

DIFERENCIAS ENTRE OCHO ESPECIES DE MAMÍFEROS EN LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA INDUCIDA POR EL FLUIDO OVIDUCTAL

Mondéjar, I., Avilés, M. y Coy, P.¹

¹Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30071, España. E-mail: pcoy@um.es

INTRODUCCIÓN

La resistencia de la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos a la digestión enzimática mediante proteasas ha sido un parámetro que clásicamente se ha relacionado con el control de la polispermia y cuyo incremento se consideraba, hasta hace muy poco, una consecuencia de la reacción cortical tras la entrada del espermatozoide (Gulyas & Yuan, 1985). Sin embargo, como se ha demostrado recientemente (Coy et al., 2008), el contacto de la ZP de ovocitos de cerda y de vaca con el fluido oviductal de la propia especie o de una heteróloga, en ausencia de espermatozoides, provoca un aumento muy marcado de la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa. Este aumento dificulta la entrada de espermatozoides en el ovocito y está directamente relacionado con el control de la polispermia. Además, se ha comprobado que el contacto del ovocito con el fluido oviductal previo a la fecundación también mejora el posterior desarrollo embrionario (Lloyd et al., 2009). El nuevo mecanismo descrito, denominado “endurecimiento pre-fecundación de la ZP”, está mediado por la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1) y por glicosaminoglicanos sulfatados como la heparina. Hasta el momento, no se sabe si este mecanismo está presente en todas las especies de mamíferos ni si los factores responsables del mismo (OVGP1 y S-GAGs) tienen un efecto heterólogo entre especies distintas a la porcina y la bovina. Dado el interés que podría tener para la mejora de los sistemas de producción *in vitro* de embriones, el objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto homólogo y heterólogo del fluido oviductal de 5 especies de mamíferos sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa en ovocitos de 8 especies, también de mamíferos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado ovocitos madurados *in vitro* de las especies bovina (*Bos taurus*), caprina (*Capra hircus*), porcina (*Sus scrofa domestica*) y ovina (*Ovis aries*); y ovocitos madurados *in vivo*, obtenidos tras un tratamiento con gonadotropinas, de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), hámster (*Mesocricetus auratus*), rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*). Los ovocitos madurados *in vitro* fueron decumulados mecánicamente con una pipeta automática; los ovocitos tubáricos de ratas y los de folículos preovulatorios de conejo, hámster y ratón fueron decumulados usando hialuronidasa (1 mg/ml). Posteriormente, todos los ovocitos se lavaron tres veces en tampón fosfato salino (PBS) y se trataron con el correspondiente fluido oviductal (FO). El FO usado procedió de animales adultos en fase folicular tardía de las especies bovina, porcina, ovina, caprina y de conejo y se extrajo según el protocolo descrito previamente (Carrasco et al., 2008). Los ovocitos se incubaron en gotas de fluido oviductal (FO) a razón de 1 ovocito por cada microlitro (μ l) de FO en placas cubiertas con aceite mineral que se mantuvieron a 38,5 °C bajo 5 % de CO₂ y al 100% de humedad durante 30 minutos. En cada experiencia se usó también un grupo control en el que los ovocitos no se trataron con ningún FO. Para conocer el tiempo de digestión de la ZP de los ovocitos no tratados y los tratados con FO, los ovocitos se extrajeron de las gotas correspondientes a cada tratamiento, se lavaron rápidamente en PBS y se introdujeron en gotas de 50 μ l de solución de pronasa (*Streptomyces griseus*) al 0,5 % (p/v) en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Coy et al., 2002). El proceso de disolución de las ZPs fue continuamente revisado bajo un estereomicroscopio con una platina calefactora a 38 °C y se fue anotando el tiempo de disolución de cada ZP (tiempo en el que deja de visualizarse por completo la ZP) al cual nos referiremos como tiempo de digestión de la ZP. Se realizó un análisis bivalente para analizar si las variables usadas fluido oviductal y especie de ovocito influyen de forma individual y de forma simultánea al tiempo de digestión de las ZP mediante el test estadístico ANOVA (p<0,001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los resultados obtenidos nos indica que existen diferencias significativas entre los diferentes fluidos oviductales empleados por especie de ovocito y entre las diferentes especies de ovocitos usadas por cada fluido oviductal. Para simplificar el análisis de los resultados, se realizó un análisis de la varianza (Anova) analizando el tiempo de digestión de cada especie de ovocito cuando estos son tratados con los diferentes fluidos oviductales, observándose las diferencias significativas que se muestran en la Tabla 1. Los datos obtenidos indican que cuando se analizan los ovocitos control todos ellos se digieren en pocos minutos excepto el hámster que tarda en hacerlo horas. Aún así, todos los ovocitos tratados aumentan su resistencia a la digestión de la ZP con pronasa en mayor o menor grado según se haya usado un FO u otro, con la excepción de la rata y el ratón. En estas especies la ZP presenta un tiempo de digestión similar a los controles excepto en la rata con el FO de coneja y en el ratón con los FOs caprino y de conejo en los que sí se produce un aumento en el tiempo de digestión de la ZP. Por todo ello, se puede concluir que los diferentes tipos de FOs analizados tienen la capacidad homóloga y heteróloga de producir un aumento de la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa y que podrían ser usados en general en los sistemas in vitro para la disminución de la polispermia, excepto en los casos comentados de la rata y el ratón. Las diferencias observadas entre las distintas especies podrían estar relacionadas con la diferente composición de la ZP. Así, se observa que hay especies que poseen 3 proteínas y otras con 4 proteínas (Conejo, hámster y rata)(Hoodbhoy et al., 2005; Izquierdo-Rico et al., 2009). Otro factor que puede estar implicado en estas diferencias es la diferente longitud de la mucina OVGP1 siendo más efectiva aquella procedente de la coneja, que presenta un menor número de aminoácidos (Avilés et al., 2010). Además, el diferente grado de glicosilación de la OVGP1 podría influenciar este proceso. Son necesarios estudios adicionales para esclarecer este proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avilés, M., Gutiérrez-Adan, A., Coy, P. 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 16, 896-906
- Carrasco, L. C., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J., Coy, P. 2008. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*. 136: 833-42
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M., Romar, R., Grullón, L., Matás, C., Avilés, M. 2008. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15809-15814.
- Coy, P., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., García, E. 2002. Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction*. 124: 279-288.
- Gulyas, B. J., Yuan, L. C. 1985. Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J Exp Zool* 233: 269-276.
- Hoodbhoy, T., Joshi, S., Boja, E.S., Williams, S. A., Stanley, P., Dean, J. 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 280: 12721-31.
- Izquierdo-Rico, M. J., Jiménez-Movilla, M., Llop, E., Pérez-Oliva, A. B., Ballesta, J., Gutiérrez-Gallego, R., Jiménez-Cervantes, C., Avilés, M. 2009. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *J Proteome Res* 8: 926-41
- Lloyd, R., Romar, R., Matás, C., Gutiérrez-Adan, A., Holt, W., Coy, P. 2009. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* 137: 679-687.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y del FEDER para los proyectos AGL2009-12512-C02-01 y 02.

Tabla 1. Tiempo de digestión de la ZP (horas) de ovocitos de diferentes especies tratados con diferentes fluidos oviductales.

FO Ovocito	Control-	FO Bovino	FO Caprino	FO Conejo	Ovino	Porcino	P-value
Bovino	0,05±0,01 a N=28	196,50 ± 28,56bc N=10	172,10±34,59b N=10	288,00 ± 0,00c N=10	105,90±25,37b N=10	1,78±,03a N=10	<0,001
Caprino	0,06±0,01a N=17	42,15±22,13ab N=10	13,45±3,70a N=10	240,00±0,00c N=10	120,10±32,76b N=10	0,72±0,24a N=10	<0,001
Conejo	0,04±0,01a N=10	13,95±1,29a N=10	110,40±6,40b N=10	120,00±0,00b N=9	120,00±0,00b N=10	6,48±1,01a N=10	<0,001
Hámster	24,42±4,79a N=22	26,85±10,35a N=10	47,55±15,81a N=10	288,00±0,00b N=17	240,00±3,58b N=10	63,30±12,99a N=10	<0,001
Ovino	0,09±0,01a N=20	76,86±32,55ab N=10	0,60±0,14a N=10	168,00 ± 0,00c N=10	88,27±32,54ab N=10	0,48±0,13a N=10	<0,001
Porcino	0,05±0,01a N=30	98,30±38,57b N=10	5,15±1,24a N=10	288,00±0,00c N=10	4,51±0,28a N=10	9,20±2,24a N=10	<0,001
Rata	0,07±0,01a N=21	0,04±0,01a N=10	0,05±0,01a N=10	207,43 ± 24,47b N=14	0,06±0,01a N=10	0,06±0,01a N=10	<0,001
Ratón	0,04±0,01a N=10	0,07±0,01a N=7	14,86±1,64a N=10	96,00±8,00b N=10	0,06±0,01a N=7	0,04±0,01a N=7	<0,001

DIFFERENCES AMONG EIGHT MAMMALIAN SPECIES IN THE ZONA PELLUCIDA RESISTANCE TO ENZYMATIC DIGESTION INDUCED BY OVIDUCTAL FLUID

ABSTRACT: The pre-fertilization zona pellucida (ZP) hardening is a mechanism recently described affecting, at least, porcine and bovine oocytes. By this mechanism, the ZP of oocytes in contact with oviductal fluid binds oviductal-specific glycoprotein (OVGP1) and increases its resistance to proteolytic digestion and to sperm entry. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) reinforce OVGP1-ZP binding and prolong the effect along time. The present study tried to find out if this mechanism exists in other mammalian species different from the pig and cow and if the responsible molecules in the oviductal fluid of each species can act on ZP of heterologous oocytes. With this purpose, *in vitro* matured oocytes from bovine, caprine, porcine and ovine species and *in vivo* matured oocytes from rabbit, hamster, rat and mouse were incubated in oviductal fluid collected at the end of the follicular phase from bovine, porcine, ovine, caprine and rabbit oviducts. The results showed that all the oocytes incubated with each oviductal fluid increased at a variable level their resistance to pronase digestion, except rat and mouse. Rat oocytes were affected only by rabbit oviductal fluid and mouse oocytes were affected only by rabbit and goat oviductal fluids. In conclusion, the effect of oviductal fluid on pre-fertilization zona pellucida hardening is not species-specific, and represents a common mechanism for different mammals.

Keywords: Oviductal fluid, zona pellucida, hardening, mammals.