

EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS EZRINA, HSP70-1A Y HSP90 α EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* PORCINA

Canha, A., García-Martínez, S., Coy, P. y Romar, R

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. 30071 Campus Espinardo, "Campus Mare Nostrum". IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biomédica). Universidad de Murcia. rromar@um.es

INTRODUCCIÓN

El endurecimiento prefecundación de la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos ejercido por proteínas presentes en el fluido oviductal es reponsable, en parte, del bloqueo de la polispermia en la especie porcina. Entre las proteínas responsables de este endurecimiento se encuentran la osteopontina (SPP1) (Hao et al., 2006) y la oviductina (Coy et al., 2008a). Recientemente nuestro grupo ha identificado otras proteínas que están presentes en el fluido oviductal que endurece la ZP pero ausentes en fluido que no ejerce este efecto (Mondéjar et al., 2013). Entre las proteínas con posible efecto endurecedor se encuentran la ezrina y otras de la familia de las proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSP) como la HSP70-1A y la HSP90 α . La ezrina tiene un papel conocido en la capacitación espermática mediante la formación del complejo ezrina-radixina-actina (Wang et al., 2008). Por su parte, las HSP son una amplia familia de proteínas chaperonas, altamente conservadas entre especies, con numerosas funciones descritas sobre la fecundación y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos (revisado por Neuer et al., 2000). Sin embargo, el posible papel de estas proteínas en el mecanismo de endurecimiento de la ZP y la posterior fecundación en condiciones *in vitro* no se ha estudiado todavía. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la ezrina, HSP70-1A y HSP90 α sobre el endurecimiento de la ZP y los resultados de la fecundación *in vitro* en ovocitos porcinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de cerdas prepúberes (Landrace x Large White) mediante la aspiración de los folículos entre 3-6 mm de diámetro y se transfirieron a medio de maduración NCSU-37 siguiendo los protocolos de nuestro laboratorio (Coy et al., 2008). Una vez maduros (42-44 h), los ovocitos se denudaron y se incubaron 1h en medio TALP suplementado con ezrina (200 ng/ml; #ab91744, Abcam), HSP70-1A (550 ng/ml; #ADI-ESP-555, Enzo Life Sciences) y HSP90 α (550 ng/ml; #ADI-SPP-776, Enzo Life Sciences). El grupo control se mantuvo en medio TALP sin proteínas. Pasado el tiempo de incubación, los ovocitos se lavaron en PBS y se valoró el tiempo de digestión de la ZP a 38,5°C transfiriéndolos a una solución de pronasa al 0,5% en PBS. Se realizaron cuatro replicados con 6-7 ovocitos por grupo. En un segundo experimento, los ovocitos maduros se denudaron, se lavaron en medio TALP y se transfirieron a pocillos conteniendo 250 μ l de medio TALP suplementado con las proteínas a la concentración indicada anteriormente para ser inseminados (25-30 ovocitos/pocillo). Los espermatozoides, procedentes de la fracción rica del eyaculado de verracos de fertilidad probada, se diluyeron 1:1 v/v en BTS (Pursel y Johnson, 1975) y se centrifugaron (700g, 30 min) en un gradiente 45-90% v/v de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (Coy et al., 2008). El pellet obtenido se diluyó en medio TALP, se centrifugó de nuevo (100g, 10 min) y el sedimento se resuspendió en medio TALP para añadirse a los pocillos conteniendo los ovocitos, a una concentración final de 2×10^4 espermatozoides/ml. Los gametos se co-cultivaron 18-20 h y se realizaron tres replicados. Pasado este tiempo los posibles cigotos se fijaron 30 min en glutaraldehído al 0,5% en PBS y para teñir el ADN se incubaron posteriormente 15 min con Hoechst 33342 (1mg/ml en PBS; #B-2261; Sigma-Aldrich, Madrid, España). Tras la fecundación se valoró la penetrabilidad espermática, la formación de pronúcleo masculino, la monospermia y el número de espermatozoides adheridos a la ZP. Los datos se presentan como media \pm SEM. Las variables (tiempo de digestión de la ZP y parámetros de FIV) fueron analizadas mediante un ANOVA y las diferencias se consideraron significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de digestión de la ZP mostraron un efecto significativo de las tres proteínas estudiadas sobre el endurecimiento de la ZP tras la incubación de los ovocitos. La ZP del grupo control tardó en digerirse $66,0 \pm 2,1$ s ($n=27$) y la incubación con HSP70 y HSP90 α aumentó este tiempo a $81,6 \pm 2,8$ s ($n=25$) y $79,7 \pm 3,8$ s ($n=25$) respectivamente ($P<0,0001$). La ezrina fue la proteína que indujo un mayor efecto endurecedor ($113,9 \pm 3,5$ s; $n=25$) siendo mayor al grupo control y a ambas HSPs ($P<0,0001$). A pesar de que el endurecimiento de la ZP se puede calificar de discreto, los resultados preliminares de FIV se mostraron en consonancia con lo observado. Así pues, los ovocitos inseminados en presencia de ezrina mostraron una penetrabilidad significativamente inferior a la del grupo control y a ambas HSPs (Tabla 1; $P<0,0001$). Consecuentemente, el número de espermatozoides por ovocito penetrado fue menor en el grupo ezrina aumentando así los porcentajes de monospermia de valores en torno al 20%, para los grupos control y HSPs, a casi el 80% para el grupo ezrina. Curiosamente, el efecto de la ezrina sobre el descenso de penetrabilidad no parece deberse a la disminución del número de espermatozoides que se une a la ZP, ya que éste fue similar al grupo control (en torno a 25 células). Este efecto sobre la penetrabilidad no se observó para ambas HSPs. Una hipótesis para explicar estos resultados sería que estas proteínas estuvieran ejerciendo un efecto favorecedor sobre la funcionalidad espermática capaz de superar el discreto endurecimiento que realizan sobre la ZP. Ambas proteínas tienen un efecto demostrado sobre la interacción entre gametos y están presentes en los espermatozoides porcinos, donde varían su localización conforme se produce la capacitación y reacción acrosómica (Spinaci et al., 2005; Volpe et al., 2008). En cerdos, la fecundación in vitro en presencia de anti-HSP70 reduce la penetrabilidad (Spinaci et al., 2005) y la HSP90 regula la motilidad espermática (Huang et al., 2000) por lo que se hacen necesarios más replicados de FIV y estudios de funcionalidad espermática para dilucidar el efecto de estas HSPs sobre la interacción entre gametos.

En la especie porcina, la relación directa entre el endurecimiento de la ZP y el descenso en la penetrabilidad ya ha sido descrita previamente por nuestro grupo (Cánovas et al., 2009; Coy et al., 2008b). En este estudio, el endurecimiento inducido por la ezrina fue discreto pero los cambios inducidos parecen ser suficientes para traducirse en un marcado descenso de los espermatozoides con capacidad para atravesar la ZP y fecundar al ovocito. Por otra parte, la ezrina podría estar afectando a la funcionalidad espermática. Recientemente, Piehl et al. (2013) han descrito la presencia de ezrina en exosomas de verraco atribuyéndole una función estabilizadora de la membrana celular previniendo así la capacitación espermática. Una hipótesis sería que la concentración de ezrina utilizada durante el cocultivo de los gametos en nuestro estudio podría estar afectando la funcionalidad espermática. Se requieren más estudios para valorar el posible efecto de esta proteína sobre la capacitación y reacción acrosómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cánovas, S., Romar, R., Grullon, L.A., Aviles, M. & Coy P.2009. *Reproduction*. 137: 803-812.
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C. & Avilés, M. 2008a. *ProcNatlAcadSci USA*. 105: 15809-15814.
- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C. & Aviles, M. *Reproduction*. 2008b. 135:19-27.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J. & Prather, R.S. 2006. *Biol Reprod*.75: 726-298.
- Huang, S.Y., Tam, M.F., Hsu, Y.T., Lin, J.H., Chen, H.H., Chuang, C.K., Chen, M.Y., King, Y.T., Lee, W.C. 2005. *Theriogenology*. 64: 1940-1955.
- Mondéjar, I., Martínez-Martínez, I., Avilés, M. &Coy, P. 2013. *Biol Reprod*. 89: 67-74.
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z&Witkin, S.S. 2000. *Hum Reprod Update*. 6:149-159.
- Piehl, L.L., Fischman, M.L., Hellman, U., Cisale, H., Miranda, P.V. 2013. *Theriogenology*. 79: 1071-1082.
- Spinaci, M., Volpe, S., Bernardini, C., DeAmbrogi, M., Tamanini, C., Seren, E., Galeati, G. 2005. *Mol Reprod Dev*. 72: 534-541.
- Pursel, V.G. & Johnson, L.A. 1975. *J. Anim Sci*. 40: 99-102.
- Volpe, S., Galeati, G.,

Bernardini, C., Tamanini, C., Mari, G., Zambelli, D., Seren, E., Spinaci, M. 2008. *Reprod Dom Anim.* 43: 385-392. •Wang, L., Chen, W., Zhao, C., Huo, R., Guo, X.J., Lin, M., Huang, X.Y., Mao, Y.D., Zhou, Z.M. & Sha, J.H. 2010. *Asian J Androl.* 12: 667-676.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

Tabla 1: Efecto de las proteínas sobre los resultados de fecundación *in vitro*. *PEN:* porcentaje de ovocitos penetrados respecto a los inseminados; *MON:* porcentaje de ovocitos monospermicos respecto a los penetrados; *SPZ/O:* número medio de espermatozoides por ovocito penetrado; *PNM:* porcentaje de ovocitos con pronúcleo masculino; *SPZ/ZP:* número medio de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida.

Grupo	N	PEN (%)	MON (%)	SPZ/O	PNM (%)	SPZ/ZP
Control	80	86,2±3,9a	22,0±5,1a	2,8±0,2a	97,0±2,06	26,9±1,3ab
HSP70-1A	82	75,6±4,8a	29,0±5,8a	2,4±0,2a	100	33,0±1,9c
HSP90α	81	86,3±4,9a	18,0±5,9a	2,6±0,2a	100	28,6±1,3ac
Ezrina	78	28,0±5,1b	78,0±8,8b	1,3±0,1b	100	23,7±1,3b
<i>P valor</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0005	0,2837	<0,0001

a,b,c: en la misma columna indican diferencias entre grupos

EFFECT OF EZRIN, HSP70-1A AND HSP90α PROTEINS ON PORCINE IN VITRO FERTILIZATION

ABSTRACT: The prefertilization hardening of the zona pellucida (ZP) decreases polyspermic fertilization in pigs. Specific proteins responsible of that ZP changes are the osteopontin (SPP1) and oviductin (OVGP1). Recently, other oviductal factors have been identified as potential inducers of ZP hardening. Among these proteins are ezrin and heat shock proteins such as HSP70-1A and HSP90α. However, its potential role on ZP hardening and further fertilization results have not been studied yet. This work was designed to test whether the incubation of *in vitro* matured pig oocytes with these proteins can harden the ZP and affect further fertilization results. Incubation of matured oocytes for 1 h in TALP medium supplemented with ezrin (200 ng/ml), HSP70-1A (500 ng/ml), HSP90α (500 ng/ml) or without protein (control group) showed differences in ZP digestion time being higher in the ezrin group (113.9 ± 3.5 s; n=25) compared with control (66.0 ± 2.1 s; n=27), HSP70-1A (81.6 ± 2.8 s; n=25) and HSP90α group (79.7 ± 3.8 s; n=25). Presence of ezrin during gametes coculture showed a significant decrease in penetrability and an increase on monospermy rate. The role of ezrin preventing sperm capacitation may explain these results but further studies are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: ezrin, Hsp70-1A, Hsp90α, fertilization