

## DESARROLLO DE UN MODELO EN 3D PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN ENTRE GAMETOS

Hamze<sup>1</sup>, J.G., Canha<sup>2</sup>, A., Zamorano<sup>1</sup>, L., Algarra<sup>1</sup>, B., Olivares<sup>3</sup>, M.C., Romar<sup>2</sup>, R., Jimenez-Movilla<sup>1</sup>, M.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. IMIB. Edificio LAIB. Crta. Finca Buenavista s/n, 30120. El Palmar. Murcia. España.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, 30071 Campus Espinardo, "Campus Mare Nostrum". IMIB. Universidad de Murcia. Murcia. IMIB. España.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. IMIB. España  
mariajm@um.es

### INTRODUCCIÓN

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular glicoproteica que rodea al ovocito, está formada por 3 o 4 proteínas (ZP1; ZP2; ZP3 y ZP4) y participa en el reconocimiento entre gametos. Recientemente en la especie de ratón se ha descrito que el procesamiento de la ZP2 en su extremo N-terminal (LADEN) participa en este proceso (Avella M *et al.*, 2014), pero no sabemos si estos resultados pueden ser trasladados a otras especies puesto que este proceso es altamente especie-específico.

Los mecanismos actuales para estudiar la interacción entre gametos implican el empleo de un gran número de animales de laboratorio, un alto coste de producción y manutención de organismos modificados genéticamente y además resulta difícil trasladar los resultados obtenidos de una especie a otra distinta. Además, para el estudio del reconocimiento entre gametos existe un factor muy limitante en la mayoría de especies que es la obtención del gameto femenino. Para ello se requiere el sacrificio o intervención del animal en muchas ocasiones.

Por otro lado, a nivel europeo existen diferentes acciones que contribuyen a la disminución progresiva y sustitución del uso de animales en investigación. La directiva 2010/63/UE hace referencia al principio de reemplazo, reducción y refinamiento (3R) según el cual se debe evitar o sustituir en la medida de lo posible el uso de animales en investigación, utilizar el mínimo número posible y minimizar el dolor y la angustia, así como mejorar el bienestar de los animales utilizados.

Con este trabajo lo que proponemos es un modelo 3D que imite la forma del ovocito mediante la conjugación de las proteínas recombinantes de la ZP porcina a esferas magnéticas. Este modelo permitirá el estudio *in vitro* de la interacción entre gametos, la identificación y caracterización de la actividad de las proteínas que conforman la ZP, además del estudio de las condiciones fisiológicas de los espermatozoides en el momento del reconocimiento con el óvulo. El desarrollo de este modelo puede ser muy ventajoso ya que, una vez comprobada la idoneidad del ensayo, este sería fácilmente trasladable a otras especies.

El modelo propuesto podría utilizarse en el futuro no sólo como modelo para estudiar la interacción entre gametos evitando el uso de animales, sino también como método *in vitro* de selección espermática.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las proteínas recombinantes de la ZP porcina (ZP2, ZP3 y ZP4) se expresaron en células de mamífero (células CHO, Chinese Hamster Ovary). Una vez secretadas fueron identificadas mediante electroforesis y Western Blot. Cada proteína posee una secuencia que permite detectarla con anticuerpos específicos (Flag para ZP2, HA para ZP3 y V5 para ZP4) además de una cola de residuos de histidina que permite su conjugación a las esferas magnéticas (His Mag Sepharose™ Excel). Las esferas magnéticas poseen un diámetro similar al ovocito (65 µm).

Las esferas magnéticas conjugadas con las distintas proteínas fueron co-incubadas durante 2 horas con espermatozoides porcinos en medio TALP con una concentración

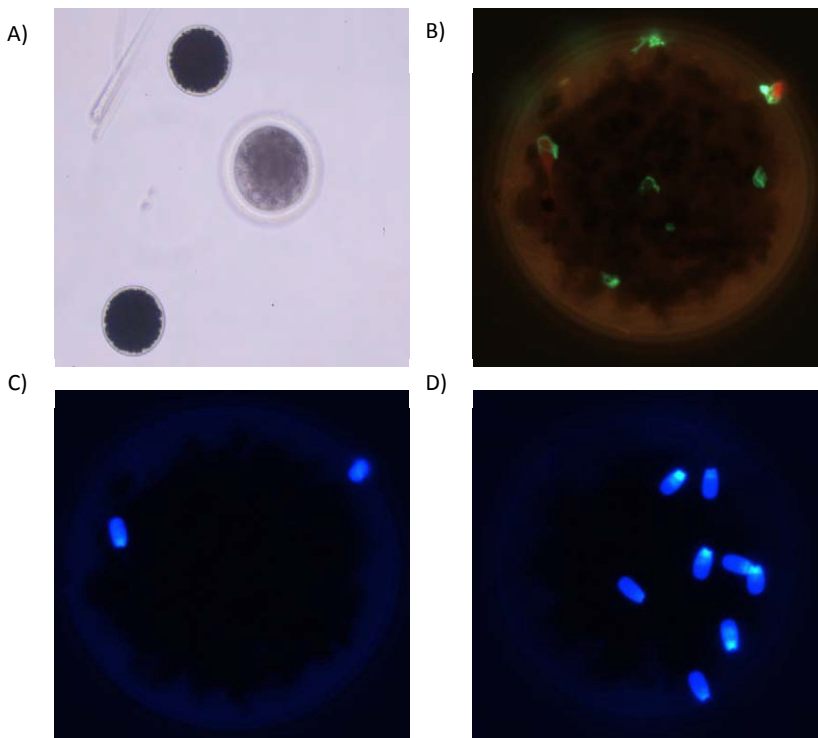
final de 200.000 espermatozoides/mL. Tras el periodo de incubación, las esferas se lavaron en TALP y PBS, y se fijaron. Una vez fijadas se evaluó las condiciones fisiológicas de los espermatozoides; como capacidad de unión, viabilidad y estatus acrosómico mediante las tinciones con Hoechst, PNA y yoduro de propidio (triple tinción) para finalmente ser observadas mediante microscopía de fluorescencia.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proteínas recombinantes expresadas en células CHO (ZP2, ZP3 y ZP4) se identificaron mediante electroforesis y Western Blot obteniendo pesos moleculares de 100 kDa, 55 kDa y 65 kDa respectivamente. La adhesión de estas proteínas a las esferas magnéticas fue confirmada por Western Blot.

Tras la co-incubación de las esferas con los espermatozoides, estos fueron evaluados mediante microscopía fluorescente pudiendo diferenciar claramente los patrones de tinción establecidos; unidos a las esferas, espermatozoides reaccionados y no reaccionados. Con este experimento se determinó que el 78,93% de los espermatozoides unidos a las esferas eran evaluables.

Con este nuevo modelo se pueden realizar nuevos estudios moleculares y fisiológicos que ayuden a entender el proceso de interacción entre la zona pelúcida y los espermatozoides y a la vez evaluar la fisiología y calidad espermática sin la necesidad de sacrificar animales para la obtención del gameto femenino.



**Figura 1.** Esferas magnéticas vistas al microscopio. A) Esferas magnéticas y ovocito en campo claro. B) Esfera magnética con espermatozoides porcinos teñidos con PNA y yoduro de propidio. C y D) Esferas magnéticas con espermatozoides teñidos con Hoechst.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avella, M.A., Baibakov, B., Dean, J. 2014. J Cell Biol. 205(6):801-809.

**Agradecimientos:** MINECO y FEDER (AGL2015-70159-P). Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, “Jóvenes Líderes en Investigación” (18937/JLI/13).

### DEVELOPMENT OF A 3D MODEL TO STUDY GAMETE INTERACTION

**ABSTRACT:** Obtaining porcine ZP recombinant proteins in mammalian cells (CHO) and conjugate them with Ni<sup>+2</sup> magnetic beads allow us to mimic the shape of the oocyte generating different 3D models. These models can help us to study gamete interaction in depth as well as what happen at a physiological level to sperm that is bound to the beads.

**Keywords:** zona pellucida, sperm, magnetic beads, porcine