LOCALIZACIÓN DE HAPTOGLOBINA EN EL OVIDUCTO PORCINO Y SU EFECTO EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*

López-Úbeda[1,2,3], R., Soriano-Úbeda[2,4], C.,Matás[2,4], C., García-Vázquez[2,4], F.A., Avilés[1,2],M., Guillén-Martínez[1,2], A. y Izquierdo-Rico[1,2], M.J.

[1]Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, *Campus Mare Nostrum*, 30100, Murcia.[2]IMIB-Arrixaca (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria), Murcia.[3]FFIS (Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia). [4]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, *Campus Mare Nostrum*, 30100, Murcia.
mjoseir@um.es

INTRODUCCIÓN

La haptoglobina (Hp) es una proteína de fase aguda, que recientemente ha sido identificada en diferentes regiones del tracto reproductor de mamíferos, incluyendo útero de conejo (Olson *et al.,* 1997), endometrio humano (Berkova *et al.,* 2001), testículos y ovarios de rata (O'Bryan *et al.,* 1997) y útero y ovario de ratón (Friedrichs *et al.,* 1995). En un estudio anterior, nuestro laboratorio describió la presencia de ARNm de Hp en el oviducto porcino durante las distintas fases del ciclo estral (Ramón et al., 2012). La presencia de Hp, en ausencia de inflamación, en los distintos órganos reproductivos de mamíferos y concretamente en el microambiente que rodea los gametos durante su paso por el oviducto, podría indicar un papel potencial de la Hp en los eventos reproductivos.

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia y distribución de la Hp en el oviducto porcino durante la fase postovulatoria y analizar su posible efecto en un sistema de fecundación *in vitro* (FIV).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y procesado de los oviductos: Los oviductos procedentes de ovarios en fase postovulatoria se obtuvieron a partir de aparatos reproductores de cerdas cíclicas (Landrace X Large White) sacrificadas en matadero. Se realizó la disección del oviducto seleccionando la región ampular-ístmica. El tejido oviductal se fijó en paraformaldehído 4%, se deshidrató y fue embebido en parafina para la realización de cortes de un grosor de 5 µm.

Inmunohistoquímica: las preparaciones histológicas fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en una serie decreciente de etanol. El revelado antigénico se llevó a cabo en tampón citrato con pH 6 (Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero fetal bovino 6%-TBS-Tween durante 90 minutos. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo rabbit anti-pig Haptoglobin (Creative Diagnostics) a una dilución 1:10 durante toda la noche. Se realizaron lavados con TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50. Las muestras fueron reveladas mediante diaminobencidina (DAB Kit, Abcam).

Obtención de ovocitos y maduración *in vitro*: los ovocitos se aspiraron de folículos ováricos preantrales (3-6 mm de diámetro) de ovarios procedentes de matadero. La maduración se realizó en pocillos de 500 µl de medio (NCSU-37) suplementado con PMSG/HCG y dbAMPc. Pasadas 20 horas, los ovocitos fueron trasferidos a medio NCSU-37 libre PMSG, HCG y AMPc y se cultivaron durante 20-22 horas más (Funahashi y Day, 1993).

FIV: Grupos de 50 ovocitos decumulados se transfirieron a 500 µl de medio TALP suplementado con Hp a una concentración de 10 µgr/ml (en el caso del grupo control el TALP no fue suplementado). El co-cultivo se realizó añadiendo una concentración espermática entre 1-2 x 10^5 espermatozoides/ml procedentes de machos de fertilidad probada. A las 18 horas post-inseminación se fijaron los posibles cigotos en glutaraldehído al 0,5% en PBS, se tiñó el ADN con Hoechst 33342 (1mg/ml en PBS) y se evaluaron los diferentes parámetros de FIV: porcentaje de penetración, número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida, y la formación de pronúcleos. Los datos se presentan como la media ± SEM y se realizaron 3 replicados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según las imágenes obtenidas mediante inmuhistoquímica (Figura 1) se observa señal de la proteína Hp en el tejido oviductal durante la fase postovulatoria. Este hecho puede indicar una función de dicha proteína sobre la fecundación. Para comprobarlo llevamos a cabo el segundo experimento donde se realizó una FIV co-incubando los gametos (espermatozoides y ovocitos) con la proteína.

Los resultados de FIV obtenidos (Tabla 1) mostraron que la presencia de Hp en el medio de fecundación disminuye el porcentaje penetración lo que podría ser indicador de su posible unión al ovocito o al espermatozoide.

Como conclusión de este trabajo podemos decir que la proteína Hp está presente en el oviducto porcino principalmente a nivel de células epiteliales. Su función a este nivel podría estar relacionada con la unión a alguno de los gametos. Serán necesarios estudios posteriores para esclarecer la función biológica reproductiva exacta de esta proteína.

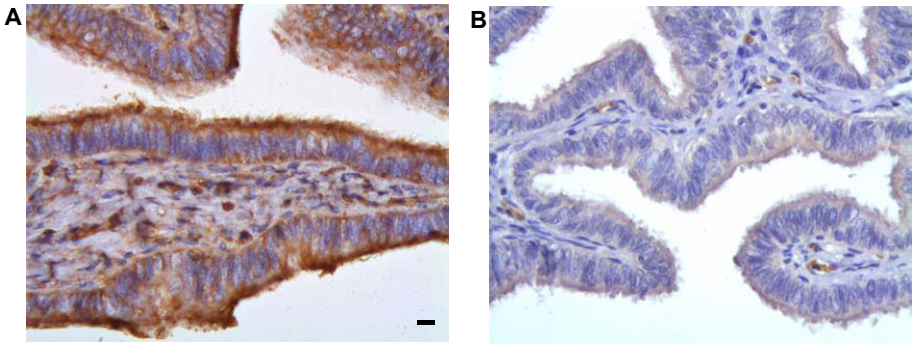


***Figura 1**. Localización inmunohistoquímica de Hp en el oviducto porcino en fase postovulatoria. A) Localización de Hp a nivel de células epiteliales (coloración marrón) B) Control: sin anticuerpo primario. Barra= 10 µm.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Olson, G.E., Winfrey, V.P., Matrisian, P.E. et al. 1997. J. Endocrinol. 152: 69–80. • Berkova N, Lemay A, Dresser DW, Fontaine JY, Kerizit J and Goupil S. 2001.Molecular Human Reproduction. 7: 747–754. • O'Bryan, M.K., Crima, J., Mruk, D. et al. 1997. J. Androl., 18: 637–645. • Friedrichs, W., Navarijo-Ashbaugh, A., Bowman, B. et al. 1995. Biochem. Biophys. Res. Commun., 292: 250–256. • Ramón, M.C., Acuña, O.S., Ruano, M.J., Avilés, M., Izquierdo-Rico, M.J.2012. Reproduction, Fertility and Development. 25:248. • Funahashi, H. & Day, B.N. 1993. J. Reprod Fertil. 98:179-185.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por Fundación Séneca 19357/PI/14 y el MINECO-FEDER AGL2015-70159-P y AGL2015-66341-R.

***Tabla 1**. Resultados de FIV obtenidos en presencia (grupo Haptoglobina) o ausencia (grupo Control) de la Hp durante la co-incubación de los gametos.*

GRUPO	N	PEN%	SPZ/ZP	PRONÚCLEOS
Control	146	89,73 ± 2,52 [a]	19,51 ± 1,11 [a]	3,45 ± 0,18 [a]
Haptoglobina	167	79,04 ± 3,16 [b]	12,50 ± 0,67 [b]	2,49 ± 0,13 [b]

* Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05).
N: número de ovocitos. PEN%: porcentaje de ovocitos penetrados. SPZ/ZP: número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. PRONÚCLEOS: número medio de pronúcleos por ovocito.

IMMUNOLOCATION OF HAPTOGLOBIN PROTEIN IN THE PORCINE OVIDUCT AND ITS EFFECT ON *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF)

ABSTRACT: Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein that has recently been identified in different regions of the mammals' reproductive tract, specifically in the microenvironment that surrounds the gametes during their passage through the oviduct, which could indicate a potential role for Hp in reproductive events. The aim of this study was to detect the presence and distribution of Hp in the porcine oviduct during the postovulatory phase and to analyse its possible effect on an *in vitro* fertilization system. The presence in the oviduct of the Hp protein was detected by immunohistochemistry using histological sections of oviducts in postovulatory phase and ejaculated sperm were co-incubated with oocytes in the presence of Hp. Immunostaining for the Hp protein detected its presence at the level of epithelial cells and added it during gametes co-incubation modulated the IVF decreasing penetration percentage and sperm binding. In conclusion, the function of the Hp protein could be related to the binding to some of the gametes.

Keywords*:* haptoglobin, oviduct, immunolocation, *in vitro* fertilization.