

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Consideraciones generales sobre enzimología.

Las enzimas son **proteínas** que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. Las enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse. Ello hace viable que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH (Lehninger, 2006a).

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Las enzimas son **catalizadores específicos**: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y, casi siempre, actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. En una reacción catalizada por una enzima:

1. La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama **sustrato**.
2. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada **centro activo**. El centro activo comprende (1) un sitio de unión, formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.

Una vez formados los **productos**, la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción.

Las enzimas, a diferencia de los catalizadores inorgánicos, catalizan reacciones específicas. Sin embargo hay **distintos grados de especificidad**. Por ejemplo, la enzima sacarasa es **muy específica**: rompe el enlace  $\beta$ -glicosídico de la sacarosa o de compuestos muy similares. Así, para la enzima sacarasa, la sacarosa es su **sustrato natural**, mientras que la maltosa y la isomaltosa son **sustratos análogos**. La enzima actúa con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos. Entre las **enzimas poco específicas** están las proteasas digestivas como la quimotripsina, que rompe los enlaces amida de proteínas y péptidos de muy diverso tipo (Lehninger, 2006a).

### 2.1.1. Nomenclatura y clasificación de enzimas.

Antiguamente, las enzimas recibían **nombres particulares**, asignados por su descubridor. Al ir aumentando el número de enzimas conocidas, se hizo necesaria una **nomenclatura sistemática** que informara sobre la acción específica de cada enzima y los sustratos sobre los que actuaba. Esto condujo a la Unión Internacional de Bioquímica, en 1956, a crear una Comisión de Enzimas (Enzyme Commission, EC), con la finalidad de "Considerar la clasificación y nomenclatura de las enzimas, sus unidades de actividad y métodos estándar de ensayos, junto con los símbolos utilizados en la descripción de la cinética enzimática".

Cinco años más tarde (1961), la EC publicó las bases de la nomenclatura y la clasificación de las enzimas en función de su acción catalítica específica. Así pues, las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases.

La EC asignó a cada enzima un nombre sistemático adicional a su nombre común. El nombre sistemático de una enzima consta actualmente de 3 partes: El sustrato preferente, el tipo de reacción catalizada y el sufijo "asa", que indica la naturaleza del proceso catalizado.

Un ejemplo sería la glucosa fosfato isomerasa que cataliza la isomerización de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

Muchas enzimas catalizan **reacciones reversibles**. No hay una manera única para fijar cuál de los dos sentidos se utiliza para nombrar la enzima. Así, la glucosa fosfato isomerasa también podría llamarse fructosa fosfato isomerasa.

Cuando la acción típica de la enzima es la **hidrólisis** del sustrato, el segundo componente del nombre se omite y por ejemplo, la lactosa hidrolasa se llama simplemente lactasa. Además del nombre sistemático, aún persisten otros consagrados por el uso. Así, la glucosa ATP fosforiltransferasa se llama habitualmente glucoquinasa.

El nombre de cada enzima puede ser identificado por un **código numérico**, encabezado por **las letras EC** (Enzyme Commission), **seguidas de cuatro números separados por puntos**. El primer número indica a cuál de las seis clases pertenece la enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo, y el tercero y el cuarto reseñan los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción.

Las seis clases definidas de enzimas son las siguientes:

1. **Óxidorreductasas:** catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, la transferencia de hidrógeno (H) o electrones ( $e^-$ ) de un sustrato a otro. Son las enzimas relacionadas con las oxidaciones y las reducciones biológicas que intervienen de modo fundamental en los procesos de respiración y fermentación.
2. **Transferasas:** son enzimas que llevan a cabo la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, sin hidrólisis ni oxidorreducción. Este grupo de enzimas actúa sobre los sustratos más diversos, transfiriendo grupos metilo, aldehído, glicosil, amina, sulfato, sulfúrico, etc.
3. **Hidrolasas:** catalizan reacciones de hidrólisis. Actúan normalmente sobre las grandes moléculas del citoplasma, como son la de glucógeno, las grasas y las proteínas. La acción catalítica se expresa en la escisión de los enlaces entre átomos de carbono y nitrógeno (C-N) o carbono y oxígeno (C-O).
4. **Liasas:** realizan reacciones en las que grupos químicos del sustrato son escindidos, sin hidrólisis y originando un doble enlace. Estas enzimas rompen (raramente construyen) enlaces entre átomos de carbono, o bien entre carbono y oxígeno, carbono y nitrógeno, y carbono y azufre.
5. **Isomerasas:** catalizan reacciones en la que se presentan reordenamientos intramoleculares del sustrato. Se dividen en varias subclases: racemasas y epimerasas, actuando en la racemización de los aminoácidos y en la epimerización de los azúcares, respectivamente. Las primeras son en realidad pares de enzimas específicas para los dos isómeros y que producen un solo producto común.
6. **Ligasas:** llevan a cabo reacciones en las que se forman enlaces entre dos moléculas, con hidrólisis de ATP o cualquier otro compuesto rico en energía. A este grupo pertenecen enzimas de gran relevancia reciente, como las aminoácido-ARNt ligasas, conocidas habitualmente con el nombre de sintetetas de aminoácidos-ARNt o enzimas activadoras de aminoácidos. Representan el primer paso en el proceso biosintético de las proteínas y forman uniones C-O. Otro ejemplo es el de las ácido-tiol ligasas, de las cuales la más conocida es la acetil coenzima A sintetasa, que forma acetil coenzima A.

En la Tabla 1 se hace referencia a la clasificación de las 7 enzimas de interés para este trabajo, todas ellas del grupo hidrolasas y subclase glicosidasas.

Tabla 1. Clasificación de algunas hidrolasas.

Nombre común	Código (EC)	Enlace hidrolizado	Sustrato
$\alpha$ -L-fucosidasa	3.2.1.51	Glicosídico	$\alpha$ -L-fucosa
$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa	3.2.1.52	Glicosídico	$\beta$ -N-acetil-glucosamina
$\beta$ -D-galactosidasa	3.2.1.23	Glicosídico	$\beta$ -D-galactosa
$\alpha$ -D-galactosidasa	3.2.1.22	Glicosídico	$\alpha$ -D-galactosa
$\alpha$ -D-manosidasa	3.2.1.24	Glicosídico	$\alpha$ -D-manosa
$\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa	3.2.1.53	Glicosídico	$\beta$ -N-acetil-galactosamina
N-acetil-neuraminidasa	3.2.1.18	Glicosídico	Ácido N-acetil-neuramínico

### 2.1.2. Factores que afectan a la actividad enzimática.

Las propiedades de las enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, **cambios en la conformación** suelen ir asociados a **cambios en la actividad** catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de una enzima son: el pH, la temperatura y los cofactores.

Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos -COOH; amino -NH<sub>2</sub>; tiol -SH; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado **pH óptimo**. La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a 7 y la arginasa lo tiene a 10. Como ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular: los amortiguadores o tampones fisiológicos.

En general, los aumentos de **temperatura** aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima**. Por encima ella, el

aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Lehninger, 2006a).

A veces, una enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los **cofactores**. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc. Casi un tercio de las enzimas conocidas requieren cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama **coenzima**. Muchas de estas coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas. Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente a la enzima se llaman **grupos prostéticos**. La forma catalíticamente activa de la enzima, es decir, la enzima unida a su grupo prostético, se llama holoenzima. La parte proteica de una holoenzima se llama apoenzima (inactiva), de forma que: **apoenzima + grupo prostético = holoenzima** (Lehninger, 2005a).

Otros factores que podrían afectar a la actividad enzimática de tejidos obtenidos *in vitro* serían el tiempo y la temperatura de almacenamiento de las muestras, ya que durante éstos, las enzimas pueden disminuir o perder su actividad. Este aspecto se discute en el punto 2.3.2.2.1.1.1.

### 2.1.3. Formas de expresar la actividad enzimática.

Los niveles enzimáticos se miden por su actividad catalítica en condiciones controladas. Existe en la literatura un gran número de formas diferentes de expresar la actividad de una determinada enzima, dadas las posibilidades de combinaciones entre los distintos factores, como son: tiempo, temperatura, volumen, etc.

La multiplicidad de unidades ha dado lugar a gran confusión y el uso de métodos muy variados por los distintos laboratorios ha hecho sumamente difícil la posibilidad de estudiar y comparar resultados. Así, entre otras cosas, podemos conocer algunas unidades enzimáticas de mayor relevancia o importancia hasta la actualidad.

Bessey et al. (1946) definen la Unidad Bessey-Lowry (U-B-L), conocida también como **unidad milimolar**, para medir principalmente la actividad de las fosfatasas (concretamente fosfatasa alcalina) y que corresponde a la cantidad de enzima que en condiciones de ensayo libera por hidrólisis 1 mmol de p-nitrofenol/1 hora/ 37°C.

En vista de la gran variedad de unidades de actividad enzimática que iban proliferando, la Unión Internacional de Bioquímica en 1961 define una nueva unidad, la **Unidad Internacional (UI)**, como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en condiciones controladas (25°, 30°, 37°C). La

**actividad específica** de un preparado enzimático se expresa en unidades de enzima por litro o mililitro de muestra, o bien en unidades de enzima por miligramo de proteína.

Las unidades recomendadas desde entonces son, pues, las del Sistema Internacional de Unidades (SI). De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, para la unidad mol/s se usa el término **katal**. En algunos casos el estado actual de la tecnología no permite que algunos resultados de medida posean trazabilidad respecto a una unidad SI; en estos casos se utilizan unidades arbitrarias, incluyendo entre ellas las UI de la Organización Mundial de la Salud.

## 2. 2. Importancia de las enzimas en el proceso de fecundación.

El proceso de la fecundación es un complejo conjunto de subprocesos en el que aún hoy existen muchas lagunas de conocimiento. El estudio de cualquiera de las diferentes etapas de este proceso contribuirá, sin duda, a la mejora de las técnicas empleadas en los sistemas *in vitro* cuya última finalidad es imitar lo más fielmente posible, el proceso fisiológico. A nivel molecular, las interacciones entre los distintos “protagonistas” de la fecundación (espermatozoide y ovocito, especialmente a nivel de sus membranas plasmáticas y de la zona pelúcida, células del *cumulus oophorus*, células epiteliales del oviducto...) se producen mediante reacciones en las que intervienen proteínas (algunas de las cuales son enzimas) y carbohidratos. El papel de algunas enzimas en estas reacciones es hoy parcialmente conocido. Sin embargo, existen muchas otras cuyo papel, o incluso cuya presencia y actividad en el aparato reproductor, se desconocen por completo. Los siguientes apartados pretenden hacer un somero repaso a los conocimientos actuales sobre el proceso de fecundación con especial mención a las enzimas conocidas que intervienen en el mismo.

### 2.2.1. Espermatozoides.

Los espermatozoides o gametos masculinos son células haploides (dotadas con la mitad de los cromosomas de la especie) y terminalmente diferenciadas, que deben sobrevivir en el tracto reproductor de la hembra sin maquinaria sintética para realizar los procesos de transcripción y traducción. Los gametos masculinos son sujeto de estrés físico tanto en la eyaculación como durante las contracciones del oviducto y deben ser capaces de soportar daños oxidativos para mantener la fecundidad (Suárez y Pacey, 2006). Además, como son organismos extraños al oviducto tienen que combatir con éxito el sistema inmune de la hembra que los considera como organismos infecciosos (Menge y Edwards, 1993). Los espermatozoides de los animales domésticos tienen una estructura similar, y de forma esquemática pueden dividirse en dos partes: la cabeza y la cola (Yanagimachi, 1994). La **cabeza** del

espermatozoide contiene un **núcleo** ovalado y aplanado con cromatina altamente compacta. De acuerdo al tipo de cromatina sexual se identifican los gametos que portan los cromosomas X y los cromosomas Y. El núcleo del espermatozoide está cubierto en la parte anterior por el **acrosoma**. Este acrosoma que posee doble membrana, contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina (Töpfer-Petersen y Calvete, 1995; Jansen et al., 2001), galactosiltransferasa, fosfolipasa C y varias proteasas (Miller et al., 2002). Finalmente, en la cabeza encontramos la teca perinuclear citoplasmática, que es un único elemento del citoesqueleto que se propone como parte del entramado del núcleo del espermatozoide (Olson et al., 1983; Mújica et al., 2003).

#### 2.2.1.1. Proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide que podrían actuar como ligandos para el ovocito.

Cada una de estas divisiones estructurales de la cabeza del espermatozoide está involucrada en el proceso de fecundación. Estudios en los que se emplean sacáridos específicos para pruebas de inhibición, exoglicosidasas para hidrolizar azúcares funcionales de la superficie del espermatozoide y pruebas con inhibidores de la síntesis de glicoproteínas, sugieren que una gran variedad de oligosacáridos se expresan en la superficie del espermatozoide e influyen directamente en el proceso de fecundación de los mamíferos (Ahuja, 1985; Wassarman, 1990).

La conservada estructura y simple composición de la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos de los mamíferos ha facilitado la identificación de los componentes de la superficie que interactúan con el espermatozoide. Por el contrario, se ha postulado que los ligandos del espermatozoide para la ZP no han sido conservados y que, de hecho, esa variación conduce a la especiación (Snell y White, 1996). De hecho, Swanson et al. (2001) han postulado que muchos de los genes que median en el proceso de reproducción sexual, como los involucrados en el reconocimiento entre gametos, rápidamente evolucionan como resultado de una selección Darwinniana positiva. Sin embargo, la complejidad de los patrones de expresión de las proteínas en la membrana plasmática (MP) del espermatozoide (Gillis et al., 1978; Russel et al., 1983; Mack et al., 1987; Naaby-Hansen, 1990; Xu et al., 1994), la especificidad regional en la distribución de las proteínas del gameto masculino (Peterson et al., 1987; Bearer y Friend, 1990) y las dificultades para aislar fracciones de la MP libres de contaminación citoplasmática (Snow y Ball, 1992) han hecho que la identificación de los componentes que se unen a la ZP sea un tedioso trabajo.

A pesar de lo anterior, se han identificado, en diversas especies, numerosas proteínas de la MP del espermatozoide (Tabla 2) que interactúan con el ovocito, algunas de las

cuales son enzimas. A continuación, se hace una breve descripción de esas proteínas identificando la especie donde ejercen su acción fisiológica.

En la **especie bovina** se han identificado enzimas en la MP del espermatozoide con función en la fecundación. Inicialmente, Fayrer-Hosken et al. (1991) encuentran actividad  **$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa** (GalTasa) en la MP del espermatozoide bovino y equino sugiriendo que ésta puede servir como un ligando durante el inicio de la unión espermatozoide-ovocito. Los niveles de GalTasa y su localización en el espermatozoide de esta especie fueron descritos por Larson y Miller (1997). De las 7 galactosiltransferasas identificadas, GalTasa-1 está localizada en la membrana plasmática y el aparato de Golgi (Joziase, 1992; Miller et al., 2002). Esta enzima adiciona galactosa a las glicoproteínas y los glicolípidos con residuos terminales acetilglucosamina N-unidos (Miller et al., 1992). Como integrante de la MP, GalTasa-1 puede actuar sobre glicoproteínas específicas incluyendo la ZP3 (Miller et al., 2002).

En el **cerdo**, al menos cuatro clases de proteínas espermáticas están involucradas en la unión inicial del espermatozoide con el ovocito. La proteína de adhesión a la zona (Apz), la P105/45 y las espermadhesinas. La **Apz** representa el 1% del total de las proteínas de la membrana plasmática del verraco y muestra gran afinidad por polisacáridos sulfatados. Estudios realizados por Sacco et al. (1989) y Yurewicz et al. (1993) indican que la Apz se fija específicamente a la ZP3 $\alpha$ , el componente de la ZP de cerdo con capacidad de unión con el espermatozoide. Por otra parte, la **P105/45** se une con gran afinidad con la ZP porcina en condiciones fisiológicas (Hardy y Garbers, 1994). Esta proteína ha sido clonada y recibe el nombre de zonadhesina (Hardy y Garbers, 1995). Las **espermadhesinas** han sido localizadas en la región apical de la cabeza del espermatozoide porcino sobre la MP que cubre al acrosoma (Yurewicz et al., 1993). Se derivan de las secreciones del epitelio de la vesícula seminal y se unen al espermatozoide en el momento de la eyaculación. Estas proteínas son retenidas en la superficie del espermatozoide como resultado de la unión con la fosfatidiletanolamina, el fosfolípido más abundante de su membrana (Dostalova et al., 1995a). La espermadhesina AQN-1 tiene gran afinidad por manosa, que es el carbohidrato que reconoce el espermatozoide porcino en el epitelio oviductal, y se ha demostrado que inhibe la unión espermatozoide-oviducto (Töpfer-Petersen et al., 2002). Larson y Miller (1997), mediante estudios de inmunofluorescencia localizaron **GalTasa** en la parte lateral de la cabeza espermática, zona ésta donde el espermatozoide se une a la ZP, sugiriendo un papel en la interacción entre los dos gametos, aunque no se ha determinado su azúcar receptor en la ZP.

En el **ratón** se han identificado cinco componentes integrales de la MP [p95,  $\beta$ -1,4-galactosil transferasa, proteasa con actividad de tripsina,  $\alpha$ -D-manosidasa y proteínas

inmovilizadores sulfoglicolipídicas (SLIP) 1] y dos proteínas periféricas (p15Kda y sp56) implicadas en el reconocimiento de la zona y en la unión con el espermatozoide.

Dentro de las proteínas integrales, **la p95** se ha encontrado sobre la superficie de la cabeza de espermatozoides móviles con acrosoma intacto. La p95 se une a toda la zona o a la ZP3 purificada de ratón y tiene actividad tirosina quinasa (Leyton y Saling, 1989).  **$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa** (GalTasa) participa en la síntesis de carbohidratos complejos, específicamente adicionando galactosa del nucleótido uridina difosfato-galactosa (UDP-gal) a los residuos de N-acetil-glucosamina, su sustrato aceptor, tanto en las glicoproteínas como en los glicolípidos en el aparato de Golgi y en el retículo endoplasmático (Mc Leskey, et al., 1998). GalTasa puede transferir galactosa de UDP-gal a la ZP3, pero no a la ZP2 o a la ZP1 (Miller et al., 1992). En ausencia de manganeso, sin embargo, se cree que GalTasa actúa como una lectina, no como una enzima. La existencia de esa lectina con especificidad de glucosamina en la superficie del espermatozoide de ratón está apoyada en el hecho de que la aglutinación de los espermatozoides de ratón de los eritrocitos no fijados de conejo es inhibida por glucosamina (Kawai et al., 1991). Por su parte, una **proteasa con actividad tripsina**, localizada sobre la superficie de la MP, está involucrada en la unión del espermatozoide de ratón con la ZP debido a que el enlace se realiza con anterioridad a la reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982) y porque los inhibidores de la tripsina bloquean competitivamente este enlace (Saling, 1981). Aunque  **$\alpha$ -D-manosidasa** ha sido detectada en la superficie de los espermatozoides de ratón, rata, hámster y humano (Tulsiani et al., 1989, 1990), la participación de esta enzima en la unión inicial del espermatozoide a la zona pelúcida está en duda por dos razones: a) porque en estudios de Cornwall et al. (1991) la  $\alpha$ -galactosa, el azúcar que ha sido identificado como el receptor del espermatozoide de ratón en los oligosacáridos del tipo O-unidos de la ZP (Bleil y Wassarman, 1988) no tiene efecto sobre la adhesión entre gametos y b) porque tanto en la ZP2 como en la ZP3 se han encontrado cadenas de oligosacáridos con galactosa unidas al extremo N-unido, y no al O-unido de la cadena de oligosacáridos (Tulsiani et al., 1992). Solamente los oligosacáridos del tipo O-unido tienen actividad como receptores de espermatozoides (Rossiere y Wassarman, 1992; Kinloch et al., 1995; Wassarman et al., 2004). Además, existen las **proteínas inmovilizadoras sulfoglicolipídicas** (SLIP1) que se distribuyen en la cabeza del espermatozoide de dos maneras: a) sobre toda la región acrosómica, excepto en la protuberancia convexa y, b) concentradas en el área posterior del acrosoma que limita con la parte post-acrosomal (Tanphaichitr et al., 1992, 1993). Aunque el reconocimiento de la ZP3 por SLIP1 no ha sido demostrado, en estudios de competición *in vitro* SLIP1 inhibe la adhesión espermatozoide-ovocito (Tanphaichitr et al., 1993).

Tabla 2. Proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide y su posible receptor en el ovocito, en distintas especies.

<b>Espécimen</b>	<b>Proteína espermática</b>	<b>Azúcar en la ZP del ovocito</b>	<b>Referencia</b>
Toro	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Larson y Miller, 1997; Miller et al., 2002
Cerdo	AP <sub>z</sub>	Polisacáridos sulfatados	Peterson y Hunt, 1989; Peterson et al., 1991
	Zonadhesina (p105/45)	Desconocido	Hardy y Garbers, 1994, 1995
	AWN-1(espermadhesina)	$\alpha$ -Gal-GalNAc/Gal-GlcNAC unido o no a ácido siálico	Calvete et al., 1995; Dostalova et al., 1995b
	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Larson y Miller, 1997; Parillo et al., 2003
Ratón	Proteína 95 (p95)	Desconocido	Leyton et al., 1992; Kalab et al., 1994
	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	N-acetilglucosamina ZP3	Miller et al., 1992
	Tripsina (proteínasa)	Desconocido	Saling, 1981; Benau y Storey, 1987
	$\alpha$ -D-manosidasa	Manosa u oligosacáridos ricos en manosa	Cornwall et al., 1991
	SLIP1	Sulfoglicolípidos	Tanphaichitr et al., 1993
	Proteína de 15kDa	Desconocido	Poirier et al., 1986; Aarons et al., 1991
	Sp56	$\alpha$ -D-galactosa	Cheng et al., 1994
Rata	$\alpha$ -D-manosidasa	$\alpha$ -metilmanosa	Tulsiani et al., 1995
	Ligando de galactosa	N-acetil-galactosamina	Abdullah et al., 1991; Mertz et al., 1995
	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Larson y Miller, 1997
Cobayo	Ligando de L-fucosa	$\alpha$ -L-fucosa	Huang et al., 1982
	PH-20	Desconocido	Primakoff et al., 1985
	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Larson y Miller, 1997

Conejo	RSA (54 kDa)	Carbohidratos sulfatados	Abdullah et al., 1991
	RSA (sp17)	Carbohidratos sulfatados	O'Rand et al., 1988; Richardson et al., 1994
Caballo	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Larson y Miller, 1997
Humano	Ligando de manosa	$\alpha$ -D-manosa	Benoff et al., 1993a,b, 1995
	$\alpha$ -D-manosidasa	Oligosacáridos ricos en manosa	Tulsinai et al., 1990
	hu9	$\alpha$ -D-Manosa	Burks et al., 1995
	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	N-acetil-glucosamina en ZP3	Humphreys-Beher y Blackwell, 1989; Humphreys-Beher et al., 1990
	Tripsina (proteínasa)	Desconocido	Pillai y Meizel, 1991; Llanos et al., 1993
	Proteína de 15 kDa	Desconocido	Boettger-Tong et al., 1993
	Lectina de galactosa	Galactosa	Goluboff et al., 1995
Selectina	Desconocido	Lucas et al., 1995; Clark et al., 1995	
FA-1	Desconocido	Naz y Ahmad, 1994	

Por otra parte, dentro de las proteínas periféricas de la MP murina que participan en el reconocimiento de la zona pelúcida y en la unión con el espermatozoide, existe una **proteína de 15kDa** identificada en la parte apical de la membrana plasmática del espermatozoide que se enlaza a un inhibidor de la proteinasa originada en el plasma seminal. En los espermatozoides capacitados *in vitro* participa en la adhesión a la zona pelúcida del ovocito de ratón (Poirier et al., 1986). Inmunoagregados del inhibidor de la proteinasa y la traslocación al segmento ecuatorial inducen la reacción acrosómica (RA) solamente en espermatozoides capacitados (Aarons et al., 1991). Otra proteína, la **Sp56**, inicialmente considerada como una proteína de la superficie de la membrana, se encuentra en la superficie de la cabeza de los espermatozoides con acrosoma intacto, pero no en los reaccionados, y se distribuye en la parte convexa de las crestas de la superficie dorsal de la cabeza espermática en dirección a los sitios de unión de la ZP3. Tiene gran afinidad por los residuos de  $\alpha$ -D-galactosa de la ZP3 (Cheng et al., 1994). En estudios posteriores Kim et al. (2001) demuestran que la p56 es un componente de la matriz acrosomal.

En la **rata** existen dos proteínas en la MP del espermatozoide con función en la fecundación. La enzima  **$\alpha$ -D-manosidasa** espermática exhibe su actividad especialmente sobre los oligosacáridos que contienen manosa. Su actividad y su pH óptimo de 6'5 la diferencian de  $\alpha$ -D-manosidasa acrosomal que trabaja en condiciones ácidas (pH=4'4). La enzima  $\alpha$ -D-manosidasa espermática se localiza en el área periacrosomal de la cabeza espermática (Tulsiani et al., 1995) con su unidad catalítica externamente orientada (Tulsiani et al., 1989). También se ha localizado en la superficie dorsal de la cabeza del espermatozoide que cubre al acrosoma una **lectina de la galactosa**, calcio-dependiente, capaz de unirse a la galactosa y a la acetil-galactosamina (Mertz et al., 1995). Esta proteína del espermatozoide de la rata participa en el enlace con la ZP (Abdullah et al., 1991).

Sólo dos candidatos de las proteínas del espermatozoide del **cobayo** han demostrado que se unen a carbohidratos y ninguno presenta restricción especie-específica. Son el **receptor de L-fucosa** y la **PH-20**. Tanto la L-fucosa como la fucoidina son fuertes inhibidores de la unión entre el espermatozoide y la ZP del ovocito de esa especie, en comparación con una gran variedad de monosacáridos (Huang et al., 1982). La fucoidina también inhibe la adhesión del espermatozoide humano con la ZP humana, al igual que el espermatozoide de hámster con la ZP de esta especie (Huang et al., 1982). En consecuencia, la fucosa es parte de una señal común de reconocimiento que regula la unión de los gametos en los mamíferos. Como la acrosina, presente en una gran variedad de especies, se une a ligandos de fucosa (Yanagimachi, 1994), existe la posibilidad de que el ligando de la L-fucosa en el espermatozoide de cobayo sea acrosina, lo que estaría de acuerdo con los datos que indican que solamente los espermatozoides reaccionados de cobayo se unen a la zona pelúcida (Huang et al.,

1984). También, en el cobayo se localiza tanto en la MP externa del espermatozoide como en la membrana interna del acrosoma el antígeno posterior de la cabeza (PH-20; Primakoff et al., 1988). La PH-20 posiblemente forma, en la membrana plasmática del espermatozoide, complejos con al menos otra proteína (Primakoff et al., 1985). Sin embargo, la PH-20 no se requiere para la unión del espermatozoide con acrosoma intacto con la ZP del ovocito. Estudios de competición con PH-20 purificada muestran que esta proteína inhibe la unión a la ZP del espermatozoide de cobayo reaccionado, pero no del espermatozoide intacto (Myles et al., 1987). En consecuencia, debe tenerse en cuenta que la PH-20 migra desde la superficie posterior de la cabeza hasta la membrana interna del acrosoma en asociación con la RA. Simultáneamente, se presenta hidrólisis proteolítica y el número de moléculas de la PH-20 en la superficie del espermatozoide se incrementa. La proteína PH-20 tiene actividad hialuronidasa (Lin et al., 1994) y, además de la función de unión con la zona, le confiere capacidad al espermatozoide con acrosoma intacto de penetrar a través de las células del *cumulus* para alcanzar la ZP (Hunnicuttt et al., 1996). El gen que codifica para la PH-20 ha sido identificado, mediante Southern blotting, en el ADN de ratón, rata, hámster, conejo, toro, mono y hombre (Lathrop et al., 1990). Además, la PH-20 ha sido localizada en la MP de espermatozoides de una gran variedad de especies incluyendo la humana (Lin et al., 1993, 1994).

En el **conejo** se han identificado dos proteínas implicadas en la adhesión del espermatozoide a la zona y ambas tienen actividad específica por la galactosa. La **proteína autoantigénica** del espermatozoide de conejo (RSA) es una glicoproteína de la membrana que funciona como una lectina en la unión del gameto masculino con la ZP (O'Rand et al., 1988). En los espermatozoides intactos de conejo, la RSA se localiza sobre la región postacrosomal-ecuatorial y después de la RA se reubica formando grandes complejos en la parte media de la región ecuatorial (Esaguy et al., 1988). La proteína purificada RSA está compuesta por dos subunidades de 49 y 54 kDa (Abdullah et al., 1991). El ligando purificado de la galactosa obtenido de los testículos rápidamente se adhiere a la ZP solubilizada de conejo (Abdullah et al., 1991), lo que indica que la subunidad de 54 kDa es un componente del ligando de galactosa del espermatozoide. Otra proteína de unión del espermatozoide del conejo, la **RSA de 17 kDa**, se une con gran afinidad con la ZP y con carbohidratos sulfatados (O'Rand et al., 1988). Este polipéptido de 17kDa está asociado con la parte interna de la MP de la región apical del espermatozoide de conejo y solamente es accesible a los anticuerpos después del comienzo de la RA (Richardson et al., 1994).

Aunque tanto los espermatozoides **humanos** reaccionados como los intactos se pueden unir a la ZP (Morales et al., 1989), es evidente que para que ocurra la fecundación, el espermatozoide humano debe tener el acrosoma intacto cuando se

une a la ZP homóloga y debe ser objeto de la RA después de la adhesión con la zona (Benoff, 1997). Los espermatozoides humanos expresan gran cantidad de ligandos para una gran variedad de azúcares simples y complejos. La **proteína de unión a manosa** aparece en la superficie del espermatozoide durante la capacitación (Benoff et al., 1993a) asociada a la superficie externa del acrosoma. La unión con los residuos de manosa de la zona induce, primero, una fusión ligando-receptor y, posteriormente, una translocación a la parte ecuatorial o postacrosomal del espermatozoide. Esta traslocación es seguida por la inducción de la RA (Benoff et al., 1993b). A su vez, se ha comprobado que la enzima  **$\alpha$ -D-manosidasa** actúa como ligando en la interacción ovocito-espermatozoide (Tulsiani et al., 1990) y es similar a la descrita para la MP de espermatozoides de rata y ratón (Tulsiani et al., 1989; Cornwall et al., 1991), pero diferente a la que se encuentra dentro del acrosoma que es ácida (Tulsiani et al., 1990). Por otra parte, la **proteína Hu9** de 95 kDa que está ubicada en el segmento ecuatorial del espermatozoide intacto (Moore et al., 1987), es potencialmente homóloga a la proteína p95 del espermatozoide de ratón. La secuenciación mediante ADN complementario, específico de los testículos humanos, indica que la Hu9 es una proteína transmembranosa que no tiene homología con las hexoquinazas. Análisis de inmunofluorescencia (Moore et al., 1987) localizan esta proteína en la región del acrosoma de los espermatozoides humanos capacitados (Burks et al., 1995). Existe, sin embargo, la posibilidad de que la Hu9 sea parte de un complejo que regula la interacción del espermatozoide con la ZP. Además, se ha localizado en la superficie del espermatozoide humano **GalTasa** y se cree que su presencia puede ser parte de un sistema común de identificación en los gametos de los mamíferos (Humphreys-Beher y Blackwell, 1989; Humphreys-Beher et al., 1990). Por otra parte, la superficie del espermatozoide humano, como la del de ratón, es capaz de unirse a los inhibidores de tripsina. Sin embargo, en contraste con lo encontrado en el espermatozoide de ratón, los **inhibidores de tripsina** no tienen efecto en la adhesión del espermatozoide con la zona pelúcida (Llanos et al., 1993). Preferentemente, estos agentes bloquean la zona y la reacción acrosómica inducida por el fluido folicular al prevenir un incremento del calcio intracelular requerido para la exocitosis acrosomal (Pillai y Meizel, 1991; Llanos et al., 1993). Otro componente de la MP, de la cabeza del espermatozoide humano, es la **proteína 15 kDa** que aparentemente reconoce el inhibidor de la tripsina-acrosina lo que puede inducir la RA en los espermatozoides capacitados (Boettger-Tong et al., 1993). También existe en los espermatozoides humanos una proteína que tiene relación con la **lectina de la galactosa** encontrada en los espermatozoides de ratón y conejo. Este ligando está localizado en el acrosoma del espermatozoide humano (Goluboff et al., 1995). Otra proteína, la **selectina** se ha encontrado dentro del acrosoma y se libera durante la RA, por lo que puede ser considerada como un segundo ligando (Miller et al., 2002). Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha localizado en la superficie del espermatozoide humano el **antígeno para fecundación-1** (FA-1; Naz et al., 1992).

Todos los espermatozoides exhiben afinidad por los anticuerpos tanto en su parte media como en la región de la cola. Además, entre el 20-40% de los espermatozoides lo hacen con la región posterior del acrosoma. Este mismo anticuerpo bloquea la adhesión del espermatozoide humano con la ZP, pero no tiene efecto sobre su motilidad ni sobre la RA (Naz et al., 1992). Sin embargo, no se conoce su receptor en la zona y no se ha determinado su papel exacto en el proceso de fecundación (Benoff, 1997).

Como se ha descrito, un número relativamente grande de proteínas de la membrana del espermatozoide ha sido implicado en los eventos iniciales del reconocimiento del ovocito en distintas especies (Tabla 2). Sin embargo, su caracterización es incompleta y en muchos casos su funcionalidad debe ser dilucidada en experimentos futuros. De cualquier forma, es evidente que los azúcares de unión en la ZP, en todas las especies, podrían verse afectados por la presencia de enzimas glicolíticas en el fluido oviductal, y que la determinación de su existencia, nivel de actividad y variaciones a lo largo del ciclo podría ser de gran utilidad para comprender el proceso de fecundación.

#### 2. 2. 1. 2. Interacción espermatozoide-células oviductales.

A diferencia de la interacción que se establece entre la MP del espermatozoide y la zona pelúcida, en la que, como se ha visto en el apartado anterior, existe un gran número de receptores y ligandos conocidos, las moléculas, y particularmente las enzimas, implicadas en la interacción del espermatozoide con las células epiteliales del oviducto han sido mucho menos estudiadas. En la actualidad, se desconoce si las diferentes glicosidasas descritas en el fluido oviductal intervienen en la adhesión o liberación de los espermatozoides a las células epiteliales, procesos ambos implicados en la regulación de etapas tan críticas para el éxito de la fecundación como la capacitación o la hiperactivación de los espermatozoides (Tulsiani, 2003).

El transporte de los espermatozoides, después del coito, desde la parte baja del aparato reproductor femenino (útero o vagina), hasta el reservorio de espermatozoides en la región ampular-ístmica del oviducto tiene, aparentemente, dos etapas. Una primera, muy rápida, en la que espermatozoides no involucrados en la fecundación demoran 15 minutos en aparecer en el oviducto, después de ser depositados en la hembra (Overstreet y Cooper, 1978). La segunda fase conocida como sustancial o fase lenta en la que el espermatozoide se prepara para la fecundación se demora de 6-12 horas en las especies domésticas (Overstreet et al., 1978). Sin embargo, esta población de espermatozoides no continúa hasta el sitio de fecundación sino que permanece en el oviducto constituyendo un reservorio hasta el momento antes de la ovulación (Hunter, 1984).

La duración de la estancia en el reservorio oviductal depende de la especie y del período del ciclo estral de la hembra. Por ejemplo, en la vaca es de 18-20 horas (Hunter y Wilmut, 1984), de 17-18 horas en la oveja (Hunter y Nichol, 1983) y de 36 horas en la cerda (Hunter, 1984).

El almacenamiento de los espermatozoides en el istmo oviductal podría tener múltiples funciones entre las se incluyen: a) servir como lugar para la capacitación espermática, b) mantener la viabilidad del gameto masculino, c) sincronizar el tiempo de maduración espermática con el tiempo de la ovulación y, d) seleccionar los espermatozoides con mejor morfología y calidad de la cromatina (Ellington et al., 1999; Waberski et al., 2006).

Exámenes con microscopía electrónica han revelado que durante el tiempo que el espermatozoide reside en la parte distal del oviducto, hay una fuerte asociación del gameto masculino con las células del epitelio del oviducto (Hunter et al., 1987). Esta unión, asegura, por un lado, que un apropiado número de espermatozoides viables y potencialmente fértiles estén disponibles y garanticen la fecundación de los ovocitos ovulados en la unión ampular-ístmica (Hunter y Nichol, 1983; Rodríguez-Martínez et al., 2001) y, por otro, podría reducir el riesgo de polispermia al permitir que pocos espermatozoides asciendan a la vez hacia la ampolla para la fecundación (Hunter y Leglise, 1971; Hunter, 1973).

La liberación de los espermatozoides del reservorio para dirigirse hacia la ampolla, donde se lleva a cabo la fecundación, parece depender del momento de la ovulación (Smith et al., 1987; Cooper et al., 1999) y de la hiperactivación espermática (Smith y Yanagimachi, 1991; Demott y Suárez, 1992). Después de la ovulación, los espermatozoides son liberados gradualmente desde el lugar de almacenamiento y ascienden a la ampolla donde la relación espermatozoide:ovocito es aproximadamente 1:1 (Hunter, 1993).

Varios factores están involucrados en la formación del reservorio de espermatozoides en el oviducto. Desde que por primera vez Suárez y sus colegas definieron la naturaleza de la unión espermatozoide-células epiteliales oviductales (CEO) como una interacción ligando-receptor (Demott et al., 1995; Lefebvre et al., 1997; Suárez, 1998; Suárez et al., 1998), se ha aceptado que el contacto directo entre los espermatozoides-CEO es el principal mecanismo en la formación del reservorio de espermatozoides (Suárez et al., 1990) y esta unión está mediada por carbohidratos. Esta hipótesis es apoyada por estudios posteriores en los que los espermatozoides permanecen unidos a las CEO incluso después de un fuerte lavado (Smith y Yanagimachi, 1990) o de un tratamiento proteolítico (Raychoudhury y Suárez, 1991). Aunque esto se ha demostrado *in vitro*, la relativa contribución de otros factores como

las secreciones mucosas, las propiedades químicas del fluido oviductal, los gradientes de temperatura y la apertura del lumen del oviducto no son claros. No obstante todos ellos podrían contribuir en diferentes grados a la formación del reservorio espermático.

La unión espermatozoide-CEO es un proceso reversible que parece que involucra a los oligosacáridos de la membrana de las células epiteliales (DeMott et al., 1995; Dobrinski et al., 1996; Suárez, 1998; Suárez et al., 1998) y lectinas calcio-dependientes en la superficie del espermatozoide (Suárez et al., 1998). En todas las especies estudiadas hasta ahora, se ha demostrado que diferentes azúcares (Tabla 3) participan en este proceso (DeMott et al., 1995; Dobrinski et al., 1996; Lefebvre et al., 1997; Suárez et al., 1998). En cerdos, la formación del reservorio espermático parece que incluye la interacción de receptores oligosacáridos con residuos de manosa en las células oviductales, con moléculas de unión en la superficie del espermatozoide (Töpfer-Petersen, et al., 2002). Contrario a esto, datos experimentales indican que la fucosa es el carbohidrato que constituye el sitio de unión en las células epiteliales del oviducto en bovinos (Lefebvre et al., 1997; Suárez et al., 1998). Descripciones adicionales sobre esta interacción (Suárez et al., 1998), establecen que un trisacárido tipo Lewis [Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] está involucrado en la unión espermatozoide-CEO. Este trisacárido, que tiene fucosa en su composición, mostró más capacidad para inhibir la fusión del espermatozoide a las CEO que la fucosa sola. En estudios realizados en otras especies también se ha encontrado la participación de otros azúcares en la interacción oviducto-espermatozoide: en hámster, el ácido siálico y la fetuina (una sialoglicoproteína, DeMott et al., 1995), mientras que en équidos la galactosa o glicoproteínas con residuos expuestos de galactosa (Dobrinski et al., 1996).

Evidencias funcionales y estructurales indican que una lectina de unión a fucosa, presente en el espermatozoide de toro, es una proteína del plasma seminal secretada por la vesícula seminal denominada PDC-109 (BSP-A1/A2, Igotz et al., 2001; Gwathmey et al., 2003). Durante la eyaculación, esta proteína se incorpora a la MP del espermatozoide permitiendo su asociación con las células del oviducto. Este mecanismo propuesto explica la limitada capacidad de unión que tienen los espermatozoides que no han tenido contacto con los fluidos seminales como, por ejemplo, los espermatozoides epididimarios (Petrunkina et al., 2001; Gwathmey et al., 2003). Además, el exceso de PDC-109 en el plasma seminal podría bloquear los sitios de unión de los espermatozoides en las regiones posteriores del tracto reproductor femenino facilitando el transporte de los espermatozoides hacia el oviducto (Suárez, 2002).

Tabla 3. Carbohidratos involucrados en la interacción espermatozoide-células epiteliales oviductales en distintas especies.

Espécimen	Azúcar	Referencia
Vaca	Fucosa	Lefebvre et al., 1997
Cerdeja	Lactosa, maltosa.	Green et al., 2001
	Manosa	Wagner et al. 2002
Rata	Ácido siálico	Cortés et al., 2004
Yegua	Galactosa	Lefebvre et al., 1995
		Dobrinski et al., 1996
Hámster	Ácido siálico y fetuína	DeMott et al., 1995

Recientemente otros monosacáridos también han sido encontrados formando parte de la mucosa oviductal. Sant'Ana et al. (2005), utilizando lectinas durante el ciclo ovárico de la cerdeja hallaron la presencia de una gran variedad de azúcares terminales y, además, diferencias regionales en la expresión de esos azúcares. Así, por ejemplo, la unión de la lectina SBA (*Soya bean agglutinin*) con N-acetil-galactosamina fue mayor en el infundíbulo durante la fase luteal mientras que la de la lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) con  $\alpha$ -N-acetil-galactosamina estuvo restringida al istmo durante la misma fase. Por su parte, la unión de la lectina RCA-I (*Ricinus communis agglutinin-1*) con  $\beta$ -Galactosa fue más intensa en la ampolla y el infundíbulo durante la fase folicular. Mientras tanto, la reacción de la lectina UEA-I (*Ulex europaeus agglutinin-1*) con  $\alpha$ -L-fucosa fue más fuerte en la ampolla durante la fase folicular y en el infundíbulo durante la luteal. A su vez, la lectina Con-A (*Concanavalin A*) se unió fuertemente con  $\alpha$ -D-manosa durante la fase luteal en la ampolla, en tanto que la de la unión más fuerte de la lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*) con  $\beta$ -N-acetil-glucosamina se observó en el istmo durante la fase luteal y, finalmente, la lectina PNA (*Peanut agglutinin*) reaccionó con  $\beta$ -D-galactosa(1-3)galactosamina sin importar la fase del ciclo estral ni la región del oviducto.

Otro factor que puede estar involucrado en el almacenamiento de espermatozoides en el oviducto, es el gradiente de **temperatura** a lo largo de este órgano. Hunter y Nichol, (1986) midieron la temperatura del oviducto de cerdejas antes de la ovulación y encontraron que el istmo era 0.75°C más fresco que la ampolla durante la etapa preovulatoria, pero esa diferencia de temperatura no fue detectada después de la ovulación. Igualmente, David et al. (1971) refirieron similares diferencias regionales de temperatura en el oviducto de conejas. Estas variaciones regionales de temperatura podrían ser el reflejo de diferencias en la vascularización regional y en el flujo linfático que, a su vez, pueden afectar la composición del fluido oviductal. El incremento de la contractilidad del miosálpinx en la región ampular durante el periodo periovulatorio

podría, también, ser el responsable de los gradientes de temperatura. Aunque de baja magnitud, estas diferencias de temperatura entre la ampolla y el istmo podrían inhibir directa o indirectamente la motilidad del espermatozoide y contribuir a la formación del reservorio espermático. Por el contrario, los aumentos de temperatura en los momentos previos a la ovulación podrían incrementar la actividad de las glicosidasas presentes en el fluido oviductal y contribuir a la liberación de los gametos masculinos del reservorio de espermático.

Las **glicosidasas** presentes en el fluido oviductal podrían tener diferentes funciones dependiendo de la región donde se encuentren. Si se hallan activas en la ampolla después de la ovulación podrían modificar las glicoproteínas del espermatozoide y de la ZP del ovocito. Por el contrario, si están activas en el istmo preovulatorio su papel podría consistir en la modificación de las glicoproteínas de las células epiteliales, pero si su actividad en esta misma región es postovulatoria podrían también actuar en la modificación de las glicoproteínas de las CEO para permitir el paso del embrión en desarrollo al útero. Desafortunadamente todas estas hipótesis no han sido estudiadas hasta la fecha, aunque se desarrollan ampliamente en la discusión del presente trabajo.

#### 2.2.2. Ovocitos.

En los mamíferos, el ovocito o gameto femenino es una célula haploide, producida por el ovario, portadora del material genético y apta para ser fecundada por el espermatozoide. Esta célula sexual femenina es la más voluminosa del cuerpo y se forma por meiosis en un proceso llamado ovogénesis. La ovogénesis es el proceso de formación y diferenciación de los ovocitos en los mamíferos. Igual que la espermatogénesis, la ovogénesis se basa en un proceso meiótico que produce, por cada célula originaria (ovogonia), cuatro células con un genotipo recombinado y la mitad de ADN. En contraste, una sola célula es funcional y en el citoplasma se acumula material de reserva que proveerá de nutrientes al embrión que se genere durante las primeras etapas de desarrollo.

##### 2.2.2.1. Foliculogénesis y crecimiento del ovocito.

Dado que, como se verá más tarde, en el apartado de material y métodos, ha sido necesario un conocimiento básico sobre el proceso de foliculogénesis y las características de los ovarios en las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo para su clasificación, el siguiente apartado pretende repasar brevemente este proceso antes de comenzar a revisar la bibliografía existente sobre los azúcares en la ZP del ovocito que interactúan con las proteínas descritas en la MP del espermatozoide.

Después de iniciar la meiosis, las ovogonias reciben el nombre de **ovocitos primarios** y quedan detenidos en la profase I del ciclo (Moor y Warnes, 1979; Picton y Gosden, 1999; Picton, 2001). Esto sucede, en algunos mamíferos, durante la fase final de la vida prenatal (Picton, 2001). La profase I meiótica es larga y pasa por varios estadios transitorios antes de alcanzar el de diplotene difuso (estado de dictiatio) donde la primera división meiótica se detiene (Fair, 2003). Cuando alcanza esta etapa, el ovocito está rodeado de una capa simple de 4-8 células pregranulosas planas inhibitorias de la meiosis (Sawyer et al., 2002) y una intacta lámina basal, constituyendo así la primera categoría de los **folículos primordiales inactivos**, que permanece en esta fase de inhibición hasta que son estimulados a crecer (Fair, 2003). El inicio de la meiosis coincide con el comienzo de la formación, desarrollo y diferenciación del folículo, denominada **foliculogénesis** (Picton y Gosden, 1999; Picton, 2001) que está regida *in vivo* por la FSH (Sebon et al., 2003) y la leptina, una hormona que actúa vía LH y FSH (Brannian y Hansen, 2002; Williams et al., 2002). La detención de la meiosis, al parecer, está asociada con una reducción en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) del ovocito y está inhibida por la actividad de una proteína quinasa A dependiente de AMP<sub>c</sub> (Thibault et al., 1987; Mattioli et al., 1994; Picton y Gosden, 1999; Aktas et al., 2003).

Los folículos primordiales en la vaca alcanzan un diámetro de 30µm (Miyano, 2003) y en animales domésticos se considera que cada hembra posee de 100.000 a 400.000 (Sebon et al., 2003) en el momento del nacimiento. En la pubertad, los folículos continúan su crecimiento (Sebon et al., 2003), regulado por las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH (Fanchin, 2002).

La activación de los folículos primordiales se caracteriza porque las células planas de la granulosa, antes de comenzar a dividirse por mitosis, se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito primario (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Fair et al., 1997) constituyendo así los **folículos primarios** (Fair, 2003). Esta etapa se identifica por el depósito de un tipo de material fibrilar que representa el inicio de la zona pelúcida (Gosden et al., 1997; Wassarman, 1988). Al mismo tiempo, las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa que secretan un fluido denominado fluido folicular primario que se acumula en pequeñas lagunas distribuidas entre sus propias células (Makabe et al., 2006). Estas modificaciones morfológicas transforman los folículos primarios en **folículos secundarios** adquiriendo el ovocito mayor volumen en completa ausencia de división celular, acompañado de una hipertrofia e hiperplasia de las células granulosas. Existe una estrecha y recíproca comunicación entre la granulosa y el ovocito a través de uniones tipo "gap", que garantizan la supervivencia de ambos. Las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa, las cuales poseen uniones estrechas, tipo "tight", que son importantes en el

metabolismo del ovocito (Picton y Gosden, 1999; Miyano, 2003; Sebon et al., 2003). Los folículos secundarios en la vaca adquieren un diámetro entre 150-200  $\mu\text{m}$  (Gutiérrez et al., 2000; Miyano, 2003) y de 200-300  $\mu\text{m}$  en la cerda (Mao et al., 2002). Hasta este estadio los folículos se clasifican en **preantrales** debido a que aún no se ha formado la cavidad antral. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH, se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de fluido folicular. A medida que la cantidad de fluido folicular aumenta, las cavidades que ocupa también aumentan para formar el antro (Macchiarelli et al., 1991, 1992).

Posteriormente, cuando las cavidades de líquido intersticial coalescen en un solo antro folicular, los folículos secundarios se transforman en folículos **antrales o terciarios**. Esta etapa se caracteriza histológicamente por la presencia de la ya mencionada cavidad antral y por estar rodeados de varias capas de células cúbicas de la granulosa, que secretan fluido folicular (Makabe et al., 2006) el cual, al acumularse produce un reordenamiento de las mismas y separa dos poblaciones celulares diferentes en el compartimiento de la granulosa: las células del *cumulus oophorus*, cuya capa más interna en contacto con el ovocito se denomina *corona radiata*; y las células murales que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal (Canipari, 1994). Estas dos capas están unidas por un pedículo delgado de pocas células de la granulosa (Motta y Van Blerkom, 1975). A nivel molecular, esta etapa se caracteriza por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa (McNatty et al., 1984a). Las células de la teca expresan receptores para LH y ocurre un aumento progresivo de la síntesis de estradiol folicular (Richards, 1980; Ireland y Roche, 1982; McNatty et al., 1984b). El incremento en la producción de estradiol amplía la respuesta de los folículos antrales dominantes a la estimulación de las gonadotropinas (Richards, 1980; Veldhuis et al., 1982), de tal manera que, de acuerdo al desarrollo, hay una divergencia entre los folículos: unos aumentan rápidamente de tamaño haciéndose más grandes que otros (Savio et al., 1988).

El desarrollo folicular no es igual en todos los animales mamíferos. En **especies monotocas**, como el vacuno, se caracteriza por: (a) un reclutamiento de los folículos primordiales durante un largo período del crecimiento folicular y, (b) la selección de un folículo dominante y atresia del resto de la cohorte (Trounson et al., 2001). En consecuencia, los folículos terciarios pueden llegar a ser, o no, dominantes según su desarrollo. Los folículos dominantes, a diferencia de los que no lo son, expresan en las células de la granulosa, además de los receptores para FSH, receptores para LH. La formación del antro en los folículos de las **especies politocas**, como la cerda, ocurre en el momento en que los ovocitos completan su crecimiento y han adquirido la capacidad de reiniciar la meiosis (Eppig y Schroeder, 1989).

Los cambios moleculares que conlleva la dinámica folicular pueden ocurrir en cualquier folículo terciario, es decir que todos los folículos pertenecientes a una misma oleada de desarrollo folicular tienen la capacidad de ser dominantes. Esto se comprueba al eliminar quirúrgicamente el folículo dominante una vez producida la selección. El folículo terciario no dominante que le sigue en tamaño de la misma oleada pasará a dominar sobre los otros. El folículo dominante en comparación con el resto, presenta concentraciones mayores de estradiol en el fluido folicular (Ginther et al., 1997) lo que se debería a un mecanismo intrafolicular que amplifica el estímulo de la FSH regulado por un factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Rivera y Fortune, 2003). A medida que el ovocito aumenta en diámetro se suceden modificaciones como la proliferación y redistribución de las organelas citoplasmáticas, la aparición del espacio perivitelino y la migración de los gránulos corticales, junto con el núcleo, a la periferia del ovocito (Fair et al., 1997).

Durante esta etapa de crecimiento, continúa la comunicación entre las células del *cumulus* y el ovocito, mediante uniones fisiológicas tipo “gap” (Gilula et al., 1978). Estos canales están constituidos por proteínas estructurales que son miembros de una extensa familia conocida colectivamente con el nombre de conexinas (Haefliger et al., 1992). Esta red de uniones intercelulares posibilita el intercambio bidireccional de sustratos de bajo peso molecular (iones, nucleótidos y aminoácidos) con finalidad nutritiva y reguladora (Anderson y Albertini, 1976; Makabe et al., 2006) y de factores que regulan la expansión y la esteroidogénesis del *cumulus* (McNatty et al., 1984b; Prochazka et al., 1998). Como consecuencia de la dinámica folicular, cuyo objetivo es alcanzar el máximo desarrollo, los folículos reciben el nombre de **preovulatorios o folículos de Graaf**, en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos en 1672. En esta etapa el número de células de la granulosa llega al máximo y la actividad mitótica disminuye. Los folículos tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación. La vascularización de la teca es máxima y alcanza la membrana basal y, en consecuencia, el flujo sanguíneo es alto (Thibault et al., 1987), la actividad de la aromatasa está en su mayor nivel y, por tanto, la aromatización de andrógenos tecales también es máxima. Además, la conexión entre el *cumulus* y las células de la granulosa se hace más laxa, hasta que al final se separan. Horas antes de la ovulación, se completa la mitosis I de la meiosis, dando origen al **ovocito secundario** y al primer corpúsculo polar. Después de la expulsión del corpúsculo, el ovocito secundario inicia la mitosis II de la meiosis, quedando detenido en **metafase II** (M II).

Los ovocitos se liberan del folículo de Graaf como ovocitos secundarios en M II y permanecen en este estadio dentro del oviducto o en cultivo, hasta que sean estimulados a completar la meiosis si se sucede la fecundación o la partenogénesis (Hunter, 2003).

#### 2.2.2.2. Carbohidratos que podrían actuar como receptores para el espermatozoide en la zona pelúcida.

Un típico gameto femenino, ovulado, está rodeado por dos capas, una externa constituida por las células del **cumulus oophorus** y una interna, densa, la **zona pelúcida** (ZP), conocida también como capa vitelina (anfibios), corion (teleósteos) y membrana perivitelina (aves), con función similar en todas las especies (Spargo y Hope, 2003). El término **ZP** se reserva para los mamíferos euterios y marsupiales (Hoodbhoy y Dean, 2004). El ovocito rodeado por la ZP y las células del *cumulus*, unidas entre sí por una matriz extracelular, recibe el nombre de complejo *cumulus-ovocito* (Talbot y DiCarlantonio, 1984a).

La ZP juega un importante papel en el proceso de fecundación, incluyendo el reconocimiento especie específico de los gametos, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión hasta la implantación en el útero (Wassarman, 1988).

La ZP es una estructura porosa que en varias especies como el ratón, el hámster, el conejo, la cerda y la vaca está formada por tres clases de glicoproteínas sulfatadas (Shimizu et al., 1983) denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassarman, 1980a; Wolgemuth et al., 1984; Wassarman, 1988; Araki et al., 1992; Noguchi et al., 1994; Moos et al., 1995), también llamadas ZPB, ZPA y ZPC, respectivamente, por el tamaño del gen que las codifica (Harris et al., 1994). En un trabajo reciente se indica que la ZP humana está constituida, también, por cuatro glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZPB (Lefièvre et al., 2004) al igual que la de rata (Hoodbhoy et al., 2005) y la de hámster (Avilés et al., comunicación personal).

Al menos en el ratón, que es la especie mejor estudiada, las tres glicoproteínas son sintetizadas y secretadas durante el crecimiento del folículo durante la ovogénesis y el grosor de la ZP va aumentando con el crecimiento del ovocito (Bleil y Wassarman, 1980a; Kimura et al., 1994). Sin embargo, en estudios realizados en cerda y vaca, se indica que tanto las células foliculares como el ovocito son responsables de la síntesis de la ZP (Sinowitz et al., 1995; Kölle et al., 1998). Los mismos resultados fueron hallados en la mona por Bogner et al. (2004). No obstante lo anterior, aún existe el debate sobre la procedencia de las proteínas que forman la ZP en algunas especies. En un estudio de Eberspaecher et al. (2001) en ratona, mona y mujer, se demuestra que las proteínas que forman parte de la ZP son expresadas y

ensambladas exclusivamente por el ovocito.

En la mayoría de las especies, la ZP es secretada morfológicamente en capas asimétricas, por lo tanto, encontramos diferencias entre la capa interna y la externa (Phillips y Shalgi, 1980; Ahuja y Bolwell, 1983; Shalgi y Raz, 1997). La capa interna estaría localizada cerca del ovocito, desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, mientras que la zona externa sería la que se ubica cerca de las células del *cumulus* y mediaría en la unión con el espermatozoide. Mediante microscopía electrónica de barrido, se han advertido poros superficiales en la ZP de ovocitos humanos no fecundados, con diámetros muy similares a la cabeza del espermatozoide, que podrían ser esenciales para la fecundación (Nikas et al., 1994), lo que se corrobora en observaciones de las porciones anteriores de las cabezas de espermatozoides humanos penetrando la ZP a través de estos poros (Tsuiki et al., 1986; Familiari et al., 1988). Hay, igualmente, variaciones morfológicas entre los poros de las distintas especies. Los poros de la ZP bovina son más pequeños que los de ratón y gato. En las diferentes especies la forma de los poros varía de elíptica a concéntrica (Vanroose et al., 2000) y, por lo general, los poros son mayores en la superficie externa de la ZP y van disminuyendo de tamaño centrípetamente hacia la zona interna (Nikas et al., 1994). La naturaleza porosa de la ZP permite, además, el ingreso de moléculas grandes como las inmunoglobulinas. No obstante, moléculas de menor peso molecular como la heparina, no son capaces de penetrar la ZP lo que indica que la habilidad de las moléculas para atravesar esta matriz extracelular no depende principalmente del tamaño de la molécula sino de otras propiedades bioquímicas y fisicoquímicas como, por ejemplo, la carga eléctrica que presente la superficie de la molécula (Shivers y Dunbar, 1997).

Aunque las tres glicoproteínas de la zona juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la ZP, están altamente diferenciadas en relación a su papel biológico. En el ratón, la **ZP1** actúa como un nexo de unión entre los filamentos de la ZP2 y la ZP3 (Wassarman, 1999). No obstante estudios posteriores han demostrado que esta teoría no es exactamente correcta. Esta última (**ZP3**), actúa como **receptor primario** de reconocimiento espermático de la especie (Bleil y Wassarman, 1980b; Wassarman, 1988). Para identificar esta función se añadió cada glicoproteína aislada a los espermatozoides y se determinó cuál podía unirse a este gameto y bloquear su interacción con el ovocito no fecundado. Bajo estas condiciones *in vitro* la ZP3 purificada se unió exclusivamente a la cabeza del espermatozoide de ratón con acrosoma intacto y, como resultado, impidió la unión del espermatozoide con el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980b, 1986; Wassarman, 1990), mientras que la ZP1 y la ZP2 carecieron de esta actividad inhibitoria. Por otro lado, la unión de la ZP3 está restringida a los espermatozoides de ratón con acrosoma intacto y no se observa en los que han sufrido la reacción acrosómica

(Bleil y Wassarman, 1986). Además, la unión entre la cabeza espermática y la ZP3 da lugar a la inducción de la RA (Bleil y Wassarman, 1983; Wassarman, 1988).

Después de producirse la RA, la **ZP2** (ZPA) en el ratón, y en la vaca (Hinsch et al., 2003) actúan como **receptor secundario** de reconocimiento, facilitando la penetración del espermatozoide reaccionado a través de la zona (Bleil et al., 1988) y activando procesos importantes para la prevención de la polispermia (Bleil y Wassarman, 1980b).

Estas glicoproteínas adquieren los oligosacáridos mediante un proceso conocido como **glicosilación**. Este proceso es una forma de modificación covalente de las proteínas sintetizadas por la adición de carbohidratos. Ésta se inicia en el retículo endoplásmico rugoso y se completa en el aparato de Golgi (Kobata, 1992; Roth, 1996; Benoff, 1997; Berger y Roth, 1997; Dennis et al., 1999). Estos oligosacáridos actúan como señales de reconocimiento a nivel de la superficie celular. Así, por citar un ejemplo, son responsables de la expresión del grupo sanguíneo (A, B y 0) en la especie humana.

Las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas de la ZP se clasifican en dos familias dependiendo de la naturaleza de la unión entre los oligosacáridos y la cadena polipeptídica: los oligosacáridos N-unidos (asparagina) y los O-unidos (serina/treonina) (Shimizu et al., 1983; Florman y Wassarman, 1985). En los oligosacáridos del tipo N-unidos (Asp) se forma un enlace glicosídico entre el carbohidrato N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y el grupo amino (NH<sub>2</sub>) del aminoácido terminal asparagina de la proteína (Figura 1). Los oligosacáridos del tipo N-unidos tienen en común los cinco residuos iniciales en su cadena, lo que se denomina "core".

Los oligosacáridos del tipo O-unidos (Ser/Tre) inician la glicosilación, generalmente, en el complejo de Golgi con la formación de un enlace glicosídico entre la N-acetil-galactosamina (GalNAc) y los residuos de serina o treonina de la proteína. Esta unión está catalizada por la enzima N-acetil-galactosaminiltransferasa. Posteriormente, otras transferasas contribuyen con la elongación de la cadena, constituyendo otros "core" o estructuras específicas.

Como resultado de la glicosilación, cada glicoproteína es relativamente ácida (Wassarman et al., 1999). Este componente glicosídico puede llegar a formar el 50% de la masa de algunas de las glicoproteínas, como sucede en la ZPC (ZP3) de las especies murina, bovina y humana. Por otro lado, estos carbohidratos parecen jugar un papel importante en la interacción espermatozoide-ovocito (Benoff, 1997; Shalgi y Raz, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001).

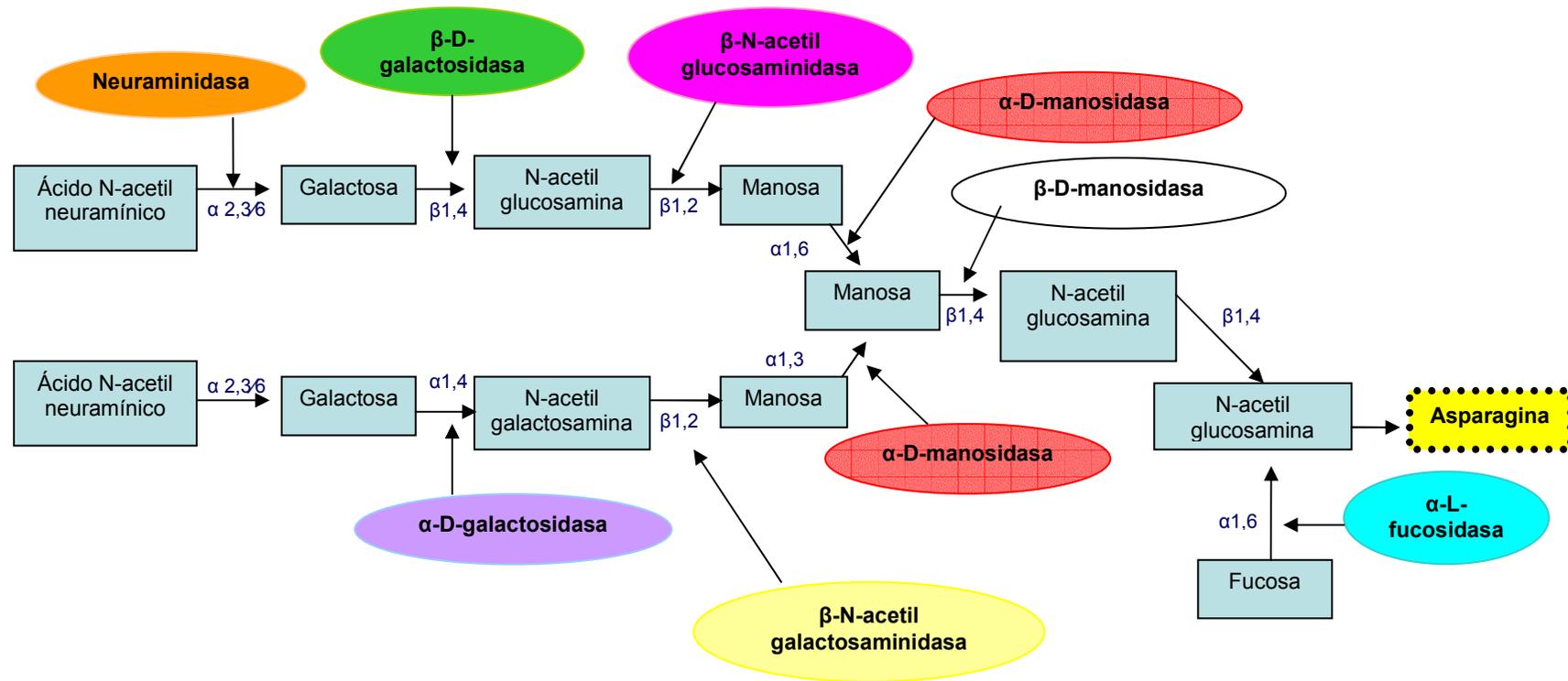
Análisis inmunocitoquímicos a nivel estructural revelan que la composición de azúcares de la zona es heterogénea en diferentes especies: residuos de  $\alpha$ -galactosa se encuentran ubicados en la porción interna de la zona pelúcida y otros, como por ejemplo, la N-acetil-glucosamina, dispersos uniformemente a lo largo de la zona (Avilés et al., 2000; Jiménez-Movilla et al., 2004). La heterogeneidad de la zona causa problemas cuando se interpreta el efecto de agregar ZP3 soluble o ZP3 tratada con glicosidasa porque una parte de la ZP3 podría ser de la porción interna de la zona y, por lo tanto, no estaría expuesta a la unión inicial con el espermatozoide.

Las cadenas de oligosacáridos de la ZP porcina han sido secuenciadas (Katsumata et al., 1996; Nakano et al., 1996; Yonezawa et al., 1999; von Wiitzendorff et al., 2005). La mayoría de los oligosacáridos tipo O-unidos y N-unidos son extensiones de repeticiones de lactosamina con tamaño heterogéneo, sulfatadas y con residuos terminales de ácido siálico. En esta especie, los dos tipos de oligosacáridos han sido postulados como ligandos en la unión con el gameto masculino (Yurewicz et al., 1991; Noguchi et al., 1992).

La ZP murina, motivo de numerosos estudios, ha sido secuenciada y sus cadenas oligosacáridas caracterizadas mediante técnicas muy sensibles como FAB y MALDI-TOF (Easton et al., 2000; Dell et al., 2003). Las cadenas de la ZP de ratón contienen en sus cadenas N-unidas estructuras de tipo rico en manosa y tipo complejo de cadenas biantenarias. Las estructuras terminales de la ZP tienen la presencia de polilactosamina y galactosa (Gal) terminal unida de tipo  $\alpha$  (Noguchi y Nakano, 1993). Sin embargo, recientemente (Easton et al., 2000) han determinado la presencia de la secuencia  $\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  que no había sido descrita.

Los oligosacáridos de tipo O-unidos secuenciados de la ZP de ratón presentan estructuras heterogéneas pero llevan el mismo rango de estructuras terminales que están presentes en los oligosacáridos del tipo O-unido. La mayoría de los glicanos son del tipo core 2 ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6[\text{Gal}\beta 1-3]\text{GalNAc}$ ) extendidos con uno o dos residuos de ácido siálico (N-acetil o N-glicolil-neuramínico), N-acetil-lactosamina ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ) con uno o dos residuos de ácido siálico,  $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$  y  $\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{NeuAc}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  (Easton et al., 2000; Dell et al., 2003).

Figura 1. Estructura de un oligosacárido biantenarico del tipo N-unido, enlazado a un residuo de asparagina de la proteína. Se muestra una deglicosilación secuenciada de las exoglicosidasas objeto de este estudio. Adaptado de Tulsiani, 2006.



En la actualidad, no existe un modelo único en el que se determinen las bases moleculares de la unión del espermatozoide con la ZP en los mamíferos, a pesar de las múltiples investigaciones realizadas (Rankin et al., 2003; Dean, 2004).

Mientras que en el ratón es universalmente aceptado que los oligosacáridos de la ZP3 son los responsables del enlace con el espermatozoide, en otros animales la situación no es tan clara. En especies domésticas como la porcina (Tabla 4) y la bovina (Tabla 5) hay evidencias de que la ZP4 (ZPB), probablemente en combinación con la ZP3 (ZPC), es la responsable de la interacción con el espermatozoide (Kudo et al., 1998; Yurewicz et al., 1998; Yonezawa et al., 2001). La determinación de los carbohidratos involucrados en el reconocimiento entre gametos, en estas dos especies, se realizó mediante ensayos de competición.

Tabla 4. Receptores para los espermatozoides en la ZP porcina.

<b>Azúcar</b>	<b>Referencia</b>
N-acetil-lactosamina	Mori et al., 2000
$\beta$ -galactosa	Yonezawa et al., 2005

Igualmente, empleando lectinas, se han encontrado en la ZP de los ovocitos porcinos residuos de  $SO_4$ - $\alpha$ -galactosa (Parillo et al., 2002) y, posteriormente Parillo et al. (2003) hallaron residuos de N-acetil-glucosamina,  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -fucosa,  $\beta$ -gal-(1,4)glcNAc,  $\beta$ -gal-(1,3)-galNAc,  $\beta$ -galNAc y ácido siálico en la ZP de los ovocitos de esta misma especie.

Tabla 5. Receptores para los espermatozoides en la ZP bovina.

<b>Azúcar</b>	<b>Referencia</b>
$SO_4$ - $\alpha$ -galactosa	Parillo et al., 2000
$\alpha$ -manosa	Amari et al., 2001
$\alpha$ -2,3 ácido siálico	Velásquez et al., 2007

Como en la especie porcina, Parillo et al. (2000) en estudio con lectinas en la bovina encontraron residuos de  $SO_4$ -galactosamina,  $SO_4$ -galactosil- $\beta$ -1,3galactosamina,  $SO_4$ -galactosil- $\beta$ -1,4-glucosamina en la ZP de los ovocitos.

En el ratón hay evidencias de que otra glicoproteína, ZP2 (ZPA), actúa como receptor secundario. Es decir que es responsable de la unión del espermatozoide reaccionado

a la ZP (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1994; Topper, 1997; Sinowatz et al., 2001; Dean, 2004). En cuanto a la glicoproteína ZP1 de ratón parece jugar un papel importante en la organización de la matriz de la ZP (Rankin et al., 1999). Sin embargo, es importante destacar que sin la presencia de la glicoproteína ZP3 no se produce la formación de la ZP durante la folículoogénesis siendo por lo tanto el papel de la ZP3 clave en la fecundación al actuar como receptor primario, inductor de la reacción acrosómica (en el ratón) y estructural (Rankin et al., 1998, 1999; Dean, 2004; Hoodhoy y Dean, 2004).

En general, se acepta que los oligosacáridos de la zona son los responsables de la interacción espermatozoide-ovocito (Benoff, 1997; Shalgi y Raz, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001), y que la unión entre los gametos es relativamente específica de especie debido a la diferente composición de los glúcidos que forman parte de las glicoproteínas en las distintas especies (Yanagimachi, 1994). Así, por citar un ejemplo, los residuos de  $\alpha$ -galactosa presentes en la ZP de ratón y rata (Tabla 6) no se manifiestan en la ZP de los ovocitos humanos ni de hámster (Shalgi y Raz, 1997; Avilés et al., 2000; Jiménez-Movilla et al., 2004). No obstante, la especificidad de especie en la interacción espermatozoide-ovocito parece muy relativa, puesto que en trabajos recientes existen evidencias que demuestran que los espermatozoides equinos y porcinos se unen a la ZP de los ovocitos bovinos (Sinowatz et al., 2003) y que los espermatozoides humanos se unen a la ZP de ovocitos porcinos (Cánovas et al., 2007). Sin embargo, estos azúcares no han sido bien identificados y los datos relacionados con los monosacáridos ubicados en los oligosacáridos del tipo O-unidos, que son necesarios para unir el espermatozoide a la zona, son contradictorios.

Los modelos que postulan la participación de determinados glúcidos O-unidos y N-unidos como receptores espermáticos apoyan la existencia de glicosidasas presentes en los gránulos corticales como responsables de la eliminación de esos azúcares tras la fecundación (Miller et al., 1993a).

Hay estudios que evidencian que los espermatozoides tanto de bóvidos como de suinos se unen a glúcidos del tipo O-unido a la ZP (Amari et al., 2001; Nakano y Yonezawa, 2001; Yonesawa et al., 2001). En el caso de la especie bovina, Amari et al. (2001) proponen una cadena con cinco residuos de manosa, del tipo N-unida, como responsable de la unión con el espermatozoide. Sin embargo, recientemente Velásquez et al. (2006) han demostrado la implicación del ácido siálico en la unión del espermatozoide a la ZP bovina, aunque todavía no se conoce el tipo de glicoproteína al que está unido el ácido siálico.

El hecho de que los carbohidratos presentes en la ZP parecen desempeñar un papel relevante en la interacción con el espermatozoide implica que la presencia de diferentes glicosidasas podría afectar a este proceso de unión entre gametos. Cabe esperar que el fluido oviductal no presente aquellas glicosidasas que pudieran hidrolizar los carbohidratos responsables de esta interacción.

Tabla 6. Azúcares receptores de espermatozoides de ratón y su ubicación en las proteínas de la ZP3.

Azúcar	Referencia
N-acetil-glucosamina	Shur y Hall, 1982; López et al., 1985; Miller et al., 1992
$\alpha$ -galactosa, $\alpha$ -Manosa	Bleil y Wassarman, 1988; Nakano y Yonezawa, 1993; Noguchi y Nakano, 1993 Cornwall et al., 1991; Tulsiani et al., 1992, Litscher et al., 1995
L-fucosa	Johnsston et al., 1998
$\beta$ -galactosa	Mori et al., 1997
galNAc $\beta$ 1-4(NeuAc $\alpha$ 2-3)gal $\beta$ 1-4glcNAc	Easton et al., 2000 ; Dell et al., 2003

### 2.2.2.3. Interacción ovocito-oviducto.

Al igual que ocurría con el espermatozoide, las moléculas implicadas en la interacción ovocito-oviducto han sido mucho menos estudiadas que las implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito. Aún así, existen algunas referencias interesantes que se comentan a continuación.

En los mamíferos, en el momento de la ovulación, las fimbrias envuelven al ovario y el infundíbulo recoge el contenido de los folículos, es decir, los ovocitos recién ovulados y rodeados de las células del *cumulus oophorus* (Talbot y Di Carlantonio, 1984a) y un pequeño volumen de fluido folicular denso (Leese, 1988). La **captación** de los ovocitos se produce en virtud del movimiento de los cilios y la adhesión de los complejos *cumulus*-ovocito (CCO) al epitelio oviductal (Norwood et al., 1978; Talbot et al., 1999). Los cilios conducen el CCO rumbo a la ampolla donde sobreviene la fecundación (Huang et al., 1997).

Si bien es cierto que los cilios crean corrientes capaces de mover pequeñas partículas como esporas de licopodio (Norwood et al., 1978; Talbot et al., 1999)

también lo es que, las solas corrientes no pueden desplazar hacia la abertura del infundíbulo estructuras mayores como los CCO que tienen entre 0'7-1'0mm de diámetro. Por lo tanto, la **adhesión** es necesaria para fijar los CCO al epitelio del infundíbulo y de esta manera permitir que los cilios vibrátiles conduzcan los CCO sobre la superficie del infundíbulo sin perder su contacto. La adhesión entre los CCO y el infundíbulo es específica, puesto que los CCO no se adhieren bien a otros epitelios, incluyendo las células ciliadas de la tráquea (Lam et al., 2000).

Estudios realizados por Lam et al. (2000) revelan que la **matriz extracelular** de los CCO y las coronas de los cilios que constituyen el epitelio oviductal, participan en el proceso de adhesión de los ovocitos. El **contacto** de la matriz extracelular podría ser entre el **ácido hialurónico** (Chen et al., 1990; Kan, 1990; Dandekar et al., 1992; Salustri et al., 1992; Russell y Salustri, 2006) y las **proteínas**, como el inhibidor de Inter- $\alpha$ -tripsina, la dermatina (un proteoglicano sulfatado) y una proteína de 46 kDa (Camaioni et al., 1996; Chen et al., 1996; Familiari et al., 1996). Pruebas de microscopía revelan que las proteínas y el ácido hialurónico se mezclan y conforman una red constituida por gránulos y filamentos (Talbot y DiCarlantonio, 1984b; Talbot, 1984) y que la proteína inhibidora de la tripsina se enlaza covalentemente a los hialuronatos durante la expansión del *cumulus* (Russell y Salustri, 2006; Scarchilli et al., 2007).

Por otra parte, la capa muscular que integra la capa media de la pared del oviducto está constituida por células dispuestas circular y longitudinalmente. En el momento del estro, la dirección de la actividad contráctil es desde la ampolla hasta el sitio de fecundación.

Durante la etapa de **transporte** se produce la maduración final del ovocito secundario; en esta madurez ZP podría sufrir cambios en su composición si se tiene en cuenta que el ovocito pasa de un ambiente folicular, a otro muy diferente, el tubárico (Hunter, 1989). La adhesión de glicoproteínas oviductales (oviductinas) a la ZP es, tal vez, uno de los cambios más importantes (Hunter, 1989; Buhi et al., 1993; Hunter, 1994; Buhi, 2000).

### 2.3. Enzimas y fluido oviductal.

Una vez estudiados los diferentes ligandos y receptores involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito y en las interacciones entre los gametos y las células oviductales, corresponde la revisión de lo que constituye el objetivo central de este trabajo, es decir, la investigación de la posible actividad de diferentes enzimas en el fluido oviductal para poder estudiar en el futuro el papel que cada una de estas enzimas podría jugar en las interacciones celulares mencionadas.

### 2.3.1. Histología del oviducto.

El oviducto es el lugar del aparato reproductor femenino donde, en condiciones apropiadas, se realizan la maduración de los gametos y la fecundación y se llevan a cabo las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Desde el punto de vista anatómico, el oviducto se puede dividir en cuatro regiones: el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la unión útero-tubárica (Abe, 1994,1996; Hunter, 1994).

Cada región del oviducto está formada por células ciliadas y secretoras pero distribuidas en diferentes proporciones. La pared del oviducto consta de tres capas diferentes: una serosa externa, una muscular media y una mucosa interna. El epitelio oviductal está constituido por células cilíndricas ciliadas y células secretoras (Harper, 1988; Gandolfi, 1995; Abe, 1996). Las células ciliadas presentan microvellosidades en su superficie externa. Estas células se encuentran en altas proporciones en el epitelio tanto de las fimbrias como de la ampolla (Nakatani et al., 1985; Harper, 1988). Los cilios juegan un importante papel en la conducción del ovocito en estas dos regiones (Nakatani et al., 1985; Harper, 1988; Di Carlantonio et al., 1995). No obstante, la función de las células ciliadas en el istmo no ha sido completamente esclarecida.

Las células secretoras predominan en el istmo y, a diferencia de las ciliadas, forman elevaciones o domos en el epitelio. Su estructura interna es la típica de las células que sintetizan activamente proteínas, es decir, con gránulos secretores de distinta naturaleza (Harper, 1988). Se desconoce, en parte, si la secreción de las distintas regiones del oviducto es la misma a pesar de que, en ellas, los tipos celulares son similares (Abe, 1996).

Estudios realizados en células del epitelio oviductal humanas han demostrado la presencia de receptores para estrógenos y progesterona (Amso et al., 1994). Hay evidencias de que el desarrollo de los cilios en el oviducto depende de la presencia de estrógenos y es inhibido y bloqueado por la progesterona. Esta regulación hormonal se aprecia tanto en el infundíbulo como en la ampolla según la fase del ciclo estral o menstrual (Harper, 1988). Bajo la influencia de la progesterona las células ciliadas se reducen en número (Brenner et al., 1983; West y Brenner, 1985; Slayden y Brenner, 2004). La formación de los cilios se lleva a cabo durante la fase proliferativa del ciclo menstrual (proestro en el ciclo estral) en respuesta a estrógenos, mientras que la madurez la adquieren hacia la mitad del ciclo (Verhage et al., 1979; Abe y Oikawa, 1993; Steinhauer, 2004). En contraste, la mayor actividad ciliar se percibe una vez producida la ovulación durante la fase luteínica (Critoph y

Dennis, 1977; Patton y Halbert, 1979; Halbert y Patton, 1981). Un incremento similar en la actividad ciliar se ha observado en el oviducto de coneja tres días después del apareamiento cuando los ovocitos o los embriones deben estar en el istmo; en consecuencia, el significado de este cambio es desconocido (Borell et al., 1957).

A la mitad del ciclo en la mujer, el epitelio oviductal alcanza su altura máxima (30-35µm) y ambos tipos de células tienen el mismo tamaño. Inmediatamente se sucede la ovulación, las células secretoras descargan su producto y, con frecuencia, reducen su tamaño por lo que los cilios se hacen más prominentes. Posteriormente, todo el epitelio se contrae debido al aplanamiento y ensanchamiento de las células ciliadas (Harper, 1988).

Las células secretoras del istmo son más activas hacia la mitad del ciclo. Los estrógenos estimulan la secreción del epitelio oviductal que es máxima en la fase folicular del ciclo estral (Lippes et al., 1981; Nancarrow y Hill, 1995). El istmo se llena durante todo el período folicular con secreciones apocrinas que, parece, no emergen en la ampolla (Harper, 1988).

### 2.3.2. Fluido oviductal (FO).

El fluido oviductal (FO) representa el entorno acuoso donde los gametos y los embriones se encuentran suspendidos durante el tránsito por el oviducto. Este fluido es una mezcla de iones y macromoléculas solubilizadas en agua. Análisis bioquímicos muestran que el FO es un medio complejo constituido por una sutil mezcla de un exudado de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, de productos específicos de secreción de origen epitelial, y de los fluidos folicular y peritoneal (Beier, 1974; Leese, 1988; Malayer et al., 1988). La concentración de los nutrientes en el FO está generalmente por debajo de sus concentraciones en el plasma (Leese y Barton, 1984), lo que indica que el transporte a través del oviducto ocurre por difusión (Leese y Gray, 1985). Algunos componentes del FO como iones (Brunton y Brinster, 1971; Brunton, 1972), albúmina (Glass, 1969), inmunoglobulinas (Parr y Parr, 1986), glucosa y piruvato (Leese y Gray, 1985) se consideran que son transferidos de la sangre, mientras que un número de proteínas específicas del oviducto son sintetizadas "de novo" por las células epiteliales (Gandolfi et al., 1993; Gandolfi, 1995; Killian, 2004).

La secreción de FO en la coneja ha sido medida por la diferencia de potencial entre la capa serosa (positiva) y el lumen (negativo). Un incremento en la diferencia de potencial ha sido asociado con el descenso en la producción del fluido luminal, y esta inhibición es mediada por el AMP<sub>c</sub> (Gott et al., 1988). En humanos, hay evidencia suficiente que indica que la fuerza que conduce a la formación del FO es la secreción

transepitelial de iones  $\text{Cl}^-$  dentro del lumen del oviducto y que el ATP extracelular es el modulador potencial de esta secreción (Dickens et al., 1996; Downing et al., 1997). Asimismo, se ha propuesto que agonistas adrenérgicos y el  $\text{AMP}_c$  son los moduladores de la formación de fluido oviductal en conejas, en parte por la vía del transporte transepitelial de  $\text{Cl}^-$  (Dickens et al., 1993).

Además de las propiedades secretoras, el epitelio del oviducto parece que tiene también algunas funciones de absorción. La vilina, una proteína de 95 kDa asociada con la actina, considerada como marcador típico de las células de absorción (Bretscher et al., 1981), fue detectada en la porción proximal del oviducto de ratona (infundíbulo, ampolla y parte del istmo) lo que sugiere una posible función de absorción (Horvat et al., 1990). Además de esto, la idea de un movimiento molecular bidireccional a través del epitelio oviductal había sido propuesta inicialmente por Leese (1988).

El **pH** del oviducto ha sido determinado en varias especies. En estudios realizados en cerdo (Engle et al., 1968; Hunter, 1988), conejo (Vishwakarma, 1962; Mass et al., 1977; 1987), humano (David et al., 1973) y macaco (Mass et al., 1977) se ha observado que los valores de pH varían según la especie y que las características del pH, como el gradiente de temperatura, difieren considerablemente con la etapa del ciclo estral y con la región del oviducto (Mass et al., 1977; 1987). En la rata, el fluido de la ampolla, que es el sitio de fecundación, tiene un pH de 8-8'2 (Ben-Yosef et al., 1996). Igualmente, Nichol et al. (1997), midieron *in vivo* el pH en distintas regiones del oviducto de cerdas y hallaron que, hacia la mitad del ciclo, el pH fluctúa entre 0'3 y 0'7 unidades en la ampolla y la unión ampollar-ístmica respectivamente, y que en el momento de la ovulación el pH aumenta 0'4 unidades probablemente debido a la alcalinidad del fluido folicular. Estas variaciones de pH, en el momento de la ovulación, podrían permitirle a las glicosidasas encontrar su pH óptimo de acción, incrementar su actividad enzimática e incidir en la liberación de los espermatozoides de su lugar de almacenamiento en la parte distal del istmo.

Si bien es cierto que los embriones parecen ser tolerantes a un amplio rango de pH (Brinster, 1965a,b; Zhao et al., 1995; Kane, 1974; Bavister, 1988) y que Ben-Yosef et al. (1996) mostraron que el pH interno de los ovocitos ovulados de rata no cambia durante la fecundación, a pesar de que las oscilaciones internas de calcio eran evidentes, también lo es que pequeñas alteraciones en el pH parece que causan dramáticos efectos en otros procesos fisiológicos que ocurren en el fluido del oviducto. Por ejemplo, (a) la concentración fisiológica de bicarbonato: promueve la separación de las células de la *corona* de los ovocitos de coneja (Stambaugh et al., 1969), (b) estimula el proceso de la respiración en el espermatozoide (Hamner y Williams, 1964), y (c) causa la hiperactivación de la motilidad del espermatozoide

(Boatman y Bavister, 1983; Yanagimachi, 1988, 1994) que es esencial para la penetración de la zona (Boatman y Robbins, 1991). En consecuencia, estas variaciones de pH del oviducto tienen gran significado, dado que el pH alcalino que acompaña al ovocito en su descenso por el oviducto podría influenciar la motilidad del espermatozoide cuando está en la proximidad del gameto femenino. Además, el perfil del pH del oviducto parece controlado tanto por los mecanismos local y sistémico, como por la presencia de factores embrionarios (Nichol et al., 1997).

#### 2.2.2.2. Métodos de recogida del fluido oviductal.

El fluido oviductal ha sido obtenido de diversas maneras para propósitos experimentales: directamente de animales vivos, de hembras ovariectomizadas o de animales sacrificados en el matadero. Muestras de FO de la ampolla y de la unión útero-tubárica han sido también recogidas con una micropipeta en cerdas anestesiadas (Engle et al., 1968). Además, en una serie de experimentos en conejas anestesiadas, los oviductos fueron canulados en cada extremo y una determinada cantidad de solución salina se hizo recircular por el lumen durante 4 horas para estudiar el movimiento de aminoácidos (Leese et al., 1979) y de sustratos energéticos (Leese y Aldridge, 1979) a través del epitelio oviductal. A continuación describiremos algunas de las técnicas mencionadas.

La recogida *in vivo* del fluido luminal ha sido realizada durante años por un gran número de investigadores en animales domésticos y en diferentes etapas del ciclo reproductivo, mediante **canulación**. Esta técnica incluye la implantación y fijación quirúrgica de una cánula en el oviducto (generalmente al final de la ampolla) para recoger el FO durante un período de tiempo limitado. Para asegurarse de que sólo se recoge FO y prevenir el paso del fluido al útero, se liga la unión útero-tubárica con el mismo tipo de ligadura (Bishop, 1956). De esta forma se recoge el fluido de todo el tracto oviductal. La cánula se exterioriza a través de una incisión que se hace en el costado del animal. La inserción de cánulas en animales vivos para la recogida de FO ofrece la ventaja de poder realizarla diariamente y durante varios ciclos estrales. Sin embargo, la alta susceptibilidad de contaminación del FO, la evidente formación de edema en las paredes del oviducto, el rechazo de la cánula por el órgano y la obstrucción del catéter con fibrina son algunas de sus desventajas. Además el mantenimiento de los animales en estas condiciones es complejo.

Esta técnica se ha realizado con éxito en la especie **bovina** (Stanke et al., 1974; Roberts et al., 1975; Kavanaugh y Killian, 1988; Gerena y Killian, 1990; Wegner y Killian, 1991; Greve et al., 1996), **porcina** (Engle et al., 1968; Rodríguez-Martínez et al., 1983; Archibong et al., 1989; Nichol et al., 1992), **ovina** (Black et al., 1963; Perkins et al., 1965; Iritani et al., 1969; Warnes et al., 1978; Sutton et al., 1984a),

**cunicula** (Bishop, 1956; Mastroianni et al., 1961; Engle et al., 1968; Liberski y Boatman, 1995), **equina** (Engle et al., 1970, 1975, 1984; Cambell et al., 1979; Willis et al., 1994), **simia** (Mastroianni et al., 1961; 1970) y **humana** (Lippes et al., 1972; Borland et al., 1980).

Con este método se pueden colocar cánulas tanto en la ampolla como en el istmo de un mismo oviducto, de tal manera que es posible establecer diferencias regionales para investigar no sólo la composición del fluido sino, también, su función (Kavanaugh et al., 1992; Grippo et al., 1992, 1994, 1995; Way et al., 1994; Rodríguez y Killian, 1998; Staros y Killian, 1998).

La **inyección vascular** es otra forma de recogida de FO usando preparaciones oviductales *in vitro*. Se inyectan determinadas sustancias a la arteria ovárica, se dejan circular y, finalmente, se drenan a través de una incisión en la vena ovárica. No hay recirculación. Para hacer la recogida de FO se coloca una cánula en el lumen del oviducto. Esta técnica tiene la ventaja de enviar los nutrientes y el oxígeno directamente al tejido a través de la ruta fisiológica, además de que la formación de FO puede ser monitorizada continuamente mientras que los compuestos del ensayo son agregados al medio en las concentraciones deseadas por tiempos mayores de 3 horas. De esta forma se han hecho estudios sobre la composición de FO en conejas (Leese y Gray, 1985; Gott et al., 1988; Dickens y Leese, 1994) y mujeres (Dickens et al., 1995; Tay et al., 1997).

El fluido oviductal también ha sido recogido a partir de animales sacrificados en el matadero. Dos métodos empleados para la obtención del FO son el lavado y la aspiración.

En el **lavado**, antes de hacer la disección de los oviductos, se hace una incisión sobre la unión útero-tubárica y se coloca un catéter a 1-2 cm en dirección hacia la ampolla. Con la ayuda de una jeringa se introduce una solución a través del infundíbulo, se presiona el oviducto en la dirección del catéter y se recoge el FO diluido con la solución empleada (Buhi et al., 1997).

En cuanto a la **aspiración**, las muestras de FO se obtienen cuidadosamente tras disecar el oviducto bajo condiciones de asepsia usando tijeras y pinzas apropiadas. Una vez disecado el oviducto, se inserta la punta de una pipeta en el lumen de la ampolla y el fluido se aspira en esa dirección, como resultado de la presión negativa creada por la liberación del émbolo de la pipeta y la simultánea presión manual sobre el oviducto en la misma dirección (Romar et al., 1997; Elhassan et al., 2001). Con esta técnica se pueden obtener muestras de fluido de todo el oviducto o por regiones, evitándose de esta forma el manejo de los animales que conllevan los métodos de

recogida de FO *in vivo*. Además, se puede programar la recogida de FO puesto que los oviductos se pueden conseguir diariamente, durante todo el año. Otra ventaja, frente a los lavados, es que con la aspiración se obtiene el FO puro sin diluir y permite obtener FO de un número muy elevado de muestras. Quizás el inconveniente sea el poco volumen de FO obtenido por oviducto y el entrenamiento que requiere la disección individual de los oviductos.

#### 2.3.2.2. Composición del fluido oviductal.

Los componentes del FO, en general, se pueden dividir en dos grupos: los electrolitos (iones) y los compuestos orgánicos.

Para la mayoría de las especies la concentración de **iones** en el FO tiende a ser igual a la sanguínea, con algunas excepciones. El FO tiene consistentemente concentraciones más altas de  $K^+$  y  $Cl^-$  que la sangre (Lippes et al., 1972; David et al., 1973; Borland et al., 1980). De la misma manera, los niveles de  $K^+$  en el fluido oviductal bovino (FOB) son considerablemente más elevados que en el plasma, siendo mucho más altos en el momento del estro o cerca de él (Olds y VanDemark, 1957). Los altos niveles de  $K^+$  en el FO parecen ser constantes en todas las especies y es un factor que debe ser considerado cuando se diseñan medios de cultivo para fecundación y cultivo embrionario temprano. En experimentos realizados en ovocitos de ratona sometidos a un sistema de fecundación *in vitro*, se obtuvieron más gestaciones usando un medio formulado sobre la composición del fluido oviductal humano, que con el medio Tyrode's (que contiene una concentración más baja de  $K^+$ ). La disminución del contenido de  $K^+$  del FO humano, al nivel que presenta el medio Tyrode's, disminuyó el número de los embriones de ratón en desarrollo (Quinn et al., 1985). Estudios en conejo indican que bajas concentraciones de  $K^+$  pueden inhibir la motilidad del espermatozoide, supresión ésta que puede ser revertida con piruvato (Burkman et al., 1984). Datos experimentales de Murdoch y White (1971) sugieren que la inhibición de la motilidad del espermatozoide por la baja concentración de  $K^+$  es mediada por el consumo de oxígeno y la glicólisis.

En vacas, las concentraciones de  $Ca^{2+}$  en el FOB del istmo son significativamente más altas que las del FOB de la ampolla, y se mantienen más elevadas que las de niveles plasmáticos en el momento de la ovulación (Grippio et al., 1992). Por el contrario, el  $Ca^{2+}$  en el FO humano tiende a ser más bajo que en el suero (Borland et al., 1980). Igualmente, las concentraciones de  $Mg^{2+}$  en el FOB varían significativamente de acuerdo con la etapa del ciclo estral, pero no en relación con la región del oviducto y son consistentemente bajas comparadas con las del suero (Grippio et al., 1992). Sorpresivamente, la concentración de  $Mg^{2+}$  en FO de yegua es de 2 a 5 veces más alta que la media de la concentración del plasma sanguíneo

(Cambell et al., 1979) y, aparentemente, más elevada que en otras especies. En la cerda, los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  se encuentran en mayor concentración que los de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{P}^{5,+/-,3,4}$  (Iritani et al., 1974).

La concentración de **proteínas** en el FO es aproximadamente un 10-15% de su concentración en el suero (Leese, 1988). El fluido del oviducto está constituido parcialmente por dos clases de proteínas que derivan de dos fuentes: la trasudación de la mucosa y las secreciones propias de las células epiteliales. La primera, es la mayor fuente de proteínas del FO y está constituida principalmente por albúmina e inmunoglobulinas (Leese, 1988), que representan cerca del 95% del total del contenido proteico del FO (Oliphant et al., 1978). Por otra parte, las proteínas sintetizadas “de novo” por las células oviductales aportan la segunda fuente de proteínas intraluminales en las especies estudiadas. Análisis de éstas proteínas muestran que están glicosiladas y, pese a la presencia de las células del *cumulus* y de la *corona radiata*, gran cantidad de ellas se unen a la zona pelúcida del ovocito después de la ovulación e, incluso, muchas de ellas la cruzan y se asocian a las blastómeras del embrión en desarrollo (Gandolfi et al., 1989; Kan et al., 1993; Murray, y Mesinger, 1994). La mayoría de las glicoproteínas específicas del oviducto (OGP) se originan en las células secretoras no ciliadas del epitelio oviductal. Estudios inmunocitoquímicos han localizado OGP en los gránulos secretores de las células secretoras oviductales. Incluso, diferencias regionales en la localización de estas OGP han sido demostradas repetidamente (Kapur y Johnson, 1986, 1988; Abe y Oikawa, 1991; Gandolfi et al., 1991; Kan et al., 1993; Abe, 1996), lo que indica un importante grado de especificidad regional en la síntesis de las OGP. Igualmente existen diferencias en la secreción de estas OGP según la fase del ciclo estral en que se encuentra el animal, presentándose las concentraciones más altas durante el periodo periovulatorio. Mientras los estrógenos estimulan la síntesis y la secreción de las OGP, la progesterona, por el contrario, parece tener poco efecto (Abe et al. 1998).

Las OGP han sido identificadas y caracterizadas en varias especies como el **ratón** (Kapur y Johnson, 1985, 1986), **hámster** (Leveille et al., 1987; Oikawa et al., 1988; Kan et al., 1990; Abe et al., 1992), **rata** (Abe y Abe, 1993), **oveja** (Sutton et al., 1984a; 1986), **cerda** (Buhi et al., 1989), **vaca** (Malayer et al., 1988; Boice et al., 1990a; Gerena y Killian, 1990), **cabra** (Gandolfi et al., 1993; Abe et al., 1995a), **babuino** (Fazleabas y Verhage, 1986; Verhage y Fazleabas, 1988, Verhage et al., 1989) y **humano** (Verhage et al., 1988; Wagh y Lippes, 1989).

Aunque la función biológica de estas proteínas no ha sido demostrada, algunas de ellas se han encontrado asociadas con la zona pelúcida (Abe y Oikawa, 1990; Boice et al., 1990b; Kan et al., 1990; Wegner y Killian, 1991; Staros y Killian, 1998), con el citoplasma de los ovocitos ovulados (Brown y Cheng, 1986; Hedrick et al., 1987;

Kapur y Johnson, 1988; Kan et al., 1989), con embriones en las primeras etapas del desarrollo (Gandolfi et al., 1989, 1991; Boice et al., 1992) o con la superficie del espermatozoide (Sutton et al., 1984b; Lippes y Wagh, 1989; McNutt et al., 1992; King y Killian, 1994; King et al., 1994; Abe et al., 1995b).

Asimismo, se ha demostrado que el contacto de los espermatozoides bovinos con las OGP induce la capacitación (McNutt et al., 1992). También se ha sugerido que otra función de las proteínas del oviducto estaría asociada con el mecanismo de liberación de los espermatozoides, que se encuentran adheridos a las células epiteliales del istmo (Gandolfi, 1995). La exposición de ovocitos porcinos maduros y/o espermatozoides a las OGP porcinas disminuye tanto la polispermia como la fijación de los espermatozoides a la ZP, pero mantiene altas tasas de penetración en los ovocitos fecundados *in vitro*. Además de esto, las OGP tienen un efecto embriotrófico cuando son agregadas al medio de cultivo de embriones porcinos aumentando los porcentajes de división embrionaria y la formación de blastocistos (McCauley et al., 2003).

En un estudio realizado en el hámster dorado, una OGP, denominada oviductina-1, fue localizada en los gránulos secretores de las células oviductales no ciliadas. Esta proteína es transferida a la zona pelúcida de los ovocitos durante su tránsito a través del oviducto, más tarde aparece interiorizada por las blastómeras de embriones de 2, 4 y 9 células y, posteriormente, es procesada mediante la vía metabólica endosomal/lisosomal (Kan et al., 1988, 1989, 1993). Igualmente, en el ganado vacuno, ha sido detectada una OGP de 97kDa en las células secretoras de la ampolla y del istmo (Boice et al., 1990a). En la oveja, una glicoproteína similar de 92kDa ha sido encontrada solamente en las células secretoras (no ciliadas) de la ampolla pero no en las del istmo (Gandolfi et al., 1991). El hecho de que esta glicoproteína solamente haya sido encontrada en los gránulos de secreción de las células secretoras de la ampolla, indica que esta OGP es producida exclusivamente por la región del oviducto en donde la fecundación y el desarrollo embrionario temprano tienen lugar (Abe, 1996).

Adicionalmente, las lipoproteínas de alta densidad del FO de la fase folicular del ciclo estral tienen un efecto capacitante *in vitro* (Ehrenwald et al., 1990). Se cree que estas lipoproteínas están involucradas en la capacitación espermática como aceptores del colesterol liberado de la membrana plasmática del espermatozoide capacitado (Ehrenwald et al., 1990).

La composición de **ácidos grasos** en el FO también ha sido analizada. Un total de 8 ácidos grasos (mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico) han sido identificados como los más comunes constituyentes del FO

(Yahia Khandoker et al., 1997). En suinos y bóvidos, existen diferencias tanto en el contenido como en la composición de ácidos grasos en el FO, debido a las posibles diferencias en los procesos de secreción y transudación (Leese, 1988). En las dos especies el ácido oleico es el mayor componente (~37%), seguido del palmítico (~32%) y el esteárico (21~%). Además, la presencia de los 3 ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico y araquidónico) conocidos como esenciales (McDonald et al., 1973) en el FO de estas especies es interesante, debido a que son los precursores de la síntesis de las prostaglandinas (Tsafirri et al., 1972). Mientras que la presencia de ácido mirístico y palmitoleico es escasa en el fluido oviductal porcino (FOP). Además, los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico constituyen aproximadamente el 80% del total de ácidos grasos del FOP y FOB (Yahia Khandoker et al., 1997). Similares promedios se presentan para la fracción de ácidos grasos en FO humano y el plasma sanguíneo de la mayoría de los animales (Spector, 1971).

La concentración de **hormonas** en el fluido luminal del oviducto también ha sido determinada en varias especies. La concentración de **progesterona** en el FO de hámster en el momento de la ovulación es significativamente más baja que en el fluido folicular pero más alta que en el plasma (Libersky y Boatman, 1995). Las concentraciones de **estradiol** en el FO de coneja durante el estro y la pseudopreñez son similares a las del suero; en contraste, las concentraciones de progesterona son similares a las del plasma durante el estro, pero más bajas durante la pseudopreñez (Richardson y Oliphant, 1981). Adicionalmente, el número de los receptores de estradiol y de progesterona en el oviducto de cerda se ha estudiado durante el ciclo estral. Estos receptores siguen un patrón similar, incrementándose durante el estro y disminuyendo a partir de ese momento, pero su número varía significativamente entre la ampolla y el istmo (Stanchev et al., 1985). En bovinos, la progesterona actúa sobre los tejidos después de unirse a su receptor intracelular. D'Haeseler et al. (2007) hallaron que el número de receptores de progesterona en los folículos primordiales, primarios y secundarios aumenta progresivamente con la maduración del folículo. Igualmente, en las células de la granulosa la cantidad de estos receptores es mayor en los cuerpos hemorrágicos y disminuye en las luteínicas del cuerpo lúteo, posiblemente debido al efecto negativo de alta producción local de progesterona, y menor las del estroma del cuerpo *albicans*. Además, las estructuras foliculares examinadas (folículos, células granulosas) poseen más receptores de progesterona durante el estro que en las demás etapas del ciclo estral. Estas variaciones en el número de receptores de progesterona en los diferentes tejidos del ovario bovino sugieren una influencia ciclo-dependiente de la progesterona.

Las hormonas esteroideas, cualitativa y cuantitativamente, modifican el fluido luminal del oviducto, a través tanto de un efecto directo sobre las células epiteliales como indirecto por medio de su acción sobre la red vascular (Jansen, 1984).

Particularmente, los estrógenos estimulan la secreción de fluido oviductal mientras que la progesterona la inhibe (Perkins, 1974). En general, la cantidad del fluido producido por el oviducto se incrementa durante el estro y disminuye en el metaestro, diestro y la preñez. Asimismo, un aumento de la secreción del fluido puede diluir la concentración de ciertos componentes como nitrógeno no proteico y ácido láctico (Iritani et al., 1971). Igualmente, el efecto de las hormonas esteroideas también se ha probado en ovejas ovariectomizadas donde las tratadas con estrógenos aumentaron la secreción de FO, mientras que en las tratadas con progesterona se disminuyó e incluso antagonizó el efecto del estrógeno (McDonald y Bellvé, 1969).

Asimismo, el estudio de las **prostaglandinas** en el FO ha concentrado la atención de los investigadores. La prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) ha sido detectada en fluido oviductal, en epitelio, lámina propia de las fimbrias y ampolla de los oviductos humanos (Ogra et al., 1974). Mientras que las concentraciones de PGF2 $\alpha$  fueron medidas en el FO ovino y no se observó relación con la etapa del ciclo estral (Warnes et al., 1978), en el cerdo hay fluctuaciones diarias evidentes y un patrón consistente entre la concentración de PGF2 $\alpha$  y la etapa del ciclo estral, detectándose las mayores concentraciones al segundo día del celo (Rodríguez-Martínez et al., 1983).

La prostaglandina E2 (PGE2) y la PGF2 $\alpha$  aumentan significativamente en las fimbrias del oviducto de coneja justo antes de la ovulación, lo que indica que juegan un importante papel en la ovicaptación (McComb y Moon, 1985). En los oviductos humanos, las concentraciones de PGE2 y PGF2 $\alpha$  se elevan a lo largo del oviducto, siendo más bajas en la unión útero-tubárica y las mayores en las fimbrias. Estas prostaglandinas aumentan su concentración casi al doble durante la fase luteínica que en la etapa folicular (Nieder y Augustin, 1986). Del mismo modo, en los oviductos humanos el número de sitios de unión para la PGE2 y la PGF2 $\alpha$  es mayor en el istmo que en la ampolla y su número aumenta durante la fase luteínica (Sato, 1988). Por otro lado, la síntesis de PGF2 $\alpha$  de las células epiteliales del oviducto bovino se encuentra bajo la regulación inhibitoria de la hormona del crecimiento y del factor del crecimiento I (IGF-I) (Makarevich y Sirotkin, 1997).

A su vez, la **gonadotropina coriónica** humana (hCG) parece estimular la producción de prostaglandinas de la mucosa del oviducto. Se ha demostrado que la PGE2 inhibe las contracciones y estimula la frecuencia del batido de los cilios (Coutinho y Maia, 1971; Spilman y Harper, 1975; Nozaki e Ito, 1986) lo que sería necesario para la fecundación y el transporte del embrión. El incremento de los niveles de hCG da como resultado un aumento en la síntesis de ARNm y de ciclooxigenasa-2 y, por consiguiente, aumenta la producción de PGE2 por las células de la mucosa del oviducto humano (Han et al., 1996).

Los **factores de crecimiento** son hormonas que se han detectado en el FO como reguladores multifuncionales de la proliferación y la diferenciación celular. Hay claras evidencias de que muchos factores de crecimiento están involucrados, entre otros, en el desarrollo embrionario temprano, lo mismo que en otros procesos reproductivos como el crecimiento del trofoblasto, la diferenciación de las células del endometrio, la nidación del embrión, la proliferación de las membranas asociadas y la regulación de la esteroidogénesis (Simmen y Simmen, 1991). Muchos estudios han demostrado la presencia de factores de crecimiento, sus receptores y de las proteínas de unión a dichos factores en el tejido del oviducto y/o el FOB (Gandolfi et al., 1995), el FOP (Wiseman et al., 1992) y de otras especies (Eriksen et al., 1994; Watson et al., 1994; Adachi et al., 1995).

En consonancia con esto, se ha observado que el contenido de IGF-I y II en el FOP es más elevado en el estro que en el proestro o metaestro, aunque las concentraciones en estas dos últimas etapas permanecen similares (Wiseman et al., 1992). Igualmente en el oviducto ovino, el ARNm que codifica para IGF-I muestra un patrón crítico, incrementándose rápidamente durante la fase folicular y disminuyendo posteriormente (Stevenson y Wathes, 1996). De la misma manera, ARNm, IGF-I, IGF-II y sus proteínas de unión (IGFBP-2,-3,-4 y -5) han sido detectados tanto en los oviductos bovinos como en las células oviductales cultivadas *in vitro* (Xia et al., 1996; Winger et al., 1997). Asimismo, el IGF-I, su receptor (IGF-IR) y las proteínas de unión (IGFBP 1-4) se han hallado por inmunohistoquímica en la ampolla y el istmo de oviductos humanos. Su número es ciclo-dependiente, incrementándose durante la fase de proliferación tardía y la fase secretora temprana (Pfeifer y Chegini, 1994). Adicionalmente, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), su receptor (EGFR), el factor de crecimiento transformante (TGF $\alpha$ ) y la amfirregulina (un factor de crecimiento) han sido encontrados en el oviducto porcino (Kennedy et al., 1994; Swanchara et al., 1995; Wollenhaupt et al., 1997). En tanto que el EGF sigue un patrón cíclico de liberación, aumentando más en las cerdas cíclicas que en las recién preñadas (Swanchara et al., 1995), el EGFR está más elevado en el primer día del ciclo estral que en el sexto (Wollenhaupt et al., 1997). Por otra parte, los factores EGF, TGF $\alpha$  y EGFR parecen estar regulados por estrógenos tanto en el babuino (Schell et al., 1994) como en humanos, y la transcripción del ARNm para estas tres proteínas es inducida por estrógenos (Adachi et al., 1995). En contraste, en la yegua, solamente un estudio ha referido la presencia de un factor de crecimiento en el oviducto (Eriksen et al., 1994). La presencia de factores de crecimiento y de sus receptores en el oviducto y las primeras etapas del desarrollo del embrión sugiere la participación de mecanismos autocrinos y paracrinos en el proceso de fecundación y desarrollo del embrión (Aguilar y Reyley, 2005).

**Compuestos energéticos** como glucosa, piruvato y lactato se han encontrado en el FO en todas las especies estudiadas (Nichol et al., 1992). El objetivo de estos metabolitos en el oviducto es nutrir al ovocito, espermatozoide y embrión en sus primeras etapas del desarrollo mientras son transportados por el oviducto (Leese y Gray, 1985). Los principales sustratos energéticos en el FO son la **glucosa** (Brewis et al., 1992) y el **piruvato** derivado de la sangre, aunque la **sacarosa** y el **lactato** también están presentes. En el FO de coneja, el 25% del lactato proviene de la sangre y el 75% restante es producido por las células epiteliales a partir de la glucosa procedente del torrente sanguíneo. De la misma manera, el piruvato puede ser sintetizado por el epitelio oviductal porcino a partir de glucosa o lactato (Nichol et al., 1992).

El piruvato, lactato, glucosa y sacarosa se transportan al lumen del oviducto de coneja en diferentes cantidades (Leese y Gray, 1985). La glucosa es transportada mediante difusión facilitada a través del epitelio oviductal (Leese y Jefries, 1977) y los iones Cl<sup>-</sup> están involucrados como mediadores en la secreción del FO (Dickens y Leese, 1994). Los niveles de glucosa, piruvato y lactato son 1'8 veces más altos en la ampolla que en el istmo de coneja debido a la mayor área de superficie de la ampolla (Leese, 1983). La composición del FOP es ligeramente diferente en todos los segmentos del oviducto (Nichol et al., 1992). Los ovocitos ovulados y el embrión temprano pasan la mayor parte de su permanencia en el oviducto en el sitio de fecundación, la región ampular-ístmica (Nichol et al., 1992). En consecuencia, una gran producción de glucosa en la ampolla es necesaria para nutrir al embrión hasta su entrada al útero.

Los niveles de lactato y glucosa en el FO humano también varían dependiendo del momento del ciclo estral (Gardner et al., 1996) y en porcino los niveles de glucosa en el FOP disminuyen dramáticamente después de la ovulación (Nichol et al., 1992, 1998). Además, la presencia de embriones no afecta a las concentraciones de glucosa, piruvato y lactato en los fluidos de la ampolla, la unión ampular-ístmica de cerdas ovariectomizadas unilateralmente. Como resultado, los niveles de estos sustratos energéticos en el FOP parecen estar regulados por mecanismos sistémicos (Nichol et al., 1998).

En la coneja, similarmente a lo observado en el cerda, se presenta una disminución en la concentración de glucosa en el FO tres días después del apareamiento, lo que coincide con la entrada del embrión al útero, momento en el que la presencia de glucosa en el oviducto ya no es necesaria (Edwards y Leese, 1993).

Un total de 20 **aminoácidos** libres han sido identificados en el FOB (Stanke et al., 1974), aunque un estudio posterior mostró que 25 aminoácidos están presentes en el FO de vacas, ovejas, cerdas, conejas y ratonas (Guérin et al., 1995a). En el FO de la

yegua sólo se han detectado 17 aminoácidos y sus concentraciones son mayores que en el plasma sanguíneo o en el fluido folicular (Engle et al., 1984). De todos los aminoácidos estudiados, la glicina es el que alcanza mayores concentraciones en las especies examinadas, aunque los niveles de aminoácidos libres varían en las diferentes especies y durante las diferentes etapas del ciclo estral (Menezo y Laviolette, 1971; Engle et al., 1984; Guérin et al., 1995a; Moses et al., 1997). Un estudio realizado por Nancarrow et al. (1992) mostró que la mayoría de los aminoácidos (metionina, leucina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, glicina, alanina, taurina, tirosina) presentes en el FO de la oveja, están en concentraciones más altas que en el plasma; entretanto treonina, serina y ornitina se presentan en menor concentración. En estudios *in vivo* con conejos anestesiados, Leese et al. (1979) hallaron que 23 aminoácidos incrementan sus concentraciones durante el tiempo que el fluido está recirculando por el oviducto hasta que alcanza un promedio del 27% de la concentración del plasma, con la glicina y la alanina presentes en grandes cantidades. Además, seis aminoácidos neutros aumentan sus concentraciones por encima de las del plasma después de la ovulación.

Los aminoácidos libres que se encuentran en el oviducto parecen ser importantes en la interacción entre gametos y para el desarrollo del embrión. El medio de cultivo SOF (Synthetic Oviductal Fluid; fluido oviductal sintético) suplementado con aminoácidos a las concentraciones del FO *in vivo* permite el desarrollo de un alto porcentaje de blastocistos ovinos comparado con el SOF suplementado con 2% de plasma humano o con albúmina sérica bovina (Walker et al., 1996). La concentración total de aminoácidos encontrados en el plasma humano y en el fluido folicular es de un tercio a un medio menor a las concentraciones presentes en los medios convencionales usados para fecundación *in vitro*. La utilización de un medio modificado que contiene aminoácidos a las concentraciones halladas en el fluido folicular humano, es más efectiva para el cultivo de embriones de ratón que otros medios comerciales (Nakazawa et al., 1997). Otro aminoácido, la hipotaurina, es conocido por tener efectos de protección contra el daño celular causado por peroxidación (Aruoma et al., 1988; Green et al., 1991; Baker et al., 1996). Además, la taurina y la hipotaurina, que parecen ser compuestos importantes para la viabilidad del espermatozoide, la capacitación, la fecundación y el desarrollo del embrión, están presentes tanto en el espermatozoide como en las secreciones genitales (Guérin y Menezo, 1995). Estos aminoácidos son secretados por los cultivos de células epiteliales bovinas, porcinas, caprinas y cunicolas (Guérin y Menezo, 1995). La enzima cisteín sulfonato descarboxilasa, identificada en cultivos bovinos y caprinos, parece ser la responsable de la producción de cisteína mediante la vía metabólica del ácido sulfónico (Guérin et al., 1995b).

Overstreet y Cooper (1975) fueron los primeros en observar que los espermatozoides

de conejo recogidos del istmo de la coneja antes de la ovulación eran inmóviles o ligeramente móviles. Esta observación es interpretada como una inhibición transitoria o una suspensión del movimiento del flagelo del espermatozoide, porque la motilidad puede ser restaurada mediante la dilución de los espermatozoides inmóviles con un medio o con FO de la ampolla (Overstreet et al., 1980). Durante el almacenamiento del espermatozoide en la parte caudal del epidídimo, una secreción proteica que incrementa la viscosidad del fluido del epidídimo inhibe el movimiento flagelar del espermatozoide. De la misma manera, **secreciones mucosas** han sido descritas en el FO de vacas (McDaniel et al., 1968), cerdas (Hunter, 1995), conejas (Jansen y Bajpai, 1982) y mujeres (Jansen, 1978). Estas secreciones podrían suprimir la motilidad del espermatozoide de una manera análoga a las secreciones del epidídimo. Suárez et al. (1990) y Raychoudhury y Suárez (1991), respectivamente, observaron espermatozoides atrapados en secreciones producidas *in vitro* por explantes de oviductos bovinos y porcinos. En estos estudios la motilidad de los espermatozoides atrapados en el mucus no fue completamente caracterizada. Sin embargo, en microfotografías de microscopio confocal, el mucus oviductal se puede ver distribuido en la cabeza del espermatozoide formando gránulos o esferas relativamente grandes (Hunter et al., 1991). Igualmente, Suárez et al. (1998) observaron, en cortes histológicos de oviductos bovinos, la estrecha luz del oviducto completamente llena con secreciones mucosas. De forma semejante, el FOP del estadio preovulatorio contiene abundantes glucosaminoglicanos que llenan el lumen del reducido segmento donde se encuentra el reservorio de espermatozoides (Rodríguez-Martínez et al., 2001). El hialuronato es uno de los mucopolisacáridos producidos por el epitelio del istmo que alcanza la concentración máxima en el FOP durante el estro (Rodríguez-Martínez et al., 2001). Esta observación en combinación con la habilidad del hialuronato para modular la capacitación espermática *in vitro* (Suzuki et al., 2000, 2002), ha conducido a la hipótesis de que los mucopolisacáridos podrían actuar en el transporte del espermatozoide en el oviducto (Rodríguez-Martínez et al., 2001). Por lo tanto, es probable que la estrechez del istmo en combinación con las secreciones mucosas durante la etapa preovulatoria pueda impedir o retardar el tránsito del espermatozoide, contribuyendo a la formación del reservorio de espermatozoides (Suárez et al., 1997). Además, hay que tener en cuenta que en la composición del FO hay enzimas, como las glicosidasas, que se encuentran presentes en el istmo, podrían modificar la parte glucídica de los glucosaminoglicanos y tornar el medio menos denso permitiendo así la liberación de los espermatozoides para dirigirse al sitio de fecundación en la región ampular-istmica.

#### 2.3.2.2.1. Enzimas presentes en el fluido oviductal.

Estudios realizados en el FO de diferentes especies han identificado varias enzimas como fosfolipasa C (Grippio et al., 1994), catalasa (Lapointe y Sirard, 1998), fosfatasa

alcalina, (Alamanni, 1956), amilasa (Hochberg, 1974), lactato deshidrogenasa (Lippes et al., 1972), diesterasas y lisozima (White et al., 1963, 1964), glicosidasas como  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa (Roberts et al., 1975), proteasas (Díaz et al., 2000) e inhibidores de proteasas (Buhi et al., 1997). Varias de estas enzimas presentan en el FO niveles más bajos que en el torrente sanguíneo (Hunter, 1988). Algunas participan en la regulación de la composición de las secreciones del oviducto, pH (anhidrasa carbónica) y contenido de lactato y piruvato (enzimas glicolíticas). Algunas de ellas también están involucradas en el proceso de capacitación (fosfolipasa C, catalasa, esterasas y proteasas; Menezo y Guerin, 1997).

A continuación describiremos algunas de las funciones de las enzimas encontradas en el FO, dejando para un apartado específico a las glicosidasas, por ser el objeto de estudio del presente trabajo.

La enzima **fosfolipasa C**, actúa sobre los fosfolípidos hidrolizando el enlace diacilglicerol del grupo fosfocolina. Un estudio realizado por Grippo et al. (1994) mostró que esta enzima tiene mayor actividad en el FOB del istmo que en el de la ampolla y, además, que la enzima presenta menor actividad en el FOB obtenido durante la fase folicular tardía, es decir, inmediatamente antes de la ovulación.

**Catalasa** activa la descomposición del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  evitando la peroxidación lipídica y la pérdida de viabilidad espermática (Lapointe y Sirard, 1998).

**Fosfatasa alcalina** del FO ha sido implicada en la hidrólisis de los grupos fosfatos de las proteínas y también en el paso de metabolitos a través de las membranas (Alamanni, 1956).

La enzima **amilasa**, por su parte, hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 presentes en los polisacáridos como el almidón o el glucógeno (Hochberg, 1974).

La enzima **lactato deshidrogenasa** (Lippes et al., 1972), participa en el metabolismo energético anaerobio, reduciendo el piruvato procedente de la glicólisis para regenerar el  $NAD^+$ .

**Fosfodiesterasa** cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster y su acción regula la concentración de adenosín monofosfato y de guanosín monofosfato cíclicos (White et al., 1963, 1964) y la enzima **lisozima** (muramidasa) tiene función bactericida.

Entretanto, las enzimas **proteasas** catalizan la hidrólisis de las proteínas. La actividad proteolítica de estas enzimas en los oviductos de hámster superovuladas es más alta que en las hembras control, lo cual indica que la síntesis y la secreción de estas enzimas está bajo el control de las gonadotropinas (Díaz et al., 2000).

Del mismo modo, entre los inhibidores de proteasas se han descrito el **TIMP-1** (inhibidor de tejido de metaloproteinasas-1), **gelatinasas**, **colagenasas**, **estromelisin** y **PAI-1**, (inhibidor del activador de plasminógeno). Este conjunto de enzimas protegen la degradación de la ZP y mantienen la integridad del embrión, además de regular la síntesis de la matriz extracelular (Kouba et al., 2000).

#### 2.3.2.2.1.1. Glicosidasas en el fluido oviductal.

Las glicosidasas junto con otras enzimas hidrolíticas como las proteasas, fosfatasa, lipasa y sulfatasa clásicamente se encuentran dentro de los lisosomas que son organelas involucradas en los procesos de digestión intracelular y mecanismos de defensa (Tulsiani et al., 1998). Estas enzimas son glicoproteínas, que poseen un 10% de carbohidratos del total de su peso molecular (Tulsiani et al., 1998), y actúan dentro de los lisosomas a un pH ácido por lo que, generalmente, se les conoce con el nombre de hidrolasas ácidas (de Duve, 1963). Como su nombre indica, las enzimas glicosidasas catalizan reacciones de hidrólisis en las que se rompen enlaces de las cadenas de azúcares que componen las glicoproteínas y los glicolípidos (Seaman y Jackson 1971; Jackson y Seaman 1972; Sharon, 1974; Tulsiani et al., 1998), con liberación de monosacáridos u oligosacáridos de menor peso molecular que el sustrato original. Estas hidrolasas están ampliamente clasificadas como exoglicosidasas y endoglicosidasas. Las primeras actúan sobre los enlaces glicosídicos del extremo no reductor de las cadenas de azúcares y, las segundas, operan sobre los enlaces glicosídicos que se hallan en el interior de la cadena de sacáridos (Flowers y Sharon, 1979; Tulsiani et al., 1998; Tulsiani, 2006).

Además de encontrarse en los lisosomas, las glicosidasas se hallan en fluidos extracelulares como la sangre (Tulsiani y Touster, 1981), el fluido luminal epididimario (Skudlarek et al., 1993), membranas de espermatozoides (Jauhiainen y Vanha-Perttula, 1986, Tulsiani et al., 1989; Cornwall et al., 1991) y los fluidos del tracto reproductor femenino (Tulsiani et al., 1996). Sin embargo, el papel potencial de las glicosidasas cuando se encuentran presentes en forma soluble en fluidos con un ambiente de pH neutro no ha sido aún dilucidado (Tulsiani, 2006).

Aunque estas enzimas han sido extensamente estudiadas en los tejidos de la mayoría de las especies domésticas, los estudios sobre glicosidasas presentes en el FOB han sido escasos y obsoletos, e inexistentes para el FOP. En bóvidos y óvidos Roberts et al. (1975, 1976) estudiaron los niveles de actividad de  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa y  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en el FOB en diferentes etapas del ciclo estral. Mientras que durante el estro (fase folicular) los niveles de estas dos enzimas son similares a los niveles detectados en el suero ( $1\mu\text{g}$ -sustrato/hr/mg proteína), en diestro (fase luteal) las actividades de ambas enzimas son más elevadas ( $\sim 24$  y  $\sim 4\mu\text{g}$  de

sustrato/24hr/mg proteína, respectivamente (Roberts et al., 1975). En la oveja, al igual que en la vaca, durante el estro los niveles de  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en el FO son similares a los detectados en el plasma sanguíneo. Durante el diestro y la preñez la actividad de estas dos enzimas aumenta 4 veces los niveles de actividad detectados en el suero (Roberts et al., 1976). Es posible que los cambios en la actividad de las glicosidasas tengan relación con los lisosomas, dado que hay un incremento de los lisosomas durante el estro y el metaestro (Pizarro et al., 1984). El incremento de la actividad enzimática puede estar relacionada con la secreción y degradación de las glicoproteínas del oviducto durante el ciclo estral. Asimismo, en primates, Arias et al. (1995) encontraron  $\beta$ -hexosaminidasa correlacionada con la presencia de glicoproteínas oviductales.

En otro estudio, Tulsiani et al. (1996) descubrieron que en el oviducto de hámster los niveles de 5 glicosidasas ( $\alpha$ -D-manosidasa,  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa y  $\beta$ -D-glucosaminidasa) no variaron a lo largo del ciclo estral.

Las glicosidasas presentes en el FO podrían tener diferentes funciones dependiendo de la región donde se encuentren. Si se hallan presentes en la ampolla después de la ovulación podrían tener mayor actividad modificando las glicoproteínas del espermatozoide y de la ZP del ovocito. Por el contrario, si están presentes en el istmo preovulatorio su papel consistiría en la modificación de las glicoproteínas de las células epiteliales, pero si su ubicación en esta misma región es postovulatoria podrían también actuar en la modificación de las glicoproteínas de las CEO para permitir el paso del embrión en desarrollo al útero.

En las tablas 7 y 8 se describe la presencia de algunas **glicosidasas** en el FO de diferentes mamíferos y aves.

Tabla 7. Enzimas glicolíticas en fluido oviductal de mamíferos.

Espécimen	Enzima	Referencia
Vaca	$\beta$ -D-N-acetil-glucosaminidasa $\beta$ -D-N-acetil-galactosaminidasa	Roberts et al., 1975
Oveja	$\beta$ -D-N-acetil-glucosaminidasa $\beta$ -D-N-acetil-galactosaminidasa	Roberts et al., 1976
Hámster	$\alpha$ -D-manosidasa, $\beta$ -D-galactosidasa, $\beta$ -D-glucuronidasa, $\alpha$ -L-fucosidasa, $\beta$ -D-N-acetil-glucosaminidasa	Tulsiani et al., 1996

Del mismo modo, en 1976, Tarentino y Maley purificaron  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en oviducto de gallina y describieron que esta enzima hidroliza las glicoproteínas que

tienen un residuo de N-acetil-glucosamina en el extremo no reductor de la cadena. Igualmente, en esta misma especie, Droba et al., (2005) encontraron que las actividades  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\beta$ -D-manosidasa halladas en la región del *magnum* fueron similares a las obtenidas para todo el oviducto por Sukeno et al. (1972). Además, Hamagashira et al. (1996) purificaron la enzima  $\alpha$ -1,2-manosidasa del oviducto de gallina, que podría participar en el catabolismo de las glicoproteínas. Su mayor actividad la desplegó a pH 6'5.

De la misma manera, utilizando pruebas histoquímicas y bioquímicas se estudió en el oviducto de codorniz y de aves de corral la actividad de algunas glicosidasas. En la codorniz,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa tiene mayor actividad en el *mágnium*, mientras que la  $\beta$ -D-glucuronidasa expresa distintas actividades en la superficie de todo el epitelio y en las glándulas de la región útero-vaginal. Por su parte,  $\alpha$ -D-galactosidasa y  $\alpha$ -L-fucosidasa poseen de débil a moderada actividad en la superficie del epitelio y en las glándulas del oviducto (Skoleck-Winnisch et al., 1977; Oku et al., 1991). Asimismo,  $\alpha$ -D-manosidasa ha sido purificada y caracterizada en la sección del *mágnium* y su actividad se aceleró con CO<sub>2</sub> (Oku et al., 1991). Entretanto, en aves de corral la principal fuente de la enzima  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa se localizó en el istmo (Solomon, 1979).

Tabla 8. Enzimas glicolíticas en fluido oviductal de aves.

Espécimen	Enzima	Referencia
Gallina	$\alpha$ -D y $\beta$ -D-manosidasa	Sukeno et al., 1972
	$\beta$ -N-acetil-hexosamidasa y $\beta$ -galactosidasa	Skolek et al., 1976
	$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa	Tarentino y Maley, 1976
	$\alpha$ -1,2-manosidasa	Hamagashira et al., 1996
	$\beta$ -N-acetil-hexosamidasa, $\alpha$ -D- y $\beta$ -D-galactosidasa, $\alpha$ -D y $\beta$ -D-manosidasa, $\alpha$ -D-glucosidasa y $\alpha$ -L-fucosidasa	Droba et al., 2005
Codorniz	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa, $\beta$ -galactosidasa, $\beta$ -D-glucuronidasa, $\alpha$ -galactosidasa, $\alpha$ -fucosidasa, $\alpha$ -D-manosidasa	Skoleck-Winnisch et al., 1977
Aves de corral	$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa	Solomon, 1979.

A continuación, se describen las principales características de las 7 glicosidasas objeto de este estudio.

### 1. $\alpha$ -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51).

Los sinónimos de esta enzima son  $\alpha$ -L-fucósido fucosidolasa y  $\alpha$ -fucosidasa. Su peso molecular es de 210-220 kDa.

Está involucrada en la degradación de un diverso grupo de compuestos fucoglicoconjugados. La enzima  $\alpha$ -L-fucosidasa es soluble, se encuentra en el lisosoma y exhibe actividad enzimática ácida. Además, tiene propiedades cinéticas similares con sustratos sintéticos (paranitrofenil-fucósido y 4-metilumbeliferil-fucósido) (Johnson y Alhadeff, 1991).

Varios estudios han documentado la presencia de  $\alpha$ -L-fucosidasa en las membranas de espermatozoides de **toro** (Jauhiainen y Vaha-Pertulla, 1986), **ratas** (Avilés et al., 1996), **humanos** (Alhadeff et al., 1999) y **cerdo** (Song et al., 2000), en donde ha sido encontrada principalmente en la matriz acrosomal y en la membrana externa del acrosoma presentando su máxima actividad enzimática a pH ácido (4-5) (Song et al., 2000). Esta enzima, en la rata, exhibe alta actividad en los espermatozoides intactos a pH neutro. Su inusual ubicación y las propiedades cinéticas sugieren que tiene un papel en la interacción espermatozoide-ovocito en el tracto reproductor de la rata (Avilés et al., 1996) y quizá en la mujer (Alhadeff et al., 1999). En el útero de la rata la actividad cambia cíclicamente durante el ciclo estral, presentando los mayores niveles en el estro y el metaestro y, después, declina a medida que el ciclo progresa (Pizarro et al., 1984). Estudios comparativos de  $\alpha$ -L-fucosidasa del semen y de los espermatozoides humanos indican que la presencia de  $\alpha$ -L-fucosidasa en el espermatozoide humano tiene diferentes propiedades a la del fluido seminal humano, aunque su función aún no se conoce (Alhadeff et al., 1999).

Igualmente, esta exoglicosidasa ha sido encontrada ampliamente distribuida en otros tejidos de rata y ratón (hígado, bazo, riñón, intestino, prepucio, testículos, vesícula seminal, útero y vagina) y, particularmente, presenta una gran actividad en el epidídimo de estas dos especies (Levy y McAllan, 1961). Su actividad es baja en fluido vaginal humano y presenta actividad en tejidos de especies porcina y bovina (hígado, riñón, testículos, ovario y útero) siendo su mayor actividad en el epidídimo (Levy y McAllan, 1961).

La ausencia de esta enzima causa acumulación de fucosa en los tejidos, originando deterioro neurológico y retardo en el crecimiento (Smith et al., 1977). Además,  $\alpha$ -L-

fucosidasa puede servir para determinar el cáncer colorrectal humano, ya que su actividad es significativamente menor en estos pacientes.

## 2. $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa (EC 3.2.1.52).

Los sinónimos de esta enzima son  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa; hexosaminidasa;  $\beta$ -acetil-aminodeoxihexosidasa; N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidasa; N-acetil- $\beta$ -hexosaminidasa;  $\beta$ -hexosaminidasa;  $\beta$ -acetil-hexosaminidasa;  $\beta$ -D-N-acetil-hexosaminidasa;  $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidasa; hexosaminidasa A; N-acetil-hexosaminidasa y  $\beta$ -D-hexosaminidasa.

$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa exhibe gran actividad en epidídimo de rata (290920 $\mu$ g de sustrato/g de tejido/1hr) y ratón (207920 $\mu$ g de sustrato/g de tejido/1hr; Conchie et al., 1959) y moderada actividad en el útero de estas dos especies (15530 y 31620 $\mu$ g de sustrato/g de tejido/1hr, respectivamente). En el ratón, esta enzima se ha encontrado en los acrosomas de los espermatozoides y es liberada durante la reacción acrosómica facilitando la penetración espermática a través de la zona (Miller et al., 1993b). La participación de  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en la interacción espermatozoide-ovocito ha sido propuesta en muchas especies, aunque no está claro en qué etapa. Ha sido relacionada con la dispersión del *cumulus*, la unión y penetración de la zona y el bloqueo de la polispermia (Farooqui y Srivastava, 1980; Lambert, 1989; Godknecht y Honegger, 1991, 1995; Miller et al., 1993a, b; Prody et al., 1985; Martínez et al., 2000; Miranda et al., 2000; Perotti et al., 2001).

Igualmente, en la especie murina, esta enzima se halla en los gránulos corticales de los ovocitos y es liberada tras la fecundación inactivando la unión de la enzima galactosiltransferasa e impidiendo así la unión de los espermatozoides a la zona y bloqueando la polispermia (Miller et al., 1993a). Su actividad en los órganos sexuales, y en menor grado en otros tejidos, está bajo control endocrino (Conchie y Finley, 1959).

En el espermatozoide humano juega un importante papel en la fecundación (Brandelli et al., 1994; Miranda et al., 2000) y se encuentra en la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo (Takada et al., 1994; Song et al., 2000), toro (Khar y Anand, 1977a), carnero (Allison y Hartree, 1970), rata (Majumder y Turkington, 1974), búfalo y macho cabrío (Anand et al., 1977), ratón (Miller et al., 1993b), y hámster, donde participa en la unión primaria del espermatozoide a la zona pelúcida (Zita et al., 2006). Además, en el útero de la rata tiene máxima actividad a pH 4'4-4'6 (Pizarro y Martínez, 1984) y su nivel cambia cíclicamente durante el ciclo estral, presentando los mayores niveles en el estro y el metaestro para después disminuir a medida que el ciclo progresa. Por su parte, Tsiligianni et al. (2003) observaron que esta enzima es

particularmente activa en el fluido uterino de ovejas. Similares resultados fueron encontrados en yeguas (Reilas et al., 2000). Además, en bovinos se ha descrito en el fluido uterino donde su actividad es significativamente más alta cuando hay presencia de blastocistos que cuando hay mórulas (Tsiligianni et al., 2005). Por otra parte, Tsiligianni et al. (2006) observaron que los embriones bovinos viables liberan esta enzima durante su desarrollo, mientras que los embriones degenerados liberan menos enzima. Además, estos mismos autores encontraron que la secreción de  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa está relacionada con la mórula tardía. También, se halla presente en otros tejidos bovinos como glándula mamaria (Kitchen y Maters, 1985), bazo (Verpoorte, 1972) y cerebro de ternera (Frohwein y Gatts, 1967). Además, se ha descrito en el plasma seminal del verraco (Daron y Aull, 1985), hombre (Kapur y Gupta, 1985, 1986) y toro (Khar y Anand, 1977b). Un marcado incremento en la actividad de esta enzima se presenta en la leche de las vacas con mastitis (Kitchen y Masters, 1985).

En humanos,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa ha sido estudiada en varios tejidos, incluyendo bazo, hígado, placenta (Kitchen y Masters, 1985) y riñón (Marinkovic y Marinkovic, 1977). Igualmente ha sido detectada en el riñón de caballo (Seyama y Yamakawa, 1974).

Entre otras acciones,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa hidroliza los enlaces de los azúcares que forman parte de los gangliósidos, que son compuestos que se encuentran en el sistema nervioso. Actúa en forma conjunta con  $\beta$ -D-galactosidasa, que inicialmente rompe los enlaces de la galactosa terminal del gangliósido GM1, produciendo el gangliósido GM2, que es el sustrato sobre el cual trabaja la hexosaminidasa. Su deficiencia produce la GM2 gangliosidosis (Suzuki, 1993).

### **3. $\beta$ -D-galactosidasa (EC 3.2.1.23).**

Los sinónimos de esta enzima son lactasa;  $\beta$ -D-galactósido-galactohidrolasa;  $\beta$ -D-galactopiranosidasa;  $\beta$ -galactosidasa;  $\beta$ -lactosidasa; trilactasa y  $\beta$ -D-galactanasa. Su peso molecular es de aproximadamente 540kDa.

Esta enzima se ha encontrado ampliamente distribuida en distintos tejidos de rata y ratón (hígado, bazo, riñón, intestino, prepucio, testículos, vesícula seminal, útero y vagina), y particularmente presenta gran actividad en el epidídimo de estas dos especies. Tiene alta actividad en el tumor espontáneo de la glándula mamaria en ratón. Además, posee actividad en el riñón humano (Conchie et al., 1959). Su actividad en los órganos sexuales, y en menor grado en otros tejidos, está bajo control endocrino (Conchie y Finley, 1959). En las células germinales (espermatoцитos, espermátidas redondas y elongadas) se observó que  $\beta$ -D-galactosidasa es sintetizada

en los espermatoцитos y en las espermátidas redondas de rata (Abou-Haila y Tulsiani, 2001). También posee actividad en el tejido nervioso del macaco (Robins et al., 1968), en el hígado humano (Meisler, 1975) y en el espermatozoide de conejo (Nikolajczyk y O'Rand, 1992), ratas (Majumder y Turnington, 1974; Hall y Killian, 1987; Skudlarek et al., 1993) y cerdo, principalmente en la matriz y en la membrana del acrosoma siendo su actividad enzimática máxima a pH ácido (4-5; Song et al., 2000). En el útero de rata la actividad cambia cíclicamente durante el ciclo estral, presentando los mayores niveles de actividad a pH 4'4-4'6 (Pizarro y de Martínez, 1984) en el estro y el metaestro declinando la actividad a medida que el ciclo progresa.

En los espermatozoides es posible que tenga una doble función: actuar como una lectina o como una hidrolasa durante la fecundación (Majumder y Turkington, 1974; Nikolajczyk y O' Rand, 1992).

La deficiencia en esta enzima produce  $\beta$ -galactosidosis humana y causa enfermedades neurodegenerativas en la infancia (GM1 gangliosidosis), ataxia del cerebelo o neuropatía periférica en adultos (GM2 gangliosidosis; Suzuki, 1993).

#### **4. $\alpha$ -D-galactosidasa (EC 3.2.1.22).**

Los sinónimos de esta enzima son melibiasa;  $\alpha$ -D-galactopiranosidasa;  $\alpha$ -D-galactosido-galactohidrolasa;  $\alpha$ -galactosidasa y  $\alpha$ -galactosidasa A. Su peso molecular es de aproximadamente 80kDa.

$\alpha$ -D-galactosidasa presenta una moderada actividad en el tumor espontáneo de la glándula mamaria en ratón y en riñón humano (Conchie et al., 1959), hígado, músculo esquelético y corazón (Hers, 1963). Presenta actividad en bazo (Fujimori et al., 1968) e hígado bovinos (Bruni et al., 1969) y de rata (Jeffrey et al., 1970). En el útero de esta última especie, despliega su máxima actividad a pH 4'4-4'6 (Pizarro y Martínez, 1984), como  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa, presenta los mayores niveles de actividad en el estro y el metaestro y posteriormente declina la actividad. Igualmente, se ha identificado en el músculo de conejo (Palmer, 1971).

En humanos la deficiencia de esta enzima produce la enfermedad de Fabry, que es un trastorno que bloquea la producción de la enzima  $\alpha$ -D-galactosidasa provocando que ciertas sustancias o lípidos permanezcan dentro de las células (Clarke, 2007).

## 5. $\alpha$ -D-manosidasa (EC 3.2.1.24).

Los sinónimos de esta enzima son  $\alpha$ -D-manósido-manohidrolasa;  $\alpha$ -manosidasa; p-nitrofenil- $\alpha$ -manosidasa;  $\alpha$ -D-manopiranosidasa; 1,2- $\alpha$ -manosidasa; 1,2- $\alpha$ -D-manosidasa y exo- $\alpha$ -manosidasa. Su peso molecular es de 220kDa.

$\alpha$ -D-manosidasa ha sido encontrada ampliamente distribuida en tejidos de rata y ratón (hígado, bazo, riñón, intestino, prepucio, testículos, vesícula seminal, útero y vagina) y, al igual que en  $\beta$ -D-galactosidasa, presenta gran actividad en el epidídimo de estas dos especies (Conchie et al., 1959). Tiene alta actividad en el tumor espontáneo de la glándula mamaria en ratón (Conchie y Levvy, 1957) y su presencia es abundante en el hígado de oveja (Conchie et al., 1959). La actividad  $\alpha$ -D-manosidasa, como en sucede con  $\alpha$ -L-fucosidasa, está bajo el control endocrino (Conchie y Finley, 1959). Además, el fluido vaginal de mujeres con cáncer de cérvix presenta gran actividad  $\alpha$ -D-manosidasa (Lawson, 1960). Se ha encontrado en los espermatozoides de ratas (Tulsiani et al., 1989) y ratón (Corwall et al., 1991). En el cerdo exhibe su actividad principalmente en la matriz acrosomal y en la membrana interna del acrosoma unida al lípido fosfatidil inositol (Kuno et al., 2000; Song et al., 2000). Su máxima actividad enzimática se presenta a pH fisiológico (7-8; Song et al., 2000). También posee actividad en el útero de la rata y la actividad cambia cíclicamente durante el ciclo estral, presentando los mayores niveles en el estro y el metaestro. Además, esta glicosidasa es particularmente activa en el fluido uterino de ovejas con más de 7 cuerpos lúteos por ovario en comparación con aquellas con menos cuerpos lúteos (Tsiligianni, 2003). Al igual que ocurre con  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa, los embriones bovinos viables liberan más  $\alpha$ -D-manosidasa que los degenerados (Tsiligianni et al., 2006).

La deficiencia en la actividad de esta enzima en los lisosomas causa mannosidosis, enfermedad conocida por el almacenamiento de manosa y que conduce a un desenlace fatal en la primera década de la vida en el hombre (Ockerman, 1969; Kjellman et al., 1969) y en los bovinos a la muerte prematura (Hocking et al., 1972).

## 6. $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa (EC 3.2.1.53).

Los sinónimos de esta enzima son N-acetil- $\beta$ -galactosaminidasa; N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa;  $\beta$ -acetil-galactosaminidasa;  $\beta$ -D-N-acetil-galactosaminidasa y N-acetil-galactosaminidasa. Su peso molecular oscila entre 80 y 100kDa.

La enzima  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa tiene gran afinidad por los sustratos que contienen N-acetil-galactosamina en el extremo reductor de la cadena. Sin embargo, N-acetil-galactosamina es también escindida por la  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa, una

enzima que tiene doble actividad. Puede actuar como  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa o como  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa (Shuter et al., 1970). En general, ha sido imposible separar estas dos actividades de la enzima por los métodos convencionales de fraccionamiento proteico, como la electroforesis y la cromatografía. Este hecho, junto con la idéntica inactivación térmica, el mismo comportamiento frente a la mezcla de sustratos y la similitud en los pH óptimos de acción sugieren que las dos actividades de  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa son catalizadas por la misma enzima y en el mismo sitio activo (Cabezas, 1989).

$\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa tiene actividad en el cerebro de ternera (Frohwein y Gatts, 1967), cerdo (García-Alonso et al., 1990), rata donde actúa a un pH óptimo de 5'2 (Izumi y Suzuki, 1980) y de hombre (Shuter et al., 1970), participando en el metabolismo de los glicolípidos (gangliósidos) del cerebro en los que N-acetil-galactosamina es un componente que representa el 3% del total de lípidos cerebrales (Rouser et al., 1961). Posee actividad, igualmente; en el hígado de oveja (Donoso y Spikes, 1980) y en el plasma seminal humano (Kapur y Gupta, 1986), porcino (Daron y Aull, 1985) y bovino (Khar y Anand, 1977b), así como asociada a la membrana plasmática del espermatozoide de *Drosophila* insinuando un papel en la interacción entre los gametos (Cataneo et al., 2002). En humanos se ha detectado mayor actividad en el adenocarcinoma de colon (Gil-Martín et al., 1997).

La deficiencia en esta enzima produce una enfermedad caracterizada por una degeneración progresiva de las funciones neurológicas seguida por la muerte del individuo durante la niñez, debido a un desorden heredado en el catabolismo de los gangliósidos, conocida como enfermedad de Tay-Sachs (Srivastava y Beutler, 1973).

## **7. Neuraminidasa (EC 3.2.1.18).**

Los sinónimos de esta enzima son sialidasa; acilneuraminil hidrolasa; exo- $\alpha$ -sialidasa,  $\alpha$ -neuraminidasa y acetil-neuraminidasa. Su peso molecular es de 50-60kDa.

Neuraminidasa cataliza la hidrólisis reversible del ácido N-acetil-neuramínico a piruvato y N-acil-D-manosamina o los oligosacáridos que tienen residuos terminales de ácido siálico.

Las enzimas sialidasas en los mamíferos se clasifican de acuerdo a su localización como lisosomales (Miyagi y Tsuiki, 1984), citoplasmáticas (Miyagi y Tsuiki, 1985) y de la membrana plasmática (Miyagi et al., 1990) abreviadas Neu-1, Neu-2 y Neu-3, respectivamente. Cada una desempeña un papel específico dependiendo de la ubicación y de las propiedades catalíticas. Dentro de ellas, la enzima sialidasa de la

membrana plasmática (Neu-3) cataliza la hidrólisis de los gangliósidos que juegan un importante papel en el control de procesos biológicos dentro de los que se incluyen la regulación del crecimiento celular, las interacciones entre las superficies celulares, la diferenciación celular y las señales transmembranas (Hakomori et al., 1998).

Se ha detectado actividad neuraminidasa en el cerebro de cerdos (Tettamanti y Zambotti, 1968), terneros (Schengrund y Rosenberg, 1970), conejos (Tettamanti et al., 1970), humanos (Ohman et al., 1970) y ratas (Leibovitz y Gatt, 1968; Preti et al., 1970).

Su actividad también se ha establecido en el hígado y la glándula mamaria de rata (Tulsiani y Carubelli, 1971) y en los leucocitos humanos (Yeh et al., 1971). Así como en diferentes tejidos de pollo y su embrión (Cook y Ada, 1963) y en oviducto de sapo (Martínez y Olavaria, 1973). En general, presenta actividad en la mayoría de los tejidos como riñón, hígado, bazo, cerebro, músculo, pulmones y testículos de ratas, cobayo, toro, conejo, sapo y cerdo (Brunetti et al., 1962),

La deficiencia en esta enzima conduce a la enfermedad conocida como sialidosis que consiste en una acumulación anormal de ciertos carbohidratos complejos (mucopolisacáridos) y sustancias lipídicas (mucolípidos) en muchos tejidos corporales (Mueller et al., 1986).

#### 2.3.2.2.1.1.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad enzimática de las glicosidasas.

Se han realizado muchas investigaciones *in vitro* sobre la estabilidad de las enzimas, pero los resultados son ampliamente divergentes. Uno de los posibles factores de esta inestabilidad es la temperatura de almacenamiento.

En la actualidad, se estudia la actividad de algunas glicosidasas bajo diferentes condiciones de almacenamiento: a temperatura ambiente (25°C), en refrigeración (4°C) y en congelación (0°C/-20°C/-30°C). Es de aceptación general que las temperaturas de congelación son las más empleadas para el almacenamiento de las enzimas, aunque los informes sobre el tiempo de alteración de la actividad enzimática a estas temperaturas son muy variables y, en algunos casos, no se menciona.

La enzima  $\alpha$ -L-fucosidasa del epidídimo de rata y ratón es relativamente estable tanto a temperaturas de almacenamiento de 0°C como a temperaturas de congelación más bajas (-20°C), por períodos variables hasta de tres semanas (Levy y McAllan, 1961; Avilés et al., 1996).

El tiempo que  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del líquido amniótico permanece estable cuando se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  es largo y varía, según el autor, después de 3 meses (Den Tandt, 1972), en tanto que la estabilidad de dicha enzima, proveniente del oviducto de gallina, es mayor de año y medio (Lucas, 1979).

Existe discrepancia en cuanto a la estabilidad de  $\beta$ -D-galactosidasa a temperaturas de congelación. En el tejido nervioso de rata y mono la estabilidad de esta enzima es indefinida (Robins et al., 1968). Por el contrario, Conchie y Hay (1959), establecen varias semanas de estabilidad para  $\beta$ -D-galactosidasa en tejidos de ratón y de rata, mientras que para  $\beta$ -D-galactosidasa del acrosoma del espermatozoide de rata Abou-Haila y Tulsiani (2001) no mencionan el tiempo de almacenamiento ni la alteración de la actividad enzimática. Lo mismo sucede con algunas glicosidasas en el mucus cervical (Tsiligiannidis et al., 2003).

Igualmente, Droba et al. (2005), en la determinación de la actividad  $\alpha$ -D-galactosidasa y  $\alpha$ -D-manosidasa en el fluido oviductal de la gallina emplean la misma temperatura de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), aunque no mencionan el tiempo de la pérdida de la actividad enzimática.

Roberts et al. (1975) estudiaron la actividad de algunas enzimas en el fluido oviductal bovino estableciendo que en el caso de las glicosidasas,  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa y  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa, son estables a temperaturas de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante cuatro semanas, lo que concuerda con un trabajo posterior en la especie ovina (Roberts et al., 1976).

Finalmente, sialidasa del oviducto de sapo almacenado a temperatura de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) mantiene la actividad hasta dos semanas (Martínez y Olavaria, 1973). Entretanto, en el hígado de rata exhibe varios grados de estabilidad a temperaturas de congelación. En la mayoría de los casos, sialidasa, conserva la estabilidad durante más de dos meses, sin embargo en otros hay una pérdida significativa de actividad después de dos semanas (Brunetti et al., 1962).

Por los anteriores estudios se puede concluir que la mayoría de las glicosidasas estudiadas son relativamente estables cuando se congelan lo antes posible después de la recogida de las muestras y son almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .