ITEA (2005), Vol. **Extra N.º 26.** Tomo I, 386-388

INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-ZONA PELÚCIDA EN LA ESPECIE BOVINA: PAPEL DEL ÁCIDO SIÁLICO Y DEL ENZIMA NEURAMINIDASA.

JG Velasquez[1], P Barajas[1,2], J Marcos[3], M Jiménez-Movilla[3], R Gutiérrez-Gallego[4], J Ballesta[3], M Avilés[3], P Coy[2]

[1]CORPOICA y Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia; [2] Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España; [3]Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España; [4]Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, España

INTRODUCCIÓN

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que rodea a los ovocitos de mamíferos desde los estadios iniciales del proceso de foliculogénesis, permaneciendo a su alrededor durante la fecundación y hasta el momento de la eclosión del blastocisto. Esta matriz está formada por tres o cuatro proteínas altamente glicosiladas (glicoproteínas) según la especie (1-4). Entre otras funciones, la ZP debe interaccionar con el espermatozoide fecundante para que éste la atraviese y alcance al oocito, y se ha evidenciado que los carbohidratos de sus glicoproteínas juegan un papel importante en este proceso de reconocimiento y unión (2,5).

Sin embargo, la identificación precisa de las moléculas implicadas no ha sido posible hasta el momento. Aunque se ha demostrado una modificación en el contenido de ácido siálico de la zona pelúcida (ZP) de ovocitos bovinos después de la fecundación (6), no existe ninguna evidencia de la implicación de estos residuos en la interacción espermatozoide-ZP.

Por otra parte, se sabe que tras la fecundación se produce un bloqueo de la polispermia para evitar la penetración de espermatozoides adicionales en el ovocito (7,8). Este bloqueo está directamente asociado en los mamíferos con la reacción cortical, provocada por la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del ovocito, pero los mecanismos moleculares responsables de este bloqueo siguen siendo un tema sin esclarecer.

Por estas razones, los objetivos del presente trabajo fueron:

(1) investigar el papel del ácido siálico contenido en la ZP de ovocitos de vaca en la interacción espermatozoide-ZP,

(2) caracterizar el ácido siálico de la ZP de ovocitos de vaca mediante análisis químicos y citoquímicos,

(3) averiguar si la enzima neuraminidasa (sialidasa) tiene algún papel sobre el endurecimiento de la ZP y/o el mecanismo de bloqueo de la polispermia.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en ovocitos de vaca rodeados por 4 o más capas de células del *cumulus oophorus*, obtenidos de folículos ováricos de 2 a 6 mm de

diámetro. Para conseguir los objetivos propuestos, se desarrollaron cinco experiencias.

En la primera de ellas, realizamos cocultivos de ZPs aisladas con espermatozoides de toro en presencia de enzima neuraminidasa, así como ensayos de FIV en presencia de esta misma enzima.

En la segunda experiencia se probaron dos tipos diferentes de macromoléculas, lectinas (LFA, MAA y SNA) y anticuerpos monoclonales (anti sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x), con una especificidad conocida para diferentes tipos de residuos de ácido siálico, realizándose ensayos de unión espermatozoide-ZP para cuantificar su efecto inhibidor.

En la tercera experiencia dos carbohidratos (metil-α-manopiranosa y sialil-lactosa) y dos glicoproteínas (fetuina y asialofetuina), también fueron testadas mediante ensayos de unión espermatozoide-ZP, para estudiar el posible efecto en el bloqueo del receptor espermático para la ZP.

En la experiencia 4, caracterizamos los tipos de ácido siálico presentes en la ZP de ovocitos de vaca mediante análisis químicos y citoquímicos. Para ello se procedió al análisis del ácido siálico mediante HPLC en ZPs bovinas aisladas y se procesaron ovocitos fijados con glutaraldehido para citoquímica ultraestructural, usando lectinas (LFA, MAA, SNA) y anticuerpos (anti-sialil-Lewis^a y anti-sialil-Lewis^x), empleando partículas de oro coloidal como marcador.

Finalmente, en la quinta experiencia se investigó la influencia de la enzima sialidasa sobre la resistencia de la ZP bovina a la digestión con pronasa, con la intención de averiguar si esta enzima podría estar implicada en el endurecimiento de la ZP tras la fecundación de los ovocitos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron una inhibición superior al 30% y 70% de la unión espermatozoide-ZP cuando la ZP se trató con los enzimas neuraminidasas de *Clostridium perfringens* y *Salmonella thyphimurium* a concentraciones de 1UI/ml y 10UI/ml, respectivamente. Se detectó asimismo un 71'13% de inhibición en la penetración en experimentos de FIV cuando se usaron ovocitos previamente incubados con el enzima sialidasa (9). La presencia de un inhibidor del enzima sialidasa incrementó el número de espermatozoides unidos a la ZP y el porcentaje de ovocitos polispérmicos tras la FIV (9).

Los resultados del segundo experimento indicaron una inhibición, superior al 60%, del número de espermatozoides unidos a la ZP que fue dosis dependiente con las lectinas LFA y MAA (10). La incubación de las ZP aisladas con la lectina SNA y los anticuerpos anti-sialil-Lewis no afectó a la unión espermatozoide-ZP.

Del experimento 3 se dedujo que tanto sialil-lactosa como fetuina afectan a la unión espermatozoide-ZP, mientras que metil-α-manopiranosa y asialofetuina no presentan ningún efecto inhibidor sobre esta unión.

En el experimento 4 se observó mediante análisis de HPLC la presencia de dos tipos principales de ácido siálico en la ZP bovina: el 5-N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) y el 5-N-glycolilneuramínico (Neu5Gc). El Neu5Ac es el componente mayoritario (85%) mientras que el Neu5Gc está presente en menor cantidad (15%) (11). La

utilización de técnicas citoquímicas de lectinas nos indica la presencia de los carbohidratos: Neu5Ac/NeuGcα2,3Galβ1,4GlcNAc (MAA), Neu5Ac/NeuGcα2,6Gal/GalNAc (SNA) y Neu5Ac/NeuGc-Galβ1,3GalNAc (neuraminidasa-PNA) (11).

Por último, en el experimento 5 se demostró que la resistencia de la ZP bovina a la digestión con pronasa no varía después de la incubación con el enzima sialidasa,

De los resultados obtenidos podemos deducir que la interacción espermatozoide-ZP es un proceso dependiente de carbohidratos, mediado por el ácido siálico con unión α2,3 a N-acetil-lactosamina contenida en las glicoproteínas de la ZP de ovocitos de vaca. Además, el efecto observado al emplear el inhibidor de sialidasa nos sugiere la presencia de este enzima en los gránulos corticales de los ovocitos bovinos y su participación en el mecanismo de bloqueo de la polispermia. Sin embargo, la eliminación de los residuos de ácido siálico de la ZP bovina mediante el enzima sialidasa no parece ser el mecanismo responsable del endurecimiento de la ZP.

REFERENCIAS

1. Wassarman, P.M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. Ann Rev Biochem, 57: 415-442.
2. Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. Mol Hum Reprod, 3:599-637.
3. Nakano, M., N. Yonezawa (2001). Localization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. Cells Tissues Organs, 168:65-75.
4. Lefièvre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis I.A., Monk, M., Hughes, D.C., Barratt, C.L. (2004) Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. Hum Reprod,19:1580-6.
5. Talbot P., BD. Shur, GD Myles (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. Biol Reprod, 68:1-9.
6. Katsumata, T., S. Noguchi, N. Yonezawa, M. Tanokura, M. Nakano (1996). Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. Eur J Biochem, 240(2):448-53.
7. Wassarman, P.M. (1987). Early events in mammalian fertilization. Ann. Rev Cell Biol, 3: 109-142.
8. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. En “Physiology of reproduction”, Vol 1 (Eds. Knobil & Neil J), pags. 189-317.
9. Velasquez, J.G., Barajas, P., Marcos, J., Ballesta, J., Avilés, M., Coy P. (2005). Evidences for the presence of sialidase enzyme in the bovine oocyte. Its role in the block to polyspermy. Reprod Dom Anim (en prensa).
10. Velásquez, J.G., Marcos, J., Barajas, P., Gardón, J.C., Jiménez-Movilla, M., Ballesta, J., Coy P., Avilés, M. (2004) Involvement of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida interaction. Hum Reprod 19 (Supp 1): 155.
11. Marcos, J., Velásquez, J.G., Gutiérrez-Gallego, R., Jiménez-Movilla, M., Ballesta, J., Coy, P., Avilés, M. (2005). Characterization of the different sialic acids contained in the bovine zona pellucida. Reprod Dom Anim (en prensa).