fertilization and treated with 0.27 ppm mercuric mercury for 12 minutes, gave rise to a pluteus with marked teratogenic effects.

The treatment of eggs with 6.75 ppm mercuric mercury for 60 minutes inhibits cellular division. The fertilization of eggs treated with 5.4 ppm mercuric mercury brings about two cells but then only one of the blastula keeps on dividing. The treatment of fertilized cells of 2 cells, 16 cells, gastrula and early pluteus with 0.27 ppm mercuric mercury stops development. The treatment of blastula with 0.0168 ppm mercuric mercury brings about teratogenic effects in the pluteus.

KEYWORDS: Mercuric effect. Sea urchin. Gametes. Embrionic development.

---

* Proyecto 203108. Dirección de Investigación. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407. Universidad de Concepción, Chile.

Fotomicroscopia. Guido Cea C.

INTRODUCCION

En el año 1950, se ha informado de una enfermedad de tipo neurológica, ocurrida a pescadores de la Bahía de Minamata en Japón y su relación con la ingesta de pescado contaminado con altas concentraciones de mercurio. Goldwater (1971:383). Debido a incidentes similares ocurridos posteriormente, se comenzó a investigar los riesgos potenciales de este agente sobre el medio ambiente. La base química de los efectos del mercurio y sus derivados es la fuerte afinidad que tiene sobre los grupos SH de cisteína. También se ha descrito interacciones con otros aminoácidos como triptófano y tirosina, grupos carboxilos y fosforilos. Se ha reportado, además, que puede unirse a los ácidos nucleicos a través de sus grupos fosfatos o bases nitrogenadas. Ramachandran (1964:1603); Chen (1971:552). De esto se deduce la gran variabilidad de efectos tóxicos que el mercurio puede tener sobre los sistemas biológicos y en distintos compartimentos celulares. A nivel de la membrana plasmática se ha descrito alteración de la permeabilidad y consecuentemente de los procesos de transporte activo. Bouquegneau *et al.* (1979:563). La penetración del mercurio al interior de la célula y su consiguiente unión a numerosos sistemas enzimáticos produce alteraciones en el metabolismo intermediario. Dos posibles mecanismos se han descrito para explicar la actividad tóxica de este metal:

a) puede desplazar del sitio activo algún otro metal considerado importante en la actividad de la enzima y
b) puede unirse a la enzima produciendo cambios de conformación en el sitio activo. Eichhorn et al (1969:937). En el núcleo puede alterar la estructura y función de la cromatina comprometiendo la expresión de los genes. Eichhorn (1973:1210). Se ha descrito que los lisosomas son el principal blanco de los metales pesados a partir de los cuales se redistribuye posteriormente. Mego *et al.* (1975:1227).

El objetivo de esta publicación es describir los efectos tóxicos del mercurio II sobre gametos y los procesos de fecundación y desarrollo embrionario en la especie *Tetrapygus niger.*

MATERIAL

Material biológico.

Los erizos de la especie *Tetrapygus niger,* fueron recolectados de la Bahía de San Vicente, VIII Región del Bío-Bío, Chile. A partir de ellos se obtuvieron los gametos por inyección de ClK 0.55 M en la cavidad celómica. Los óvulos fueron lavados exhaustivamente con agua de mar filtrada y usados inmediatamente para los estudios de fecundación y desarrollo. Los espermatozoides se usaron inmediatamente para estos estudios.

Reactivos químicos.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico sin purificación posterior: acetato de sodio, cloruro de potasio, Tritón X-100 y cloruro de mercurio.

METODOS

1.— Tratamiento de los espermatozoides con mercurio II.

Espermatozoides de erizo negro fueron suspendidos con agua de mar al 2% v/v con mercurio II, a diferentes concentraciones que varían entre 0.27 a 2.3 ppm, observándose por microscopía óptica su motilidad y registrándose el tiempo en que esta motilidad se pierde. Una suspensión de espermatozoides en agua de mar se utilizó como control. Espermatozoides pretratados con mercurio II 0.27 ppm que conservan motilidad fueron lavados a los 12 minutos

y utilizados en fecundación. Para ello se adicionó 10 ml a 250 ml de óvulos al 1% v/v en agua de mar. El proceso de fecundación y desarrollo se siguió por microscopía óptica.
El control de la fecundación y desarrollo se realizó simultáneamente utilizando igual procedimiento anterior con espermatozoides suspendidos en agua de mar.

2.— Tratamiento de los óvulos con mercurio II.

Los óvulos de erizo fueron suspendidos en agua de mar filtrada con mercurio II 6.75 ppm. A 2, 5, 15, 30 y 60 minutos se tomaron alícuotas que fueron lavadas y centrifugadas a 30 x g por un minuto para obtener los óvulos libres de mercurio en solución. Los óvulos así tratados, fueron homogenizados con tampón acetato de sodio - ácido acético 0.1 M; cloruro de potasio 30 mM; Tritón X-100 al 0.2% pH 5.6 y centrifugados a 10.000 por g por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de mercurio soluble por espectrofotometría de absorción atómica. (E.A.A.).
Una alícuota de óvulos correspondiente a tratamiento por 60 minutos fue lavada exhaustivamente con agua de mar y utilizada para fecundación. Concentraciones de 4.05 y 5.4 ppm fueron también utilizadas por 60 minutos para experimentos de fecundación y desarrollo.

3.— Efecto de mercurio II en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Ovulos de erizo fueron fecundados, observándose el desarrollo embrionario por microscopía óptica hasta el estado de pluteus tardío (340 hrs.). A los estados de: célula fecundada, 2, 16 células, gástrula y pluteus temprano se separaron dos alícuotas. A una de ellas se le adicionó mercurio II a una concentración final de 0.27 ppm. La otra se utilizó como control. Estados de blástulas natatorias fueron suspendidas en agua de mar con mercurio II 0.0168 ppm. Los efectos se observaron por microscopía óptica.

RESULTADOS

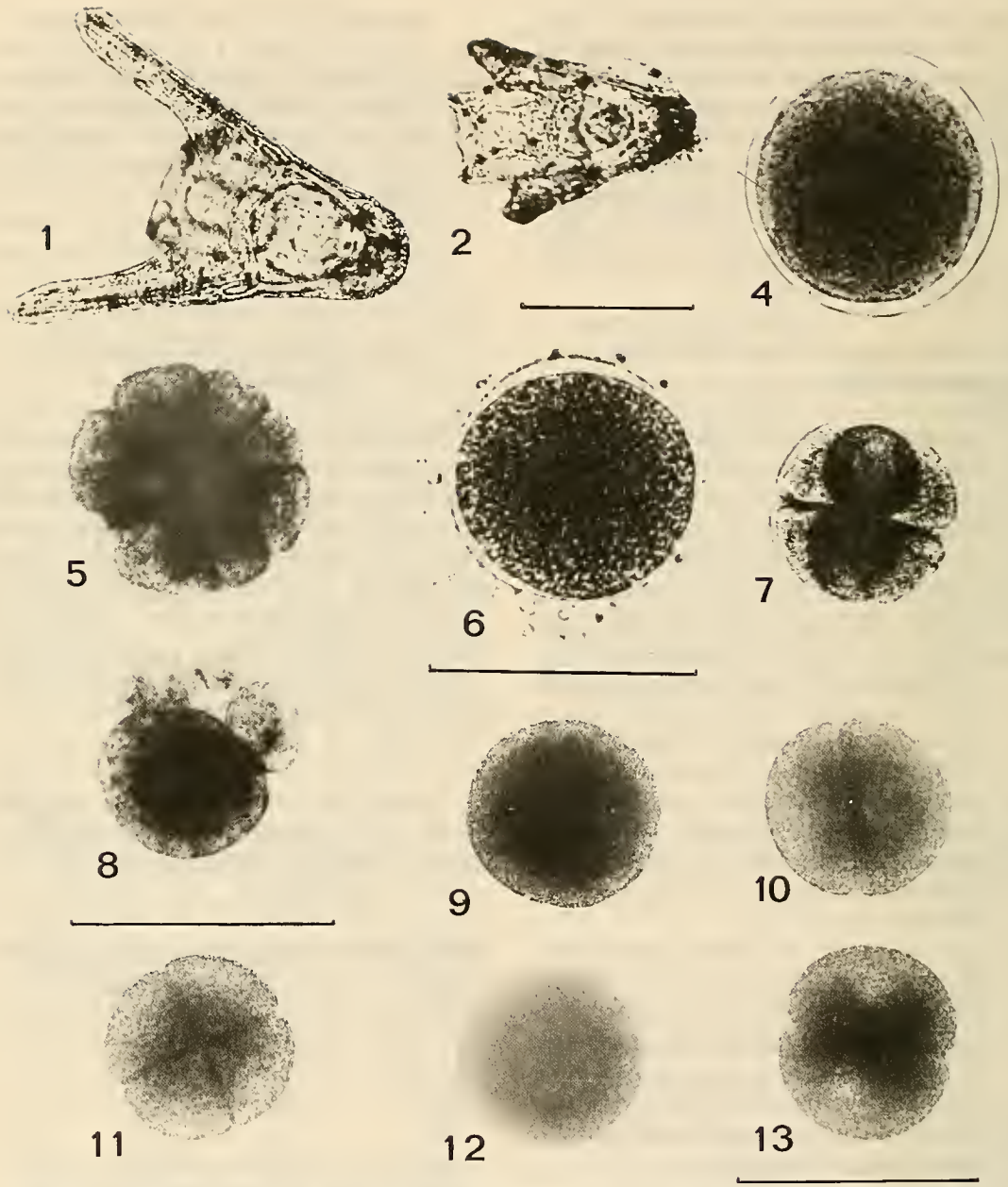
Efecto de mercurio II sobre los espermatozoides.

Motilidad. La pérdida de la motilidad de la población de espermatozoides con diferentes concentraciones de mercurio en función del tiempo se observa en la Tabla I. A concentración 0.27 ppm la pérdida ocurre a los 20 min. A medida que aumenta la concentración de mercurio el tiempo disminuye. Así, a concentración 1.35 ppm o mayores la motilidad se pierde al minuto. Tabla I.

TABLA I.- Efecto del mercurio II sobre la motilidad de los espermatozoides a diferentes concentraciones.

Mercurio II ppm	Pérdida de la motilidad Tiempo (min)
0	1200 + 91.9
0.27	20 + 1.58
0.54	17 + 1.35
0.81	15 + 1.2
1.08	12 + 0.95
1.35	1 + 0.079
2.16	1 + 0.079
2.7	1 + 0.075

Espermatozoides fueron suspendidos en agua de mar al 2% con diferentes concentraciones de mercurio II a 18°C. La motilidad fue controlada por microscopía óptica. Cada tiempo representa el promedio de cinco experimentos y se indica la desviación estándar.

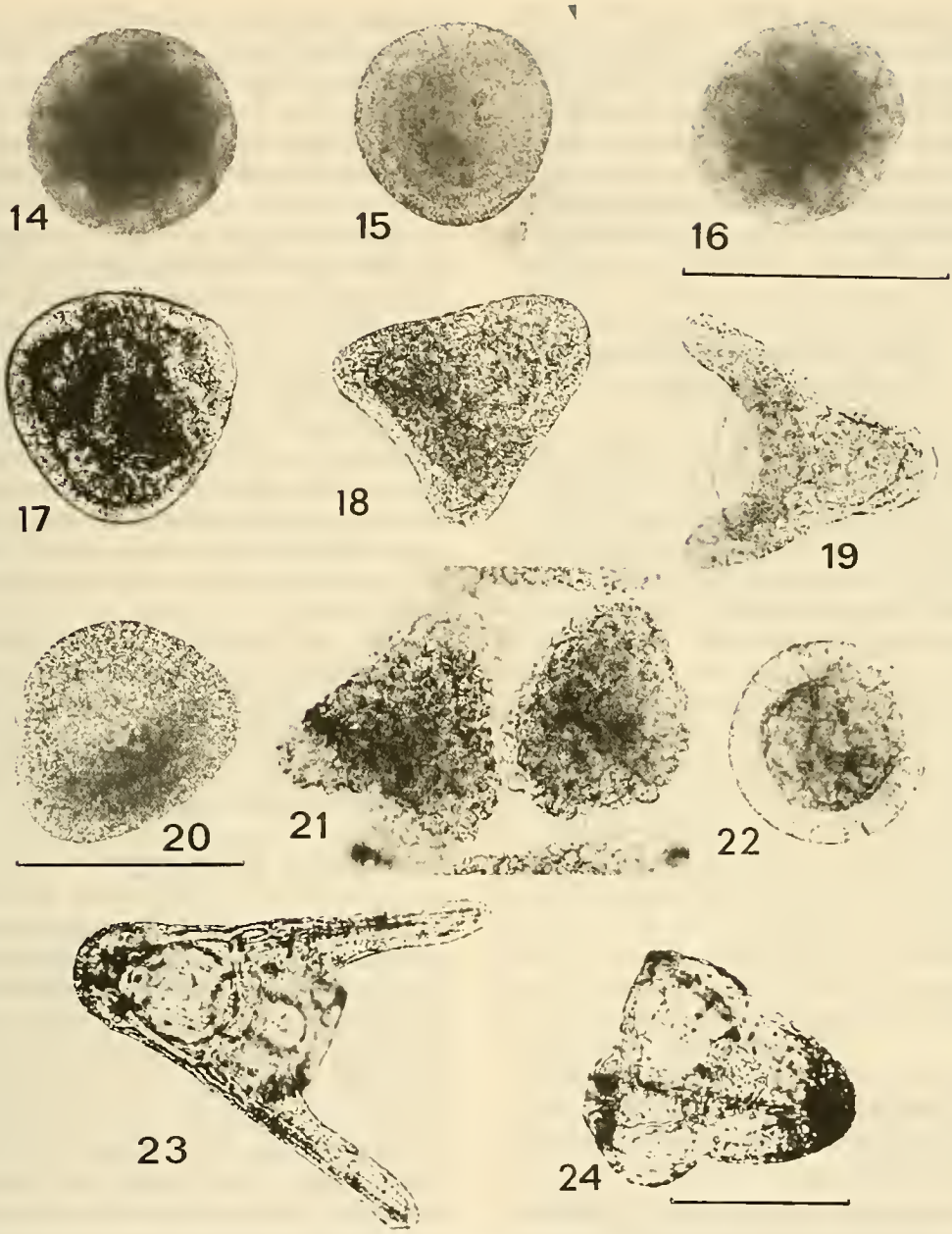


Desarrollo embrionario de erizo utilizando espermatozoides pretratados con mercurio II 0.27 ppm. Fig. 1: Control. Pluteus tardío de 340 hrs. Fig. 2: Pluteus tardío de 340 hrs, obtenido de espermatozoides pretratados. Preparaciones vivas. Trazo = 100 um.

Fecundación y desarrollo embrionario utilizando óvulos pretratados con mercurio II 6.75 ppm durante 60 min. Fig. 4: Control 10 min post fecundación. Fig. 5: Control 150 min post fecundación. Fig. 6: Ovulo pretratado 150 min post fecundación. Preparaciones vivas. Trazo = 100 um.

Desarrollo embrionario utilizando óvulos pretratados con mercurio II 5.4 ppm durante 60 min. Fig. 7: Control 120 min post fecundación. Fig. 8: Embrión anormal registrado a los 120 min post fecundación. Preparaciones vivas. Trazo = 100 um.

Efecto de mercurio II 0.27 ppm sobre huevos y estado de dos células. Fig. 9: Control 10 min post fecundación. Fig. 10: Control 60 min post fecundación. Fig. 11: Control 90 min post fecundación. Fig. 12: Huevos pretratados y registrados a los 60 min. Fig. 13: Estados de dos células pretratadas y registradas a los 90 min. Las preparaciones fueron fijadas con glutaraldehido 2.5% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2. Trazo = 100 um.



Efecto de mercurio II 0.27 ppm sobre estados de 16 células. Fig. 14: Control 16 células 120 min post fecundación. Fig. 15: Control blástulas 20 hrs post fecundación. Fig. 16: Células pretratadas y registradas a las 20 hrs. Las preparaciones fueron fijadas en glutaraldehido 2.5% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 Trazo = 100 um.

Efecto de mercurio II 0.27 ppm sobre estados de gástrula y pluteus temprano. Fig. 17: Control gástrula 36 hrs. Fig. 18: Control pluteus temprano. 48 hrs. Fig. 19: Control pluteus tardío 72 hrs. Fig. 20: Gástrula pretratada y registrada a las 48 hrs. Fig. 21: Pluteus temprano pretratado y registrado a las 72 hrs. Las preparaciones fueron fijadas en glutaraldehido 2.5% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2. Trazo = 100 um.

Efectos de mercurio II 0.0168 ppm sobre el desarrollo de blástulas. Fig. 22: Control blástula 20 hrs post fecundación. Fig. 23 Control pluteus 280 hrs post fecundación. Fig. 24: Pluteus anormal registrados a las 280 hrs. obtenido de blástulas pretratadas. Las preparaciones fueron fijadas en glutaraldehido 2.5% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 Trazo = 100 um.

Fecundación. Espermatozoides mantenidos en agua de mar con mercurio II 0.27 ppm hasta los 12 min. fueron utlizados en fecundación. Se observa solamente retardo en el desarrollo de todos los estados, destacándose que los estados de pluteus tardío (340 hrs) son anormalmente vesiculados con escaso desarrollo de los brazos orales y anales. Figs. 1 y 2.

Efecto de mercurio II en los óvulos no fecundados

Incorporación. La incorporación de este metal medida en fracciones solubles obtenidas a partir de óvulos pretratados con mercurio II 5.4 ppm, en función del tiempo se observa en la figura 3. La incorporación es máxima a los 15 min., manteniéndose constante hasta los 60 min.

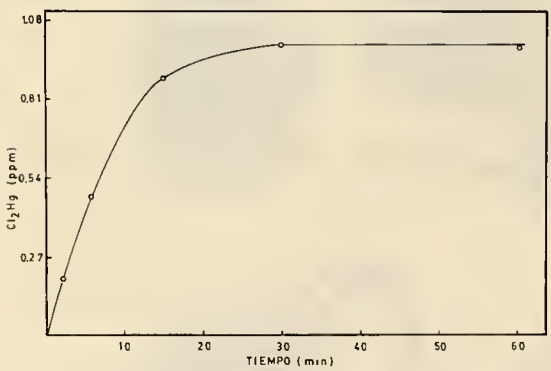


Fig. 3.- Incorporación de mercurio II en óvulo no fecundado medida en fracciones solubles obtenidas de homogenizado por centrifugación a 10000 x g por 30 min.

Fecundación y desarrollo embrionario. El tratamiento de los óvulos con agua de mar con mercurio II 6.75 ppm por 60 min. y la posterior fecundación, produce solamente membrana de fecundación a los 10 min., pero se inhibe totalmente la división celular, registrándose a los 150 min. permanencia de la membrana de fecundación y expulsión de material citoplasmático. Figs. 4, 5 y 6. A concentración de mercurio II 5.4 ppm por 60 min. se produce el estado de dos células, pero a partir de este estado uno de los dos blastómeros se sigue desarrollando, observándose embriones con número anormal de células. Figs. 7 y 8.

Efecto de mercurio II sobre diferentes estados del desarrollo

Huevos (10 min. post fecundación); estados de dos células (60 min. post fecundación) y de 16 celulas (2 hrs. post fecundación), tratados con agua de mar con mercurio II 0.27 ppm detienen su desarrollo. Figs. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

Estados de gástrulas (36 hrs. post fecundación) y de pluteus temprano (48 hrs. post fecundación), tratados con agua de mar con mercurio II 0.27 ppm detienen su movilidad y desarrollo. Figs. 17, 18, 19, 20 y 21. Posteriormente todos los estados se disgregan.

Estados de blástulas tratados con agua de mar con menor concentración de mercurio (0.0168 ppm) retardan su desarrollo obteniéndose a las 280 hrs. pluteus anormales sin desarrollo de brazos orales y anales. Figs. 22, 23 y 24.

DISCUSION

Las investigaciones con mercurio como agente contaminante se refieren preferentemente a estudios realizados en mamíferos y a la redistribución de este metal por la actividad del hombre a nivel industrial y agrícola. D'Itri (1976:53), Appelquist et al (1985:244); Patel et al (1985:22); Santoro et al (1986:219). En relación a este último punto se ha informado de altas concentraciones de mercurio en la VIII Región del Bío-Bío, Chile, destacándose un aumento de concentración que va desde el agua de mar al sedimento y al organismo marino. Un dato específico referido al Golfo de Arauco en esta VIII Región, indica que el contenido de mercurio en el agua de mar es 0.19 ppb; el del sedimento es 0.25 ppm y el de *Aulacomya ater* (cholgua) es de 0.24 ppm. Martínez (1980:40).

Escasa información existe sobre el efecto tóxico de metales pesados en ga-

metos y sobre desarrollo embrionario en especies marinas, tanto a nivel morfológico como molecular. Los invertebrados marinos especialmente los equinodermos constituyen un excelente modelo para el estudio de estos efectos. Ello debido a que esta especie libera fácilmente un elevado número de gametos con los que se puede realizar la fecundación y la obtención de embriones hasta el estado de pluteus permitiendo estudiar el proceso a nivel morfológico y bioquímico. Epel (1977:128); Okasaki (1975:177); Wassarman (1987:554).

Se ha probado el efecto del mercurio sobre la motilidad de los espermatozoides y éste se traduce dependiendo del tiempo de tratamiento, en pérdida de la motilidad, retardo en el desarrollo y aparecimiento de estados de pluteus con drásticos efectos teratogénicos. (Tabla I y Figs. 1 y 2). La concentración utilizada está dentro del rango descrito como concentración sub-letal en la VIII Región del Bío-Bío.

El espermatozoide es una célula que está formada por acrosoma, núcleo, mitocondrias y flagelo y en consecuencia carece de mecanismos de defensa que son típicos para otros tipos de células. Por ejemplo, por carecer de lisosomas típicos no puede desintoxicarse de los metales pesados frente a los cuales este organelo se describe como el principal blanco para estos agentes. Viarengo (1975:153). Por otro lado, por no haberse descrito en estas células inducción de proteínas no dispone de uno de los mecanismos más efectivos contra la entrada de metales tóxicos, como es la síntesis de metalotioneínas. Rocsejadi (1980:167); Winge et al (1984:11419).

Las mitocondrias son organelos capaces de acumular activamente Hg y otros metales pesados, George (1982:3), inhibiendo la fosforilación oxidativa y por consiguiente se sugiere que la inhibición de la fuente energética sería, en parte, la causante de la pérdida de la motilidad de los espermatozoides.

En cuanto al mecanismo molecular de acción de este metal se propone una interacción del mercurio con grupos sulfidrilos de una proteína del espacio intermembranoso. Southard et al (1974:2147).

Otra posibilidad es que el mercurio afecte la motilidad de los espermatozoides por interacción con grupos SH de las tubulinas que son las proteínas de los microtúbulos del flagelo, Wadsworth et al (1982:21), o bien compitiendo con el magnesio que se describe como indispensable en la formación del complejo GTP-Mg^{++} en el mecanismo de deslizamiento de los microtúbulos. Olmsted et al (1975:2996).

El efecto teratogénico del mercurio ha sido reportado en mamíferos y utilizando generalmente concentraciones del orden de 1 mg/kg peso. Holt et al (1986:243). En el caso presente el efecto teratogénico a nivel de pluteus demuestra una alteración en la expresión del material genético lograda con espermatozoides pretratados con mercurio II 0.27 ppm. Este efecto, se sugiere podría deberse a una interacción selectiva hacia proteínas nucleares del espermatozoides como enzimas involucradas en los procesos transcripcionales o con el material genético. Se ha reportado una disminución de la síntesis de RNA en organismos que acumulan metales en el interior del núcleo. Viarengo et al (1982:345); Mitsumori et al (1981:305).

El pretratamiento de los óvulos con mercurio II produce inhibición de la división celular, cuando la concentración es 6.75 ppm, no observándose cambios en la distribución del material celular (Figs. 4, 5 y 6). Cuando la concentración es 5.4 ppm se producen estados aberrantes de segmentación indicando que uno de los dos blastómeros se sigue desarrollando y por lo tanto tienen diferente sensibilidad al mercurio (Figs. 7 y 8). Estos efectos podrían relacionarse con la degradación de las proteínas de los gránulos de vitelo necesarias para el proceso de segmentación. Esta degradación, de acuedo a la hipótesis planteada por Brachet (1974:176) haría necesaria la participación de enzi-

mas proteolíticas. En relación a esto, se ha descrito la presencia de dos enzimas proteolíticas tipo catepsinas D en el óvulo de erizo negro, Sánchez-Chiang et al (1986:81), que son inhibidas tanto in vivo como in vitro por el mercurio. Ponce et al (1987:26). Estas enzimas proteolíticas podrían participar también en el aporte de aminoácidos para la síntesis de proteínas necesarias en el proceso de división celular como la ciclina, que son degradadas antes del proceso de segmentación y se vuelven a sintetizar posteriormente Evans et al.(1983:389).

El efecto letal del mercurio sobre diferentes embriones como 2 y 4 células, 16 células, gástrula y pluteus temprano, es muy difícil de cincunscribir a una interacción de determinados mecanismos moleculares por cuanto evidentemente se están dando en estos estados múltiples posibilidades y en diversas estructuras de estos embriones. La menor concentración utilizada en estos estados y la drasticidad de su efecto sugieren una mayor sensibilidad de los embriones en relación a la célula huevo. (Figs. 9 a 24).

Se discute la posibilidad que en el medio acuático natural, estos efectos se produzcan en todos aquellos organismos que se reproduzcan por fecundación externa. Si bien es cierto, la mayor concentración de mercurio se describe en el sedimento, (0.25 ppm) por efecto de las surgencias, cualquier organismo de la biótica marina, estaría en condiciones de ser afectado por metales tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

Appelquist, H., Draback, I., Osbirk, S. 1985. Variation of mercury contact of quillemost feathers over 150 years. Marine Pollution Bulletin 16. 2: 244-248.

Bouquegneau, J.M. and Gilles, R. 1979. Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. Metabolism of osmoregulation in animals. Guilles, R. ed. New York: 563:580.

Brachet, J., 1974. Introduction to molecular embriology. Heidelberg Science library. 176 pp.

Chen, R.F. 1971. Fluorescence quenching due to mercuric ion interaction with aromatic amino acids and proteins. Arch. Biochem. Biphys. 142: 552:564.

D'Itri, F.M. 1976. Environmental Health Critera 1 Mercury, World Health Organization Geneva, 131 pp.

Eichhorn, G.L., Clark, P., Tarien, E. 1969. The interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. J. Biol. Chem. 244: 937-942.

Eichhorn, G.L., 1973. Complexes of polynucleotides and nuclei acids. Inorganic Biochemistry, 2: 1210-1245.

Epel, D. 1977. The program of fertilization. Sci. Am. 237. 11: 128:138.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell. 33.2: 389-396.

George, S.G. 1982. Subcelular accumulation and detoxication of metals in acuatic animals. Vernberg, W.B. Calabrese, A., Thurberg, F.P. and Vernberg, F.J. eds. Academic Press, New York. 3-52.

Goldwater, L.J. 1971. Mercury in the environment. Scientific American 224, 5: 15-21.

Holt D., Webb M. 1986. The toxicity and teratogenicity of mercuric mercury in the pregnant rat. Arch. Toxicol. 58: 243-248.

Martínez, C. 1980. Evaluación del grado de contaminación del litoral de la VIII Región. Informe final convenio SERPLAC - Universidad de Concepción. 40-50.

Mego, J.L., Cain, J.A. 1975. An effect of cadmiun on heterolysosome formation and function. Biochem. Pharmacol. 24: 1227-1232.

Mitsumori, K., Maita, K., Saito, T., Tsuda, S., Shirasu, Y. 1981. Carcinogenicity of methylmercury chloride in ICR mice. Preliminary note on renal carcinogenesis. Cancer Lett. 12: 305-310.

Okasaki, R. 1975. The Sea Urchim Embryo. Czihak, G. Spinger-Verlag Berlin Heidelberg New York. 700 pp.

Olmsted, J.B., Borisy, G.G. 1975. Ionic and nucleotide requeriments for microtubule polymerization in vitro. Biochemistry 14, 13: 2996-3004.

Patel, B., Bangera, V.S., Patel, Sh., Balani, M.C. 1985. Heavy metals in the Bombay Harbour Area. Marine Pollution Bulletin 14.1: 22-28.

Ponce, O., Sánchez-Chiang, L., Magaña, A. y Enríquez, S. 1987. Efecto de mercurio sobre fecundación y desarrollo embrionario. Boletín Primer Congreso Argentino de Biología del Desarrollo: 26.

Ramachandran, L.K. and Witkop, B. 1964. The inte-

raction of mercury acetate with indoles, tryptophan and proteins. Biochemistry 3: 1603-1611.

Rocsejadi, G. 1980. The significance of low molecular weight metallothionein-like proteins in marine invertebrates: current status. Mar. Environ. Res. 4: 167-181.

Sánchez-Chiang L., Ponce O., Lansberger E., Enríquez S. 1986. Cathepsins D from sea urchin egg *Tetrapygus niger* isolation by affinity chromatography and properties. Comp. Biochem. Physiol. 85 B. 1: 81-87.

Santoro, E.D., Koepp, S.J. 1986. Mercury levels in organism in proximity to old chemical site. Marine Pollution Bulletin 17, 5: 219-224.

Southard, J., Nitiservajo, P., Green, D.E. 1974. Mercurial toxicity and the perturbation of the mitocondrial control system. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs Exp. Biol. 33: 2147-2153.

Viarengo, A. 1975. Biochemical effects of trace metals. Marine Pollution Bulletin 14. 4: 153-158.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Orunesu, M., 1982. Effects of Cu on nuclear RNA polymerase activities in the mussel digestive gland. Mar. Biol. Lett. 3: 345-352.

Wadswoth, P., Sloboda, D. 1982. Characterization of tubulin modified with the sulfhydryl-reactive fluorochrome monobromo (trimethylammonio) bimane. Biochemistry 21. 1: 21-28.

Wassarman, P. 1987. The biology and chemistry of fertilization, Science 235: 554-560.

Winge, D.R., Nielson, K.B., Zeikus, R.D. and Gray, W.R. 1984. Structural characterization of the isoforms of neonatal and adult rat liver metallothionein. J. Biol. Chem. 259. 18: 11419-11425.