

## GLICOSIDASAS EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS EYACULADOS Y EPIDIDIMARIOS

De Ondiz, A.<sup>1,2</sup>, Avilés, M.<sup>3</sup>, García-Vázquez, F.A.<sup>2</sup> y Ruiz, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Cs. Veterinarias. Universidad del Zulia. Venezuela.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología y <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular e Histología.  
Universidad de Murcia. 30071. Murcia. España. E-mail: aitor.de@um.es

### INTRODUCCIÓN

La fecundación es un conjunto complejo de procesos en el que hasta el día de hoy todavía existen muchos interrogantes. El estudio de sus diferentes etapas contribuirá a la mejora de la eficiencia en los sistemas de cultivo *in vitro* cuyo objetivo final es reproducir el proceso fisiológico lo más fielmente posible (Wassarman et al., 2005; Shur, 2008; Avilés et al., 2010). Durante la fecundación, las interacciones entre los espermatozoides y el ovocito a nivel molecular, con especial detalle en la membrana plasmática espermática con la zona pelúcida (ZP), células del *cumulus oophorus* y células epiteliales del oviducto, se producen entre proteínas y carbohidratos (Tulsiani et al., 1989; Shur, 2008). El papel de algunas de las enzimas que participan en estas reacciones es conocido sólo parcialmente (Shur, 2008).

Se han propuesto varias proteínas de la superficie de los espermatozoides en diversas especies que funcionan como moléculas de unión a la ZP (Tulsiani et al., 1989; Avilés et al., 1996; Wassarman et al., 2005; Shur, 2008). Las glicosidasas son las enzimas responsables de la rotura hidrolítica de las uniones glucosídicas en la naturaleza. Estas enzimas han sido propuestas en diferentes mamíferos (rata, ratón, hámster, conejo, cerdo y hombre) como un elemento importante del reconocimiento y la unión de los gametos durante la fecundación (Tulsiani et al., 1989; Avilés et al., 1996; Larson y Miller, 1997; Song et al., 2000; Venditti et al., 2007; 2010). Estas glicosidasas espermáticas tienen su mayor actividad en condiciones de pH ácido por tener un comportamiento como enzimas lisosomales, pero al mismo tiempo se está investigando su papel en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y cuantificar los niveles de actividad enzimática de siete glicosidasas ( $\alpha$ -D-manosidasa,  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -D-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosaminidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, y N-neuraminidasa) en espermatozoides porcinos eyaculados y epididimarios, en condiciones de pH fisiológico.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Los espermatozoides eyaculados fueron obtenidos de verracos de fertilidad probada mediante el método de extracción manual. Los espermatozoides epididimarios se obtuvieron de epidídimos de verracos (80-120 kg peso vivo) sanos sacrificados en matadero. Una vez en el laboratorio, los testículos junto con los epidídimos fueron lavados con solución salina fisiológica atemperada, procediéndose tras ello a la separación del epidídimo del testículo y luego a la disección de la cola del epidídimo. Posteriormente, se inyectó 2 ml de aire en el conducto deferente (próximo a la cola del epidídimo) utilizando una aguja de 21G acoplada a una jeringuilla de 5 ml para extraer el fluido epididimario junto con los espermatozoides. Una vez obtenidos los espermatozoides eyaculados y epididimarios se lavaron 3 veces en PBS (*Phosphate Buffer Solution*) para eliminar el plasma seminal o el fluido epididimario, ajustándose la concentración espermática en función de la glicosidasa a evaluar.

La actividad de siete glicosidasas ( $\alpha$ -D-manosidasa,  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -D-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosaminidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, y N-neuraminidasa) se determinó de manera simultánea en los espermatozoides porcinos eyaculados y epididimarios. Se trabajó con 2 concentraciones distintas para los diferentes tipos de espermatozoides (esp), debido a que con estas concentraciones las enzimas realizan su función en condiciones de linealidad, evitándose así la saturación del sistema que podría producir niveles erróneos de actividad enzimática. Las concentraciones espermáticas fueron  $25 \times 10^6$  esp/ml para la determinación de la actividad enzimática de  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\alpha$ -L-fucosidasa y  $250 \times 10^6$  esp/ml, para las enzimas  $\beta$ -D-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosaminidasa y N-neuraminidasa.

Estas muestras fueron evaluadas por el protocolo descrito previamente por Avilés et al. (1996), para  $\alpha$ -L-fucosidasa espermática en la rata. Se utilizaron sustratos sintéticos específicos unidos al grupo fluoróforo 4-metilumbeliferil-glicósido (4MUB), de manera que cuando existe la enzima correspondiente en la muestra a evaluar, ésta rompe el enlace y libera un producto fluorescente. El fluoróforo liberado emite fluorescencia a una determinada longitud de onda, siendo ésta proporcional a la actividad de la glicosidasa en el medio estudiado; por lo tanto, la actividad de las glicosidasas fue analizada midiendo la liberación del 4-metilumbeliferil-glicósido. La cantidad de fluoróforo liberado se determinó por fluorescencia con la ayuda de un espectrofluorímetro Fluostar Galaxy (BMG Lab. Technologies, Durham, Carolina del Norte, EEUU) a una longitud de onda de 340 nm y 450 nm de excitación y emisión, respectivamente. Tanto las muestras como los controles se dispusieron, para su medición, en una placa de 96 pocillos con 200  $\mu$ l de muestra/pocillo.

A partir de los valores netos de fluorescencia se transformaron éstos en cantidad de 4MUB producida y se calcularon los datos finales de actividad enzimática. La actividad enzimática (AE) se definió como la actividad de cada una de las glicosidasas expresada en unidades, considerando que 1 unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima necesaria ubicada en determinado número de espermatozoides ( $10 \times 10^7$ ) para liberar 1 nmol de sustrato (4-metilumbeliferil-glicósido) por minuto a 37°C y pH=7 (Avilés et al., 1996). Se comparó estadísticamente la actividad enzimática entre las distintas glicosidasas. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía. Cuando el ANOVA señaló efecto significativo los valores fueron cotejados por una prueba de comparación de medias de Tukey considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron las medias obtenidas en las glicosidasas encontradas en los espermatozoides porcinos tanto eyaculados como epididimarios como fase inicial del estudio de la función de las glicosidasas espermáticas durante la fecundación porcina y poder evaluar la acción de estas enzimas en espermatozoides eyaculados y epididimarios durante la fecundación *in vitro* (FIV) (Tabla 1). Los valores medios detectados para los espermatozoides eyaculados difieren de los epididimarios para la enzima  $\alpha$ -D-manosidasa ( $P \leq 0,05$ ) esto se podría deber a que parte de esta glicosidasa se incorpora al espermatozoide cuando entra en contacto con el plasma seminal (PS), ya que el PS contiene  $\alpha$ -D-manosidasa. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para las enzimas  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -D-glucosaminidasa y  $\beta$ -D-galactosaminidasa cuando se compararon espermatozoides eyaculados y epididimarios ( $P > 0,05$ ). Tanto en espermatozoides eyaculados como epididimarios no se encontró actividad enzimática significativa para  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa y N-neuraminidasa, en condiciones de pH fisiológico.

Estos resultados indican que las enzimas  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\alpha$ -L-fucosidasa son las glicosidasas con mayor actividad de las analizadas en los espermatozoides porcinos (eyaculados y epididimarios) a pH=7. Este resultado es similar al observado previamente para estas enzimas en los espermatozoides de otras especies (ratón, rata, hombre, cerdo) Es importante mencionar que en el cerdo los resultados previos reportados son en condiciones de pH ácido y no como las de este estudio, realizado en condiciones fisiológicas inherentes a las condiciones en las que se desarrolla la fecundación (Tulsiani et al., 1989; 1990; Cornwall et al., 1991; Avilés et al., 1996; Song et al., 2000). La actividad de todas estas glicosidasas ha sido previamente descrita en el fluido oviductal porcino (Carrasco et al., 2008). Podemos concluir que en espermatozoides porcinos y en diferentes estadios de maduración, las glicosidasas referidas anteriormente presentan actividad enzimática en condiciones fisiológicas y que estas enzimas pueden tener un papel durante el reconocimiento de gametos y la fecundación, que debemos estudiar con el fin de establecer sistemas de FIV de mayor eficiencia en esta especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avilés, M., Abascal, I., Martínez-Menárguez, J., Castells, M., Skalaban, S., Ballesta, J., Alhadeff, J. 1996. *Biochem J.* 318: 821-831.
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., Coy, P. 2010. *Mol Hum Reprod.* 16: 896-906.
- Carrasco, L., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J., Coy, P. 2008. *Reproduction* 136: 833-842.
- Cornwall, G., Tulsiani, D., Orgebin-Crist, M. 1991. *Biol Reprod.* 44: 913-921.
- Larson, J., Miller, D. 1997. *Biol Reprod.* 57: 442-453.
- Shur, B. 2008. *Int J Dev Biol.* 52: 703-715.
- Song, X. X., Park, K. W., Iga, K., Niwa, K. 2000. *J Reprod Dev.* 46: 115-125.
- Tulsiani, D. R. P., Skudlarek, M. D., Orgebin-crist, M. C. 1989. *J Cell Biol.* 109: 1257-67.
- Tulsiani, D., Skudlarek, M., Orgebin-Crist, M. 1990. *Biol Reprod.* 42: 843-858.
- Venditti, J. J., Donigan, K. A., Bean, B.S., 2007. *Mol Reprod Dev.* 74: 758-766.
- Venditti, J. J., Swann, J., Bean, B. 2010. *Biol Reprod.* 82: 572-579.
- Wassarman, P., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C., Litscher, E. 2005. *Mol Cell Endocrinol.* 234: 95-103.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyectos AGL2006-03495 y AGL2009-12512-C02-01) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Fundación Séneca 0452/GERM/06, 08752/PI/08 y Vitrogen Project).

**Tabla 1.** Actividad enzimática (AE) de las glicosidasas en espermatozoides ( $10 \times 10^7$ ) porcinos eyaculados y epididimarios.

Glicosidasas (n=8)	AE (Eyaculados)	AE (Epididimarios)
$\alpha$ -D-manosidasa	9,42 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>
$\alpha$ -L-fucosidasa	1,93 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
$\beta$ -D-glucosaminidasa	0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
$\beta$ -D-galactosaminidasa	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,21 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ); n= número de muestras analizadas.

### GLYCOSIDASES IN EJACULATED AND EPIDIDYMAL PORCINE SPERM

**ABSTRACT:** Fertilization in mammals is mediated by protein receptors on the sperm plasmatic membrane attaching to carbohydrate molecules on the oocyte. Glycosidases are enzymes catalyzing hydrolytic cleavage of terminal sugar residues from glycoproteins. For this reason the glycosidases could play a role in recognition of gametes and fertilization. In this work we report the enzymatic activity of 4 glycosidases in porcine ejaculated and epididymal spermatozoa. The results showed that  $\alpha$ -D-manosidase activity was significantly higher in ejaculated than epididimal group ( $P \leq 0.05$ ). The activity of the others enzymes was statistically similar in both groups ( $P > 0.05$ ). No significant enzyme activity was found for  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-galactosidase and N-neuraminidase in physiological pH conditions. The highest enzyme activity was found in  $\alpha$ -D-manosidase and  $\alpha$ -L-fucosidase in both spermatozoa origin. We conclude that in spermatozoa at different stages of maturation, the glycosidases mentioned above have enzymatic activity under physiological conditions and that these enzymes may play a role in gamete recognition and fertilization that we must study in order to develop more efficient systems in porcine IVF.

**Keywords:** glycosidases, sperm, porcine.