LA β-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA DISMINUYE LA UNIÓN ESPERMATOZOIDE-ZONA PELÚCIDA Y LA PENETRACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA

Coy P., de Ondiz, A. y Romar, R.
Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia 30071.
pcoy@um.es

INTRODUCCIÓN

La

La fecundación *in vitro* en la especie porcina es una técnica de baja eficacia debido, principalmente, a los altos niveles de polispermia que se obtienen cuando se utiliza. Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación de la polispermia que tiene lugar en el oviducto antes del contacto del ovocito con el espermatozoide (Coy et al., 2008). Este mecanismo modifica la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos en diferentes especies, haciéndola altamente resistente a la digestión proteolítica y, como consecuencia, se reduce el número de espermatozoides capaces de unirse a la misma y penetrar el ovocito. En este cambio de la ZP intervienen la glicoproteína llamada oviductina (OVGP1) y los glicosaminoglicanos sulfatados del tipo heparina (Coy et al., 2008). Ambos tipos de moléculas se encuentran presentes en el fluido oviductal alrededor del momento de la fecundación en condiciones fisiológicas. Sin embargo, estos dos factores no son los únicos que podrían regular la interacción espermatozoide-ovocito en el oviducto.

Nuestro grupo ha identificado recientemente actividad de 5 exoglicosidasas en el fluido oviductal de las especies porcina y bovina, con variaciones a lo largo del ciclo estral (Carrasco et al., 2008a, Carrasco et al., 2008b). Las glicosidasas son enzimas que se encuentran normalmente en el interior de los lisosomas y catalizan la separación hidrolítica de los residuos de azúcares terminales de la porción glucídica de las glicoproteínas y glicolípidos. Su presencia en el oviducto de la cerda sugiere la posibilidad de que alguna de estas enzimas intervenga también en la regulación de la polispermia afectando la interacción espermatozoide-ovocito mediante la eliminación de residuos glicídicos necesarios para la misma. En el presente estudio, decidimos estudiar el papel de la β-N-acetil-glucosaminidasa.

Se sabe que el reconocimiento espermatozoide-ovocito en el ratón está mediado por la unión de la enzima β-1,4-galactosil-transferasa (GalTasa), localizada en la parte lateral de la membrana plasmática del espermatozoide, a residuos del azúcar β-N-acetil-glucosamina de la ZP del ovocito (Bleil y Wassarman, 1980; Shur y Hall, 1982; Miller et al., 1992). Debido a que se ha demostrado que GalTasa se expresa en la membrana plasmática del espermatozoide de verraco (Larson y Miller, 1997) nos planteamos la hipótesis de que la presencia de β-N-acetil-glucosaminidasa en el medio de fecundación *in vitro*, en concentraciones similares a las que la hemos detectado en el fluido oviductal alrededor del momento de la fecundación, afectara al número de espermatozoides capaces de unirse a la ZP y penetrar el ovocito, al eliminar uno de sus posibles sitios de unión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron ovarios de cerdas prepúberes en matadero y se transportaron al laboratorio a 38ºC en solución salina. Los ovocitos se obtuvieron mediante rallado de los folículos entre 3-6 mm de diámetro y se seleccionaron bajo estereomicroscopio por el número de capas de células del *cumulus* y la homogeneidad del citoplasma, para posteriormente transferirlos al medio de maduración NCSU-37 según los protocolos previamente descritos (Funahashi y Day, 1993). Al finalizar el proceso de maduración los ovocitos se denudaron parcialmente y se transfirieron a medio de fecundación (TALP, (Coy et al., 2008), con o sin 0.5 μl/ml de β-N-acetil-glucosaminidasa (Sigma A2415) durante 30 minutos. A continuación, los ovocitos se lavaron dos veces en medio TALP y se introdujeron en pocillos de fecundación (250 μl de medio TALP).

Los espermatozoides, procedentes de la fracción rica del eyaculado de verracos de fertilidad probada, se diluyeron en BTS (Pursel y Johnson, 1975) en proporción 1:20 y se procesaron siguiendo el protocolo descrito por PorciPure™ System (Nidacon Internacional

AB). La suspensión espermática final se diluyó en 250 μl de medio TALP y se añadió a los pocillos conteniendo los ovocitos, a una concentración final de 2 x 10^5 espermatozoides/ml. A los 10 minutos de coincubación, los ovocitos fueron lavados por sucesivos pases a través de una pipeta automática para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la ZP y se transfirieron a medio TALP sin espermatozoides. A las 18-20 horas post inseminación los posibles cigotos se fijaron en glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 30 minutos y se tiñeron con una solución de Hoescht 33342 1mg/ml durante 15 minutos. Finalmente, se evaluaron en microscopio de fluorescencia para determinar su grado de penetración, monospermia y el número de espermatozoides adheridos a la ZP. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y se consideraron valores significativos con $P<0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque preliminares, los resultados del presente estudio indican que la incubación de los ovocitos porcinos en presencia de 0.5 μl/ml de β-N-acetil-glucosaminidasa disminuye la capacidad de los espermatozoides para unirse a la ZP y penetrar el ovocito, aumentando los porcentajes de monospermia (Tabla 1). Además, en experimentos adicionales realizados con mayores concentraciones de enzima se inhibió totalmente la penetración.

Tabla 1. *Efecto de la β-N-acetil-glucosaminidasa sobre diferentes parámetros de fecundación in vitro en la especie porcina.*

Grupo	% Penetración (N)	% Monospermia	Espermatozoides/ ovocito	Espermatozoides/ZP
Control	75.00±6.60 (44)	35.29±8.31[a]	2.88±0.46[a]	21.51±2.97[a]
Enzima	65.22±7.10 (46)	67.74±8.53[b]	1.80±0.34[b]	11.21±1.69[b]

Estos resultados sugieren que la actividad enzimática de β-N-acetil-glucosaminidasa en el fluido oviductal podría tener un papel en la regulación de la polispermia en la especie porcina, similar al planteado por Miller et al., para la β-N-acetil-glucosaminidasa acrosomal en el modelo de ratón (Miller et al., 1993). En estos trabajos, Miller et al. proponen que β-N-acetil-glucosaminidasa acrosomal podría funcionar de dos maneras: a) catalíticamente hidrolizando residuos de β-N-acetil-glucosamina durante la penetración de la ZP o, b) actuando como una lectina y enmascarando residuos β-N-acetil-glucosamina y, por lo tanto, bloqueando la unión de GalTasa con la ZP.

Nuestros resultados sugieren una acción preferente de β-N-acetil-glucosaminidasa oviductal sobre la acrosomal debido a que como todas las glicosidasas lisosomales, β-N-acetil-glucosaminidasa acrosomal tiene mayor actividad a pH ácido, y el pH en el escenario donde se lleva a cabo la fecundación está alrededor de 7'4. Además, el pH de la ampolla oviductal porcina en el momento de la ovulación aumenta 0'4 unidades debido a la alcalinidad del fluido folicular (Nichol et al., 1997). Puesto que, como es sabido, desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo de las enzimas pueden afectar drásticamente su actividad, es muy probable que β-N-acetil-glucosaminidasa oviductal, que se encuentra inmersa en su medio natural, actúe catalíticamente remodelando la superficie de la ZP y disminuyendo las posibilidades de que GalTasa del espermatozoide interactúe con los residuos β-N-acetil-glucosamina de la ZP del ovocito antes de que β-N-acetil-glucosaminidasa acrosomal pueda tener ningún efecto.

En conclusión β-N-acetil-glucosaminidasa oviductal puede ser uno más de los factores oviductales que regulan la polispermia en la especie porcina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bleil, J.D. & Wassarman, P.M. 1980. *Cell* 20: 873-882.
Carrasco, L.C., Coy, P., Aviles, M., Gadea, J. & Romar, R. 2008a *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 808-817.
Carrasco, L.C., Romar, R., Aviles, M., Gadea, J. and Coy, P. 2008b *Reproduction* 136: 833-842.
Coy, P., Canovas, S., Mondejar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullon, L., Matas, C. and Aviles, M. 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15809-15814.
Funahashi, H. and Day, B.N. 1993. *J. Reprod. Fertil.* 98: 179-185.
Larson, J.L. & Miller, D.J. 1997. *Biol. Reprod.* 57: 442-453.
Miller, D.J., Gong, X. & Shur, B.D. 1993. *Development.* 118: 1279-1289.
Miller, D.J., Macek, M.B.& Shur, B.D. 1992. *Nature.* 357: 589-593.
Nichol, R., Hunter, R.H. &Cooke, G.M. 1997. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1069-1074.
Pursel, V.G. & Johnson, L.A. 1975. *J. Anim. Sci.* 40: 99–102.
Shur, B.D. & Hall, N.G. 1982. *J. Cell Biol.* 95: 574-579.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el Ministerio de Educación y Ciencia y el FEDER (AGL2006-03485) y el Gobierno regional de Murcia a traves de la Fundación Séneca (03018/PI/05).

β-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE DECREASES THE SPERMATOZOA-ZONA PELUCIDA AND IN VITRO PENETRATION IN PIG

ABSTRACT: In mammals, sperm–egg interactions are mediated by protein receptors on the sperm plasma membrane attaching to carbohydrate containing molecules on the oocyte.. Glycosidases are enzymes catalyzing hydrolytic cleavage of terminal sugar residues from glycoproteins. So, they could play a role in the modification of sperm receptors on the oocyte thus reducing the number of sperm attached and their further penetration into the ooplasm. We have reported activity for five exoglycosidades in the bovine and porcine oviductal fluid. In this study we evaluated the role of one of these glycosidases on the sperm-ZP binding and penetration in porcine oocytes. In vitro matured oocytes were partially denuded and incubated for 30 min with (0.5 µl/ml) or without β-N-acetyl-glucosaminidase. Then, oocytes were gently washed and inseminated at 2 x 10^5 spermatozoa/ml. After 10 min of coculture, oocytes were washed to remove the excess of sperm attached to the ZP and transferred to fresh TALP medium. Fertilization results were assessed at 18 h postinsemination. Incubation of oocytes with β-N-acetyl-glucosaminidase decreased the number of sperm attached to the ZP and the mean number of sperm per penetrated oocyte, so increasing monospermy rates.

Keywords: glycosidase, IVF, monospermy, pig