

## 7. RESUMEN.

El proceso de fecundación tiene lugar en un complejo microambiente en el tracto reproductor femenino y el fluido oviductal (FO) representa el medio acuoso en el que los ovocitos, espermatozoides y embriones se encuentran suspendidos durante su tránsito por el oviducto. Los eventos iniciales de este proceso requieren la interacción entre moléculas complementarias ubicadas en diferentes superficies celulares. En este sentido, el papel desempeñado por los carbohidratos en diferentes momentos del proceso reproductivo como, por ejemplo, la interacción del espermatozoide con las células epiteliales oviductales, un prerrequisito para la penetración de la zona pelúcida del ovocito, y el reconocimiento espermatozoide-ovocito, necesario para la unión primaria, entre otros, ha sido bien documentado.

La importancia de moléculas que contienen carbohidratos, como las glicoproteínas, glicolípidos y glicosaminoglicanos presentes en las superficies celulares, le da la opción a las glicosidasas presentes en el FO de desempeñar potenciales funciones en el proceso de reproducción ya que estas enzimas catalizan la hidrólisis de las cadenas de oligosacáridos y modifican por tanto las interacciones entre células. Sin embargo, los niveles de actividad enzimática y sus fluctuaciones a lo largo del ciclo estral no han sido estudiados detalladamente en las especies bovina y porcina.

En el presente trabajo, investigamos las variaciones a lo largo del ciclo estral de la actividad enzimática de 7 exoglicosidasas ( $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-manosidasa,  $\beta$ -N-acetilgalactosaminidasa, y N-acetilneuraminidasa), de la cantidad de proteínas y del volumen de FO bovino (FOB) y porcino (FOP). Esta investigación se realizó con FO obtenido mediante aspiración de oviductos procedentes de hembras sacrificadas en matadero y clasificados de acuerdo a la morfología de los ovarios, atendiendo al tamaño de los folículos y la presencia y aspecto del cuerpo lúteo. Todo el FOB procedió de novillas púberes, mientras que en el caso de la especie porcina se obtuvo FOP tanto de animales púberes como prepúberes.

El FO obtenido se centrifugó (7.000g, 10 minutos, 4°C), descartando los pequeños sedimentos celulares y midiendo el volumen del sobrenadante para calcular con posterioridad el volumen medio de FO obtenido por oviducto en cada una de las muestras y fases del ciclo estral tanto en el FOB como en el FOP. Finalmente, las muestras se almacenaron (-80°C) para su posterior análisis por un tiempo máximo de 3 semanas. En ambas especies se obtuvieron muestras a lo largo de un año.

Para cada una de las muestras se valoró la actividad enzimática y la concentración de proteínas. La actividad enzimática se determinó mediante la fluorescencia (340nm

excitación, 450nm emisión) emitida por la liberación de derivados del sustrato 4'metilumbeliferil utilizado para cada una de las enzimas:  $\alpha$ -L-fucósido,  $\beta$ -N-acetil-glucosamínido,  $\beta$ -D-galactósido,  $\alpha$ -D-galactósido,  $\alpha$ -D-manósido,  $\beta$ -N-acetil-galactosamínido y N-acetil-neuramínico. La concentración de proteínas de las secreciones oviductales se valoró utilizando el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) mediante absorbancia (560nm) y utilizando BSA como estándar. Se definió 1 Unidad de actividad enzimática específica (U) como el cociente entre la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1pmol de sustrato (4'metilumbeliferil-glicósido)/minuto a 37°C y pH=7, y la concentración de proteínas de la muestra.

El método de recogida de FO mediante disección oviductal y la aspiración del contenido con pipeta automática permitió obtener FO en volúmenes suficientes y de calidad apta para su análisis en las especies estudiadas.

Tras analizar el FO de un total de 237 oviductos bovinos y 269 porcinos, los resultados desvelaron que de las 7 exoglicosidasas analizadas, el FOB y el FOP no presentan actividad para dos de ellas ( $\alpha$ -D-galactosidasa, neuraminidasa) en ninguna de las fases del ciclo estral estudiadas, pero sí para las otras 5 ( $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-manosidasa, y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa).

La actividad enzimática del FOB no presentó oscilaciones a lo largo de las fases folicular y luteal y mostró una actividad específica media de 39'7, 88'4 y 65'3U respectivamente para  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa y  $\beta$ -D-galactosidasa. Sin embargo, la actividad específica  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa fue mayor en la fase folicular que en la luteal (92'8 vs. 83'1U y 66'5 vs. 59'4U, respectivamente para ambas enzimas). En cuanto a la concentración de proteínas y el volumen, no se observaron diferencias en las distintas fases del ciclo estral. La concentración media de proteínas en el FOB fue de 55'0 $\mu$ g/ $\mu$ l y el volumen medio de fluido obtenido por oviducto de 36'5 $\mu$ l.

Por lo que se refiere a la especie porcina, la actividad enzimática específica osciló a lo largo del ciclo estral en las 5 glicosidasas activas. Así, la actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa y  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa fueron máximas en los momentos cercanos a la ovulación (fase folicular tardía) alcanzando valores de 72'0 y 91'9U respectivamente para cada enzima y descendiendo marcadamente después de la ovulación para mantenerse constante durante las fases luteal tardía y folicular temprana. Por su parte, la actividad específica  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\beta$ -N-acetilgalactosaminidasa alcanzó su máximo en la fase folicular temprana (70'3, 104'4 y 69'8U respectivamente para

cada enzima) y descendiendo marcadamente después de la ovulación para mantenerse constante durante la fase luteal.

La comparación entre el FOP en fase folicular temprana obtenido de cerdas púberes y prepúberes mostró mayor actividad específica  $\beta$ -D-galactosidasa en los animales púberes (70'3 vs. 57'6U respectivamente). Igualmente se observaron oscilaciones a lo largo del ciclo en la concentración de proteínas del FOP cuyos niveles máximos fueron en la fase luteal tardía (53'5 $\mu$ g/ $\mu$ l) y los mínimos en la fase folicular tardía (39'4 $\mu$ g/ $\mu$ l). El volumen de FOP obtenido por oviducto también se vio afectado por el ciclo estral recogiéndose en los momentos previos a la ovulación (fase folicular tardía) los mayores volúmenes (50'62 $\mu$ l/oviducto) que descendieron tras la ovulación y con el progreso del ciclo estral. Al calcular la concentración de proteínas totales ( $\mu$ g)/oviducto se obtuvieron valores de  $1.354'77 \pm 172'78$ ,  $2.118'57 \pm 200'65$ ,  $1.680'49 \pm 122'79$  y  $1.563'20 \pm 149'76$  respectivamente para la fase folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. La mayor concentración de proteínas/oviducto se alcanzó en los momentos previos a la ovulación, en la fase folicular tardía ( $P=0'02$ ). El aumento en la secreción de FO y la síntesis de proteínas oviductales, en los momentos cercanos a la ovulación ha sido descrito ampliamente en la literatura y sugiere el control de las hormonas esteroideas sobre estas funciones.

De los resultados obtenidos podemos deducir que tanto el FOB como el FOP muestran actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa con variaciones a lo largo del ciclo estral en algunas de ellas, lo que podría indicar un papel de estas exoglicosidasas en el proceso de reproducción, aunque dicho papel, debe ser demostrado en futuras investigaciones. Así, es posible que la  $\alpha$ -L-fucosidasa intervenga en la liberación de espermatozoides unidos a las células epiteliales del oviducto, o en la remodelación de la ZP del ovocito durante su paso por el oviducto.  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa podría participar en la dispersión de las células del cúmulus, en la penetración del espermatozoide a través de la ZP y también en la remodelación de la misma.  $\beta$ -D-galactosidasa podría liberar moléculas de  $\beta$ -galactosa de la superficie de las células oviductales, lo que tendría un papel tanto en la nutrición como en la liberación de algunas células espermáticas del reservorio oviductal.  $\alpha$ -D-manosidasa podría igualmente remodelar la superficie del ovocito y eliminar receptores espermáticos en la ZP, o podría actuar como proteína de unión a las células oviductales. Por último se sugiere un papel de la  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en la modificación de receptores de la ZP bovina y en la interacción de espermatozoides con la ZP porcina.