EFECTO DEL FLUIDO OVIDUCTAL PORCINO PRE- Y POST-OVULATORIO SOBRE LA RESISTENCIA ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Ballester[1,2], L., Martínez-Soto[3], J.C., Matás[1,2], C., Romar[1,2], R. y Coy[1,2], P.

[1]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Excelencia Internacional *Mare Nostrum*. [2]Instituto Murciano de Investigación Biomédica (IMIB). Murcia 30100, [3]IVI-Murcia, Murcia 30007. pcoy@um.es

INTRODUCCIÓN

El oviducto es el ambiente natural donde tienen lugar el transporte y la maduración final de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. La producción de fluido oviductal se encuentra bajo control hormonal y se han observado diferencias entre las distintas fases del ciclo estral. Las primeras referencias publicadas en la especie porcina indicaron valores de estrógenos y progesterona en plasma y fluido folicular de 60-70 pg/ml y 1-3 ng/ml, respectivamente, en fase folicular y de 10-30 pg/ml y 48 ng/ml en fase luteal (Henricks *et al*., 1972). Desgraciadamente no existen datos publicados de estas hormonas en el fluido oviductal.

Estudios previos han demostrado que la zona pelúcida (ZP) en el oviducto experimenta un cambio en su resistencia a la digestión enzimática que a su vez provoca un incremento en los niveles de monospermia en las especies porcina y bovina. Además, se ha demostrado que uno de los factores implicados en dicho cambio es la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1, Coy *et al*., 2008a), que es secretada por las células epiteliales oviductales y es dependiente de estrógenos (Buhi *et al*., 2000). El fluido oviductal porcino recogido alrededor del momento de la ovulación aumenta la resistencia de la ZP a la digestión enzimática (Coy *et al*., 2008a) pero se desconoce si el de la fase pre-ovulatoria es más o menos efectivo que el de la fase post-ovulatoria sobre esta modificación de la ZP. A raíz de estas consideraciones, los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar los niveles de estrógenos y progesterona en los fluidos oviductales pre- y post-ovulatorios de cerdas adultas; 2) establecer el grado de resistencia a la digestión enzimática de la ZP de ovocitos porcinos incubados en los dos tipos de fluido oviductal y 3) comprobar si los ovocitos incubados en cada uno de los fluidos presentan diferencias en su resistencia a la penetración espermática tras la fecundación *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del fluido oviductal porcino (FOP) y medición de las concentraciones de estrógenos y progesterona: Los oviductos porcinos procedentes de matadero se clasificaron tal y como describieron Carrasco *et al*., (2008) y solo se utilizaron los oviductos en las fases pre-ovulatoria (folículos de 9-11 mm de diámetro y cuerpos *albicans* del ciclo previo) o post-ovulatoria (cuerpos hemorrágicos recientes, pequeños folículos en crecimiento y presencia o ausencia de cuerpos *albicans*). Los fluidos, obtenidos por aspiración, se centrifugaron (7000 g, 10 min a 4ºC) y se almacenaron a -80ºC. Para la medición hormonal se obtuvo un volumen total de 400 µl de fluido de cada una de las fases y fueron necesarios 30 oviductos. Los valores hormonales se determinaron mediante inmunoensayo de micropartículas por quimioluminiscencia (ARCHITECT, Abbot, Illinois, EEUU).

Obtención de los ovocitos porcinos y maduración in vitro (MIV): El medio de maduración fue NCSU-37 (Petters y Wells, 1993). Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se recogieron a partir de folículos antrales (3-6 mm de diámetro). La suplementación del medio y el proceso de MIV se realizó tal y como se describió previamente (Coy *et al*., 2008b).

Tratamiento de los ovocitos en FOP y evaluación de la solubilidad de la ZP: Los ovocitos se decumularon, se incubaron en cada tipo de FOP (un ovocito por µl de fluido) y se cubrieron con aceite mineral. Las condiciones de incubación fueron 30 min a 38,5ºC y 5% de CO_2. El grupo control se incubó en PBS de Dulbecco (DPBS) en las mismas condiciones que los experimentales. Tras la incubación, se lavaron rápidamente y se transfirieron a 50 µl de solución de pronasa 0,5% (p/v) en DPBS (a 38,5ºC) para valorar los tiempos de digestión de las ZPs. El tiempo de disolución de la ZP de cada ovocito se registró como el tiempo desde la colocación del ovocito en pronasa hasta que la zona dejó de ser visible a 200x bajo un microscopio invertido. Se digirió la ZP de 10 ovocitos por cada grupo.
Fecundación in vitro *(FIV):* Grupos de 50 ovocitos decumulados se lavaron en medio TALP, se incubaron 30 min en 50 µl de FOP pre- y post-ovulatorio, se lavaron de nuevo y se transfirieron a 250 µl de medio TALP suplementado con un 1% de los FOP anteriores. El tratamiento de los espermatozoides se realizó como se describió previamente (Coy *et al*., 2008b). La concentración espermática fue de 50.000 espermatozoides/ml. A las 18 h post-inseminación se fijaron y tiñeron los posibles cigotos para evaluar los resultados (Coy *et al*., 2008b). Se realizaron tres replicados.
Análisis estadístico: Los datos se representaron como media ± SEM. Las variables fueron analizadas mediante ANOVA de una vía (tiempo de digestión de la ZP y parámetros de FIV) y las diferencias se consideraron significativas para $P<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de estrógenos y progesterona en FOP durante la fase pre-ovulatoria fueron de 83 pg/ml y 3,8 ng/ml, respectivamente. Estos valores se encuentran en un rango similar a los obtenidos por otros investigadores en plasma sanguíneo en la misma fase (Henricks *et al*., 1972; Shearer *et al*., 1972). Igualmente ocurre con las concentraciones hormonales durante la fase post-ovulatoria. En nuestro caso fueron de <10 pg/ml (por debajo del nivel de detección de la técnica) y 9,1 ng/ml para estrógenos y progesterona, respectivamente, similares a los obtenidos en análisis realizados en fluido folicular en fase post-ovulatoria (Rátky *et al*., 2005). Esto indica que nuestra selección en base a la morfología ovárica fue correcta. En consecuencia, es de suponer que los niveles de OVGP1 en el FOP pre-ovulatorio serían más altos que en el post-ovulatorio. Esta hipótesis se vio respaldada por el hecho de que el fluido pre-ovulatorio tuvo un efecto significativamente mayor sobre el tiempo de digestión de la ZP que el post-ovulatorio (33,59 ± 3,90 min y 15,05 ± 2,88 min, respectivamente), en comparación con el grupo control (1,38 ± 0,20 min). Estos resultados apoyarían de nuevo la relación directa que existe entre los niveles de OVGP1 y el grado de resistencia de la ZP a la digestión en pronasa (Coy *et al*., 2008a). El patrón hormonal de los fluidos oviductales y los datos de resistencia enzimática podrían corroborar que determinados factores oviductales, como la OVGP1, que modifican la ZP, dependen de la secreción de estrógenos, dado que el estímulo estrogénico sobre las células epiteliales del oviducto favorece la secreción de OVGP1 (Buhi *et al*., 2000). Es posible que existan otras proteínas implicadas en este proceso que también se detectarían en el FOP en los momentos cercanos a la ovulación por estímulo de los estrógenos, pero hasta el momento no han sido identificadas. El análisis proteómico de ambos tipos de fluido, que actualmente estamos realizando, aportará información complementaria a este estudio.
En la FIV se observó una tasa de monospermia significativamente mayor tras la incubación de los ovocitos en fluido pre-ovulatorio, además de ser menor el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (S/O) y los adheridos a la ZP, en comparación con el fluido post-ovulatorio (tabla 1). Estos datos podrían interpretarse desde el punto de vista fisiológico si tenemos en cuenta que, *in vivo*, la fecundación tras la inseminación o monta natural durante el estro es monospérmica, mientras que la inseminación retardada produce polispermia en cerdos (Hunter, 1967). Debido a que unas horas después de la ovulación disminuyen los niveles de estrógenos en el oviducto como hemos comprobado en este estudio, podría deducirse que se reduce el efecto que produce la OVGP1 sobre la resistencia de la ZP, como también corroboran

nuestros resultados relativos a la menor resistencia de la ZP a la digestión en presencia de fluido oviductal post-ovulatorio. Como consecuencia de esta menor resistencia, la polispermia aumentaría y, con ello, se reduciría la eficiencia en la fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En conclusión, los datos del presente estudio apoyan la hipótesis de que los niveles hormonales en el fluido oviductal antes y después de la ovulación determinan el grado de resistencia de la ZP a la digestión enzimática, así como el éxito en la fecundación, siendo el fluido de la fase inmediatamente pre-ovulación el que ofrece las condiciones óptimas para el encuentro entre los gametos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Buhi, W.C., Álvarez, I.M. & Kouba, A.J. 2000. Cells Tissues Organs. 166: 165-179. • Carrasco, L.C., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J. & Coy, P. 2008. Reproduction.136: 833-842. • Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M., Romar, R., Grullón, L., Matás, C. & Avilés, M. 2008a. Proc Natl Acad Sci USA. 105: 15809-15814. • Coy, P., Grullón, L., Cánovas, S., Romar, R., Matás, C. & Avilés, M. 2008b. Reproduction. 135: 19-27. • Henricks, D.M., Guthrie, H.D. & Handlin, D.L. 1972. 6: 210-218. • Hunter, R.H. 1967. J Reprod Fert. 13: 133-147. • Petters, R.M. & Wells, K.D. 1993. J Reprod Fertil Suppl. 48: 61-73. • Rátky, J., Torner, H., Egerszeg, I., Schneider, F., Sarlos, P., Manabe, N. & Brüssow K.P. 2005. J Reprod Dev. 51: 109–115. • Shearer, I., Purvis, J., Jenkin, G. & Haynes, N.B. 1972. J Reprod Fert. 30: 347-360.

Agradecimientos: A Soledad Rodríguez y a Juan Antonio Carvajal, por su asistencia técnica en la obtención de fluido oviductal y en la preparación de medios de cultivo.
Trabajo financiado por el MEC-FEDER (AGL2009-12512-C02-01) y el MINECO (AGL2012-40180-C03-01).

***Tabla 1**: Efecto de la incubación de ovocitos en fluido oviductal porcino pre- (FOP pre) y post-ovulatorio (FOP post) sobre los resultados de fecundación in vitro.*

Grupo	N	Penetración (%)	Monospermia (%)	S/O	Espermatozoides adheridos a la ZP
FOP pre	155	85,81 ± 2,81[a]	34,59 ± 4,14[a]	2,29 ± 0,11[a]	8,43 ± 0,65[a]
FOP post	150	95,33 ± 1,73[b]	11,19 ± 2,65[b]	3,63 ± 0,19[b]	12,63 ± 1,10[b]

Nota: [a, b] en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05)
S/O: Número de espermatozoides en el interior de cada ovocito

EFFECT OF THE PRE- AND POST- OVULATORY PORCINE OVIDUCTAL FLUID ON THE ENZYMATIC RESISTANCE OF THE ZONA PELLUCIDA AND THE IN VITRO FERTILIZATION RESULTS

ABSTRACT: Porcine oviductal fluid (OF) from animals at the late follicular phase of the estrous cycle or after ovulation was collected, and estrogen and progesterone levels were assessed. Pre-ovulatory OF contained higher concentrations of estradiol than progesterone, whereas the opposite occurred for post-ovulatory OF. Pre- and post-ovulatory OF was used to incubate porcine oocytes for 30 min. ZP digestion time (assessed by 0.5% pronase) and in vitro fertilization parameters assessed after incubation indicated that the pre-ovulatory OF, with higher estrogen concentration, increased the resistance of the ZP to enzymatic digestion and the levels of monospermy after IVF. These results suggest that, under physiological conditions, the effect of the oviductal fluid on the ZP enzymatic resistance can be a key factor for the success of fertilization by reducing the chances of polyspermy.

Keywords: porcine oviductal fluid, hormones, ZP digestion time, IVF.